

## ISOLASI DAN KARAKTERISASI KAPANG ENDOFIT DARI PEGAGAN (*Centella asiatica* (L.) URBAN)

**Nur Sabrina Hasyati<sup>1</sup>, Agung Suprihadi<sup>1</sup>, Budi Raharjo<sup>1</sup>, Kristiani Dwiatmi<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro  
Kampus Tembalang, Semarang 50275 Telp/Fax. 024-7474698*

<sup>2</sup>*Balai Besar Biologi dan Genetik Kementerian Pertanian, Bogor, Jawa Barat  
Email: [hasyyati2208@gmail.com](mailto:hasyyati2208@gmail.com)*

### ABSTRAK

Kapang endofit hidup berkoloni di dalam jaringan tanaman yang sehat tanpa menimbulkan kerugian pada tanaman inangnya. Berbagai jenis tanaman dapat berpotensi sebagai sumber isolat kapang endofit. Tanaman yang menjadi inang untuk kapang endofit salah satunya adalah pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi secara molekuler kapang endofit dari tanaman pegagan. Isolasi kapang endofit melalui tahapan yaitu tahap sterilisasi permukaan dan pemurnian. Isolat kapang yang didapatkan kemudian diidentifikasi secara molekuler menggunakan region ITS. Amplifikasi DNA menggunakan primer ITS 4 dan ITS 5. Delapan pita DNA berhasil di amplifikasi dengan ukuran 600 pb. Hasil identifikasi molekuler berdasarkan analisis BLAST dan filogenetik. Hasil analisis BLAST menunjukkan kemiripan masing - masing isolat dengan spesies kapang pada *genebank* diketahui isolat BiogenCC M1 dan BiogenCC M25 dengan *Phoma* sp., isolat BiogenCC M6 dengan *Colletotrichum siamense*, isolat BiogenCC M10 merupakan *Colletotrichum destructivum*, isolat BiogenCC M15 dan BiogenCC M28 dengan *Mycoleptodiscus indiscus*, dan isolat BiogenCC M18 dan BiogenCC M19 dengan *Fusarium oxysporum*.

*Kata kunci: Kapang endofit, identifikasi molekuler, ITS, pegagan*

### ABSTRACT

Endophytic mold live in colonies in healthy plant tissues without causing damage to the host plant. Various types of plants can be potentially as a source of endophytic mold isolates. Plants that are hosts for the mold endophyte one of them is gotu kola (*Centella asiatica* (L.) Urban). This study aimed to isolate and identify the molecular of endophytic molds from gotu kola. Isolation of endophytic mold through the stages namely stage surface sterilization and purification. Mold isolates obtained later in the identification of the molecular basis using ITS region. DNA amplification using the primers ITS ITS 4 and 5. Ribbon successfully amplified DNA with a size of 600 bp. The results of molecular identification and phylogenetic analysis based BLAST. The results of the analysis of BLAST showed similarities each - each isolates with species of mold on *genebank* known isolates BiogenCC M1 and BiogenCC M25 with *Phoma* sp., Isolate BiogenCC M6 with *Colletotrichum siamense*, isolates BiogenCC M10 is *Colletotrichum destructivum*, isolates BiogenCC M15 and BiogenCC M28 with *Mycoleptodiscus indiscus*, and isolates BiogenCC BiogenCC M18 and M19 with *Fusarium oxysporum*.

*Keywords: Mold endophyte, Molecular identification, ITS, Pegagan.*

## PENDAHULUAN

Mikroorganisme endofit secara alami hidup di dalam jaringan tanaman dan mampu hidup dengan membentuk koloni tanpa membahayakan inangnya. Mikro-organisme endofit merupakan bagian dari faktor biotik dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Mikroorganisme endofit dapat berupa bakteri atau jamur, tetapi di alam jamur endofit terutama jenis kapang yang paling banyak melimpah jika dibandingkan dengan bakteri endofit. Tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa mikroorganisme endofit yang mampu menghasilkan senyawa-senyawa yang bermanfaat (Tan dan Zou, 2001 ; Stone *et al.*, 2004).

Kapang endofit mempunyai hubungan mutualisme dengan inangnya diantaranya, melindungi inang dari patogen, memiliki metabolit sekunder yang sama dengan inangnya, antibakteri dan antivirus. Kapang endofit merupakan sumber bahan organik yang kaya dengan aktivitas biologis yang menarik dan keanekaragaman yang tinggi. Kapang endofit yang berhasil diisolasi dari tanaman inangnya dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder, misalnya kapang endofit yang berhasil diisolasi dari tanaman *Taxus* yang memiliki kemampuan untuk memproduksi Taxol. Eksplorasi tentang kapang endofit dari tanaman akan bermanfaat untuk mencari jenis-jenis kapang endofit yang memiliki kemampuan spesifik dan unik. Berbagai jenis tanaman dapat berpotensi sebagai sumber isolat kapang endofit (Noverita *et al.*, 2009 ; Radji, 2005).

