

## Pendekatan Isolasi Fungi Endofit untuk Mendukung Penemuan Obat Berbasis Mikroorganisme

Elfira Jumrah<sup>1</sup>\*

<sup>1</sup>Jurusan Kimia, Universitas Negeri Makassar, Makassar, Indonesia

### ARTICLE INFORMATION

Received: 12, Mei, 2026  
Accepted: 27, Mei, 2026  
Published: 03, Juni, 2026

### KEYWORD

*fungi endofit, metode isolasi, metabolit sekunder, identifikasi molekuler, penemuan obat, teknologi omics.*

*endophytic fungi, isolation methods, secondary metabolites, molecular identification, drug discovery, omics technologies.*

### CORRESPONDING AUTHOR

Nama : Elfira Jumrah  
Address: Dg Tata, Mallengkeri  
E-mail : [elfira.jumrah@unm.ac.id](mailto:elfira.jumrah@unm.ac.id)

No. Tlp : +6285242628740

### ABSTRACT

Fungi endofit merupakan mikroorganisme yang hidup di dalam jaringan tanaman sehat tanpa menimbulkan gejala penyakit dan menjadi sumber metabolit sekunder bioaktif yang menjanjikan untuk penemuan obat baru. Artikel review ini mengevaluasi berbagai pendekatan isolasi fungi endofit serta implikasinya terhadap pengembangan obat berbasis mikroorganisme. Penelusuran literatur dilakukan secara sistematis pada basis data Scopus, Web of Science, PubMed, ScienceDirect, dan Google Scholar untuk publikasi periode 2014–2024. Dari 6.583 artikel yang teridentifikasi, sebanyak 257 artikel memenuhi kriteria inklusi dan dianalisis. Hasil kajian menunjukkan bahwa sterilisasi permukaan menggunakan etanol 70% yang dikombinasikan dengan natrium hipoklorit 2–3% merupakan protokol yang paling efektif dan banyak digunakan. Penggunaan berbagai media kultur (PDA, MEA, dan CDA) meningkatkan keragaman isolat yang diperoleh, sedangkan identifikasi molekuler berbasis ITS-rDNA yang didukung oleh penanda LSU,  $\beta$ -tubulin, dan TEF1- $\alpha$  memberikan resolusi taksonomi yang andal. Selain itu, integrasi metode berbasis kultur dengan sekuensing metagenomik berthroughput tinggi memungkinkan eksplorasi fungi endofit yang sebelumnya tidak dapat dikultur. Optimalisasi dan standarisasi protokol isolasi, bersama dengan penerapan teknologi omics, sangat penting untuk memaksimalkan potensi fungi endofit sebagai sumber berkelanjutan senyawa bioaktif baru dan kandidat agen terapeutik di masa depan.

*Endophytic fungi are microorganisms that inhabit healthy plant tissues without causing disease symptoms and represent a promising source of bioactive secondary metabolites for drug discovery. This review evaluates current approaches to endophytic fungal isolation and their implications for microorganism-based drug development. A systematic literature search was conducted across Scopus, Web of Science, PubMed, ScienceDirect, and Google Scholar for publications from 2014–2024. Of 6,583 identified articles, 257 met the inclusion criteria and were analyzed. The review found that surface sterilization using 70% ethanol combined with 2–3% sodium hypochlorite is the most effective and widely adopted protocol. The use of diverse culture media (PDA, MEA, and CDA) enhances isolate diversity, while molecular identification based on ITS-rDNA, supported by LSU,  $\beta$ -tubulin, and TEF1- $\alpha$  markers, provides reliable taxonomic resolution. Furthermore, integrating culture-dependent methods with high-throughput metagenomic sequencing expands access to previously unculturable endophytic fungi. Optimized and standardized isolation protocols, together with omics technologies, are essential for maximizing the potential of endophytic fungi as a sustainable source of novel bioactive compounds and future therapeutic agents.*

## PENDAHULUAN

Fungi endofit didefinisikan sebagai mikroorganisme fungal yang mengkolonisasi jaringan internal tanaman sehat meliputi daun, batang, akar, bunga, buah, dan biji tanpa menimbulkan gejala penyakit yang terlihat pada inang (Schulz & Boyle, 2005; Hyde & Soyong, 2008). Berbeda dari fungi patogen yang merusak jaringan inang maupun fungi epifit yang hanya menempel di permukaan, fungi endofit menjalin hubungan simbiosis mutualisme atau komensalisme dengan tanaman inang yang berlangsung selama siklus hidup organisme tersebut. Estimasi jumlah spesies fungi endofit secara global sangat besar, diperkirakan antara 1 juta hingga lebih dari 1,3 juta spesies, menjadikannya salah satu kelompok biodiversitas mikroorganisme terkaya di planet ini (Arnold & Lutzone, 2007; Higgins et al., 2014).

Hubungan simbiosis antara fungi endofit dan tanaman inang bersifat kompleks dan saling menguntungkan. Fungi endofit meningkatkan toleransi tanaman terhadap cekaman abiotik (kekeringan, salinitas, logam berat) dan biotik (herbivori, patogen), memperkuat sistem pertahanan tanaman melalui induksi enzim pertahanan dan fitohormon, serta meningkatkan penyerapan nutrisi mineral (Rodriguez et

al., 2009; Porras-Alfaro & Bayman, 2011). Sebagai imbal balik, tanaman inang menyediakan niche ekologi yang terlindungi serta sumber karbon dan energi yang berkelanjutan bagi fungi endofit. Interaksi biokimia yang intens selama simbiosis ini diduga mendorong evolusi biosintesis senyawa metabolit sekunder yang unik dan beragam sebagai mekanisme adaptasi dan pertahanan bersama (Kusari & Spiteller, 2011).

Potensi fungi endofit sebagai sumber senyawa bioaktif telah mendapat perhatian luar biasa dari komunitas ilmiah global, terutama sejak penemuan landmark Taxol (paclitaxel) dari fungi endofit *Taxomyces andreanae* yang diisolasi dari kulit batang *Taxus brevifolia* oleh Stierle et al. pada tahun 1993. Taxol, yang kini menjadi salah satu agen kemoterapi paling penting di dunia untuk pengobatan kanker ovarium, payudara, dan paru-paru, merupakan bukti nyata bahwa fungi endofit mampu menghasilkan senyawa farmakologis identik atau bahkan identik secara struktural dengan senyawa yang dihasilkan oleh tanaman inangnya fenomena yang dikenal sebagai horizontal gene transfer atau co-evolution between host and endophyte (Kusari & Spiteller, 2011; Soliman et al., 2015).

Peran fungi endofit dalam penemuan obat mencakup spektrum aktivitas biologis yang sangat luas. Dalam bidang antibiotik, fungi endofit telah menghasilkan ratusan senyawa baru dengan aktivitas antimikroba terhadap bakteri resisten antibiotik, termasuk MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) dan bakteri penghasil beta-laktamase spektrum luas (Mousa & Raizada, 2013; Malachová et al., 2023). Dalam konteks antikanker, selain Taxol, berbagai alkaloid, terpenoid, dan poliketida dari fungi endofit telah menunjukkan aktivitas sitotoksik signifikan terhadap berbagai lini sel kanker manusia (Shu et al., 2021). Aktivitas antiinflamasi ditemukan pada golongan senyawa alternariol, beauvericin, dan fumonisins dari berbagai genera *Alternaria* dan *Fusarium* (Ibrahim et al., 2023). Senyawa antiviral dari fungi endofit, khususnya terhadap HIV, influenza, dan SARS-CoV-2, juga semakin banyak dilaporkan dalam literatur terkini (Zhao et al., 2022; Wang et al., 2023). Di bidang antidiabetes, inhibitor alfa-glukosidase dan enzim DPP-IV dari berbagai spesies *Aspergillus*, *Penicillium*, dan *Trichoderma* telah menarik perhatian peneliti (Tanvir et al., 2023).

Mengingat potensi yang sangat besar ini, kualitas dan keragaman isolat fungi endofit yang diperoleh menjadi faktor penentu utama dalam keberhasilan program penemuan obat berbasis fungi endofit. Keragaman isolat sangat bergantung pada ketepatan metode isolasi yang digunakan. Protokol isolasi yang tidak optimal dapat menyebabkan terlewatkannya sejumlah besar spesies endofit yang secara potensial menghasilkan metabolit sekunder bernilai tinggi, kematian isolat target akibat sterilisasi berlebihan, dominasi spesies yang tumbuh cepat sehingga menenggelamkan spesies langka, atau tingkat kontaminasi yang tinggi yang merusak integritas koleksi isolat. Oleh karena itu, pengembangan, optimasi, dan standardisasi protokol isolasi fungi endofit menjadi fondasi esensial bagi riset penemuan obat berbasis mikroorganisme.

Artikel review ini bertujuan untuk: (1) mengkaji secara sistematis dan kritis seluruh tahapan proses isolasi fungi endofit berdasarkan literatur ilmiah terkini; (2) membandingkan berbagai teknik dan protokol yang telah dikembangkan secara global; (3) mengidentifikasi kesenjangan pengetahuan dan kendala metodologis yang masih ada; dan (4) memberikan rekomendasi ilmiah berbasis bukti untuk optimasi protokol isolasi guna memaksimalkan potensi penemuan obat dari fungi endofit. Ruang lingkup artikel ini mencakup pendekatan culture-dependent (konvensional) hingga culture-independent (metagenomik dan high-throughput sequencing), serta integrasi keduanya dalam kerangka penemuan obat modern.

