

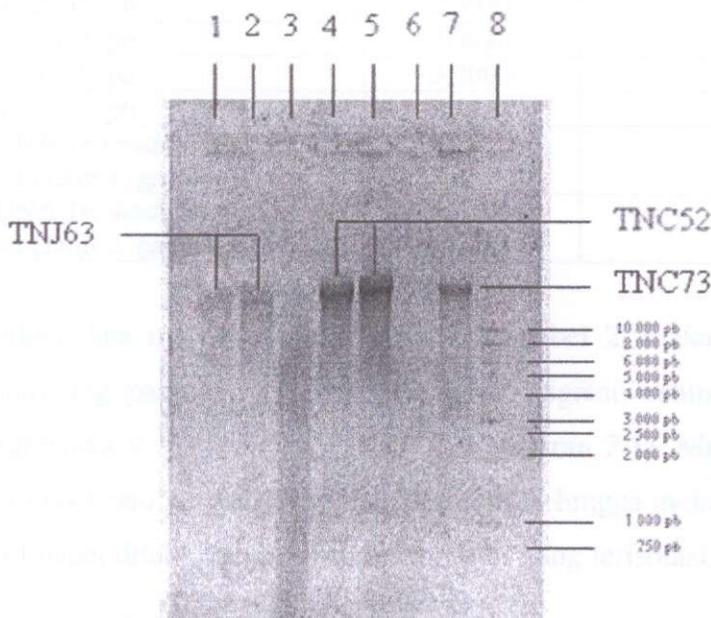
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

4.1.1. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA kromosomal dilakukan dengan metode kit Wizard Genomic yang menggunakan enzim litikase sebagai pemecah dinding sel. Isolasi DNA dilakukan pada miselium yang berumur 4 dan 5 hari. Isolat DNA kemudian diuji dengan elektroforesis gel agarosa 0.8% dan memberikan pita yang terlihat jelas dengan deteksi menggunakan ethidium bromida (Gambar 9). Pita DNA terlihat jelas pada miselium yang berumur 4 hari (Gambar 9, jalur 1 dan 2), sedangkan yang berumur 5 hari tidak terlihat adanya pita (Gambar 9, jalur 3). Isolat DNA *Trichoderma sp.* TNC52 dan *Gliocladium sp.* TNC73 digunakan sebagai perbandingan.



Gambar 9. Foto hasil gel elektroforesis isolasi DNA *Trichoderma sp.* TNJ63.

Keterangan: Jalur 1 dan 2: Isolat DNA *Trichoderma sp.* TNJ63 dari miselium berumur 4 hari. Jalur 3: Isolat DNA *Trichoderma sp.* TNJ63 dari miselium berumur 5 hari. Jalur 4 dan 5: Isolat DNA *Trichoderma sp.* TNC52 dari miselium berumur 4 hari. Jalur 6: Isolat DNA *Trichoderma sp.* TNC52 dari miselium berumur 5 hari. Jalur 7: Isolat DNA *Gliocladium sp.* TNC73 dari miselium berumur 5 hari. Jalur 8: Standar 1 Kb DNA Ladder dengan 10 pita.

4.1.2. Berat molekul DNA

Berat molekul DNA ditentukan dengan mengelektroforesis isolat DNA dan standar 1 Kb DNA *Ladder* pada gel agarosa 0,8% yang sama (Gambar 9). Pita-pita isolat dan standar DNA yang terlihat jelas pada gel diukur jarak migrasinya (Tabel 2). Standar DNA memiliki 13 buah pita dengan berat molekul yang berbeda satu sama lain, namun pada gel yang terlihat jelas hanya 10 buah pita.

Tabel 2. Migrasi isolat DNA *Trichoderma sp.* TNJ63 dan standar DNA pada gel elektroforesis.