Tanaman yang menjadi inang untuk kapang endofit salah satunya adalah pegagan (*Centella asiatica* (L). Urban). Pegagan merupakan salah satu tanaman dari famili *Umbeliferae* yang sejak dulu telah dimanfaatkan untuk kesehatan. Kandungan bahan kimia yang terdapat di dalamnya diantaranya asiatikosida, madekosida, brahmosida, tanin, resin, pectin, gula, vitamin B, serta garam mineral. Pemanfaatan dalam bidang industri diantaranya yaitu: meningkatkan sintesis kolagen didalam kulit, sebagai tonik untuk penyembuhan luka, meningkatkan daya tahan otak dan syaraf. Pemanfaatan pegagan yang tinggi tidak sebanding jumlahnya dengan ketersediaan di alam, sehingga dimungkinkan eksplorasi sumber daya pegagan yang dapat berlebihan, selain itu belum adanya upaya budidaya dari tanaman in, sehingga upaya pengembangan tanaman ini sebagai bahan baku industri dalam jumlah besar akan mengalami

hambatan. Solusi dari masalah ini salah satunya adalah mencari mikroorganisme endofit yang memiliki senyawa-senyawa kimia yang ada didalam pegagan. Perlu adanya penelitian dan eksplorasi tentang kapang endofit yang ada di pegagan (Lailani,2013).

## BAHAN DAN METODE

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah akar, daun, bunga dan tangkai daun pegagan. Metode yang digunakan untuk isolasi kapang dari tanaman pegagan yaitu metode sterilisasi permukaan dan identifikasi kapang endofit dari pegagan menggunakan metode indentifikasi molekuler menggunakan sekuens ITS dengan Primer ITS 4 dan ITS 5. Penelitian ini di laksanakan di Laboratorium Konservasi Mikroorganisme, BB Biogen, Kementerian Pertanian, Bogor, Jawa Barat, Mulai Bulan April 2016

### Tahapan Penelitian

#### Sterilisasi alat

Alat-alat yang terbuat dari gelas direndam dan dicuci hingga bersih dengan menggunakan detergen. Cawan petri dan alat-alat gelas lainnya dibungkus dengan kertas dan disterilkan dalam autoklaf.

#### Pembuatan media

Medium PDA dibuat dengan melarutkan 39 gram PDA dengan akuades hingga volume akhir mencapai 1 liter, kemudian medium disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Medium yang telah steril disimpan pada suhu ruang hingga memadat. Pembuatan media PDB dengan cara menimbang 26,5 gram kemudian dilarutkan dengan aquades steril hingga volume akhir mencapai 1 liter, kemudian medium disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm.

#### Pengambilan sampel

Sampel tanaman diambil dari kebun BB Biogen, Bogor. Sampel kemudian di beri label dan dimasukkan ke dalam kotak es kemudian, dibawa ke laboratorium. Sterilisasi permukaan sampel dilakukan pada hari ketika sampel tiba di laboratorium.

## Isolasi Kapang Endofit Pegagan

Sampel yang diambil dari kebun kemudian dilakukan sterilisasi permukaan. Tahap sterilisasi permukaan diawali dengan memotong sampel daun, akar, tangkai daun dan bunga di dalam suatu cawan petri steril. Selanjutnya potongan dari daun, akar, tangkai daun dan bunga dimasukkan ke dalam tabung *erlenmeyer* steril dan ditambahkan 10 ml Natrium hipoklorida (NaOCl) 3%. Larutan NaOCl tersebut kemudian dibuang, setelah itu ditambahkan alkohol 98%, selanjutnya pembilasan dengan akuades steril yang diulang sebanyak 3 kali. Potongan daun, tangkai daun, akar dan bunga ditiriskan di atas kertas saring yang steril untuk menyerap sisa air yang tertinggal, kemudian daun tersebut diletakkan di atas permukaan medium PDA dalam cawan petri. Cawan petri di inkubasi pada suhu 22 °C selama 7 hari. Kontrol pada bilasan terakhir digunakan untuk membuktikan ada tidaknya kontaminan pada permukaan pegagan

## Identifikasi kapang secara molekular

### Isolasi DNA

Isolasi dilakukan pada setiap isolat kapang yang didapatkan dari hasil pemurnian, isolasi DNA dilakukan dengan metode Cenis (1992) dalam Abd-Elsalam (2013) yaitu miselium yang di inokulasikan dalam 10 ml medium PDB di dalam tabung vial, kemudian ditumbuhkan di *rotary shaker* selama 72 jam, Kemudian panen miselia dengan cara di sentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 5 menit, Supernatan dibuang kemudian diambil peletnya saja, kemudian pelet dicuci dengan 500 µl TE buffer (dengan pH 8) dan 300 µl buffer ekstraksi, kemudian ditambahkan 150 µl sodium asetat pH 5,2 kemudian setelah diinkubasi pada suhu 20°C selama 10 menit, setelah itu di setrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 5 menit kemudian diambil supernatannya sebanyak 600 µl dan dipindahkan ke dalam microtube yang berisi supernatan dengan volume yang sama, kemudian sentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 10 menit, setelah itu cuci DNA dengan 500 µl ETOH ( alkohol 70%) setelah itu keringkan DNA dan larutkan dengan buffer TE sebanyak 20 µl, kemudian disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20°C.