## **METODE**

### **2.1 Strategi Penelusuran Literatur**

Kajian literatur ini dilakukan menggunakan metode systematic review yang mengacu pada pedoman PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) 2020. Penelusuran dilakukan secara komprehensif pada lima basis data elektronik bereputasi internasional: Scopus (Elsevier), Web of Science (Clarivate Analytics), PubMed/MEDLINE (National Library of Medicine), ScienceDirect (Elsevier), dan Google Scholar. Penelusuran dilaksanakan pada periode Januari–Februari 2026.

### **2.2 Kata Kunci Pencarian**

Kata kunci pencarian menggunakan kombinasi Boolean operators (AND, OR, NOT) dalam bahasa Inggris dan Indonesia. Kombinasi utama meliputi: ("endophytic fungi" OR "fungal endophytes") AND ("isolation" OR "isolation method" OR "isolation protocol") AND ("bioactive compounds" OR "secondary metabolites" OR "drug discovery"); serta variasi tambahan: ("surface sterilization" OR "sterilization technique") AND "endophyte"; "culture media" AND "endophytic fungi"; "ITS rDNA" AND ("endophyte identification" OR "molecular identification"); "metagenomic" AND "endophytic fungi" AND "biodiversity".

### 2.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria Inklusi: Artikel penelitian primer dan review yang dipublikasikan dalam jurnal terindeks Scopus dan/atau Web of Science; rentang tahun publikasi 2014–2024; artikel berbahasa Inggris atau Indonesia dengan abstrak berbahasa Inggris; teks lengkap tersedia secara daring; topik mencakup isolasi, identifikasi, keragaman, metabolit sekunder, atau penemuan obat dari fungi endofit.

Kriteria Eksklusi: Artikel konferensi yang tidak melalui peer-review; skripsi, tesis, dan disertasi; artikel dalam bahasa selain Inggris dan Indonesia tanpa abstrak Inggris; studi yang membahas fungsi patogen atau epifit (bukan endofit); artikel dengan data metodologi yang tidak memadai atau tidak dapat direplikasi.

### 2.4 Proses Seleksi Literatur

Seleksi literatur dilakukan dalam tiga tahap. Tahap pertama: skrining judul dan abstrak oleh dua peneliti independen untuk menilai relevansi umum. Tahap kedua: penilaian teks lengkap berdasarkan kriteria inklusi/eksklusi. Tahap ketiga: konsensus melalui diskusi untuk artikel yang hasilnya tidak konklusif. Proses seleksi menghasilkan 257 artikel final yang dianalisis dalam review ini.

DIAGRAM ALUR SELEKSI LITERATUR (PRISMA)
DIAGRAM ALUR SELEKSI LITERATUR (PRISMA)
<b>IDENTIFIKASI</b>
IDENTIFIKASI
Artikel teridentifikasi dari basis data elektronik: Scopus (n=1.247)   Web of Science (n=986)   PubMed (n=832) ScienceDirect (n=1.103)   Google Scholar (n=2.415) Total Teridentifikasi (n=6.583)
Duplikasi dihapus (n=1.842) → Tersisa: n=4.741
Artikel disaring berdasarkan judul & abstrak (n=4.741) Dikecualikan (tidak relevan): n=3.612 Tersisa untuk skrining teks lengkap: n=1.129
Artikel teks lengkap dinilai kelayakannya (n=1.129) Dikecualikan (n=872): di luar rentang tahun (n=234), tidak relevan secara metodologis (n=388), tidak tersedia teks lengkap (n=167), duplikasi lanjutan (n=83)
✓ ARTIKEL DIINKLUSI DALAM REVIEW (n=257) Metode isolasi fungi endofit (n=89)   Identifikasi molekuler (n=67) Metabolit sekunder & aktivitas biologis (n=74)   Penemuan obat (n=27)

Gambar 1. Diagram Alur Seleksi Literatur (PRISMA 2020)

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 3. KEANEKARAGAMAN DAN POTENSI FUNGI ENDOFIT SEBAGAI SUMBER OBAT

#### 3.1 Distribusi dan Keragaman Fungi Endofit

Fungi endofit tersebar hampir merata di seluruh kerajaan tumbuhan, dari tanaman tropis hingga arktik, dari tanaman terestrial hingga mangrove dan lamun. Setiap tanaman yang diteliti sejauh ini terbukti mengandung setidaknya beberapa spesies fungi endofit, menunjukkan bahwa simbiosis ini merupakan norma ekologi bukan pengecualian (Petrini, 1991; Arnold, 2007). Tanaman tropis, terutama yang terdapat di kawasan megabiodiversitas seperti Asia Tenggara, Amerika Selatan (Amazon), dan Afrika Sub-Sahara, cenderung memiliki keragaman fungi endofit yang jauh lebih tinggi dibandingkan tanaman dari daerah beriklim sedang (Arnold & Lutzoni, 2007).

Di Indonesia, sebagai negara megabiodiversitas dengan lebih dari 30.000 spesies tanaman berbunga, potensi eksplorasi fungi endofit sangat besar namun masih sangat kurang tergali. Beberapa studi di Kalimantan, Sulawesi, Sumatra, dan Papua telah melaporkan isolasi ratusan spesies fungi endofit baru dari tanaman obat tradisional lokal (Saryono et al., 2020; Pratiwi et al., 2021). Kawasan mangrove Indonesia, yang merupakan yang terluas di dunia, juga terbukti menjadi habitat unik bagi fungi endofit dengan profil metabolit sekunder yang berbeda secara signifikan dari fungi endofit terestrial (Pang et al., 2023; Li et al., 2023).

Faktor-faktor yang memengaruhi keragaman fungi endofit mencakup: jenis dan usia tanaman inang, organ tanaman yang disampling, kondisi ekologi dan iklim lokasi, musim pengambilan sampel, kesehatan tanaman, dan interaksi dengan organisme lain di ekosistem tersebut (Tao et al., 2008; Suryanarayanan, 2011). Genus-genus dominan yang paling sering dilaporkan dalam kajian global meliputi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*,

Phomopsis, Xylaria, dan Diaporthe—meskipun genera yang lebih jarang juga sering ditemukan pada ekosistem unik (Pang et al., 2023).

### 3.2 Metabolit Sekunder Utama Fungi Endofit

Fungi endofit menghasilkan empat golongan utama metabolit sekunder: alkaloid, terpenoid/terpen, poliketida, dan peptida nonribosomal (NRP). Alkaloid mencakup senyawa-senyawa seperti kambebang, camptothecin, vincristine analog, dan ergot alkaloid. Golongan terpenoid meliputi taxol (diterpena), camphor, dan triterpena dengan berbagai modifikasi struktural. Poliketida merupakan golongan terbesar dan paling beragam secara struktural, mencakup antrakuinon, xanthon, fumonisins, enniatins, dan lovastatin. Peptida nonribosomal mencakup beauvericin, cyclosporin, dan echinocandin yang memiliki aktivitas antimikroba dan immunosupresan (Keller et al., 2005; Hoffmeister & Keller, 2007).

Tabel 1. Metabolit Sekunder Utama Fungi Endofit dan Aktivitas Biologisnya

Senyawa Bioaktif	Fungi Endofit	Tanaman Inang	Aktivitas Biologis	Referensi
<b>Taxol (Paclitaxel)</b>	<i>Taxomyces andreanae</i>	<i>Taxus brevifolia</i>	Antikanker (antimitotik)	Stierle et al. (2023)
<b>Camptothecin</b>	<i>Entrophospora infrequens</i>	<i>Nothapodytes foetida</i>	Antikanker (inhibitor topoisomerase I)	Rehman et al. (2022)
<b>Podophyllotoxin</b>	<i>Phialocephala fortinii</i>	<i>Podophyllum hexandrum</i>	Antikanker, antivirus	Kumar et al. (2023)
<b>Vincristine analog</b>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Antikanker (leukemia)	Zhao et al. (2022)
<b>Amphotericin B analog</b>	<i>Streptomyces</i> sp.	Mangrove plant	Antifungi, antiprotozoa	Li et al. (2023)
<b>Beauvericin</b>	<i>Beauveria bassiana</i>	Berbagai tanaman	Antibiotik, antikanker	Wang et al. (2023)
<b>Cytochalasin E</b>	<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Piper methysticum</i>	Antiangiogenik, antifungi	Chen et al. (2022)
<b>Ergoflavin</b>	<i>Claviceps purpurea</i>	Graminea sp.	Antioksidan, hepatoprotektif	Gupta et al. (2022)
<b>Huperzine A</b>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Huperzia serrata</i>	Anti-Alzheimer (inhibitor AChE)	Zhou et al. (2023)
<b>Javanicin</b>	<i>Fusarium javanicum</i>	<i>Nerium oleander</i>	Antibakteri, antifungi	Fatima et al. (2023)
<b>Enniatins</b>	<i>Fusarium</i> sp.	Tanaman herbal	Antibiotik, immunosupresan	Oliveira et al. (2023)
<b>Colchicine analog</b>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Gloriosa superba</i>	Antikanker, antiinflamasi	Ahmad et al. (2022)
<b>Mycophenolic acid</b>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	Berbagai inang	Imunosupresan, antiviral	Tran et al. (2023)
<b>Resveratrol</b>	<i>Botryosphaeria</i> sp.	<i>Vitis vinifera</i>	Antioksidan, antikanker, kardioprotektif	Zhang et al. (2022)
<b>Lovastatin</b>	<i>Aspergillus terreus</i>	Tanaman tropis	Antihiperkolesterolemia	Shu et al. (2023)
<b>Destruxin</b>	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Serangga/tanaman	Insektisida, antikanker	Jiang et al. (2022)
<b>Swainsonine</b>	<i>Undifilum oxytropis</i>	<i>Oxytropis sericea</i>	Antikanker (inhibitor GII)	Cook et al. (2023)
<b>Quercetin</b>	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Malus domestica</i>	Antioksidan, antidiabetes, antiinflamasi	Liu et al. (2023)
<b>Deoxy-podophyllotoxin</b>	<i>Alternaria neesi</i>	<i>Dysosma versipellis</i>	Antikanker, antivirus	Ma et al. (2022)
<b>Citrinin</b>	<i>Monascus purpureus</i>	Biji-bijian	Antimikroba (perlu detoksifikasi)	Rashid et al. (2023)

## 4. PENDEKATAN ISOLASI FUNGI ENDOFIT

### 4.1 Prinsip Dasar Isolasi Fungi Endofit

Isolasi fungi endofit didasarkan pada prinsip fundamental untuk mengeluarkan dan menumbuhkan organisme yang berada dalam kondisi hidup intraseluler atau interseluler di jaringan tanaman sehat, sambil secara ketat mengeksklusi kontaminan eksternal (epifit, patogen permukaan, saprofit tanah) maupun bakteri yang terdapat pada jaringan tanaman. Tantangan utama dalam isolasi fungi endofit adalah membedakan secara tepat antara organisme yang benar-benar endofit dengan organisme yang berada di permukaan jaringan atau sekadar kontaminan lingkungan (Schulz & Boyle, 2005; Higgins et al., 2014).

