

**PERBANDINGAN SEKUEN KAPANG *Trichoderma* sp. BERDASARKAN  
INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS) rDNA DENGAN  
MENGUNAKAN DATABASE NCBI**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**Siti Rukmana**  
**NIM. 10620016**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2015**

**PERBANDINGAN SEKUEN KAPANG *Trichoderma* sp. BERDASARKAN  
INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS) rDNA DENGAN  
MENGUNAKAN DATABASE NCBI**

**SKRIPSI**

**Diajukan Kepada :  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang  
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S. Si)**

**Oleh:  
SITI RUKMANA  
(NIM. 10620016)**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2015**

**PERBANDINGAN SEKUEN KAPANG *Trichoderma* sp. BERDASARKAN  
INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS) rDNA DENGAN  
MENGUNAKAN DATABASE NCBI**

**SKRIPSI**

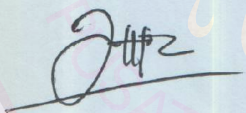
**Oleh:**

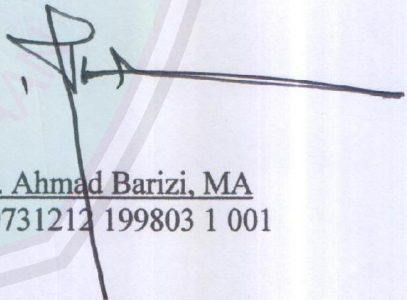
**SITI RUKMANA  
NIM 10620016**

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:  
Tanggal: 30 Juni 2015

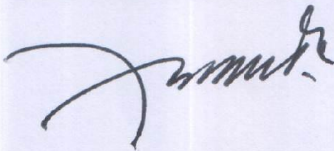
Dosen Pembimbing I,

Dosen Pembimbing II,

  
Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si  
NIP. 19650509 199903 2 002

  
Dr. H. Ahmad Barizi, MA  
NIP. 19731212 199803 1 001

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi

  
Dr. Evika Sandi Savitri, M.P  
NIP. 19741018 200312 2 002


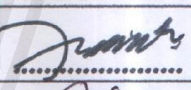


**HALAMAN PENGESAHAN  
PERBANDINGAN SEKUEN KAPANG *Trichoderma* sp. BERDASARKAN  
INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS) rDNA DENGAN  
MENGUNAKAN DATABASE NCBI**

**SKRIPSI**

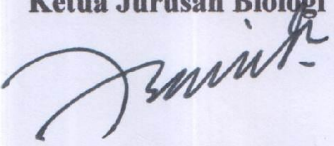
**Oleh:  
SITI RUKMANA  
NIM. 10620016**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**Tanggal :**

<b>Penguji Utama</b>	<b><u>Kholifah Holil, M.Si</u> NIP. 197511062009122002</b>	 .....
<b>Ketua Penguji</b>	<b><u>Dr. Evika Sandi Savitri, M.P</u> NIP. 19741018 200312 2 002</b>	 .....
<b>Sekretaris Penguji</b>	<b><u>Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si</u> NIP. 19650509 199903 2 002</b>	 .....
<b>Anggota Penguji</b>	<b><u>Dr.H. Ahmad Barizi, M.A</u> NIP. 19731212 199803 1 001</b>	 .....

**Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi**

  
**Dr. Evika Sandi Savitri, M.P  
NIP. 19741018 200312 2 002**

## Lembar Persembahan



*Dengan ridho Allah yang selalu mendatangkan kasih dan rahmat-Nya  
kepadaku dan dengan syafa'at Rasulullah SAW, aku persembahkan karya ini  
kepada;*

Abi dan Ummi almahbub yang berjiwa mulia dan super sabar melihatku tumbuh  
dan Abah Kyai Khusaini Al-Hafidz dan Ummy Wardah yang telah mengerti  
dalam proses penyelesaian skripsi ini

Dengan segala rasa syukur dan rendah diri di hadapan Allah SWT, skripsi ini  
dapat diselesaikan dengan ridho-Nya dan dukungan serta do'a dari seluruh orang  
almahbub.