### Amplifikasi

DNA hasil ekstraksi selanjutnya di amplifikasi menggunakan Esco Swift MaxPro *Thermal cycler*. Gen ITS di amplifikasi menggunakan Primer ITS 5 dan ITS 4 Total volume PCR dibuat sebanyak 50

µl yang terdiri atas 2 µL primer forward; 2µL primer reverse; DNA template 4 µL; GoTaq(R) Green (Promega) sebanyak 25 µL; dan 17 µL Aquabides sebagai pelarut. PCR dijalankan pada kondisi 1 siklus denaturasi awal pada 95°C selama 5 menit, 35 siklus yang terdiri dari denaturasi 95°C selama 1 menit, annealing 57,1°C selama 1 menit, ekstensi 72°C selama 1 menit, ekstensi akhir 72°C selama 7 menit, dan suhu penyimpanan pada tahap akhir 4°C. Primer yang digunakan adalah primer universal ITS4/ITS5, ITS 4 sebagai primer *reverse* dan ITS 5 sebagai primer *forward*. primer ITS5 adalah (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') dan primer ITS4 adalah (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

Hasil amplifikasi selanjutnya dicek dengan elektroforesis. Marker 100 bp diambil sebanyak 3 µl, lalu ditambahkan loading dye 1 µl kemudian diresuspensi dan dimasukkan ke dalam sumuran pada 1,2%. gel agarose. Produk PCR dari setiap sampel diambil sebanyak 3 µl, kemudian dimasukkan ke dalam sumuran pada 1,2% gel agarose tersebut, lalu di elektroforesis selama 30 menit dengan voltase 100 volt. Gel agarose yang telah selesai selanjutnya direndam dalam larutan etidium bromida selama 15 menit, kemudian dibilas dengan aquades steril, dan divisualisasi dengan *gel doc*.

### Sekuensing

Sekuensing dilakukan untuk melihat susunan basa yang membentuk sekuens DNA. Proses sekuensing dilakukan di 1<sup>st</sup> base di Malaysia. Hasil yang diperoleh dari sekuensing DNA selanjutnya dilakukan penelusuran melalui program pelacakan *data base Basic Local Aligment Search Tool* (BLAST) pada *National Centre for Biotechnology Information, National Institute for Health, USA* sehingga kita dapat mengetahui presentase homologi isolat yang diperoleh.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Morfologi Koloni Kapang Endofit

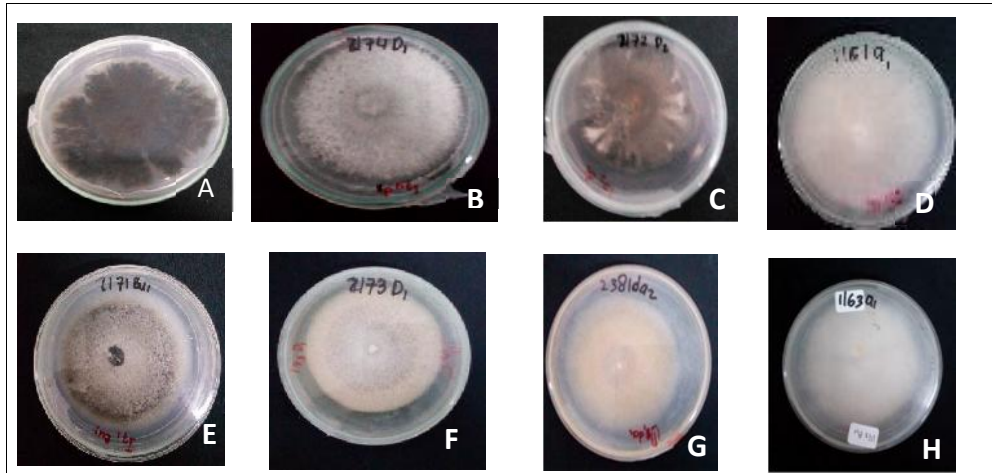
Delapan isolat kapang berhasil diisolasi dari setiap bagian akar, daun, tangkai daun tanaman pegagan. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 4.1

Delapan isolat kapang endofit yaitu empat isolat dari daun, dua isolat dari tangkai daun, satu isolat dari akar dan satu isolat dari bunga. Kapang endofit dapat tumbuh dari setiap bagian tanaman pegagan, hal ini sesuai dengan pendapat Worang (2003), bahwa kapang endofit terdapat di dalam sistem jaringan tanaman seperti daun, bunga, tangkai daun maupun akar dan dapat menginfeksi

tanaman sehat pada jaringan tertentu dan mampu menghasilkan mikotoksin, enzim, serta antibiotika yang bermanfaat bagi tanaman inang. Kapang endofit dapat diisolasi dari jaringan tanaman yang sehat. Kapang endofit dapat diisolasi dari jaringan tanaman terutama melalui perakaran, namun demikian bagian tanaman seperti bunga, ranting dan daun dapat juga digunakan sebagai jalan masuk.

