BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

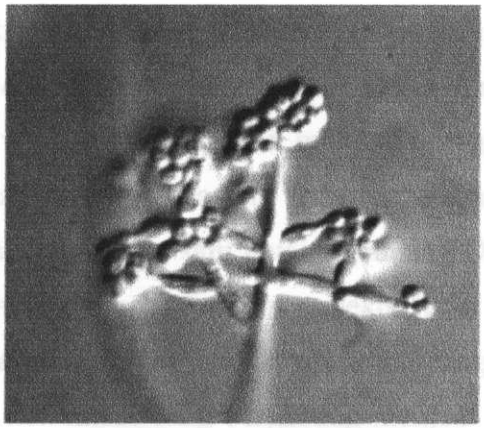
2.1. Jamur *Trichoderma spp.*

Jamur atau fungi adalah organisme heterotrofik karena tidak memiliki klorofil, sehingga memerlukan senyawa organik untuk nutrisinya. Tubuh jamur terdiri dari dua bagian yaitu miselium dan spora. Miselium merupakan kumpulan beberapa filamen yang dinamakan hifa. Jamur berkembang biak dengan cara aseksual dan seksual. Secara aseksual yaitu dengan pembelahan, penguncupan, dan pembentukan spora. Secara seksual dengan peleburan nukleus dari dua sel induknya (Martoharsono, 1998).

Klasifikasi jamur didasarkan pada ciri morfologis yaitu bentuk miselium, ciri-ciri spora aseksual, spora seksual, dan habitat alamiah. Jamur dapat tumbuh dalam kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan bagi kebanyakan mikroorganisme lain yaitu meliputi adanya asam dan konsentrasi gula yang tinggi. Kandungan DNA jamur/kapang adalah 0,02-0,17 pg DNA per sel dengan 20 juta jumlah pasangan basa (Martoharsono, 1998).

Trichoderma spp. merupakan jamur yang banyak dijumpai di tanah dan juga di kayu. Jamur ini memiliki spesifikasi yaitu miselium bersepta, konidioforanya bercabang dan cabang biasanya dengan arah yang berlawanan. Konidia bentuknya bulat atau oval, melekat satu sama lain, dan warnanya hijau terang. Warna koloni *Trichoderma spp.* ada yang berwarna hijau gelap, kuning, dan hijau terang. Jumlah spora juga mempengaruhi warna koloni sehingga menjadi lebih gelap atau pucat. Selain itu, pH medium juga mampu mempengaruhi warna koloni. Jamur *Trichoderma spp.* berwarna hijau, secara makroskopis menyerupai *Penicilium* yaitu berwarna hijau kebiruan dan susunan konidia seperti "sapu". *Trichoderma spp.* mampu memanfaatkan komponen bahan organik selulosa dan kitin dalam tanah sehingga memainkan peranan aktif dalam pembentukan humus, yang berhubungan dengan kesuburan tanah dan pertumbuhan tanaman (Jaklitsch dkk., 2006; Samuels, 2006; Samuels dkk., 2006).

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/



Gambar 1. Morfologi *Trichoderma spp.*
(Sumber : Doctorfungus, 2006)

Menurut Harman (2006), klasifikasi taksonomi dari *Trichoderma spp.* adalah:

Kingdom : Fungi
Filum : Deuteromycota
Klas : Deuteromycetes (imperfek fungi)
Subklas : Detuteromycetidae
Ordo : Moniliales
Famili : Moniliaceae
Genus : *Trichoderma*
Spesies : *Trichoderma spp.*

2.2. DNA dan RNA

Asam nukleat berfungsi sebagai penyimpan sifat keturunan, penyimpan energi, dan beberapa di antaranya bekerja sebagai koenzim. Satuan penyusunnya disebut mononukleotida, sehingga asam nukleat disebut polinukleotida. Mononukleotida terdiri dari basa nitrogen purin (adenin dan guanin) dan pirimidin (urasil, timin, dan sitosin), gula pentosa (deoksiribosa), dan asam fosfat. DNA terdiri dari kira-kira 200.000 molekul nukleotida. Di dalam sel, DNA bertindak sebagai penyimpan informasi genetik yang tersimpan sebagai genom (total informasi genetik). Secara nyata DNA mengisi inti sel yang penyimpanannya sangat terorganisasi dalam bentuk benang kromatid dan kromosom .