Semoga Allah selalu mengirimkan orang-orang yang berjiwa mulia dan  
meneduhkan hati setiap saat.

Amiiiiin.....

## MOTTO

رَبِّ أَوْزِعْنِي أَنْ أَشْكُرَ نِعْمَتَكَ الَّتِي أَنْعَمْتَ عَلَيَّ وَعَلَى  
وَالِدَيَّ وَأَنْ أَعْمَلَ صَالِحًا تَرْضَاهُ وَأَدْخِلْنِي  
بِرَحْمَتِكَ فِي عِبَادِكَ الصَّالِحِينَ ﴿١٩﴾

*“Ya Tuhanku, anugerahkanlah aku ilham untuk tetap mensyukuri nikmat-Mu yang telah Engkau anugerahkan kepadaku dan kepada kedua orang tuaku dan agar aku mengerjakan kebajikan yang Engkau ridai; dan masukkanlah aku dengan rahmat-Mu ke dalam golongan hamba-hamba-Mu yang saleh.”*

Semoga Allah memasukkanku ke dalam golongan orang-orang yang mensyukuri nikmat-Nya serta menjadi hamba yang saleh dengan ilmu-Nya. Karena mencari ilmu merupakan sebuah kebaikan

Dan Allah ta'ala mencintai orang-orang yang berbuat kebaikan

وَاللَّهُ يُحِبُّ الْمُحْسِنِينَ ﴿١٩﴾ - عمران: ١٣٤

**SURAT PERNYATAAN  
ORISINALITAS PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Siti Rukmana

NIM : 10620016

Jurusan : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul : Perbandingan Sekuen Kapang *Trichoderma* Sp. Berdasarkan Internal Transcribed Spacer (ITS) rDNA dengan Menggunakan Database NCBI

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa hasil penelitian saya ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dalam daftar pustaka.

Apabila ternyata hasil penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur penjiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggungjawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 30 Juni 2015  
Yang membuat pernyataan,

SITI RUKMANA  
NIM. 10620016

## KATA PENGANTAR



*Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarokatuh*

Alhamdulillah rabbil 'Alamin, puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala karunia dan rahmat-Nya, shalawat serta salam tetap selalu tercurahkan kepada *sayyidana nabiyyina* Muhammad SAW sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi dengan judul “Perbandingan Sekuen Kapang *Trichoderma* Sp. Berdasarkan Internal Transcribed Spacer (ITS) rDNA dengan Menggunakan Database NCBI”. Skripsi ini dibuat sebagai salah satu syarat bagi mahasiswa sarjana program S1 untuk meraih gelar Sarjana Sains (S. Si) pada Program Studi Ilmu Biologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Penulis menyampaikan penghargaan dan ucapan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. H. Mudjia Raharjo, M.Si, selaku rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
2. Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si, selaku dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
3. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P, selaku ketua jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
4. Dr. Ulfah Utami, M.Si. selaku dosen dan pembimbing skripsi bagi penulis
5. Dr. H. Ahmad Barizi, MA. selaku dosen dan pembimbing agama skripsi
6. Mahrus Ismail, M. Si. selaku laboran laboratorium genetika dan molekuler, penulis menyampaikan terimakasih atas bimbingan dan kesediaannya untuk proses penyelesaian skripsi
7. Didik Wahyudi, M.Si yang telah menyediakan waktunya untuk berdiskusi
8. Seluruh dosen dan staf pengajar Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi UIN MALIKI Malang, penulis juga menyampaikan terimakasih atas pengertian dan dukungannya
9. Keluarga Bani Marsuki dan Bani 'Arif terutama Abi, Ummi, mbak Ira, Mas Aji, Mba Iye dan Mba Uki tercinta, penulis sampaikan terimakasih

atas doa dan nasihat yang diberikan, pengertian, dukungan serta pengorbanan yang diberikan selama penulis menyelesaikan studi ini