Endofit di dalam tanaman akan terletak pada satu tempat atau tersebar ke seluruh tanaman. Mikroba ini dapat tinggal didalam sel, bagian antar sel atau sistem vaskular.

Delapan isolat kapang endofit berhasil di isolasi dari daun, tangkai daun, akar dan bunga, kemudian selanjutnya di amati morfologinya pada Tabel 4.1.



Gambar 4.1 Isolat-isolat kapang dari bagian akar, daun, tangkai daun dan bunga tanaman pegagan pada medium PDA umur 7 hari. Keterangan, (A) BiogenCC M1, (B) BiogenCC M6, (C) BiogenCC M10, (D) BiogenCC M18, (E) BiogenCC M25, (F) BiogenCC M15, (G) BiogenCC M28, (H) BiogenCC M19.

Tabel 4.1 Morfologi Kapang endofit dari pegagan

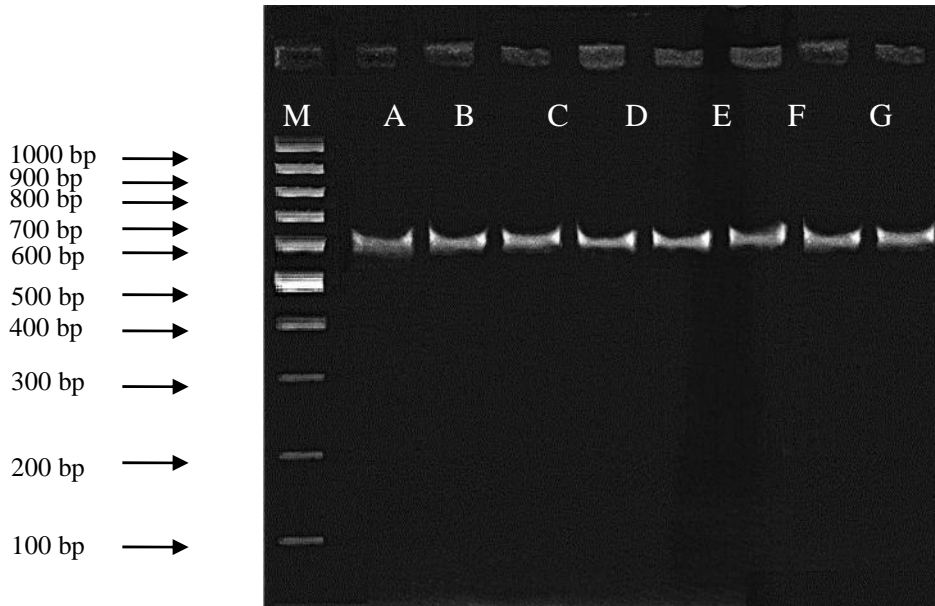
Kode isolat	Koloni pada Medium PDA			Sifat tambahan		
	Permukaan	Reverse koloni	Tekstur	Bentuk Konidia	Hifa	Growing zone
BiogenCC M1	Hitam	Hitam	Velvety	Bentuk elips	Bersepta	-
BiogenCC M6	Putih	Hitam	Velvety	Bentuk elips	Bersepta	+
BiogenCC M10	Putih-kecoklatan	Coklat-kehitaman	Cottony	Bentuk elips	Bersepta	-
BiogenCC M18	Putih	Putih-pink	Velvety	Mikro-konidia oval	Bersepta	-
BiogenCC M25	Putih	Hitam	Velvety	Tidak ditemukan	Bersepta	+
BiogenCC M15	Kuning	Kuning	Cottony	Bentuk oval	Bersepta	+
BiogenCC M28	Kuning-putih	Kuning	Cottony	Tidak ditemukan	Bersepta	+
BiogenCC M19	Putih	Putih	Velvety	Tidak ditemukan	Bersepta	-

### Isolasi DNA dan Amplifikasi Daerah ITS DNA

Isolasi DNA menggunakan metode Cenis (1992 dalam Abd-Elsalam, 2002), Delapan isolat kapang berhasil diisolasi DNA. Hasil isolasi DNA dari kapang endofit yang didapatkan memperlihatkan konsentrasi DNA yang diperoleh. Nilai konsentrasi kapang berkisar antara 104,1 – 856,2 ng/ $\mu$ l. Banyak sedikitnya DNA yang dihasilkan dipengaruhi oleh beberapa faktor pada saat ekstraksi dan kondisi sampel. Komalasari (2009) menyatakan bahwa konsentrasi hasil ekstraksi DNA dipengaruhi oleh 2 faktor yaitu kecepatan ekstraksi pada waktu ekstraksi dna komposisi penambahan lisis buffer. Berdasarkan Sambrook dan Russel (2001) Konsentrasi template minimal kapang adalah 10  $\mu$ g. Hasil ekstraksi DNA selanjutnya digunakan sebagai template pada proses amplifikasi dengan menggunakan PCR.