No.	Sampel DNA	Log pasangan basa	Migrasi sampel DNA (mm)
1.	Standar 10.000 pb	4,0000	33
2.	Standar 8.000 pb	3,9031	35
3.	Standar 6.000 pb	3,7782	38
4.	Standar 5.000 pb	3,6989	40
5.	Standar 4.000 pb	3,6021	43
6.	Standar 3.000 pb	3,4771	47
7.	Standar 2.500 pb	3,3979	49
8.	Standar 2.000 pb	3,3010	53
9.	Standar 1.000 pb	3,0000	63
10.	Standar 750 pb	2,8751	66
11.	Isolat DNA <i>Trichoderma sp.</i> TNJ63 hari ke-4 (Jalur 1, gambar 9)	-	29
12.	Isolat DNA <i>Trichoderma sp.</i> TNJ63 hari ke-4 (Jalur 2, gambar 9)	-	28

Berdasarkan data migrasi standar DNA pada tabel 2, maka dibuat kurva hubungan antara log pasangan basa dengan jarak migrasi, sehingga diperoleh persamaan regresinya $y = - 0,0327x + 5,0327$ (Lampiran 2.1). Migrasi rata-rata isolat DNA *Trichoderma sp.* TNJ63 adalah 28,5 mm, sehingga melalui persamaan regresi tersebut dapat ditentukan berat molekul DNA yang terisolasi, yaitu :

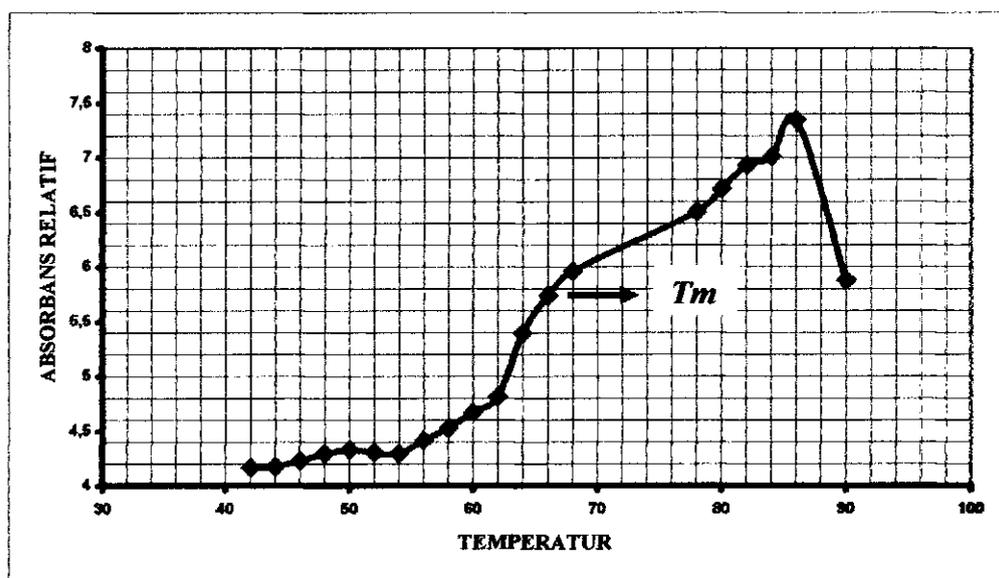
$$\begin{aligned}y &= - 0,0327x + 5,0327 \\ &= - 0,0327 (28,5) + 5,0327 \\ y &= 4,10075 \\ \text{Log pb} &= 4,10075 \\ \text{BM} &= 12.611 \text{ pb}\end{aligned}$$

4.1.3. Kemurnian DNA

Kemurnian DNA ditentukan berdasarkan nilai perbandingan A_{260}/A_{280} . Nilai absorbans isolat DNA *Trichoderma sp.* TNJ63 pada panjang gelombang 260 dan 280 nm adalah 0,155 dan 0,086. Melalui perbandingan A_{260}/A_{280} maka diperoleh nilai sebesar 1,802, yang menunjukkan bahwa isolat DNA cukup murni.

4.1.4. Titik leleh dan %(G+C) DNA

Titik leleh DNA adalah temperatur pada saat 50% untai ganda DNA terpisah menjadi untai tunggal dalam larutan, dan ditentukan nilainya dari nilai tengah kurva T_m . Kurva T_m diperoleh dari pengukuran absorbans isolat DNA *Trichoderma sp.* TNJ63 pada panjang gelombang 260 nm pada rentang temperatur 30 – 90°C (Lampiran 3). Titik leleh (T_m) ditentukan melalui kurva hubungan antara absorbans relatif terhadap temperatur (Gambar 10).