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

Secara umum struktur DNA mempunyai bagian yang disebut gen struktural yaitu rangkaian nukleotida yang menyusun spesifikasi urutan asam amino pada polipeptida. Pada prokariot, DNA merupakan molekul tunggal berukuran besar, berbentuk sirkular dengan rantai ganda dan tertutup secara kovalen, sehingga semua DNA kromosomal merupakan satu untaian panjang DNA. Pada eukariot, DNA dalam satu kromosom merupakan suatu molekul linier yang berlipat-lipat, dan spesies yang berbeda mempunyai jumlah kromosom yang berbeda (Muslim, 2003). DNA terdiri dari dua rantai yang bergabung menjadi satu melalui ikatan hidrogen antara dua basa nitrogen yaitu Adenin (A) dengan Timin (T) dan Guanin (G) dengan Sitosin (C). Ikatan A-T dihubungkan oleh dua ikatan hidrogen, sedangkan G-C dengan tiga ikatan hidrogen. Setiap putaran penuh heliks ganda memerlukan sepuluh pasang nukleotida dengan basa nitrogen terletak di tengah-tengah heliks dan gula pentosa dan fosfat mengelilinya. Struktur primer DNA terbentuk apabila gugus fosfat satu nukleotida berikatan ester dengan gugus hidroksil nukleotida lain melalui ikatan kovalen. Struktur sekunder DNA adalah DNA memiliki dua rantai polinukleotida anti pararel dalam heliks ganda DNA dengan tulang punggung gula fosfat (nukleosida) yang hidrofilik mengarah ke permukaan luar, sedangkan basa yang hidrofobik mengarah ke dalam (Lehninger, 1994).

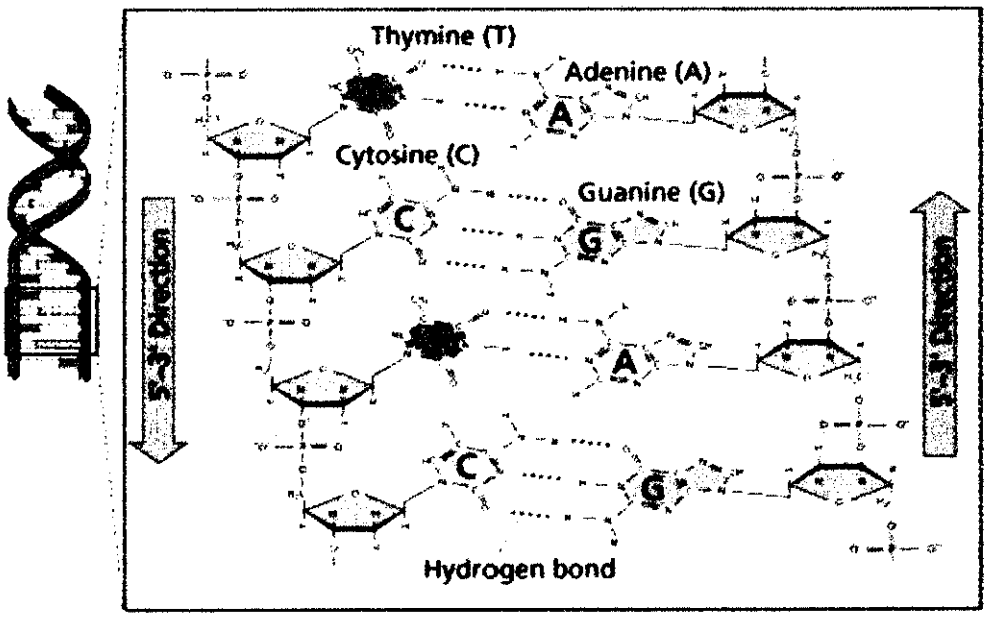
RNA adalah rantai tunggal polimer polinukleotida. Fungsi utamanya adalah sebagai pembawa informasi genetik yang disalin dari informasi genetik DNA melalui proses transkripsi dalam proses sintesis protein. RNA terdiri dari tiga jenis (Martoharsono, 1998):