Keberhasilan mengisolasi DNA sebagai cetakan (*template*) untuk reaksi PCR ditunjukkan oleh hasil elektroforesis dari produk PCR daerah ITS rDNA. Hasil amplifikasi DNA daerah ITS dengan primer ITS 4 dan ITS 5 dapat dilihat pada Gambar 4.2.

Gambar 4.2 menjelaskan hasil amplifikasi DNA kapang endofit dari pegagan menghasilkan 8 pita yaitu pita spesifik berukuran  $\pm$  600 bp dan pita yang tebal delapan isolat kapang endofit. Hal tersebut menunjukkan daerah ITS dari delapan isolat berhasil diampifikasi dengan menggunakan pasangan primer universal ITS 4 dan ITS 5 dengan kondisi PCR yang tepat dan konsentrasi *template* DNA yang cukup dan suhu *annealing* telah optimal. Menurut Abliz *dkk.*, 2004 Primer ITS 4 dan ITS 5 merupakan primer universal untuk jamur yang dapat digunakan untuk mengamplifikasi jamur. Amplifikasi pada daerah ITS tersebut dilakukan sebanyak 35 siklus. Menurut Fatchiyah *dkk.*(2011), peningkatan jumlah siklus PCR di atas 35 siklus tidak memberikan efek yang positif. Ahmed (2006) menyatakan selain penggunaan primer yang tepat dan konsentrasi template yang cukup, kondisi PCR juga sangat mempengaruhi keberhasilan amplifikasi DNA. Produk hasil amplifikasi ITS tersebut selanjutnya dipurifikasi dan disekuensing untuk mengetahui urutan basa nukleotidanya.



Gambar 4.2. Visualisasi dengan marker 100 bp (*Norgen Biotech.Corp*) M (Marker), A (BiogenCC M1), B (BiogenCC M6), C ( BiogenCC M10), D (BiogenCC M15), E ( BiogenCC M18), F (BiogenCC M22), G ( BiogenCC M25), H (BiogenCC M28).

### Identifikasi Isolat-isolat kapang dari Pegagan

Identifikasi delapan isolat kapang dilakukan berdasarkan data *sequence* daerah atau *region* ITS rDNA. Berdasarkan hasil pencarian homologi

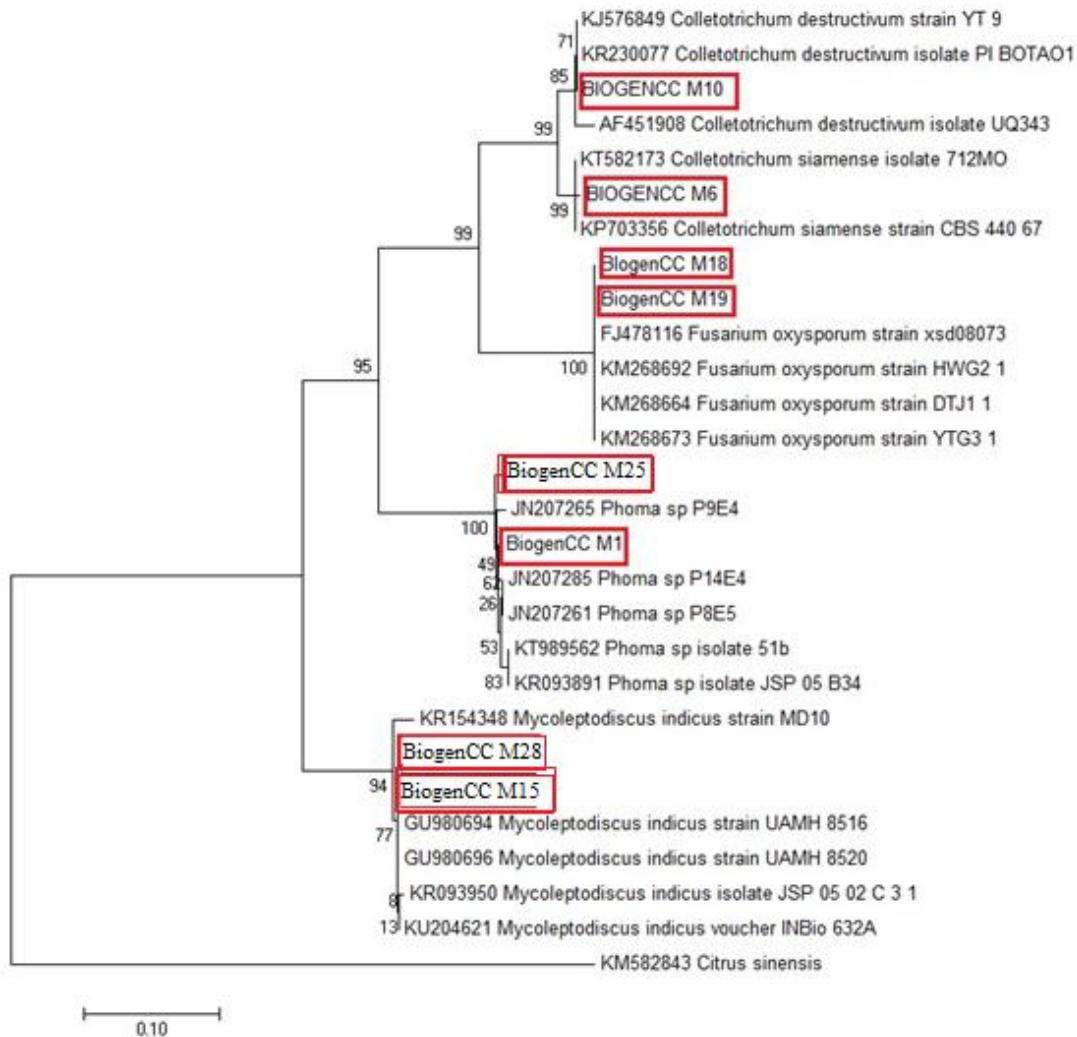
daerah ITS rDNA Hasil penelusuran BLAST Homologi diperoleh informasi kekerabatan terdekat pada kedelapan isolat. Hasil analisis BLAST isolat yang ditunjukkan pada Tabel 4.2 menunjukkan presentase homologi isolat kapang

