

# LEMBAR HASIL IDENTIFIKASI MOLEKULER FUNGI

## I. Deskripsi Sampel

No	Asal sampel	Kode/ nomor sampel	Kode sekuen	Media tumbuh
1.	Sdr. Muhammad Awaludin Universitas Padjadjaran - Bandung	<b>Curvularia</b>	C_ITS4 & C_ITS5	<i>PDA* slant</i>

**Ket.** (\*): *Potato Dextrose Agar*

## II. Proses Identifikasi

Identifikasi isolat fungi dilakukan secara molekuler berdasarkan analisis genetika secara parsial pada lokus ***Internal Transcribed Spacer (ITS) ribosomal DNA*** fungi.

Isolasi DNA diawali dengan menumbuhkan isolat fungi dalam media cair *Potato Dextrose Broth (PDB)* dan diinkubasi selama 72 jam. Biomassa berupa miselia fungi selanjutnya dipanen untuk proses ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA fungi dilakukan dengan menggunakan reagen **nucleon PHYTOpure** (Amersham LIFE SCIENCE).

Amplifikasi PCR pada ITS menggunakan **Primer ITS 4: 5`-- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3`** dan **Primer ITS 5: 5`--GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G –3`** (White *et al.*, 1990; O'Donnell, 1993).

Purifikasi *PCR product* dilakukan dengan *PEG precipitation method* (Hiraishi *et al.*, 1995) dan dilanjutkan dengan siklus sekuensing. Hasil siklus sekuensing dipurifikasi kembali dengan *Ethanol purification method*. Analisis pembacaan urutan basa nitrogen menggunakan *automated DNA sequencer* (ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer) (Applied Biosystems).

Data mentah hasil sekuensing selanjutnya di *trimming* dan di *assembling* menggunakan program BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Data sekuens yang telah di *assembling* selanjutnya di BLAST dengan data genom yang telah didaftarkan di DDBJ/ DNA Data Bank of Japan (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/>) atau NCBI/ National Center for Biotechnology Information( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) guna menentukan takson/ spesies yang memiliki *homology/ similarity* terbesar dan terdekat secara molekuler.

### III. Hasil Identifikasi Molekuler

#### A. Sekuen ITS rDNA Isolat

##### >C ITS4

TCAACCTTAGAAATGGGGTTGTTTTACGGCGTAGCCTCCCGAACACCCTTTAGCGAATAGTTTCCACAAC  
GCTTAGGGGACAGAAGACCCAGCCGGTCGATTTGAGGCACGCGGCGGACCGCGATGCCCAATACCAAG  
CGAGGCTTGAGTGGTAAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGC  
GTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTT

##### >C ITS5

TTACAGTGACCCCGGTCTAACCACCGGGATGTTTCATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGG  
CGACCCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACCTTTGCAGTCTGAGTA  
AACTTAATTAATAAATTAACACTTTTAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA  
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA

##### >Contig-C

TCAACCTTAGAAATGGGGTTGTTTTACGGCGTAGCCTCCCGAACACCCTTTAGCGAATAGTTTCCACAAC  
GCTTAGGGGACAGAAGACCCAGCCGGTCGATTTGAGGCACGCGGCGGACCGCGATGCCCAATACCAAG  
CGAGGCTTGAGTGGTAAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGC  
GTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCG  
ATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAGTTTTAATTTATTAATTAAGTTTACTCAGACTGCAAAGTTAC  
GCAAGAGTTTGAAGTGTCCACCCGGAGCCCCCGCCCGAAGGCAGGGTCGCCCCGGAGGCAACAGAGT  
CGGACAACAAAGGGTTATGAACATCCCGGTGGTTAGACCGGGGTCACGTGTA

#### B. Takson Terdekat Hasil BLAST

Kode/ Nomor Sampel	Kode Sekuen	Takson Fungi Terdekat Hasil Homologi BLAST di DDBJ/NCBI [ <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> ]
		<i>ITS1, 5.8S, ITS2 of rDNA</i>
Curvularia	>Contig-C	<b><i>Cladosporium cladosporioides</i> strain DTO 071-G1</b> (Accession no: <b>KP701872</b> ) [ Homologi: <b>99%</b> ; Max score: <b>861</b> ; Total score: <b>861</b> ; Query coverage: <b>100%</b> ; E-value: <b>0.0</b> ; Max identities: <b>468/469 (99%)</b> ; Gaps: <b>0/469 (0%)</b> ]
		<b><i>Cladosporium cladosporioides</i> isolate JSP 06 B 5.1</b> (Accession no: <b>KR093871</b> ) [ Homologi: <b>99%</b> ; Max score: <b>861</b> ; Total score: <b>861</b> ; Query coverage: <b>100%</b> ; E-value: <b>0.0</b> ; Max identities: <b>469/470 (99%)</b> ; Gaps: <b>1/470 (0%)</b> ]

#### IV. Daftar Pustaka

- Erlich, H.A. 1989. PCR technology: *Principle and applications for DNA amplification*. Stockton Press, London: x + 246 p.
- Davis, L.G., W.M. Kuehl & J.F. Battey. 1994. *Basic methods in molecular biology*. 2nd ed. Prentice-Hall International Inc., USA: xiii + 777 p.
- Hiraishi, A., Kamagata, Y., & Nakamura, N. 1995. Polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes from methanogens. *Journals of Fermentation Bioengineering*. 79: 523--529.
- Moore, D. & L.N. Frazer. 2002. *Essential fungal genetics*. Springer-Verlag, New York: vii + 357 p.
- O'Donnell, K. 1993. *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds, D.R. & Taylor, J.W. (eds). The fungal holomorph: Mitotic, meiotic, and pleomorphic specification in fungal systematics. CAB International, Wallingford, pp. 225--233.
- Sato, H. 2007. Workshop on: Molecular Approaches for The Identification of Microorganisms. NITE & Research Center for Biotechnology-LIPI, Cibinong: 11-13 July 2007.
- Thomson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin & , D.G. Higgins. 1997. The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research*. 25: 4876-4882.
- Viljoen, G.J. , L.H. Nei, & J.R. Crowther. 2005. *Molecular diagnostic PCR handbook*. Springer, The Netherlands: xviii + 307 p.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. & Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (eds). PCR protocols. Academic, San Diego, pp. 315--322.

Pelaksana: Muhammad Ilyas, M.Si. (.....)

Catatan: 1. Hasil pengujian bukan untuk keperluan komersial  
2. Hasil pengujian hanya pada sampel yang diujikan