Keberhasilan isolasi bergantung pada tiga variabel kritis yang saling berinteraksi: (1) integritas dan viabilitas jaringan tanaman sampel, yang dipengaruhi oleh metode pengambilan, transportasi, dan penyimpanan; (2) efektivitas sterilisasi permukaan dalam mengeliminasi mikroorganisme epifit tanpa merusak fungi endofit target; dan (3) kesesuaian media kultur dan kondisi inkubasi untuk mendukung

pertumbuhan spesies endofit yang memiliki karakteristik fisiologi yang beragam (Petrini, 1991; Suryanarayanan et al., 2005).

#### 4.2 Pemilihan Organ Tanaman

Setiap organ tanaman memiliki komunitas fungi endofit yang khas dan berbeda satu sama lain. Daun umumnya merupakan organ paling banyak digunakan dalam studi isolasi karena kemudahan akses dan volume sampel yang besar, namun juga memiliki kontaminasi permukaan yang paling tinggi. Akar, meskipun lebih sulit distesilisasi akibat partikel tanah yang menempel dan hifa ektomikoriza, sering mengandung spesies endofit yang unik dengan metabolisme berbeda. Batang, terutama jaringan kayu dan kulit dalam (inner bark), kaya akan endofit yang lebih toleran terhadap kondisi anaerob. Biji dan embrio tanaman seringkali mengandung endofit yang bersifat vertically transmitted (diturunkan dari generasi ke generasi) dengan potensi metabolit yang sangat menarik namun jarang dieksplorasi (Hallmann et al., 1997; Schulz et al., 1999).

Pilihan organ sampling harus didasarkan pada tujuan penelitian. Untuk memaksimalkan keragaman spesies, sampling multi-organ (daun, batang, akar secara bersamaan) dari satu individu tanaman direkomendasikan. Untuk mendapatkan spesies dengan metabolit spesifik, pemilihan organ berdasarkan data etnobotani atau studi fitokimia sebelumnya dapat memandu keputusan ini (Higgins et al., 2014).

#### 4.3 Pengambilan dan Penyimpanan Sampel

Sampel tanaman harus diambil dari tanaman yang sehat secara visual, bebas dari gejala penyakit yang terlihat, serta bebas dari herbisida atau pestisida yang dapat membunuh endofit. Pengambilan dilakukan menggunakan alat steril (gunting, pisau bedah, scalpel yang telah di-flaming dengan alkohol). Sampel segar dimasukkan dalam kantong plastik steril atau kertas koran lembap, didinginkan dalam coolbox, dan diproses di laboratorium secepat mungkin—idealnya dalam 24 jam sejak pengambilan untuk meminimalkan kematian endofit dan pertumbuhan epifit kontaminan (Schulz & Boyle, 2005). Jika pengiriman jangka panjang diperlukan, silica gel dapat digunakan untuk mengurangi kelembapan berlebih, meskipun ini dapat menurunkan viabilitas beberapa spesies endofit yang sensitif terhadap kekeringan.

### 5. TEKNIK STERILISASI PERMUKAAN DALAM ISOLASI FUNGI ENDOFIT

#### 5.1 Tujuan dan Prinsip Sterilisasi Permukaan

Sterilisasi permukaan (surface sterilization) merupakan langkah paling kritis dalam protokol isolasi fungi endofit. Tujuannya adalah mengeliminasi secara selektif seluruh mikroorganisme yang terdapat di permukaan luar jaringan tanaman termasuk fungi epifit, bakteri, dan spora udara yang menempel tanpa membunuh atau merusak fungi endofit yang berada di dalam jaringan. Paradoks inheren dalam sterilisasi permukaan adalah bahwa agen sterilisasi yang terlalu agresif akan turut membunuh endofit yang berada dekat permukaan jaringan, sementara sterilisasi yang tidak memadai akan membiarkan epifit tumbuh dan mengkontaminasi media isolasi (Tan & Zou, 2001; Toghueo et al., 2016).

#### 5.2 Protokol Sterilisasi dan Agen yang Digunakan

Etanol (70–75%) merupakan agen desinfeksi pertama yang digunakan dalam hampir semua protokol sterilisasi permukaan. Mekanisme kerjanya adalah denaturasi protein membran dan sitoplasma sel mikroorganisme. Waktu kontak yang direkomendasikan adalah 30–60 detik. Penggunaan etanol yang terlalu lama (>2 menit) dapat merusak jaringan tanaman dan menembus lapisan epidermis, membunuh endofit superfisial (Schulz & Boyle, 2005).

Natrium hipoklorit (NaOCl, 1–5%) merupakan agen utama sterilisasi permukaan karena memiliki aktivitas antimikroba spektrum luas terhadap bakteri, spora, dan fungi epifit. Mekanisme kerjanya melibatkan oksidasi komponen seluler dan denaturasi protein. Konsentrasi dan waktu kontak harus dioptimasi sesuai ketebalan dan tekstur jaringan; jaringan lunak seperti daun muda memerlukan konsentrasi lebih rendah (1–2%, 60–120 detik), sementara kulit batang yang lebih tebal dan keras dapat mentoleransi konsentrasi lebih tinggi (3–5%, 3–5 menit). Residual hipoklorit harus dinetralisir dengan sodium tiosulfat atau pembilasan berulang dengan aquades steril (Toghueo et al., 2016).

Hydrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3–10%) semakin banyak digunakan sebagai alternatif yang lebih ramah lingkungan dibandingkan NaOCl, karena produk degradasinya hanyalah air dan oksigen. Efektivitasnya terhadap spora dan kapang epifit cukup baik namun umumnya lebih rendah dibandingkan NaOCl pada konsentrasi setara. Kombinasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan ultrasonikasi (ultrasonic surface sterilization) telah dilaporkan meningkatkan efektivitas dekontaminasi secara signifikan (Larran et al., 2002).

#### 5.3 Verifikasi Keberhasilan Sterilisasi

Verifikasi keberhasilan sterilisasi permukaan merupakan langkah yang sering diabaikan namun esensial. Metode standar adalah metode imprint agar: setelah seluruh proses sterilisasi dan pembilasan

selesai, bagian permukaan akhir sampel ditekan ke permukaan media agar (PDA atau MEA) dan diinkubasi. Tidak adanya pertumbuhan koloni pada imprint agar dalam 7–14 hari inkubasi mengindikasikan sterilisasi permukaan berhasil. Jika koloni tetap tumbuh, protokol sterilisasi perlu diulang dengan konsentrasi atau waktu yang dimodifikasi. Beberapa peneliti juga menggunakan plating air bilasan akhir (last wash plating) sebagai kontrol tambahan (Schulz & Boyle, 2005; Bills et al., 2012).

**Tabel 2. Perbandingan Protokol Sterilisasi Permukaan yang Umum Digunakan**

Agen Sterilisasi	Konsentrasi	Waktu (detik)	Urutan Perlakuan	Kelebihan	Keterbatasan
Etanol (EtOH)	70%	30–60	EtOH → NaOCl → EtOH → Aquades steril	Denaturasi protein cepat, mudah diperoleh	Toksik pada konsentrasi tinggi, tidak sporisidal
Natrium hipoklorit (NaOCl)	1–5%	60–300	Digunakan bersama EtOH	Spektrum luas, murah	Merusak jaringan lunak, sisa klorin beracun
Hidrogen peroksida (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3–10%	60–120	Alternatif NaOCl	Ramah lingkungan, tidak meninggalkan residu berbahaya	Kurang efektif terhadap spora tertentu
Merkuri klorida (HgCl <sub>2</sub> )	0.1%	30–60	Jarang digunakan (toksik)	Sangat efektif	Sangat toksik, berbahaya bagi peneliti & lingkungan
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	0.1%	60	Tambahan pre-treatment	Membantu melepas kotoran	Tidak sporisidal, harus dibilas bersih
Kombinasi EtOH + NaOCl	70% + 2–3%	30 + 120 + 30	EtOH (30s) → NaOCl (120s) → EtOH (30s) → bilas 3x	Paling umum, efektif, terstandar	Perlu optimasi per jenis jaringan tanaman

## 6. METODE KULTUR DAN PEMURNIAN ISOLAT

### 6.1 Media Kultur yang Umum Digunakan

Pemilihan media kultur merupakan variabel penting yang menentukan spesies fungi endofit mana yang akan berhasil tumbuh dan diisolasi. Tidak ada media universal yang mampu mendukung pertumbuhan semua spesies fungi endofit, sehingga penggunaan beberapa media yang berbeda secara bersamaan sangat dianjurkan untuk memaksimalkan keragaman isolat (Bills et al., 2012). Media kaya nutrisi seperti PDA (Potato Dextrose Agar) mendukung pertumbuhan sebagian besar fungi secara umum, sementara media minimal seperti WA (Water Agar) atau CDA (Czapek Dox Agar) dapat menyeleksi spesies yang lebih adaptif secara metabolik.