endofit yang memperlihatkan berkisar antara 98 - 99 %. Menurut Hagström *et al.*, (2000), isolat yang

mempunyai persamaan sekuen lebih dari 97 % dapat mewakili spesies yang sama.

Tabel 4.2 Hasil Identifikasi berdasarkan tingkat Homologi delapan isolat kapang endofit dengan Analisis BLAST

Kode isolat	skore maks	% keserupaan	E. Value	No akses refrensi gen bank	Hasil Identifikasi
BiogenCC M1	889	98	0.0	JN207265.1	<i>Phoma</i> sp.
BiogenCC M6	944	98	0.0	KP145423.1	<i>Colletotrichum siamense</i>
BiogenCC M10	994	98	0.0	HQ674658.1	<i>Colletotrichum destructivum</i>
BiogenCC M15	1086	99	0.0	GU980698.1	<i>Mycoleptodiscus indicus</i>
BiogenCC M18	1041	99	0.0	KM268673.1	<i>Fusarium oxysporum</i>
BiogenCC M25	918	98	0.0	JN207265.1	<i>Phoma</i> sp.
BiogenCC M19	1002	99	0.0	JN16678.1	<i>Fusarium oxysporum</i>
BiogenCC M28	1070	99	0.0	GU980694.1	<i>Mycoleptodiscus indicus</i>



Gambar 4.3. Pohon Filogenetik pada Isolat Kapang endofit tanaman pegagan Dengan Bootstrap 1000 x ulangan A(*Mycoleptodiscus*), B (*Fusarium*), C (*Colletotrichum*), D (*Phoma*).

Gambar 4.3 menunjukkan hasil pohon filogenetik dengan *scale bar* 0,1 yang digunakan dengan *bootstrap* sebanyak 1000 kali ulangan pada Metode *Neighbor Joining* (NJ). Hasil identifikasi molekuler menunjukkan bahwa isolat BiogenCC M1 dan BiogenCC M25 yang dianalisis dengan BLAST adalah spesies *Phoma* sp. dengan presentase kemiripan 98%, dan hasil filogenetik dengan nilai *bootstrap* sebesar 49 dan 100. Hasil molekuler tersebut dilengkapi oleh deskripsi morfologi yang dapat dilihat pada Tabel 4.2, berdasarkan Tabel 4.2 menunjukkan isolat ini memiliki sebagian ciri yang sama yang dimiliki oleh spesies *Phoma* sp. Menurut Barnett and Hunter (2000 dalam Situmorang *et al.*, 2013) ciri-ciri *Phoma* sp. adalah Kapang yang habitatnya umumnya dijumpai pada tanah dan tanaman, tekstur miseliana beludru, warna koloni putih, abu-abu zaitun, kadang-kadang ditemukan berwarna merah muda, sedangkan warna sebaliknya hitam, hifanya berseptata, konidia berbentuk oval, dan klamidiospor berwarna coklat. Penelitian Rakotorina *et al.* (2008) berhasil mengidentifikasi *Phoma* sp. sebagai kapang endofit dari daun pegagan dengan frekuensi penyebarannya sebesar 1% dalam daun tersebut.