Gambar 10. Kurva titik leleh (T_m) DNA *Trichoderma sp.* TNJ63

Berdasarkan kurva T_m pada gambar 10 dapat diketahui bahwa titik leleh DNA *Trichoderma sp.* TNJ63 hasil isolasi adalah 66°C. Setelah nilai T_m diperoleh, maka dapat ditentukan nilai %(G+C)nya menggunakan rumus yang dikemukakan oleh De Ley (1970), yaitu :

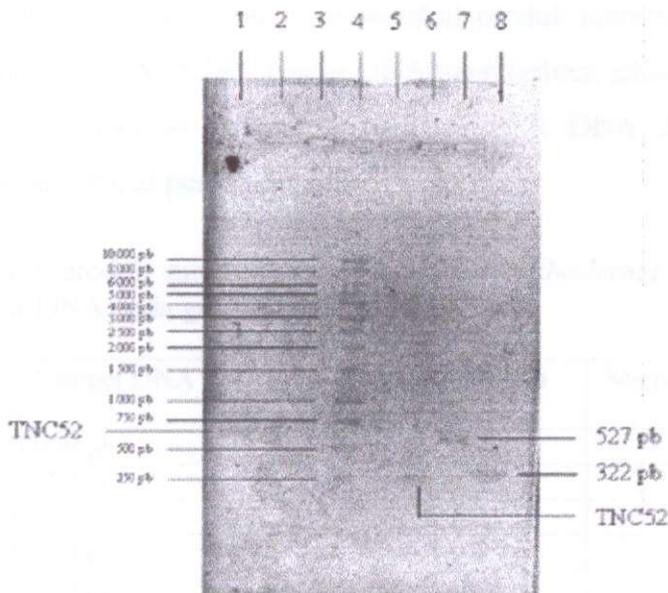
$$\%(G+C) = (T_m - 63,7) / 0,41$$

$$= (66 - 63,7) / 0,41$$

$$\%(G+C) = 5,61\%$$

4.1.5. Amplifikasi *Polymerase Chain Reaction*

Amplifikasi PCR isolat DNA pada daerah ITS-1, 5.8S, dan ITS-2 dilakukan dengan menggunakan kombinasi primer ITS5-ITS4 dan ITS1-ITS4. Amplifikasi dilakukan dengan volume total 50 μ L, yang mengandung sampel DNA, aquadest steril, campuran dNTP, bufer PCR, masing-masing primer, dan *Taq* DNA polimerase.



Gambar 11. Foto hasil gel elektroforesis produk amplifikasi PCR DNA *Trichoderma sp.* TNJ63.

Keterangan : Jalur 1 : Produk amplifikasi PCR DNA *Trichoderma sp.* TNC52 dengan kombinasi primer ITS5-ITS4. Jalur 2 : Produk amplifikasi PCR DNA *Trichoderma sp.* TNC52 dengan kombinasi primer ITS1-ITS4. Jalur 3 : Produk amplifikasi PCR DNA *Trichoderma sp.* TNC52 dengan kombinasi primer ITS3-ITS4. Jalur 4 : Standar 1 Kb DNA Ladder dengan 13 pita. Jalur 5 : Kontrol (tanpa sampel isolat DNA). Jalur 6 : Produk amplifikasi PCR DNA *Trichoderma sp.* TNC52 dengan kombinasi primer ITS5-ITS2. Jalur 7 : Produk amplifikasi PCR DNA *Trichoderma sp.* TNJ63 dengan kombinasi primer ITS5-ITS4. Jalur 8 : Produk amplifikasi PCR DNA *Trichoderma sp.* TNJ63 dengan kombinasi primer ITS1-ITS4.

Tahap awal amplifikasi PCR adalah menentukan kondisi terbaik proses PCR agar diperoleh produk spesifik. Penentuan kondisi PCR dilakukan dengan memvariasikan jumlah sampel dan temperatur annealing. Proses PCR pertama dilakukan dengan menggunakan jumlah sampel 1 μ L dan temperatur annealing 50°C. Setelah dianalisis pada gel elektroforesis agarosa 1,2% ternyata tidak diperoleh pita produk. Proses PCR kedua dilakukan dengan menggunakan jumlah sampel 3 μ L dan temperatur annealing 45°C. Produk amplifikasi PCR dan standar DNA kemudian dielektroforesis pada gel agarosa 1,2% yang sama dan memberikan pita yang terlihat jelas dengan deteksi menggunakan ethidium bromida (Gambar 11). Standar DNA memberikan 13 buah pita yang terlihat jelas dan digunakan untuk menentukan berat molekul produk amplifikasi PCR. Pita-pita produk amplifikasi PCR dan standar DNA yang terlihat jelas pada gel diukur jarak migrasinya (Tabel 3). Produk amplifikasi PCR DNA *Trichoderma sp.* TNC52 digunakan sebagai perbandingan.