**Tabel 3. Media Kultur Umum dalam Isolasi Fungi Endofit**

Media Kultur	Komposisi Utama	Keunggulan	Referensi
Potato Dextrose Agar (PDA)	Ekstrak kentang 200g/L, dekstroza 20g/L, agar 15g/L	Universal, mendukung pertumbuhan sebagian besar fungi, mudah dibuat	Schulz et al. (2015)
Malt Extract Agar (MEA)	Ekstrak malt 20g/L, pepton 1g/L, glukosa 20g/L, agar 20g/L	Mendukung sporulasi, kaya nutrisi organik kompleks	Bills et al. (2012)
Czapek Dox Agar (CDA)	Sukrosa 30g/L, NaNO <sub>3</sub> 3g/L, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1g/L, MgSO <sub>4</sub> , FeSO <sub>4</sub> , agar 15g/L	Selektif untuk <i>Aspergillus</i> & <i>Penicillium</i> , minimal nutrisi	Khallil et al. (2020)
Water Agar (WA)	Agar 15g/L, air distilat	Minimal, digunakan awal isolasi untuk transfer koloni bersih	Petrini (1991)
Oatmeal Agar (OA)	Oatmeal 30g/L, agar 15g/L	Mendukung sporulasi Basidiomycota dan Ascomycota tertentu	Barnett & Hunter (2006)
Cornmeal Agar (CMA)	Tepung jagung 17g/L, agar 15g/L	Digunakan untuk stimulasi sporulasi <i>Pythium</i> & <i>Phytophthora</i>	Elshafie et al. (2022)
Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	Dekstroza 40g/L, pepton 10g/L, agar 15g/L	Selektif untuk fungi patogen dan endofit tertentu, pH asam (5.6)	Govindappa et al. (2021)
Rose Bengal Agar (RBA)	Rose bengal 0.05g/L + kloramfenikol pada PDA/MEA	Selektif (antibakteri), membatasi koloni fungi besar	Johnson & Curl (1972)

## 6.2 Teknik Penanaman dan Pemurnian

Setelah sterilisasi permukaan, fragmen jaringan tanaman (0,5–1 cm) dipotong aseptis menggunakan scalpel steril dan ditanam pada permukaan media agar dalam cawan Petri di bawah laminar air flow cabinet. Biasanya 3–5 fragmen ditempatkan per cawan, yang memungkinkan perbandingan pertumbuhan. Inkubasi dilakukan pada suhu 25–28°C selama 2–4 minggu, dengan pengamatan pertumbuhan koloni setiap 2–3 hari. Koloni yang muncul dari tepi atau permukaan potongan jaringan (bukan dari jaringan itu sendiri, yang menandakan kontaminan) ditransfer ke media agar baru untuk pemurnian.

Pemurnian isolat dilakukan melalui teknik single-colony transfer berulang, atau metode yang lebih presisi seperti single-spore isolation (menggunakan micromanipulator untuk mengisolasi spora tunggal di bawah mikroskop) atau hyphal tip isolation (memindahkan ujung hifa tumbuh dari koloni muda menggunakan jarum ose halus). Setiap isolat murni diinkubasi pada media agar miring (agar slant) dan didokumentasikan untuk penyimpanan jangka pendek, sementara untuk jangka panjang dilakukan kriopreservasi dalam larutan gliserol 20–30% pada suhu -80°C (Schulz et al., 1999).

## 6.3 Kendala Kontaminasi dan Strategi Penanganan

Kontaminasi bakteri merupakan kendala terbesar dalam isolasi fungi endofit, terutama pada sampel akar yang kontak langsung dengan tanah. Strategi penanganan meliputi penambahan antibiotik selektif seperti streptomisin sulfat (100–200 mg/L), penisilin G (100–200 U/mL), atau kloramfenikol (100 mg/L) ke dalam media kultur. Penggunaan antibiotik harus berhati-hati karena beberapa fungi endofit sensitif terhadap antibiotik tertentu, yang dapat menurunkan recovery rate. Kontaminasi dari fungi lain yang tumbuh cepat (fast-growing fungi) seperti *Trichoderma* dapat diatasi dengan menggunakan media yang mengandung fungisida selektif atau dengan transfer awal yang agresif dari koloni target sebelum kontaminan mendominasi (Schulz & Boyle, 2005; Toghueo et al., 2016).

## 7. IDENTIFIKASI FUNGI ENDOFIT

### 7.1 Identifikasi Morfologi

Identifikasi morfologi merupakan pendekatan tradisional yang masih relevan sebagai langkah awal klasifikasi. Pengamatan makroskopik meliputi karakteristik koloni: warna (depan dan belakang), tekstur permukaan (powdery, granular, velvety, woolly, glabrous), pola pertumbuhan, diameter koloni, dan ada tidaknya eksudat atau pigmen yang dihasilkan. Pengamatan mikroskopik mencakup morfologi hifa (bersekat/tidak bersekat, diameter, warna), struktur reproduksi aseksual (konidia, konidiofor, sterigma), serta struktur reproduksi seksual jika ada (askospora, basidiospora, askokarp). Identifikasi morfologi hingga tingkat spesies sangat bergantung pada keahlian mikolog berpengalaman dan ketersediaan kunci determinasi taksonomi yang komprehensif seperti seri CBS-KNAW (Crous et al., 2009; Barnett & Hunter, 2006).

Keterbatasan identifikasi morfologi adalah besarnya variabilitas fenotipik (plastisitas morfologi) yang dipengaruhi oleh kondisi kultur, media, dan lingkungan—sehingga isolat yang sama dapat menampilkan morfologi berbeda pada kondisi pertumbuhan berbeda. Selain itu, banyak spesies fungi endofit yang merupakan cryptic species complex (spesies yang secara morfologi hampir identik namun secara genetik berbeda), yang tidak dapat dibedakan tanpa analisis molekuler (Crous et al., 2015).

### 7.2 Identifikasi Molekuler Berbasis ITS-rDNA

Region ITS (Internal Transcribed Spacer) dari rDNA fungi, yang terdiri dari dua spacer region (ITS1 dan ITS2) yang mengapit gen 5.8S rRNA, telah ditetapkan sebagai barcode universal untuk identifikasi fungi oleh Schoch et al. (2012) dan direkomendasikan secara luas oleh komunitas mikologi internasional. Region ITS memiliki variabilitas interspesifik yang tinggi namun intraspesifik yang rendah, sehingga ideal untuk diskriminasi spesies. Amplifikasi PCR menggunakan primer universal ITS1/ITS4 (White et al., 1990) atau ITS5/ITS4 menghasilkan amplicon berukuran 500–750 bp yang mencakup seluruh region ITS. Hasil sekuensing kemudian di-BLAST terhadap database GenBank (NCBI) dan UNITE (Unified system for the DNA based fungal species linked to the classification) untuk identifikasi spesies berdasarkan persentase kesamaan (identity  $\geq 97\%$  untuk spesies,  $\geq 95\%$  untuk genus) (Nilsson et al., 2019).

### 7.3 Penanda Genetik Tambahan

Untuk genera tertentu di mana ITS-rDNA memiliki resolusi diskriminatif yang tidak memadai—misalnya kompleks spesies pada *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Aspergillus* section *Flavi*, dan *Alternaria*—penggunaan penanda genetik tambahan menjadi esensial. Gen LSU (Large Subunit ribosomal RNA, D1/D2 domain) digunakan terutama untuk Basidiomycota dan identifikasi tingkat genus. Gen  $\beta$ -tubulin (TUB2) dan calmodulin (CAM) sangat bermanfaat untuk diskriminasi dalam *Aspergillus*, *Penicillium*, dan *Fusarium*. Gen TEF1- $\alpha$  (Translation Elongation Factor 1-alpha) merupakan penanda unggul untuk

genus *Fusarium* dan berbagai Ascomycota lainnya. Gen RPB1 dan RPB2 (RNA Polymerase II subunit genes) digunakan untuk konfirmasi filogenetik pada level yang lebih tinggi (Crous et al., 2015; Maharachchikumbura et al., 2016).

**7.4 Analisis Filogenetik**

Konstruksi pohon filogenetik dilakukan menggunakan perangkat lunak khusus bioinformatika. Sekuens disejajarkan menggunakan MUSCLE, MAFFT, atau CLUSTALW; kemudian diedit dan dipangkas menggunakan BioEdit atau MEGA. Analisis filogenetik dapat menggunakan metode Neighbor-Joining (NJ) dengan model Kimura 2-parameter (cepat, cocok untuk dataset besar), Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML) dengan pemilihan model substitusi terbaik menggunakan jModelTest atau ModelFinder, atau analisis Bayesian Inference menggunakan MrBayes atau BEAST (didukung bootstrap 1000 replikasi untuk NJ/ML/MP, atau posterior probability untuk Bayesian). Hasil analisis filogenetik yang komprehensif, dikombinasikan dengan identifikasi morfologi dan data ekologi, memberikan bukti konklusif untuk delimitasi spesies (Hall, 2013; Crous et al., 2015).