Hasil analisis BLAST isolat BiogenCC M6 diketahui memiliki kemiripan dengan *Colletotrichum siamense* dengan presentase homologi sebesar 98%. Hasil pohon filogenetik menunjukkan nilai *bootstrap* sebesar 99 berada dalam satu kelompok dengan *C. siamense* dan isolat BiogenCC M10 memiliki kemiripan dengan *C. destructivum* dengan nilai homologinya sebesar 98%, hal ini juga didukung dengan hasil filogenetik presentase nilai *bootstrap* sebesar 85 dengan *C. destructivum*.

Hasil identifikasi isolat BiogenCC M6 dan M10 ditambahkan dengan deskripsi morfologi pada Tabel 4.2. menunjukkan isolat BiogenCC M6 dan BiogenCC M10 sebagai spesies *C. siamense* dan *C. destructivum*. Menurut Barnett *et al.* (2000) genus *Colletotrichum* memiliki ciri-ciri: konidofornya transparan, hifanya berseptata, dan bercabang. Permukaan koloni berwarna putih keabu-abuan, Koloni sebaliknya berwarna coklat dan coklat hitam. Penelitian sebelumnya belum pernah ditemukan *C. siamense* dan *C. destructivum* sebagai kapang endofit pada tanaman pegagan, tetapi pada penelitian Manamgoda (2013) menemukan *C. siamense* sebagai endofit dari tanaman rumput *Pennisetum purpureum*. Penelitian

Tang *et al.* (2013) menemukan *C. destructivum* dari tanaman *Bletilla ochraceae* sebagai kapang endofit.

Hasil identifikasi molekuler isolat BiogenCC M18 dan Biogen CC M19 berdasarkan analisis BLAST menunjukkan presentase homologi sebesar 99% dengan *Fusarium oxysporum*, hal ini didukung hasil filogenetik dengan presentase nilai *bootstrap* sebesar 100, dan isolat BiogenCC M18 dan 19 berada satu *clade* dengan *F. oxysporum*. Identifikasi molekuler ini kemudian ditambahkan dengan hasil deskripsi morfologi pada Tabel 4.2 akan tetapi pada isolat BiogenCC M19 tidak terlihat spora ataupun konidiana hal ini berarti isolat ini tidak mengalami sporulasi atau disebut juga sebagai miselia sterilia, oleh karena itu identifikasi isolat BiogenCC M19 hanya menggunakan hasil dari identifikasi molekulernya saja. Hasil identifikasi berdasarkan molekuler menunjukkan isolat BiogenCC M18 dan M19 sebagai spesies *Fu. oxysporum*. Menurut Ganjar *dkk.* (2000) *F. oxysporum* memiliki ciri-ciri: Tekstur miseliana beludru, Permukaan koloninya berwarna putih, Sebaliknya koloni berwarna putih kekuningan, sporodkhokia hanya terbentuk pada beberapa strain.. Konidofor dapat bercabang dapat tidak. Mikrokonidia berseptata 0 - 2, umumnya terdapat dalam jumlah yang banyak sekali, terdiri dari aneka bentuk dan ukuran, bentuknya silindris sampai ovoid-elips. Penelitian sebelumnya tentang kapang endofit pada tanaman pegagan Ginting (2013) menemukan *Fusarium* pada daun pegagan sebagai kapang endofit.

Hasil Identifikasi isolat BiogenCC M28 dan BiogenCC M15 Berdasarkan analisis BLAST menunjukkan dengan presentase kemiripan 99% memiliki tingkat homologi dengan *Mycoleptodiscus indiscus*, hal ini juga didukung dengan hasil filogenetik menunjukkan kedua isolat ini berkerabat dekat dengan *M. indiscus* dengan presentase nilai *bootstrap* sebesar 97. Hasil identifikasi molekuler ini kemudian ditambahkan dengan hasil deskripsi pada Tabel 4.2 akan tetapi pada isolat BiogenCC M28 pengamatan mikroskopis pada perbesaran 400 x pada mikroskop tidak menemukan spora ataupun konidia, hal ini berarti isolat ini tidak mengalami sporulasi atau disebut juga sebagai miselia sterilia, oleh karena itu identifikasi isolat BiogenCC M28 hanya menggunakan hasil dari identifikasi molekulernya saja. Berdasarkan hasil identifikasi molekuler dan deskripsi morfologi yang diperoleh diketahui isolat BiogenCC M15 dan M25 sebagai spesies *M. indiscus*. Menurut Barnett (1972) genus *Mycoleptodiscus* warna koloni berwarna kuning,

kecoklatan, Sklerotianya berukuran kecil, terdapat konidia, berbentuk silinder, terdapat stroma dengan 1 lapisan sel. Penelitian Ginting (2013) menemukan *M.s indiscus* sebagai kapang endofit dari daun pegagan. Penelitian lain Rosa *et al.*(2012) menemukan *Mycoleptodiscus indiscus* sebagai kapang endofit dari daun tanaman *E. pereupera*.