10. Sahabat seperjuangan Asifatul Qubais, Mar'atus Shalihah, Luluk Maftuhah, Fitrah Arya dan asisten laboratorium Adelina
11. Rekan-rekan mahasiswa Jurusan Biologi khususnya Uswatun Hasanah dan angkatan 2010, penulis menyampaikan terimakasih atas segala bantuan, dukungan dan waktu yang diluangkan untuk berdiskusi selama penulis menempuh pendidikan program Sarjana
12. Abah Kyai Khusaini Al-Hafidz dan Ummi Wardah serta *asatidzaty kulluhum jami'a*, penulis menyampaikan terima kasih atas do'a dan pengertiannya selama penulis menyelesaikan skripsi
13. Segenap santri Nurul Furqan khususnya kamar Shofiyah Binti Huyyay serta Najma Muniroh, mbak Imaniyah, Rofi', Yuhas, Afiyah, Mbak isti, Sofie, Dewi, dan Himmaty, Bude Fika, penulis menyampaikan terima kasih atas segala dukungan dan waktu yang diberikan selama penulis mengerjakan skripsi

Semoga Allah SWT memberikan balasan yang berlipatganda dan semoga penelitian ini dapat memberikan manfaat.

*Wassalamu'alakum Warahmatullahi Wabarokatuh*

Malang, Februari 2015

Siti Rukmana

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PERSETUJUAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>LEMBAR PERSEMBAHAN</b> .....	<b>v</b>
<b>MOTTO</b> .....	<b>vi</b>
<b>SURAT PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xiv</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>xv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	7
1.3 Tujuan Penelitian .....	7
1.4 Manfaat Penelitian .....	7
1.5 Batasan Penelitian .....	8
<b>BAB II KAJIAN PUSTAKA</b>	
2.1 Integrasi Sains dan Agama .....	9
2.1.1 Kapang dalam al-Quran .....	9
2.1.2 DNA dalam al-Quran .....	11
2.2 Kapang Trichoderma sp. ....	12
2.2.1 Taksonomi Kapang Trichoderma sp. ....	12
2.2.2 Morfologi Kapang Trichoderma sp .....	13
2.2.3 Ekologi Kapang Trichoderma sp .....	14
2.2.4 Fisiologi Kapang Trichoderma sp .....	15
2.3 Identifikasi Kapang Trichoderma sp .....	18
2.3.1 Identifikasi secara Konvensional Kapang Trichoderma sp..	18
2.3.2 Identifikasi secara Molekuler Kapang Trichoderma sp .....	21
2.3.3 Internal Transcribed Spacer (ITS) rDNA.....	22
2.3.4 Penerapan Bioinformatika dalam Studi Filogenetik .....	24
2.3.5 Database NCBI .....	29

### **BAB III METODE PENELITIAN**

3.1 Jenis Penelitian.....	33
3.2 Waktu dan Tempat.....	33
3.3 Alat dan Bahan.....	33
3.3.1 Alat.....	33
3.3.2 Bahan.....	34
3.4 Prosedur Penelitian.....	34
3.4.1 Peremajaan Kapang.....	34
3.4.2 Teknik Molekuler untuk Perbandingan Sekuen Kapang.....	35
3.4.2.1 Isolasi DNA.....	35
3.4.2.2 Uji Kuantitatif DNA Kapang <i>Trichoderma</i> sp.....	36
3.4.2.3 Amplifikasi DNA Kapang <i>Trichoderma</i> sp dengan PCR.....	36
3.4.2.4 Uji Kualitatif DNA <i>Trichoderma</i> sp.....	37
3.4.2.5 Sekuensing DNA Kapang <i>Trichoderma</i> sp.....	38
3.4.3 Analisis Data.....	38
3.4.3.1 Pembacaan Sekuen Hasil Sekuensing.....	39
3.4.3.2 Penggabungan Hasil Sekuensing Forward dan Reverse.....	39
3.4.3.3 Pencarian Database Spesies Lain dengan Gen Bank.....	40
3.4.3.4 Pensejajaran dan Filogenetik Sekuen DNA.....	41
3.4.3.5 Perhitungan Similaritas dan Jarak Genetik <i>Trichoderma</i> sp dengan Spesies Lain.....	42