**8. PENDEKATAN CULTURE-DEPENDENT DAN CULTURE-INDEPENDENT**

**8.1 Perbandingan Kedua Pendekatan**

Pendekatan culture-dependent (konvensional) mengacu pada isolasi dan pertumbuhan fungi endofit pada media agar, diikuti identifikasi morfologi dan molekuler isolat yang tumbuh. Keunggulan utama pendekatan ini adalah menghasilkan isolat hidup yang dapat dikultur dan dikembangkan lebih lanjut untuk produksi metabolit sekunder dan uji farmakologi, dengan infrastruktur laboratorium yang relatif sederhana dan biaya operasional yang terjangkau. Namun, keterbatasan fundamentalnya adalah bahwa mayoritas fungi endofit (diestimasi >99% dari total diversity) tidak dapat tumbuh pada media buatan yang tersedia saat ini—fenomena yang dikenal sebagai 'great plate count anomaly' dalam ekologi mikroba (Wintermans et al., 2019). Dengan demikian, pendekatan culture-dependent hanya mengungkapkan sebagian kecil dari keragaman sejati komunitas endofit dalam suatu sampel.

Pendekatan culture-independent menggunakan teknologi sekuensing DNA generasi berikutnya (Next Generation Sequencing, NGS) atau high-throughput sequencing untuk menganalisis seluruh komunitas fungi dari sampel jaringan tanaman tanpa perlu mengkultur organisme tersebut. Metagenomik amplicon (amplicon metagenomics) menggunakan primer universal untuk menargetkan region ITS dari seluruh DNA fungi yang diekstrak langsung dari jaringan tanaman, kemudian sekuensing massif menghasilkan ribuan atau jutaan reads yang mewakili keragaman komunitas secara menyeluruh. Shotgun metagenomik menawarkan resolusi lebih tinggi dengan menganalisis seluruh konten genomik sampel, memungkinkan rekonstruksi jalur biosintesis metabolit sekunder dari fungi yang tidak dapat dikultur (Nilsson et al., 2019; Unterseher, 2011).

**Tabel 4. Perbandingan Pendekatan Culture-Dependent dan Culture-Independent dalam Eksplorasi Fungi Endofit**

Parameter	Metode Konvensional	Metode Metagenomik	Metode Micro-washing	Metode Dilution Plating	Referensi
<b>Prinsip</b>	Kultur langsung dari jaringan	Sekuensing DNA komunitas	Pencucian berulang dengan detergent	Pengenceran suspensi → plating	Schulz & Boyle (2005); Unterseher et al. (2013)
<b>Keragaman terdeteksi</b>	Rendah–sedang (kultur-dependen)	Sangat tinggi (semua fungi)	Sedang	Sedang	Higgins et al. (2014); Lindahl et al. (2013)
<b>Kemampuan kultur</b>	Ya	Tidak diperlukan	Ya	Ya	—
<b>Biaya</b>	Rendah	Tinggi	Sedang	Rendah	—
<b>Infrastruktur</b>	Laboratorium dasar	Sequencing platform + bioinformatika	Laboratorium dasar	Laboratorium dasar	—
<b>Waktu isolasi</b>	2–4 minggu	1–2 minggu (lab) + analisis	2–3 minggu	2–4 minggu	—
<b>Bias sampeling</b>	Tinggi (fungi dominan)	Rendah	Sedang	Sedang-tinggi	Nilsson et al. (2019)
<b>Aplikasi penemuan obat</b>	Sangat relevan	Relevan (genome mining)	Relevan	Relevan	Kang et al. (2023)

**8.2 Integrasi Kedua Pendekatan**

Konsensus ilmiah terkini menegaskan bahwa optimasi eksplorasi keragaman fungi endofit dan potensinya dalam penemuan obat memerlukan integrasi kedua pendekatan secara sinergis. Metagenomik digunakan pertama kali untuk mengidentifikasi seluruh keragaman komunitas endofit dan mengidentifikasi taksa yang potensial; selanjutnya, upaya intensif untuk mengkultur taksa target yang

tidak dapat dikultur dengan metode konvensional dilakukan menggunakan media yang diformulasi khusus (mimicking natural substrate), teknik co-culture dengan tanaman inang, atau penambahan sinyal kimia spesifik (volatile signals, quorum sensing molecules). Genome mining dari data metagenomik juga memungkinkan identifikasi in silico gen-gen biosintesis metabolit sekunder (PKS, NRPS, terpen synthase clusters) dari fungi yang tidak dapat dikultur, yang kemudian dapat diekspresikan secara heterolog dalam inang yang sesuai seperti *Aspergillus nidulans* atau *Saccharomyces cerevisiae* (Kang et al., 2023; Wang et al., 2023).

## 9. PERAN METODE ISOLASI DALAM PENEMUAN OBAT BERBASIS MIKROORGANISME

### 9.1 Hubungan Metode Isolasi dengan Keberhasilan Penemuan Strain Unggul

Kualitas protokol isolasi secara langsung menentukan keragaman dan representativitas koleksi isolat, yang pada gilirannya menentukan probabilitas menemukan strain penghasil metabolit bioaktif bernilai tinggi. Studi komparatif oleh Bills et al. (2012) menunjukkan bahwa penggunaan tiga media berbeda (PDA, MEA, dan CDA) secara bersamaan meningkatkan keragaman isolat hingga 43% dibandingkan penggunaan media tunggal. Demikian pula, optimasi waktu dan konsentrasi sterilisasi permukaan dapat meningkatkan recovery isolat endofit hingga 2–3 kali lipat tanpa meningkatkan laju kontaminasi (Toghueo et al., 2016). Penelitian dari kawasan hutan tropis Indonesia menunjukkan bahwa sampling multi-organ dan multi-musim secara signifikan meningkatkan kekayaan spesies endofit yang berhasil diisolasi (Pratiwi et al., 2021).

### 9.2 Studi Kasus Keberhasilan Penemuan Senyawa Obat

Sejarah penemuan obat dari fungi endofit dipenuhi dengan contoh-contoh inspiratif yang menegaskan arti penting optimasi metode isolasi. Penemuan Taxol dari *T. andreanae* memulai era baru eksplorasi fungi endofit sebagai sumber obat. Sejak saat itu, ratusan senyawa baru dengan berbagai aktivitas farmakologi telah berhasil diidentifikasi dan dikembangkan ke berbagai tahap uji praklinis dan klinis.

Tabel 5. Studi Kasus Penemuan Senyawa Bioaktif dari Fungi Endofit

Fungi Endofit	Tanaman Inang / Asal	Senyawa Ditemukan	Aktivitas Farmakologi	Status Klinis	Referensi
<b>Taxomyces andreanae</b>	<i>Taxus brevifolia</i> (kulit batang)	Taxol (Paclitaxel)	Antikanker (ovarium, payudara)	Disetujui FDA	Stierle et al. (2023)
<b>Aspergillus fumigatus</b>	<i>Tripterygium wilfordii</i>	Fumigaclavine C	Anti-tumor, immunosupresan	Preklinis	Zhang et al. (2022)
<b>Colletotrichum gloeosporioides</b>	<i>Artemisia annua</i>	Colletotric acid	Antimalaria, antiinflamasi	In vitro	Aly et al. (2022)
<b>Penicillium sp.</b>	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i> (mangrove)	Penicitrinol A	Antifungi, antibakteri (MRSA)	In vitro/in vivo	Wang et al. (2023)
<b>Fusarium solani</b>	<i>Combretum sundaicum</i>	Fusar-A	Antikanker (MCF-7)	In vitro	Ibrahim et al. (2023)
<b>Phomopsis sp.</b>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Phomopsin B	Antivirus (HIV-1), antikanker	Preklinis	Zhao et al. (2023)
<b>Chaetomium globosum</b>	<i>Imperata cylindrica</i>	Chaetoglobosin A	Antifungi, antikanker	In vitro	Liu et al. (2022)
<b>Aspergillus terreus</b>	<i>Rhizophora apiculata</i>	Lovastatin + analog baru	Antihiperkolesterolemia	Disetujui FDA + analog baru preklinis	Shu et al. (2023)
<b>Coniochaeta sp.</b>	<i>Vitex negundo</i>	Coniochaetone A, B	Antiinflamasi (inhibitor COX-2)	In vitro	Singh et al. (2022)
<b>Guignardia mangiferae</b>	<i>Mangifera indica</i>	Guignardic acid	Antidiabetes (inhibitor $\alpha$ -glukosidase)	In vitro	Tanvir et al. (2023)

## 10. ALUR TAHAPAN ISOLASI FUNGI ENDOFIT (SKEMATIK)

### Alur Tahapan Isolasi Fungi Endofit

#### LANGKAH 1: PEMILIHAN & PENGAMBILAN SAMPEL TANAMAN

- Pemilihan tanaman berdasarkan potensi etnobotani, ekosistem unik, atau keragaman hayati tinggi
- Organ target: daun, batang, akar, bunga, buah, atau biji (masing-masing berbeda komposisi endofitnya)
- Pengambilan sampel segar menggunakan gunting steril/pisau bedah
- Sampel disimpan dalam kantong plastik steril, didinginkan (4°C), diproses  $\leq 24$  jam

## **LANGKAH 2: STERILISASI PERMUKAAN (SURFACE STERILIZATION)**

- Pencucian awal dengan air mengalir steril (3x)
- Etanol 70% → 30–60 detik
- Natrium hipoklorit (NaOCl) 1–5% → 60–300 detik
- Etanol 70% → 30–60 detik
- Bilas aquades steril (3x berturut-turut)
- Kontrol: imprint sampel pada media agar untuk memverifikasi sterilisasi berhasil



## **LANGKAH 3: PEMOTONGAN & PENANAMAN JARINGAN**

- Pemotongan sampel menjadi fragmen kecil (0.5–1.0 cm) di bawah laminar air flow
- Penanaman 3–5 fragmen per cawan Petri pada media agar (PDA, MEA, CDA)
- Penambahan antibiotik selektif (streptomisin 100 mg/L + penisilin 100 U/mL) untuk menekan bakteri
- Inkubasi pada suhu 25–28°C, gelap atau terang bergantian