Tabel 3. Migrasi produk amplifikasi PCR DNA *Trichoderma sp.* TNJ63 dan standar DNA pada gel elektroforesis.

No.	Sampel DNA	Log pasangan basa	Migrasi sampel DNA (mm)
1.	Standar 10.000 pb	4,0000	23
2.	Standar 8.000 pb	3,9031	25
3.	Standar 6.000 pb	3,7782	28
4.	Standar 5.000 pb	3,6989	29
5.	Standar 4.000 pb	3,6021	31
6.	Standar 3.000 pb	3,4771	34
7.	Standar 2.500 pb	3,3979	37
8.	Standar 2.000 pb	3,3010	39
9.	Standar 1.500 pb	3,1761	44
10.	Standar 1.000 pb	3,0000	50
11.	Standar 750 pb	2,8751	54
12.	Standar 500 pb	2,6989	59
13.	Standar 250 pb	2,3979	65
14.	Produk PCR ITS5-ITS4 dan templat <i>Trichoderma sp.</i> TNJ63	-	57
15.	Produk PCR ITS1-ITS4 dan templat <i>Trichoderma sp.</i> TNJ63	-	63

Berdasarkan data migrasi standar DNA pada tabel 3, maka dibuat kurva hubungan antara log pasangan basa dengan jarak migrasi, sehingga diperoleh persamaan regresinya $y = - 0,0356x + 4,7507$ (Lampiran 2.2). Migrasi produk amplifikasi PCR DNA *Trichoderma sp.* TNJ63 dengan kombinasi primer ITS5-ITS4 adalah 57 mm, sedangkan dengan kombinasi primer ITS1-ITS4 adalah 63 mm, sehingga melalui persamaan regresi tersebut dapat ditentukan berat molekul produk amplifikasi PCRnya, yaitu :

- a. Produk amplifikasi PCR dengan kombinasi primer ITS5-ITS4

$$y = - 0,0356x + 4,7507$$

$$= - 0,0356 (57) + 4,7507$$

$$y = 2,7215$$

$$\text{Log pb} = 2,7215$$

$$\text{BM} = 527 \text{ pb}$$

- b. Produk amplifikasi PCR dengan kombinasi primer ITS1-ITS4

$$y = - 0,0356x + 4,7507$$

$$= - 0,0356 (63) + 4,7507$$

$$y = 2,5079$$

$$\text{Log pb} = 2,5079$$

$$\text{BM} = 322 \text{ pb}$$

4.1.6. Sekuensing DNA

Produk amplifikasi PCR DNA yang dikirim ke Lembaga Biologi Molekuler Eijkman di Jakarta pada fasilitas jasa pelayanan sekuensing DNA telah ditentukan urutan DNANYa. Penentuan urutan DNA dilakukan pada kedua arah rantai ganda produk PCR menggunakan primer ITS2, ITS3, ITS4, dan ITS5. Hasil sekuensing yang diterima berupa urutan sekuensing lengkap sebagai keluaran printer sistem pensekuens yang belum diperbaiki secara visual beserta spektrogramnya.

Hasil pembacaan sistem pensekuens (Lampiran 4) diperiksa ulang dan diperbaiki dengan membaca spektrogram secara visual (Lampiran 5), dan mencocokkan hasil sekuens dalam arah berlawanan pada kedua rantai DNA secara manual. Hasil koreksi berupa sekuens lengkap dalam arah 5' ke 3'

diberikan di gambar 12. Panjang DNA yang berhasil disekuens dan dikoreksi pembacaannya adalah sebanyak 636 pb.