Identifikasi kapang endofit dengan menggunakan identifikasi molekuler memiliki kepekaan yang tinggi, cepat, dan akurat. Identitas kapang endofit dapat diketahui hingga tingkat spesies berdasarkan pada analisis BLAST hasil peruntutan DNA. Seiring dengan perkembangan biologi molekuler, metode ini menjadi pilihan untuk mengidentifikasi, terutama bila identifikasi secara morfologi sulit untuk dilakukan.

### Kesimpulan

Kapang endofit berhasil di isolasi dari akar, tangkai daun, daun dan bunga dari tanaman pegagan. Delapan isolat didapatkan dari hasil isolasi kapang endofit, yaitu pada daun empat isolat berhasil didapatkan teridentifikasi sebagai spesies *Fusarium oxysporum*, *Colletotricum siamense*, *Colletotrichum destructivum*, *Mycoleptodiscus indiscus*, dua isolat dan pada bagian tangkai daun yaitu: *Phoma* sp dan *Mycoleptodiscus indiscus*, satu isolat pada akar yaitu *Fusarium oxysporum*, dan satu isolat dari bagian bunga yang teridentifikasi sebagai isolat *Phoma* sp.

### Saran

Perlu diuji lebih lanjut terutama identifikasi morfologi sehingga dapat dibandingkan hasil identifikasi morfologi dan molekuler, Perlu dilakukan analisis sequence daerah D1/D2 LSU daerah ITS rDNA untuk melengkapi data *sequens* dan perlu dikaji metabolit sekunder yang dihasilkan dari setiap isolat.

### Daftar Pustaka

Abd-Elsalam, Kamal., Ibrahim N. Aly., Mohmed, Abdel-Satar., Khalil, Mohmed., and Joseph A. Verreet. 2013. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *African Journal of Agriculture* 1(2): 014-016.

Abliz, P., K. Fukushima, K. Takizawa And K.Nishmura. 2004. Spesific Oligonucleotida primers for identification

of Cladiophialophora carional, a causative agent Chromoblastomycosis. *J Clin Microbiol.* 42(1).

- Ahmed,Z. Optimization of PCR conditions *in vitro* for maximum amplification of DNA from *Xanthomonas campestris* 13551. *Journal of Applied Sciences Research.* 2(3): 112-122.
- Barnett, HL., Hunter BB. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi 4 th Edition. USA. Pretice Hall Ink.
- Gandjar, I., R.A. Samson, K. van den Tweel Vermeulen., A. Oetari dan I. Santoso. 2000. Pengenalan Kapang Tropik Umum. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta.
- Ginting, Rohani Cinta. 2013. Keragaman Cendawan Endofit Asal Berbagai Jenis Tanaman Obat Potensial. *Disertasi.* Bogor, Institut Pertanian Bogor.
- Hagström, A., J. Pinhassi and U. L. Zweifel. 2000. Biogeographical Diversity Among Marine Bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.*, 21 : 231-244.
- Komalasari, K. 2009. Pengaruh Perbandingan Volume Darah dan Lisis Buffer serta Kecepatan Sentrifugasi Terhadap Kualitas DNA pada Sapi. *Skripsi.* Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Lailaini. 2013. Analisis Keragaman Protein dan Fitokimia Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Hasil Perbanyakan In Vitro. *Skripsi.* Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Radji, M. 2005. Peranan bioteknologi dan mikroba endofit dalam pengembangan obat herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 2(3): 113-126.
- Rosa, Luiz H., N. Tabanca, N. Techeon, D. E. Wedge, Zhiqiang Pan, Ulrich R.B, J.J. Bevnel, N. Agramonte, L.A. Walker, & Rita M.M. 2012. Diversity and Biological Activities of Endophytic Fungi Associated with Micropropagated Medicinal Plant *Echinacea Purpurea* (L.) Moench. *American Journal Of Plant Sciences* (3):1105-1114.
- Situmorang, E.C., Paremsewara, A., Sinthya, H.C., Mathius, N.T., dan Tony Liwang.2013. Short Communication Morphology and Histology Identification of Fungal Endophytes from oil Palm Roots in



- Ganoderma boninse Endemic Area. Journal Microbiology Indonesia. 7(4); 198-204.
- Tan, R.X. & W.X. Zou. 2001. Endophyte: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep* 18:448-459.
- Winarto, W. P., dan M. Surbakti. 2003. Khasiat dan Manfaat Pegagan, Tanaman Penambah Daya Ingat. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Worang, R. L. 2003. Fungi Endofit Sebagai Penghasil Antibiotika. Pengantar Falsafah Sains (PPS702) Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.