### **BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

4.1 Hasil Isolasi DNA dan PCR <i>Trichoderma</i> sp.....	43
4.2 Sekuen DNA Kapang <i>Trichoderma</i> sp.....	49

### **BAB IV PENUTUP**

5.1 Kesimpulan.....	57
5.2 Saran.....	57

<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	58
-----------------------------	----

### **LAMPIRAN**

**DAFTAR TABEL**

Gambar 4.1 Hasil Uji Kuantitatif DNA Sampel.....28



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Morfologi <i>Trichoderma</i> sp. ....	10
Gambar 2.2	Letak Daerah Internal Transcribed Spacer (ITS) rDNA .....	13
Gambar 4.1	Hasil elektroforesis Isolasi DNA genom <i>Trichoderma</i> sp.....	27
Gambar 4.2	Hasil Amplifikasi DNA <i>Trichoderma</i> sp dengan menggunakan ITS1-ITS4 .....	29
Gambar 4.3	Sekuen Lengkap Gen ITS rDNA <i>Trichoderma</i> sp Hasil Contig Forward dan Reverse.....	30
Gambar 4.4	Hasil Analisis Filogenetik <i>Trichoderma</i> sp. dengan Spesies Lain .....	31

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Diagram alir Kegiatan secara Umum .....	49
Lampiran 2	Tahap Isolasi DNA (Modifikasi Doyle & Doyle, 1987) .....	50
Lampiran 3	Tahap Purifikasi, Sequencing DNA, dan Analisis Filogenetik	52
Lampiran 4	Sekuen DNA ITS <i>Trichoderma</i> /Hypocrea dari Genbank.....	53
Lampiran 5	Elektroforegram Hasil Sekuensing Dengan Squence Scanner	54
Lampiran 6	Hasil Proses Penyatuan Sekuen ITS Sampel <i>Trichoderma</i> sp. dengan Bioedit.....	58
Lampiran 7	Hasil BLAST Sekuen <i>Trichoderma</i> Sp. Dengan NCBI.....	60
Lampiran 8	Hasil Penyejajaran Sekuen ITS rDNA Sampel <i>Trichoderma</i> Sp. Dan Spesies Lain.....	61
Lampiran 9	Perhitungan Similaritas Dan Jarak Genetik Antar Spesies Dengan Mega 6.0.....	64

## ABSTRAK

**Rukmana, Siti. 2015. Perbandingan Sekuen Kapang *Trichoderma* sp. Berdasarkan *Internal Transcribed Spacer* (ITS) rDNA dengan Menggunakan Database NCBI. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing Biologi: Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si. Pembimbing Agama: Dr. H. Ahmad Barizi, M.A**

---

Kata Kunci: *Trichoderma* sp., *Internal Transcribe Spacer*, NCBI

Berdasarkan identifikasi secara morfologi telah ditemukan kapang *Trichoderma* sp. sebagai penghasil selulase. Kapang tersebut berasal dari ampas tebu dan memerlukan konfirmasi terkait spesies yang telah ditemukan. Salah satu alternatif untuk mengkonfirmasi hasil identifikasi secara morfologi tersebut, yaitu metode molekuler dengan membandingkan sekuen kapang *Trichoderma* sp. berdasarkan *Internal Transcribed Spacer ribosomal* (ITS) rDNA dengan menggunakan database NCBI. Pemilihan ITS rDNA sebagai penanda molekuler, disebabkan variasi sekuens atau laju evolusinya yang cukup tinggi bahkan dalam spesies yang sama dibandingkan dengan daerah lainnya pada rDNA subunit kecil dan subunit besar, dan semua kapang memiliki ITS rDNA. Penelitian ini bertujuan membandingkan sekuen kapang *Trichoderma* sp. berdasarkan Internal Transcribed Spacer (ITS) rDNA dengan menggunakan database NCBI.