Hasil sekuensing ini dilaporkan dalam Gen Bank, untuk publikasi bersama penelitian tentang identifikasi molekular galur-galur *Trichoderma* asal Riau lainnya (Nugroho dkk., 2007). Nomor akses Gen Bank adalah EF467659 dan dapat dibuka di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> (Lampiran 6).

Urutan DNA 5' → 3'

```
TTCTTGGAAGTAAAAGTTCGTAACAAGGCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGA  
TCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCC  
TCCGCGGGGGTACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCCGCCGCC  
GGAGGAACCAACCAACTCTTTCTGTAGTCCCTCGCGGACGTATTTCTTACAGC  
TCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAAAATTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTG  
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC  
AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGG  
CATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGATCGGCCGT  
TGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTC  
TCCCGCAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCACAACCTCGCACCCGGGAGCGCG  
GCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCA  
GGTAGGAATACCCGCTGAACTTATCTTTTCTATTTTCCGGAAGGAAANCNNN
```

Gambar 12. Sekuens lengkap daerah ITS-1 dan ITS-2 rDNA *Trichoderma sp.* TNJ63.

Keterangan : Bagian yang digaris bawah merupakan daerah yang disekuens menggunakan primer ITS5 yang dicocokkan dengan daerah komplementer sekuens menggunakan primer ITS2. Bagian yang dicetak tebal merupakan daerah hasil sekuensing menggunakan primer ITS5 yang dicocokkan dengan daerah yang disekuens menggunakan primer ITS3. Bagian yang dicetak tebal dan digaris bawah merupakan sekuens primer ITS3 dan komplementer primer ITS2.

4.2. Pembahasan

Trichoderma spp. merupakan fungi yang tidak hanya mampu menghasilkan enzim ekstraselular dan antibiotik, namun juga mampu menghambat pertumbuhan fungi patogen dan merangsang pertumbuhan dan resistensi tanaman. Salah satu spesies *Trichoderma* yang ada di Riau adalah *Trichoderma sp.* TNJ63 yang diidentifikasi secara morfologi sebagai *Trichoderma viride*. Identifikasi secara morfologi sering memberikan kesalahan dalam penamaan spesies sehingga perlu ditambah dengan data molekuler. Identifikasi spesies yang tepat berhubungan dengan aplikasi spesies dalam produksi enzim, biokontrol, infeksi pada manusia dan produksi metabolit sekunder. Penelitian yang dilakukan Druzhinina dan

Kubicek (2005) menunjukkan bahwa 50% spesies *Trichoderma* yang ada di koleksi kultur yang diidentifikasi secara morfologi ternyata salah identifikasi. Berdasarkan hal itu maka penelitian pada saat ini menggunakan metoda molekuler untuk mengkarakterisasi dan mengidentifikasi spesies yaitu dengan mengamplifikasi daerah ITS rDNA.

Ekstraksi DNA untuk amplifikasi daerah ITS dilakukan dengan metoda kit Wizard Genomic yang menggunakan enzim litikase sebagai pemecah dinding sel. Hasil yang diperoleh menunjukkan isolasi DNA kromosomal *Trichoderma sp.* TNJ63 berhasil sangat baik dengan metode ini. Gel elektroforesis dari DNA hasil isolasi memberikan pita yang terlihat jelas dengan deteksi menggunakan ethidium bromida, dengan berat molekul 12.611 pb. Berat molekul DNA ini ternyata lebih kecil dibandingkan dengan berat molekul DNA *Trichoderma sp.* TNC52 hasil isolasi yaitu 14.662 pb (Hutapea, 2007). Hal ini kemungkinan disebabkan karena tidak didapatnya molekul DNA utuh pada saat proses ekstraksi DNA atau terjadinya fragmentasi DNA menjadi banyak potongan yang lebih kecil. Hal ini sesuai dengan kenyataan bahwa sulitnya mendapatkan molekul DNA dalam bentuk utuh pada proses ekstraksi DNA dan mudahnya molekul DNA terfragmentasi oleh gaya mekanik (Lehninger, 1994). Selain itu dapat juga disebabkan pembacaan jarak migrasi dan standar DNA yang kurang akurat pada gel elektroforesis. Namun demikian, isolat DNA yang diperoleh cukup baik untuk amplifikasi PCR dan sekuensing DNA.

