























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.