1. mRNA (*messenger RNA*), berfungsi untuk pembawa pesan dengan struktur berupa rantai lurus.
2. tRNA (*transfer RNA*), berfungsi sebagai membawa dan memindahkan gugus aminoasil dengan struktur berupa rantai tunggal yang memilin secara teratur.
3. rRNA (*ribosomal RNA*), berfungsi sebagai penerjemah sintesis protein bersama ribosom (karena terdapat pada ribosom) dengan struktur berupa rantai tunggal yang memilin membentuk struktur tersier.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

Perbedaan DNA dan RNA adalah :

1. DNA mengandung basa adenin, timin, guanin, dan sitosin, sedangkan RNA mengandung basa adenin, urasil, guanin, dan sitosin.
2. Struktur DNA terdiri dari dua rantai polinukleotida berbentuk heliks yang saling memilin disebut heliks ganda. Sedangkan RNA selalu berbentuk benang tunggal berupa heliks.
3. DNA terutama terdapat di dalam inti sel, sedangkan RNA pada umumnya terdapat dalam sitoplasma.
4. Gugus gula pentosa pada DNA berupa deoksiribosa, sedangkan RNA berupa ribosa.



Gambar 2. Struktur DNA
(Sumber : Toha, 2001)

Terdapat tiga hal penting pada struktur DNA dari hasil analisa kimia (Winarno dan Fardiaz, 1993):

1. DNA mengandung sejumlah basa purin dan pirimidin yang sama dalam heliks ganda.
2. Terdapat kesetimbangan antara jumlah adenin dengan timin dan guanin dengan sitosin (A=T dan G=C).

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

3. Perbandingan antara (A+T) dengan (G+C) dapat bervariasi, tetapi mempunyai nilai yang tetap pada masing-masing spesies.

2.3. Isolasi DNA

Isolasi DNA bertujuan untuk mendapatkan DNA tanpa *debris* sel. Prinsip teknik isolasi DNA mencakup berbagai tahap reaksi dengan tujuan yang berbeda-beda pada setiap tahapnya. Secara umum tahap-tahap reaksi tersebut adalah (Toha, 2001):

1. Penghancuran dinding sel yang dilakukan secara mekanis dan enzimatis.
2. Lisis sel karena degradasi membran sel, yang dilakukan dalam berbagai cara tergantung pada jenis selnya. Pada sel eukariot, proses ini sering digabung dengan tujuan dapat merusak membran inti tempat asam nukleat.
3. Membersihkan *debris* sel, yang dilakukan dengan cara sentrifugasi dan presipitasi.

Isolasi DNA yang dilakukan pada penelitian ini adalah menggunakan metode kit Wizard Genomic dengan enzim litikase sebagai pemecah dinding dan membran sel fungi. Metoda ini merupakan metoda yang dibuat khusus untuk isolasi DNA dari sel ragi dan fungi (Promega, 2002). Cara kerja kit ini didasarkan atas beberapa tahap. Tahap pertama adalah pemecahan sel menggunakan enzim litikase. Setelah dinding sel lisis, membran inti dipecah lebih lanjut menggunakan larutan *Nuclei lysis solution* yang telah disediakan dalam kit. Setelah itu, protein inti sel diendapkan dengan penambahan larutan garam pengendap protein. DNA kromosomal yang tertinggal dalam larutan diendapkan dengan larutan isopropanol. Endapan DNA yang terbentuk ditambahkan RNAse dari kit untuk mendegradasi RNA, setelah terlebih dahulu dicuci dengan etanol 70 %.