DNA kromosomal berhasil diisolasi dari miselium yang berumur 4 hari, sedangkan miselium yang berumur 5 hari DNA tidak berhasil diisolasi. Hal yang sama juga terjadi pada *Trichoderma sp.* TNC52 (Hutapea, 2007). Hal ini disebabkan karena pertumbuhan *Trichoderma sp.* TNJ63 yang cepat sehingga spora fungi sudah terbentuk sempurna pada media sehingga enzim litikase sebagai pemecah dinding sel tidak mampu memecah dinding sel spora. Pada hari ke-4, spora fungi belum terbentuk semua sehingga berhasil dilakukan isolasi. Berbeda dengan *Trichoderma sp.* TNJ63, DNA *Gliocladium sp.* TNC73 berhasil diisolasi pada hari ke-5 karena fungi ini masih berupa miselium akibat tingkat pertumbuhannya lebih lambat dari *Trichoderma sp.* TNJ63. Druzhinina dkk.

(2005) melakukan isolasi DNA untuk identifikasi spesies *Trichoderma* pada miselium yang berumur 2-4 hari. Hal ini memberikan informasi bahwa waktu yang tepat untuk isolasi DNA spesies *Trichoderma* adalah pada miselium yang berumur 2-4 hari.

Kemurnian DNA ditentukan untuk mengetahui tingkat kemurnian isolat DNA hasil isolasi. Nilai kemurnian DNA cukup baik bila perbandingan A_{260}/A_{280} adalah 1,8-2 (Runtunuwu dkk., 2002). Melalui perbandingan A_{260}/A_{280} diperoleh nilai sebesar 1,802, yang menunjukkan bahwa isolat DNA cukup murni. Jika nilai yang diperoleh lebih kecil dari nilai tersebut, kemungkinan adanya kontaminasi protein.

Karakterisasi DNA merupakan bagian dalam tahap identifikasi suatu spesies karena tiap spesies memiliki karakter berbeda. Karakter tersebut antara lain titik leleh (T_m) dan $\%(G+C)$. Titik leleh merupakan salah satu karakteristik fisik DNA yang sangat penting untuk mendesain produk PCR karena berhubungan dengan temperatur annealing karena masing-masing DNA spesies memiliki titik leleh yang khas. Nilai $\%(G+C)$ juga penting dalam membantu proses identifikasi dan klasifikasi karena masing-masing DNA spesies memiliki komposisi basa (G+C) yang bervariasi. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan De Ley (1970) yang menyatakan bahwa komposisi basa DNA bakteri yang ditelitinya bervariasi antara 25-70 mol $\%(G+C)$.

Berdasarkan kurva T_m diperoleh titik leleh DNA *Trichoderma sp.* TNJ63 hasil isolasi adalah 66°C , sehingga dari nilai T_m ini diperoleh nilai $\%(G+C)$ nya yaitu 5,61%. Namun demikian, kurva T_m yang diperoleh menunjukkan ketidakstabilan pengukuran absorbans larutan DNA dan terlihat jelas pada akhir pengukuran. Umumnya, meningkatnya temperatur larutan DNA akan menyebabkan meningkatnya absorbans DNA hingga nilai maksimum, yang kemudian akan bernilai konstan. Hal ini disebabkan antara lain peralatan spektrofotometer yang digunakan tidak dilengkapi dengan pengatur temperatur dan inkubator sehingga ada kemungkinan pengukuran absorbans tidak sesuai dengan temperatur yang digunakan.

Nilai T_m dapat digunakan dalam menentukan temperatur annealing pada proses PCR karena berhubungan dengan stabilitas hibridisasi templat DNA dengan primer. Idealnya, nilai T_m primer yang digunakan sama atau lebih besar dari templat DNA dan temperatur annealing ditentukan mulai dari 5°C dibawah nilai T_m (Benita dkk, 2003). Namun, amplifikasi PCR isolat DNA *Trichoderma* sp. TNJ63 pada temperatur annealing 50°C tidak memberikan produk. Ini menunjukkan ketidaktepatan penentuan T_m isolat DNA.