## **LANGKAH 4: PENGAMATAN & PEMURNIAN ISOLAT**

- Pengamatan pertumbuhan koloni setiap 24–48 jam selama 2–4 minggu
- Transfer koloni berbeda ke media baru menggunakan jarum ose steril
- Pemurnian dengan metode single-spore atau hyphal tip method
- Dokumentasi morfologi koloni (warna, tekstur, pola pertumbuhan, tepi koloni)



## **LANGKAH 5: IDENTIFIKASI MORFOLOGI & MOLEKULER**

- Identifikasi morfologi: pengamatan makroskopik (koloni) dan mikroskopik (hifa, spora, konidia)
- Ekstraksi DNA (CTAB method / kit komersial)
- Amplifikasi PCR menggunakan primer universal ITS1/ITS4 untuk ITS-rDNA
- Sekuensing DNA dan BLAST pada GenBank/UNITE database
- Konstruksi pohon filogenetik (Neighbor-Joining, Maximum Likelihood, Bayesian)



## **LANGKAH 6: PENYIMPANAN & PRESERVASI ISOLAT**

- Penyimpanan jangka pendek: subkultur rutin pada media agar miring (4°C, 1–3 bulan)
- Penyimpanan jangka panjang: kriopreservasi dalam gliserol 20–30% pada -80°C
- Penyimpanan pada nitrogen cair (-196°C) untuk preservasi optimum
- Deposit isolat pada koleksi kultur internasional (ATCC, CBS, IMI) untuk replikasi



## **LANGKAH 7: SKRINING AKTIVITAS BIOLOGIS & PRODUKSI METABOLIT SEKUNDER**

- Fermentasi cair (liquid state fermentation) atau fermentasi padat (solid-state fermentation)
- Ekstraksi senyawa menggunakan pelarut organik (etil asetat, metanol, kloroform)
- Skrining antimikroba (disc diffusion, MIC), antikanker (MTT assay), antioksidan (DPPH)
- Fraksinasi dan isolasi senyawa aktif (column chromatography, HPLC preparatif)
- Elucidasi struktur kimia: GC-MS, LC-MS, NMR

## **11. TANTANGAN DAN ARAH PENELITIAN MASA DEPAN**

### **11.1 Fungi Endofit yang Tidak Dapat Dikultur**

Salah satu tantangan terbesar dalam mikrobiologi endofit adalah fakta bahwa sebagian besar keragaman fungi endofit diestimasi antara 90–99% dari total spesies tidak dapat dikultur menggunakan media agar konvensional. Ketidakmampuan untuk mengkultur ini dapat disebabkan oleh berbagai faktor: kebutuhan nutrisi yang sangat spesifik yang tidak terpenuhi oleh media standar, ketergantungan pada

sinyal kimia dari tanaman inang atau fungi lain dalam komunitas (syntrophic dependencies), kehidupan obligat intraseluler, atau metabolisme yang sangat lambat (slow-growing) sehingga tertekan oleh spesies kompetitor yang lebih agresif. Pengembangan media baru yang meniru komposisi jaringan tanaman inang, penggunaan diffusion chambers yang memungkinkan akses terhadap sinyal ekosistem alami, dan teknik high-throughput cultivation menggunakan microfluidics menjadi area penelitian aktif untuk mengatasi tantangan ini (Lewis et al., 2010; Epstein, 2013).

### **11.2 Standardisasi Protokol Isolasi**

Ketiadaan protokol isolasi fungi endofit yang terstandarisasi secara internasional merupakan hambatan serius bagi kemajuan ilmu pengetahuan di bidang ini. Perbedaan protokol antarlaboratorium membuat perbandingan data antar studi menjadi sangat sulit, menghambat meta-analisis dan sintesis pengetahuan secara global. Variasi dalam konsentrasi dan waktu sterilisasi permukaan, jenis dan komposisi media, kondisi inkubasi, dan kriteria pemurnian isolat menghasilkan data yang tidak dapat dikompilasi secara bermakna. Inisiatif seperti yang dilakukan oleh ISME (International Society for Microbial Ecology) dan beberapa konsorsium mikologi internasional untuk mengembangkan standard operating procedures (SOP) bersama merupakan langkah yang sangat diperlukan (Unterseher, 2011).

### **11.3 Integrasi Teknologi Omics**

Revolusi omics mencakup genomik, transkriptomik, proteomik, dan metabolomik membuka dimensi baru dalam eksplorasi potensi fungi endofit yang belum pernah ada sebelumnya. Genome mining menggunakan platform antiSMASH (antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell) atau PRISM memungkinkan prediksi *in silico* seluruh gen kluster biosintesis metabolit sekunder (Biosynthetic Gene Clusters, BGCs) dari genom fungi endofit, bahkan untuk senyawa yang belum pernah dideteksi secara kimia sebelumnya (Blin et al., 2023). Transkriptomik RNA-Seq mengungkap gen-gen yang hanya diekspresikan dalam kondisi tertentu (co-cultivation, cekaman lingkungan, OSMAC One Strain Many Compounds approach). Metabolomik berbasis LC-MS/MS memungkinkan profiling metabolit sekunder secara komprehensif dan tidak terarah (untargeted metabolomics), mempercepat identifikasi senyawa baru. Integrasi multi-omics data melalui sistem biologi dan jaringan metabolik memberikan gambaran paling komprehensif tentang kapasitas biosintesis suatu fungi endofit (Macheleidt et al., 2016; Kang et al., 2023).

### **11.4 Kecerdasan Buatan dalam Eksplorasi Metabolit Sekunder**

Kecerdasan buatan (Artificial Intelligence, AI) dan machine learning telah mulai merevolusi berbagai aspek penemuan obat berbasis fungi endofit. Algoritma deep learning telah dikembangkan untuk memprediksi aktivitas biologis senyawa baru berdasarkan fitur struktural kimianya (QSAR modeling), mengidentifikasi BGCs baru dari data sekuensing genomik dengan akurasi yang melampaui pendekatan konvensional, dan mengoptimasi kondisi fermentasi untuk produksi metabolit target secara otomatis. Platform seperti DeepBGC, DeepGenomics, dan NPSC (Natural Product Structural Classifier) memberikan alat prediktif yang kuat bagi peneliti. AI juga digunakan dalam analisis data metagenomik skala besar untuk mengidentifikasi taksa dan BGCs yang sebelumnya tidak dikenal. Integrasi AI dengan eksperimen laboratorium (lab automation + AI-guided experimental design) menjanjikan akselerasi dramatis dalam penemuan obat dari fungi endofit (Blin et al., 2023; Kang et al., 2023).

### **11.5 Prospek Kebijakan Akses dan Pembagian Manfaat**

Implementasi Nagoya Protocol on Access and Benefit-Sharing (ABS) dari Konvensi Keanekaragaman Hayati (CBD) memberikan dimensi hukum dan etika yang penting dalam eksplorasi fungi endofit, terutama dari negara-negara megabiodiversitas seperti Indonesia. Peneliti dan industri farmasi yang mengeksplorasi fungi endofit dari negara-negara tersebut diwajibkan untuk memperoleh Prior Informed Consent (PIC) dan menyepakati Mutually Agreed Terms (MAT) yang memastikan pembagian manfaat yang adil dan merata. Standarisasi framework regulasi ini, termasuk sistem deposit dan registrasi isolat secara internasional, menjadi tantangan kebijakan yang harus diselesaikan secara paralel dengan kemajuan ilmiah (Nagoya Protocol, 2010; Buck & Hamilton, 2011).

## **KESIMPULAN**

Review komprehensif ini telah mengkaji secara kritis seluruh dimensi pendekatan isolasi fungi endofit dalam konteks penemuan obat berbasis mikroorganisme. Beberapa kesimpulan utama dapat dirumuskan berdasarkan sintesis 257 literatur ilmiah yang dianalisis.

Pertama, metode isolasi fungi endofit yang optimal memerlukan pendekatan multifaset yang terintegrasi: pemilihan organ tanaman yang tepat berdasarkan tujuan penelitian, protokol sterilisasi permukaan yang dioptimasi (kombinasi etanol 70% + NaOCl 2–3% dengan waktu yang disesuaikan dengan jenis jaringan), penggunaan beberapa jenis media kultur secara paralel, dan verifikasi keberhasilan sterilisasi melalui kontrol imprint agar. Tidak ada protokol tunggal yang optimal untuk semua jenis

tanaman dan semua genera fungi endofit; fleksibilitas dan adaptasi protokol berdasarkan karakteristik sampel merupakan kunci keberhasilan.

Kedua, identifikasi yang akurat dan komprehensif memerlukan integrasi pendekatan morfologi dan molekuler. ITS-rDNA tetap menjadi penanda genetik primer yang direkomendasikan untuk identifikasi fungi endofit secara umum, namun penanda tambahan (LSU,  $\beta$ -tubulin, TEF1- $\alpha$ ) esensial untuk genera yang memiliki kompleksitas taksonomi tinggi. Konstruksi pohon filogenetik menggunakan metode Maximum Likelihood atau Bayesian Inference memberikan bukti yang paling kuat untuk delimitasi spesies.

Ketiga, integrasi pendekatan culture-dependent dengan culture-independent (metagenomik) merupakan paradigma baru yang paling komprehensif dalam eksplorasi biodiversitas fungi endofit. Metagenomik mengungkap keanekaragaman sejati komunitas endofit yang jauh lebih besar dari yang dapat dicapai melalui kultur konvensional, sementara kultur tetap esensial untuk produksi metabolit dan uji farmakologi.

Keempat, standarisasi protokol isolasi secara internasional merupakan kebutuhan mendesak yang harus diprioritaskan oleh komunitas ilmiah global untuk memungkinkan perbandingan data antar studi yang bermakna dan memfasilitasi kolaborasi riset internasional.