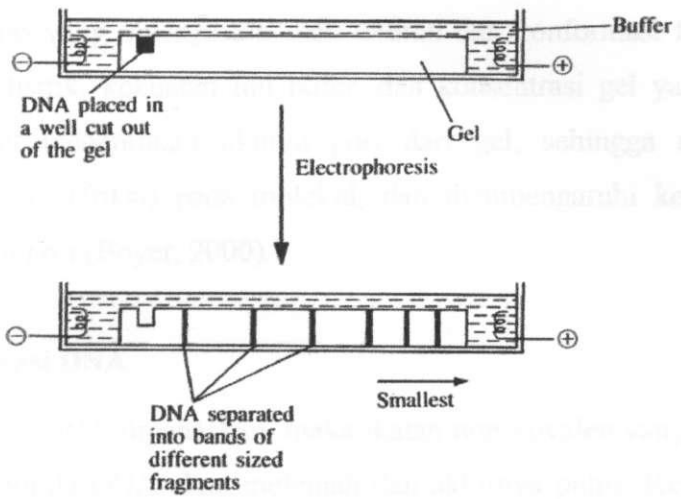
2.4. Elektroforesis

Gel elektroforesis adalah metode untuk memisahkan molekul-molekul protein atau DNA dalam medan listrik, sehingga molekul akan bergerak sesuai muatan molekul tersebut. Metode ini memanfaatkan sifat protein dan DNA yang bermuatan listrik. Muatan protein ditentukan oleh jumlah muatan bersih gugus

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

radikal asam amino yang menyusunnya. Sedangkan DNA bermuatan negatif karena adanya gugus fosfat yang menyusun nukleotida. Jadi, polimer DNA selalu poli-anion, artinya semakin panjang fragmen DNA maka muatannya semakin negatif (Muslim, 2003).

Elektroforesis adalah metode standar untuk memisahkan, mengidentifikasi, mengkarakterisasi, dan memurnikan molekul DNA, RNA, atau protein. Ada dua macam gel yang dapat digunakan dalam elektroforesis, yaitu gel poliakrilamida dan gel agarosa. DNA yang berukuran besar (0,1-20 kb) dapat dipisahkan dengan elektroforesis gel agarosa, sedangkan DNA berukuran kecil (6-2000 pb) dapat terpisah dengan elektroforesis gel poliakrilamida (Nugroho dkk, 1998).



Gambar 3. Pemisahan DNA melalui elektroforesis gel agarosa
(Sumber : Holme dan Peck, 1993)

Elektroforesis gel poliakrilamida terdiri atas gel poliakrilamida tanpa denaturasi dan gel poliakrilamida denaturasi. Poliakrilamida tanpa denaturasi dapat digunakan untuk memisahkan fragmen DNA rantai ganda dengan ukuran 6 pb (20% akrilamida) sampai 1000 pb (3% akrilamida). Sedangkan gel poliakrilamida denaturasi dapat memisahkan DNA rantai tunggal dengan berbagai ukuran (Toha, 2001).

Elektroforesis gel agarosa dapat juga dibedakan dengan cara yang sama. Kemampuan pemisahan elektroforesis ini mempunyai kisaran yang lebih luas,

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

yaitu fragmen DNA antara 70 pb (3% agarosa) sampai 800.000 pb (0,1% agarosa), tetapi daya resolusinya lebih kecil dibanding gel poliakrilamida. Oleh karena itu, gel agarosa lebih digunakan untuk menentukan ukuran pasangan basa dengan perbedaan antar pita diatas 10 pasangan basa (pb), sedangkan gel poliakrilamida digunakan untuk keperluan sekuensing, dengan beda antar pita hanya 1 pb. Kemampuan pemisahan DNA pada elektroforesis juga ditentukan oleh konsentrasi dari masing-masing gel (Toha, 2001).