Hubungan kekerabatan suatu spesies dapat ditentukan berdasarkan nilai %(G+C)nya. Jika perbedaannya sekitar 1% maka dikelompokkan ke dalam spesies yang sama (Guarro dkk., 1999). Jika nilai %(G+C) *Trichoderma* sp. TNJ63 dibandingkan dengan *Trichoderma* sp. TNC52 yaitu 3,17% (Hutapea, 2007), maka selisihnya sebesar 2.44%, artinya kedua spesies ini memiliki hubungan kerabat yang sangat dekat dan bukan satu spesies.

Untuk sekuensing daerah ITS, DNA kromosomal *Trichoderma* sp. TNJ63 diamplifikasi dengan PCR. Dalam proses PCR, perlu ditentukan kondisi terbaik agar diperoleh produk spesifik. Penentuan kondisi PCR antara lain dengan memvariasikan jumlah sampel sebagai templat DNA, temperatur annealing, kombinasi dan konsentrasi primer. Temperatur annealing yang rendah akan menurunkan spesifisitas karena adanya kompetisi antara produk non spesifik dan spesifik untuk komponen reaksi. Primer yang digunakan juga harus tepat seperti primer ITS1, ITS4, dan ITS5 karena primer ini merupakan primer universal fungi untuk sekuens daerah ITS rDNA.

Amplifikasi PCR DNA kromosomal *Trichoderma* sp. TNJ63 dilakukan pada temperatur annealing 45°C dan kombinasi primer ITS5-ITS4 dan ITS1-ITS4 setelah amplifikasi PCR pada temperatur annealing 50°C tidak memberikan produk. Produk PCR yang dihasilkan oleh kombinasi ITS5-ITS4 memberikan pita tajam dan memiliki ukuran yang sesuai dengan daerah target amplifikasi, yaitu 527 pb sehingga dapat digunakan untuk memperoleh sekuens ITS-1 dan ITS-2. Hal ini sesuai dengan literatur (Hermosa dkk., 2000 dan White dkk., 1990) bahwa daerah target amplifikasi rDNA yang lazim untuk berbagai spesies jamur haruslah memiliki ukuran 500-600 pb untuk kombinasi primer ITS1-ITS4 dan ITS5-ITS4.

Ini menunjukkan bahwa pemakaian primer ITS5 dan ITS4 dapat memberikan amplifikasi PCR terbaik daerah rDNA yang mengandung ITS-1, gen 5,8S rDNA, dan ITS-2 target.

Pada produk PCR yang diberikan oleh kombinasi ITS1-ITS4 menghasilkan pita yang kurang tajam dengan ukuran DNA sekitar 322 pb. Ukuran DNA tersebut jauh lebih kecil dari ukuran yang seharusnya diberikan oleh kombinasi primer tersebut. Kemungkinan produk PCR ini adalah hasil amplifikasi non spesifik, yaitu akibat annealing pada tempat yang bukan target rDNA. Hal yang sama juga terjadi pada penelitian yang dilakukan Nugroho dkk. (2003) pada *Gliocladium sp.* TNC73 dan TNC59 dan Hutapea (2007) pada *Trichoderma sp.* TNC52 bahwa PCR yang menggunakan kombinasi primer tersebut tidak memberikan produk, atau jika ada produk ukurannya tidak sesuai dengan yang seharusnya. Beberapa kemungkinan terjadinya hal ini adalah karena ketidakcocokan suhu annealing, konsentrasi templat yang terlalu rendah, atau primer yang tidak sesuai untuk *Trichoderma*. Kemungkinan solusi untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan menaikkan temperatur annealing sehingga dapat memberikan produk yang lebih bersih, yakni menghindari pelekatan non spesifik dan menghindari sintesis produk non spesifik yang tak dikehendaki, menambah konsentrasi templat, dan menggunakan kombinasi primer yang lain atau menggunakan primer lain yang sesuai untuk amplifikasi daerah target.