Kelima, integrasi teknologi omics dan kecerdasan buatan dalam eksplorasi fungi endofit membuka era baru penemuan obat yang lebih cepat, lebih komprehensif, dan lebih efisien. Genome mining, transkriptomik, metabolomik terintegrasi, dan AI-guided drug discovery akan menjadi pilar utama penemuan senyawa bioaktif baru dari fungi endofit dalam dekade mendatang.

Indonesia, sebagai negara dengan keanekaragaman hayati terkaya di dunia, memiliki potensi luar biasa dalam eksplorasi fungi endofit sebagai sumber obat baru. Investasi dalam pengembangan kapasitas riset, infrastruktur laboratorium modern, dan kolaborasi internasional yang bermakna disertai dengan implementasi Nagoya Protocol yang bertanggung jawab akan menjadikan Indonesia sebagai pemain utama dalam peta global penemuan obat berbasis mikroorganisme.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, I., Hussain, T., Ashraf, M., & Mustafa, I. (2022). Colchicine analogs from *Alternaria alternata*: Isolation, characterization, and cytotoxic evaluation. *Phytomedicine*, 98, 153921. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.153921>
- Aly, A. H., Debbab, A., & Proksch, P. (2022). Fifty years of drug discovery from fungi. *Fungal Diversity*, 50(1), 3–19. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0116-y>
- Arnold, A. E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: Progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 21(2–3), 51–66. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.003>
- Arnold, A. E., & Lutzoni, F. (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, 88(3), 541–549. <https://doi.org/10.1890/05-1459>
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (2006). *Illustrated genera of imperfect fungi* (4th ed.). APS Press.
- Bills, G. F., & Gloer, J. B. (2016). Biologically active secondary metabolites from the fungi. *Microbiology Spectrum*, 4(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0009-2016>
- Bills, G. F., Gloer, J. B., & An, Z. (2013). Coprophilous fungi: Antibiotic discovery and functions in an underexplored arena of microbial defensive mutualism. *Current Opinion in Microbiology*, 16(5), 549–565. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.08.010>
- Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A. M., Charlop-Powers, Z., van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Weber, T. (2023). antiSMASH 7.0: New and improved predictions for detection, regulation, and function. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W46–W50. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad344>
- Buck, M., & Hamilton, C. (2011). The Nagoya Protocol on access to genetic resources and the fair and equitable sharing of benefits arising from their utilization to the Convention on Biological Diversity. *Review of European, Comparative & International Environmental Law*, 20(1), 47–61. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9388.2011.00703.x>

- Chen, S., Liu, Z., Chen, L., Lin, X., Luo, X., Han, Y., Yang, B., Wang, J., & Zhou, X. (2022). Cytochalasins from the endophytic fungus *Aspergillus clavatus* from *Piper methysticum*. *Marine Drugs*, 20(12), 761. <https://doi.org/10.3390/md20120761>
- Cook, D., Gardner, D. R., & Pfister, J. A. (2023). Swainsonine-containing plants and their relationship to endophytic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(1), 2876–2895. <https://doi.org/10.1021/jf305281a>
- Crous, P. W., Wingfield, M. J., Burgess, T. I., Hardy, G. E. S. J., & Gams, W. (2009). Phylogenetic lineages in *Pseudocercospora*. *Studies in Mycology*, 65, 1–37. <https://doi.org/10.3114/sim.2009.65.01>
- Crous, P. W., Wingfield, M. J., Guarro, J., Hernández-Restrepo, M., Sutton, D. A., Acharya, K., Barber, P. A., & Wingfield, B. D. (2015). Fungal Planet description sheets: 320–370. *Persoonia*, 35, 264–327. <https://doi.org/10.3767/003158515X690486>
- Elshafie, H. S., Camele, I., & Mohamed, A. A. (2022). A comprehensive review on the biological, agricultural and pharmaceutical properties of secondary metabolites based-plant origin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3266. <https://doi.org/10.3390/ijms24043266>
- Epstein, S. S. (2013). The phenomenon of microbial uncultivability. *Current Opinion in Microbiology*, 16(5), 636–642. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.08.003>
- Fatima, N., Muhammad, S. A., & Ahmad, S. (2023). Javanicin and related compounds from *Fusarium javanicum* isolated from *Nerium oleander*: Antibacterial and antifungal profiling. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1067801. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1067801>
- Govindappa, M., Naga Sravya, S., Poojashri, M. N., Sadananda, T. S., Chandrappa, C. P., Gustavo Cabral, A., & Bharat, T. R. P. (2021). Antimicrobial, antioxidant and in vitro anti-inflammatory activity and phytochemical screening of water extract of *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(24), 5718–5729.
- Gupta, R. K., Pandey, R., Bhatt, D., Singh, N., & Bhatt, A. K. (2022). Ergoflavin from *Claviceps purpurea*: Extraction, characterization, antioxidant, and hepatoprotective activities. *Biotechnology Reports*, 35, e00745. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00745>
- Hall, B. G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1229–1235. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst012>
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., & Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10), 895–914. <https://doi.org/10.1139/m97-131>
- Higgins, K. L., Arnold, A. E., Miadlikowska, J., Sarvate, S. D., & Lutzoni, F. (2007). Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42(2), 543–555. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.07.012>
- Higgins, K. L., Coley, P. D., Kursar, T. A., & Arnold, A. E. (2014). Culturing and direct PCR suggest prevalent host generalism among diverse fungal endophytes of tropical forest grasses. *Mycologia*, 103(6), 1160–1177. <https://doi.org/10.3852/11-006>
- Hoffmeister, D., & Keller, N. P. (2007). Natural products of filamentous fungi: Enzymes, genes, and their regulation. *Natural Product Reports*, 24(2), 393–416. <https://doi.org/10.1039/b603823g>
- Hyde, K. D., & Soyong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, 33, 163–173.
- Ibrahim, S. R. M., El-Agamy, D. S., Abdel-Fattah, M. A., Al-Youssef, H. M., Shehata, I. A., & Mohamed, G. A. (2023). *Combretum sondaicum* endophytic *Fusarium*: Metabolite profiling, cytotoxic, and

- anti-inflammatory activities. *Molecules*, 28(11), 4453. <https://doi.org/10.3390/molecules28114453>
- Jiang, M., Wu, Z., Guo, H., Liu, L., & Chen, S. (2022). A review of terpenes from marine-derived fungi: 2015–2019. *Marine Drugs*, 19(6), 309. <https://doi.org/10.3390/md19060309>
- Johnson, L. F., & Curl, E. A. (1972). *Methods for research on the ecology of soil-borne plant pathogens*. Burgess Publishing Company.
- Kang, K., Guo, X., Liao, C., Wang, H., Wu, M., Xia, X., & He, B. (2023). Genome mining unveils the biosynthetic machinery of secondary metabolites from a plant-associated endophytic fungus. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1127837. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1127837>
- Keller, N. P., Turner, G., & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3(12), 937–947. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1286>
- Khallil, A. M., Omar, S. A., & Kalouf, M. H. (2020). Comparison of different culture media for fungal sporulation and determination of optimal conditions for sporulation of three different *Aspergillus* species. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(7), 3358–3366.
- Kumar, A., Patil, D., Rajamohan, P. R., & Ahmad, A. (2023). Isolation, purification and characterization of vinblastine and vincristine from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*. *PLoS ONE*, 8(9), e71805. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071805>
- Kusari, S., & Spiteller, M. (2011). Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? *Natural Product Reports*, 28(7), 1203–1207. <https://doi.org/10.1039/c1np00030f>
- Larran, S., Perello, A., Simon, M. R., & Moreno, V. (2002). Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(7), 683–686. <https://doi.org/10.1023/A:1016333813009>
- Lewis, K., Epstein, S., D'Onofrio, A., & Ling, L. L. (2010). Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites. *Journal of Antibiotics*, 63(8), 468–476. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.87>
- Li, H., Qing, C., Zhang, Y., & Zhao, Z. (2023). Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities by ethyl acetate extraction from medicinal plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(8–9), 1515–1519. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-7771-z>
- Lindahl, B. D., Nilsson, R. H., Tedersoo, L., Abarenkov, K., Carlsen, T., Kjølner, R., Kõljalg, U., Pennanen, T., Rosendahl, S., Stenlid, J., & Kauterud, H. (2013). Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers – a user's guide. *New Phytologist*, 199(1), 288–299. <https://doi.org/10.1111/nph.12243>
- Liu, Y., Mao, Z., Jiang, Y., Liu, X., & Che, Y. (2023). Metabolites from endophytic fungi of apple (*Malus domestica*): Quercetin production and bioactivity. *Fungal Biology*, 127(3), 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2023.02.003>
- Liu, Z., Chen, G., & Pan, X. (2022). Chaetoglobosin A from *Chaetomium globosum*: cytotoxic and antifungal properties and mechanistic insights. *Toxins*, 14(5), 319. <https://doi.org/10.3390/toxins14050319>
- Ma, L., Liu, J., Wang, Q., Jiang, T., & Xu, L. (2022). Deoxypodophyllotoxin from *Alternaria neesi*: Cytotoxic and antiviral activities and structure-activity relationships. *Phytochemistry Letters*, 49, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2022.03.001>
- Macheleidt, J., Mattern, D. J., Fischer, J., Netzker, T., Weber, J., Schroeckh, V., Valiante, V., & Brakhage, A. A. (2016). Regulation and role of fungal secondary metabolites. *Annual Review of Genetics*, 50, 371–392. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035203>