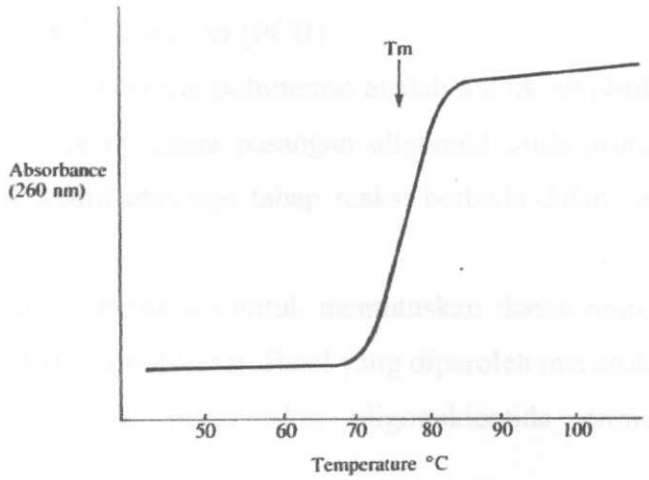
Elektroforesis pada prinsipnya merupakan proses bergeraknya molekul bermuatan melalui pori-pori gel di bawah pengaruh medan listrik dengan kekuatan tegangan atau arus listrik tertentu. Pada pH mendekati netral, DNA bermuatan negatif sehingga molekul ini dapat bermigrasi dari katoda ke anoda dengan mobilitas yang dipengaruhi oleh ukuran dan konformasi fragmen DNA, kekuatan arus listrik, kekuatan ion bufer, dan konsentrasi gel yang digunakan. Konsentrasi gel menentukan ukuran pori dari gel, sehingga mempengaruhi hambatan gesekan (friksi) pada molekul, dan mempengaruhi kecepatan gerak molekul melalui pori (Boyer, 2000).

2.5. Karakterisasi DNA

Jika larutan DNA dipanaskan, maka ikatan non kovalen yang menahan dua rantai polinukleotida DNA akan melemah dan akhirnya putus. Ketika proses ini terjadi, kedua rantai menjadi terbuka sebagian dan disebut denaturasi DNA atau DNA *melting*. Temperatur yang menyebabkan untaian DNA terdenaturasi 50% disebut *melting temperature* (*Tm*) atau temperatur leleh. Persentase (G+C) pada DNA memberikan pengaruh yang kuat pada *Tm*, yaitu semakin tinggi %(G+C) maka nilai *Tm* juga semakin tinggi. Hal ini disebabkan ikatan hidrogen antara pasangan basa G-C yang berjumlah tiga, sedangkan ikatan hidrogen antar pasangan basa A-T hanya dua. Jumlah dari untaian yang terpisah atau meleleh dapat ditentukan melalui pengukuran absorbans larutan DNA pada panjang gelombang 260 nm. Larutan DNA akan menyerap sinar pada panjang gelombang ini karena struktur elektronik pada basa DNA. Basa nitrogen akan menyerap lebih kuat pada kondisi terpisah daripada kondisi bergabung, sehingga perlakuan yang

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

menyebabkan terganggunya ikatan hidrogen pada pasangan basa, seperti panas dan alkali akan menambah absorbans DNA (Holme dan Peck, 1993).



Gambar 4. Kurva titik leleh DNA
(Sumber : Holme dan Peck, 1993)

Secara fisik, sifat-sifat nukleotida adalah (Mathews dan Van Holde, 1996) :

1. Nukleotida merupakan asam kuat, ionisasi yang utama dari fosfat terjadi pada pKa mendekati 1,0.
2. Sebagai akibat sistim ikatan rangkap pada purin dan pirimidin, basa dan turunannya menyerap sinar sangat kuat pada daerah spektrum ultraviolet.
3. Absorbans yang kuat dapat ditentukan dalam penentuan kuantitatif DNA, yaitu penentuan konsentrasi DNA pada level µg/ml melalui spektrofotometri.