Produk PCR yang diperoleh dari amplifikasi rDNA *Trichoderma sp.* TNJ63 dengan menggunakan kombinasi primer ITS5-ITS4 dikirim ke Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, pada jasa pelayanan sekuensing untuk disekuens menggunakan primer ITS5 dan ITS4. Berdasarkan spektrogram hasil sekuens diperoleh sekuens yang cukup baik dengan primer ITS5 dengan pembacaan yang baik sekitar 390 pb. Sebaliknya, sekuens dengan primer ITS4 tidak memberikan pembacaan yang baik sama sekali. Hal ini kemungkinan terjadi karena primer ITS4 hanya berhibridisasi lemah pada ujung produk PCR. Sekuens yang diperoleh dengan primer ITS5 cukup untuk memperoleh sekuens daerah ITS-1, tetapi kurang baik untuk sekuens daerah ITS-2 karena tidak adanya sekuens yang baik pada primer ITS4. Untuk mengatasi hal ini maka sekuens dilakukan juga dengan

primer ITS3 dan ITS2. Berdasarkan spektrogram hasil sekuens terlihat bahwa sekuens yang cukup baik diperoleh kedua primer dengan pembacaan yang baik sekitar 310 pb untuk ITS3 dan 230 pb untuk ITS2.

Semua hasil sekuens yang diperoleh diperiksa kembali secara manual dan visual sehingga diperoleh sekuens lengkap daerah ITS-1 dan ITS-2 rDNA *Trichoderma sp.* TNJ63 dengan ukuran 636 pb seperti terlihat pada gambar 12. Analisis lanjutan hasil sekuens lengkap tersebut menunjukkan tidak ditemukannya urutan untuk primer ITS1, sehingga mengindikasikan primer ITS1 tidak mampu untuk amplifikasi rDNA *Trichoderma sp.* TNJ63. Sebaliknya, urutan untuk primer ITS3 ditemukan dengan baik. Hal ini menunjukkan bahwa sekuens yang diperoleh tersebut memang sesuai dengan target yaitu mengandung sebagian kecil ujung 3' 18S rDNA, ITS-1, 5,8S rRNA, ITS-2, dan sebagian kecil ujung 5' 28S rDNA. Sekuens lengkap ternyata memiliki ukuran lebih besar dari 527 pb, yaitu ukuran yang diperoleh untuk produk PCR ITS5-ITS4 yang diperoleh dari analisis migrasi pada gel elektroforesis. Berarti ukuran produk PCR yang diperoleh dengan jarak migrasi kurang tepat. Hal ini kemungkinan disebabkan pembacaan jarak migrasi sampel dan standar DNA yang kurang akurat pada gel elektroforesis, karena kurang jelasnya pita fluoresensi ketika pengukuran dilakukan.

Sekuens daerah ITS-1 dan ITS-2 banyak digunakan dalam klasifikasi dan identifikasi spesies karena sekuens daerah ini sangat bervariasi diantara semua sekuens rDNA, dan baik untuk analisis perbedaan antar spesies dalam satu genus atau populasi. Hal ini didukung dengan penelitian yang dilakukan Lieckfeldt dkk. (1999) bahwa sekuens daerah ITS berbagai spesies *Trichoderma* yang ditelitinya memiliki perbedaan 13-17 pasangan basa. Selain itu, program khusus yang dibuat Druzhinina dkk. (2005) untuk klasifikasi dan identifikasi spesies *Trichoderma* juga didasarkan pada sekuens daerah ITS-1 dan ITS-2. Sub unit kecil rDNA (18S) yang banyak digunakan dalam identifikasi memiliki variasi sekuens sedikit, dan baik untuk membedakan organisme yang berkerabat jauh (Nugroho dkk., 2003). Gen 5,8S rRNA juga kurang akurat dalam identifikasi spesies karena hanya memiliki perbedaan sekuens yang kecil sehingga baik digunakan dalam tingkatan genus (Singh, dkk. 2006). Walaupun demikian, penggunaan sekuens daerah ITS

rDNA untuk klasifikasi dan identifikasi spesies belum cukup memadai karena beberapa penelitian menunjukkan tidak berhasilnya identifikasi beberapa fungi dan tanaman menggunakan sekuens daerah ITSnya, sehingga masih memerlukan metoda lain untuk kepastian spesies. Namun, untuk genus *Trichoderma* metoda identifikasi menggunakan ITS-1 dan ITS-2 sudah dinilai cukup baik dan cepat untuk 100 spesies *Trichoderma*, karena basis data untuk genus ini sudah cukup lengkap (Druzhinina dkk, 2006). Data dari sekuens dalam penelitian ini akan digunakan peneliti lain dari Laboratorium Biokimia, FMIPA, UNRI untuk membuat pohon filogenetik dari isolat-isolat *Trichoderma* Riau, sebagai penelitian lanjutan.