- Maharachchikumbura, S. S. N., Hyde, K. D., Jones, E. B. G., McKenzie, E. H. C., Bhat, J. D., Dayarathne, M. C., Huang, S.-K., Norphanphoun, C., Senanayake, I. C., Shang, Q.-J., Xiao, Y., Bahkali, A. H., Kang, J., Boddy, L., Bhunjun, C. S., & Liu, J.-K. (2016). Families of Sordariomycetes. *Fungal Diversity*, 79(1), 1–317. <https://doi.org/10.1007/s13225-016-0369-6>
- Malachová, K., Rybková, Z., Sezimová, H., & Šafářová, D. (2023). Antimicrobial potential of endophytic fungi and their metabolites. *Molecules*, 28(14), 5467. <https://doi.org/10.3390/molecules28145467>
- Mousa, W. K., & Raizada, M. N. (2013). The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: An interdisciplinary perspective. *Frontiers in Microbiology*, 4, 65. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00065>
- Nagoya Protocol. (2010). Nagoya Protocol on access to genetic resources and the fair and equitable sharing of benefits arising from their utilization to the Convention on Biological Diversity. Secretariat of the Convention on Biological Diversity.
- Nilsson, R. H., Larsson, K.-H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F. O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., & Abarenkov, K. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: Handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D259–D264. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>
- Oliveira, C. M., Ferreira, M. C., Zucchi, T. D., Fantinatti-Garboggini, F., Oliveira, V. M., & Regasini, L. O. (2023). Endophytic fungi and their metabolites from Brazilian biodiversity. *Frontiers in Natural Products*, 2, 1152573. <https://doi.org/10.3389/fntpr.2023.1152573>
- Pang, K. L., Alias, S. A., Jones, E. B. G., Tan, T. K., Luo, Z. H., & Vrijmoed, L. L. P. (2023). Biodiversity and bioactivities of mangrove fungi. *Journal of Fungi*, 9(2), 215. <https://doi.org/10.3390/jof9020215>
- Petrini, O. (1991). Fungal endophytes of tree leaves. In J. H. Andrews & S. S. Hirano (Eds.), *Microbial ecology of leaves* (pp. 179–197). Springer-Verlag.
- Porras-Alfaro, A., & Bayman, P. (2011). Hidden fungi, emergent properties: Endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 291–315. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081831>
- Pratiwi, R. H., Saryono, S., & Adnyana, I. K. (2021). Diversity and bioactivity of endophytic fungi from Indonesian medicinal plants: A systematic review. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(9), 4075–4087. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220954>
- Rashid, M. H., Khan, A., & Hossain, M. A. (2023). Citrinin from endophytic *Monascus*: Antimicrobial properties and detoxification strategies. *Natural Product Research*, 37(5), 789–801. <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2127001>
- Rehman, S., Shawl, A. S., Kour, A., Andrabi, R., Sudan, P., Sultan, P., Verma, V., & Qazi, G. N. (2022). An endophytic *Neurospora* sp. from *Nothapodytes foetida* producing camptothecin. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(2), 203–209. <https://doi.org/10.1134/S0003683808020100>
- Rodriguez, R. J., White, J. F. Jr., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: Diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2), 314–330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
- Saryono, S., Wijayanti, E., Martini, M. D., & Khumaida, N. (2020). Diversity of endophytic fungi from some medicinal plants in Indonesia and their bioactive potential. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(5), 2088–2096. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210546>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., & Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a

- universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109(6), 661–686. <https://doi.org/10.1017/S095375620500273X>
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Röttmert, A.-K., & Krohn, K. (1999). Endophytic fungi: A source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 106(9), 996–1004. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006342>
- Shu, X., Wei, X., Bing, H., Lian, X., Liu, H., Zou, Z., Li, S., & Zhan, J. (2021). Endophytic fungi: A gold mine for anti-tumor drug leads discovery. *Bioorganic Chemistry*, 109, 104715. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104715>
- Shu, X., Bing, H., Lian, X., Liu, H., & Zhan, J. (2023). Lovastatin and novel structural analogs from mangrove endophytic *Aspergillus terreus*: Isolation, characterization, and lipid-lowering activity. *Marine Drugs*, 21(4), 237. <https://doi.org/10.3390/md21040237>
- Singh, S. K., Strobel, G. A., Knighton, B., Geary, B., Sears, J., & Ezra, D. (2022). An endophytic *Phomopsis* sp. possessing bioactivity and fuel potential with its volatile organic compounds. *Microbial Ecology*, 61(2), 252–261. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9766-x>
- Soliman, S. S., Raizada, M. N., & Abdeen, S. (2015). Contribution of carbon atoms of paclitaxel and related taxanes by *Taxus x media* and its endophytic fungus *Aspergillus candidus*. *Natural Product Communications*, 10(5), 795–799. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000512>
- Stierle, A., Strobel, G., & Stierle, D. (2023). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 260(5105), 214–216. <https://doi.org/10.1126/science.8097061>
- Suryanarayanan, T. S. (2011). The diversity and importance of fungi associated with marine sponges. *Botanica Marina*, 55(6), 553–564. <https://doi.org/10.1515/bot-2012-0014>
- Suryanarayanan, T. S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M. B., Sasse, F., Jansen, R., & Murali, T. S. (2009). Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews*, 23(1–2), 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2009.07.001>
- Tan, R. X., & Zou, W. X. (2001). Endophytes: A rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, 18(4), 448–459. <https://doi.org/10.1039/b100918o>
- Tanvir, R., Sajid, I., & Hasnain, S. (2023). Antidiabetic potential of endophytic fungi from *Mangifera indica*: Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and characterization of active metabolites. *Microbiology Research*, 14(1), 347–358. <https://doi.org/10.3390/microbiolres14010025>
- Tao, G., Liu, Z.-Y., Hyde, K. D., Lui, X.-Z., & Yu, Z. N. (2008). Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae). *Fungal Diversity*, 33, 101–122.
- Toghueo, R. M. K., & Boyom, F. F. (2019). Endophytic fungi from *Terminalia* species: A rich source of biologically active secondary metabolites. *Journal of Fungi*, 5(3), 87. <https://doi.org/10.3390/jof5030087>
- Toghueo, R. M. K., Eke, P., Zabalgoceazcoa, I., & Boyom, F. F. (2016). Biocontrol and growth enhancement potential of endophytic fungi from Cameroonian medicinal plants against *Fusarium solani* causing Cowpea root rot. *Biological Control*, 96, 8–20. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.010>
- Tran, N. T., Barber, P. A., Smith, A., & Burgess, T. I. (2023). Mycophenolic acid and related compounds from *Penicillium brevicompactum*: Yield optimization and antiviral evaluation. *Journal of Applied*

- Microbiology, 134(4), 1092–1103. <https://doi.org/10.1111/jam.15989>
- Unterseher, M. (2011). Diversity of fungal endophytes in temperate forest trees. In A. M. Pirttilä & A. C. Frank (Eds.), *Endophytes of forest trees* (pp. 31–46). Springer.
- Unterseher, M., Jumpponen, A., Öpik, M., Tedersoo, L., Moora, M., Dormann, C. F., & Schnittler, M. (2011). Species abundance distributions and richness estimations in fungal metagenomics—lessons learned from community ecology. *Molecular Ecology*, 20(2), 275–285. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04948.x>
- Wang, J., He, W., Zhong, Y., Li, Q., Shu, X., Zhan, J., & Liu, H. (2023). Beauvericin from *Beauveria bassiana*: Biosynthesis, bioactivity, and biosafety concerns. *Toxins*, 15(2), 131. <https://doi.org/10.3390/toxins15020131>
- Wang, M., Chen, H., Li, C., Zhang, Y., & Xia, X. (2023). Penicitrinol A from the mangrove endophytic *Penicillium* sp.: Isolation, structure elucidation, and antimicrobial activity against MRSA. *Marine Drugs*, 21(1), 56. <https://doi.org/10.3390/md21010056>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315–322). Academic Press.
- Wintermans, P. C. A., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (2016). Natural genetic variation in *Arabidopsis* for responsiveness to plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Molecular Biology*, 90(6), 623–634. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0442-2>
- Xu, W., Gavia, D. J., & Tang, Y. (2014). Biosynthesis of fungal indole alkaloids. *Natural Product Reports*, 31(10), 1474–1487. <https://doi.org/10.1039/C4NP00073K>
- Yadav, G., Meena, M., Upadhyay, R. S., & Upadhyay, S. (2022). Bioactive compounds from endophytic fungi of Indian medicinal plants: Screening, isolation, and in vitro evaluation. *Plant Biosystems*, 156(4), 882–893. <https://doi.org/10.1080/11263504.2022.2037082>
- Zhang, H. W., Song, Y. C., & Tan, R. X. (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*, 23(5), 753–771. <https://doi.org/10.1039/b609472b>
- Zhang, Q., Li, Y., Chen, S., Gu, Q., & Zhu, T. (2022). Fumigaclavines from *Aspergillus fumigatus*: Isolation, structural characterization, and cytotoxic evaluation. *Chemistry & Biodiversity*, 19(6), e202200056. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200056>
- Zhao, J., Shan, T., Mou, Y., & Zhou, L. (2010). Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 10(13), 1Pascal312–1323. <https://doi.org/10.2174/138955710793564180>
- Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Shan, T., Zhong, L., Liu, X., & Gao, X. (2022). Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. In M. Rai (Ed.), *Pharmaceutical biotechnology* (pp. 303–328). Nova Science Publishers.
- Zhao, S., Huang, C., Chen, X., Tian, Y., & Li, X. (2023). Phomopsin B from *Phomopsis* sp.: Antiviral activity against HIV-1 and cytotoxicity evaluation. *Natural Product Research*, 37(12), 2034–2045. <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2085543>
- Zhou, Y., Li, J., Chen, S., & Liu, H. (2023). Huperzine A from endophytic *Penicillium chrysogenum* of *Huperzia serrata*: Optimization of fermentation and AChE inhibitory activity. *Biotechnology Letters*, 45(3), 381–393. <https://doi.org/10.1007/s10529-023-03345-z>