Penentuan kemurnian DNA dapat diperoleh dengan membandingkan absorbans sampel pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Panjang gelombang 260 nm merupakan panjang gelombang optimum untuk mengukur absorbans akibat resonansi ikatan rangkap pada basa purin dan pirimidin, sedangkan panjang gelombang 280 nm merupakan panjang gelombang yang biasa digunakan untuk mengukur absorbans protein (tirosin). Absorbans ini dinyatakan sebagai perbandingan rapat optis (*optical density*, O. D). Sampel DNA yang murni harus memiliki O. D 260/280 nm diatas 1,8. Jika nilai perbandingan kecil dari nilai tersebut, kemungkinan adanya kontaminasi protein. Kemungkinan kontaminasi

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

karena RNA kecil, karena sampel umumnya telah diperlakukan dengan RNAase yang akan menghancurkan RNA (Holme dan Peck, 1993; Boyer, 2000).

2.6. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

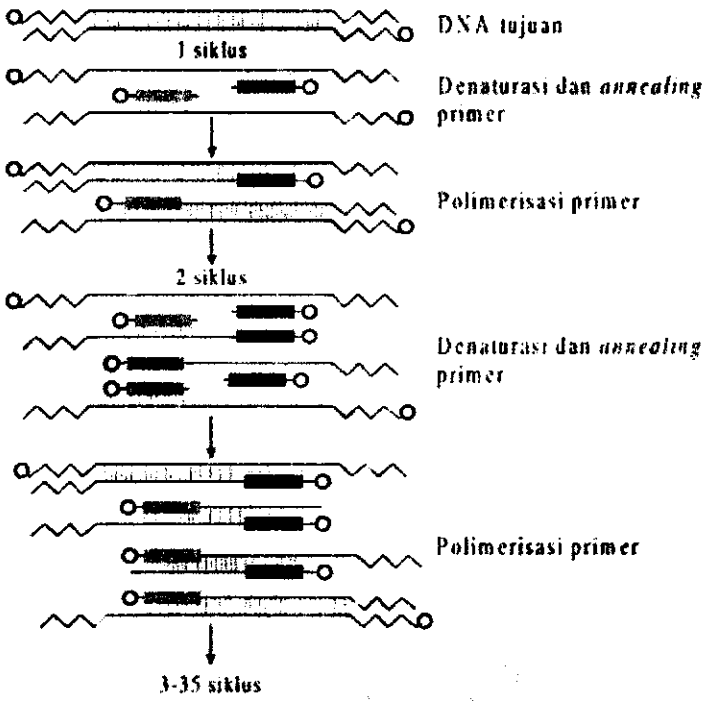
PCR atau reaksi berantai polimerase adalah teknik amplifikasi fragmen gen tertentu yang terletak di antara pasangan oligonukleotida primer spesifik. Pada prinsipnya, PCR terdiri atas tiga tahap reaksi berbeda dalam satu siklus (Toha, 2001), yaitu :

1. Tahap denaturasi, bertujuan untuk memutuskan ikatan hidrogen DNA rantai ganda yang akan diamplifikasi. Hasil yang diperoleh merupakan DNA cetakan untai tunggal untuk penempelan oligonukleotida primer dalam tahap *annealing*.
2. Tahap *annealing*, yaitu membentuk ikatan hidrogen baru antara untai tunggal DNA cetakan dengan oligonukleotida primer.
3. Tahap polimerisasi, yaitu tahap pemanjangan rantai tunggal oligonukleotida primer dengan katalis enzim DNA polimerase.

Ketiga tahap PCR dipengaruhi temperatur dengan temperatur masing-masing tahap adalah denaturasi ± 95°C, *annealing* ± 45°C, dan polimerisasi ± 72°C, bergantung pada sekuens yang didenaturasi dan diannealing, sehingga akan berbeda antar sampel DNA. Fungsi temperatur ini sangat bervariasi untuk setiap organisme, sehingga tidak ada standar yang sama untuk temperatur pada tahap-tahap tersebut. Proses PCR berlangsung dalam beberapa siklus. Kisaran siklus optimum dalam proses PCR adalah 30-35 siklus (Taylor, 1991)

Beberapa komponen yang diperlukan untuk proses PCR adalah alat PCR, DNA sampel yang akan diamplifikasi, dNTP yaitu bahan baku nukleotida saat polimerisasi yang terdiri dari dATP, dGTP, dCTP, dan dTTP. Selain itu juga dibutuhkan oligonukleotida primer yaitu nukleotida pendek untuk mengawali reaksi polimerisasi, enzim polimerase untuk mengkatalis reaksi pemanjangan primer, dan H_2O steril dalam bufer PCR sebagai pelarut. Hasil akhir proses PCR ditentukan dengan mengelektroforesis produk PCR yang diperoleh dengan DNA standar ke dalam gel agarosa 0,8-4% (Promega, 2000).

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

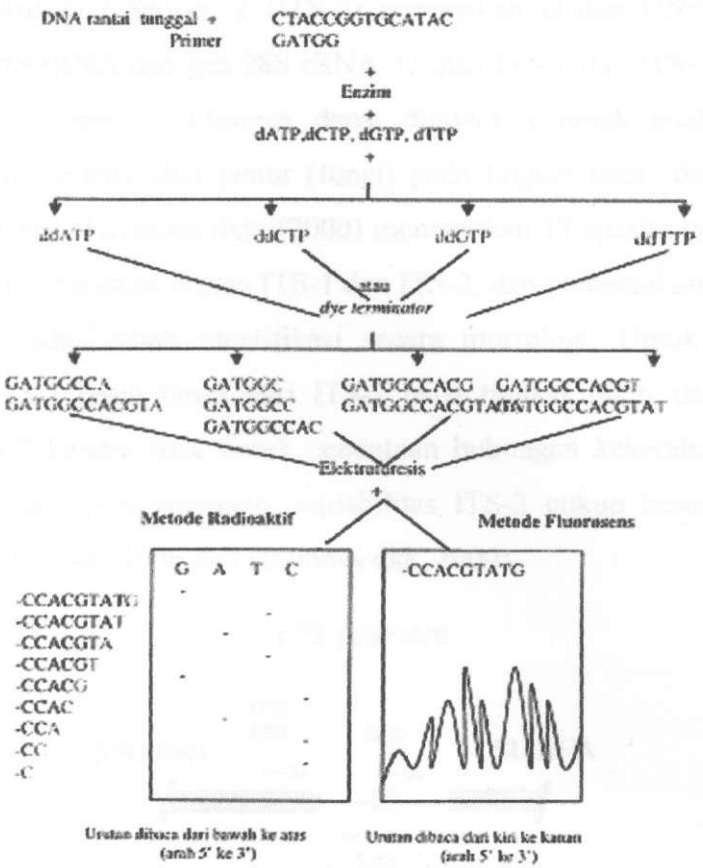


Gambar 5. Tahap reaksi PCR
(Sumber : Toha, 2001)

2.7. Sekuensing DNA

Sekuensing DNA adalah metode penentuan urutan basa nukleotida suatu fragmen DNA. Metoda ini penting untuk menentukan urutan basa nukleotida suatu gen atau fragmen DNA lainnya. Metode sekuensing yang umum dilakukan adalah metoda Sanger yang dapat dilakukan melalui metode radioaktif dan metode fluoresens (Toha, 2001). Metode sekuensing radioaktif merupakan metode sintesis enzimatis fragmen berlabel radioaktif dari rantai DNA tak berlabel, dan metodanya dilakukan secara manual. Hasil sekuensing manual adalah nukleotida yang tampak sebagai pita vertikal pada empat lajur autoradiogram yang dibaca dari bawah ke atas. Panjang fragmen nukleotida bertambah setiap satu basa dari dasar hingga puncak autoradiogram yang ditentukan dari posisi vertikal pita. Metode ini terdiri atas tiga tahap reaksi yaitu preparasi templat, pembentukan kelompok fragmen berlabel, serta elektroforesis dan pembacaan gel.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/



Gambar 6. Metode sekuensing DNA
(Sumber : Toha, 2001)

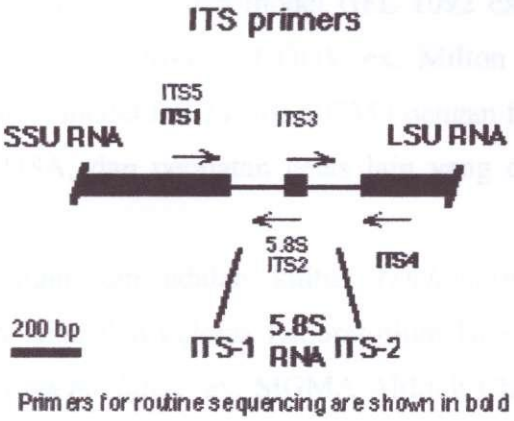
Metode sekuensing fluoresens merupakan metode perpanjangan enzimatik untuk sekuensing DNA menggunakan basa terminasi *dye fluorescen*, dan metodanya dilakukan secara otomatis dengan mesin sekuensing. Hasil sekuensing otomatis adalah urutan nukleotida DNA pada puncak grafik dari kanan ke kiri. Sumbu X grafik adalah sinyal fluoresens dan sumbu Y adalah waktu sekuensing. Kelebihan metoda sekuensing otomatis adalah reaksi sekuensing dilakukan dalam tabung tunggal, dapat menentukan urutan nukleotida lebih banyak, dan penyiapan templat lebih mudah (Toha, 2001).

2.8. *Internal Transcribed Spacer* (ITS)

Daerah *Internal Transcribed Spacer* 1 (ITS-1) rDNA merupakan urutan DNA yang berada antara gen 18S rRNA dan gen 5,8S rRNA, sedangkan daerah

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

Internal Transcribed Spacer 2 (ITS-2) merupakan urutan DNA yang berada antara gen 5,8S rRNA dan gen 28S rRNA. Urutan ITS-1 dan ITS-2 rDNA sangat bervariasi antar spesies, sehingga dapat digunakan untuk analisis hubungan kekerabatan filogenetik dari jamur (fungi) pada tingkat inter- dan intra-spesies (Kuhls dkk, 1996). Hermosa dkk. (2000) menentukan 17 spesies galur biokontrol *Trichoderma* berdasarkan urutan ITS-1 dan ITS-2, dan menemukan bahwa 16 dari 17 spesies tersebut salah identifikasi secara morfologi. Untuk *Trichoderma*, variabilitas ITS-1 lebih besar dari ITS-2 pada tingkat inter- dan intraspesies, sehingga ITS-2 kurang baik untuk penentuan hubungan kekerabatan intra- dan interspesies. Meskipun demikian, variabilitas ITS-2 cukup besar pada tingkat interseksi (Kuhls dkk, 1996 dan Hermosa dkk, 2000).



Gambar 7. Lokasi primer ITS1, ITS2, ITS3, ITS4, dan ITS5 untuk amplifikasi daerah ITS-1 dan ITS-2 rDNA
(Sumber : Vilgalys lab, 2007)

Penentuan urutan ITS-1 dan ITS-2 dari rDNA dilakukan dengan mengamplifikasi daerah ITS menggunakan teknik PCR. Amplifikasi menggunakan primer khusus yang telah didesain oleh White dkk. (1990) yaitu primer ITS1, ITS2, ITS3, ITS4, dan ITS5, yang terkonservasi pada gen 18S, 5,8S, dan 28S rRNA. Primer tersebut diperoleh dengan membandingkan urutan DNA gen 18S, 5,8S, dan 28S rRNA dari *Neurospora crossa*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Oryza sativa*, *Vicia paba*, dan mencit *Mus muculus* (White dkk. 1990).

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/