Sampel yang digunakan adalah isolat murni *Trichoderma* sp. hasil isolasi dari ampas tebu yang dilakukan oleh Surakhman (2013). Selanjutnya sampel tersebut diisolasi DNA menggunakan metode bufer CTAB modifikasi dari Doyle & Doyle (1987), diamplifikasi DNA menggunakan primer ITS1 dan ITS4. Hasil amplifikasi DNA disekuensing dengan ABI PRISM 3730xl Genetic Analyzer, Applied Biosystem, USA. Data yang didapatkan dari beberapa tahap yang telah dilakukan adalah data berupa DNA hasil PCR, sekuen DNA hasil PCR, dan perbandingan sekuen DNA kapang *Trichoderma* sp. hasil isolasi dengan spesies lainnya.

Hasil penelitian menunjukkan DNA genom *Trichoderma* sp. berukuran 23130 bp, memiliki konsentrasi 92.56 mg/  $\mu$ l yang menunjukkan kemurnian 1.91. Hasil amplifikasi DNA kapang *Trichoderma* sp. menghasilkan ampikon berukuran sekitar 600 bp. Sedangkan Perbandingan hasil sekuensing kapang *Trichoderma* sp. dengan spesies lainnya menunjukkan bahwa sampel *Trichoderma* sp. hasil isolasi dari ampas tebu adalah satu kelompok dengan *Trichoderma harzianum*, *T.piluliferum*, *Trichoderma* sp. SQR339, *Hypocrea nigricans*, dan *Trichoderma* sp. NFML CH12 BB. 15, *Trichoderma aureoviride*, *Hypocrea lixii*, *Trichoderma* BAB-4585.

## ABSTRACT

**Rukmana, Siti. 2015. The Comparing *Trichoderma* sp. Mould sequence by using Internal Transcribed Spacer with NCBI Database. Thesis. Department of Biology, Faculty of Science and Technology, State Islamic University Maulana Malik Ibrahim Malang. Biology Supervisor: Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si. Religion Supervisor: Dr. H. Ahmad Barizi, M.A.**

---

Keyword: *Trichoderma* sp., *Internal Transcribe Spacer*, NCBI

Based on the identification of morphological basis has been found mould *Trichoderma* sp. as the producer of selulase. The molds come from cane dregs and require confirmation of related species have been found. One alternative to confirm the results of the identification in the morphology, molecular methods, i.e. by comparing the sequence mould *Trichoderma* spp. based on ribosomal Internal Transcribed Spacers (ITS) of rDNA using NCBI database. The selection of ITS rDNA as a molecular marker, due to variation sequences or the rate of its evolution are quite high even within the same species compared to other areas in the small subunit rDNA and the large subunit, and all the mold has ITS rDNA. This study aimed at comparing the sequence mould *Trichoderma* spp. based on Internal Transcribed Spacer (ITS) rDNA using NCBI database.

The sample used is pure *Trichoderma* sp. isolates the results of isolation from the sugar cane by-product done by Surakhman (2013). Next the sample of DNA was isolated using CTAB method modified bufer Doyle & Doyle (1987), diamplifikasi DNA ITS1 and ITS4 primer uses. Disekuensing DNA amplification results with ABI PRISM 3730xl *Genetic Analyzer*, *Applied Biosystem*, USA. Data obtained from several stages that have been done are the data in the form of DNA, DNA sequence, PCR results results of PCR, DNA sequence comparison and mould *Trichoderma* sp. isolation result with other species.

The results showed the DNA genome of *Trichoderma* sp. sized 23130 bp, has a concentration of 109.92 mg/μl indicating the purity of 1.91. DNA amplification results mould *Trichoderma* SP. producing amplikon measuring about 600 bp. Whereas the comparison of the results of the sequencing mould *Trichoderma* sp. with other species indicates that *Trichoderma* spp. samples results isolation from cane dregs is one group with *Trichoderma harzianum*, *T. piluliferum*, *Trichoderma* sp. SQR339, *Hypocrea nigricans*, and *Trichoderma* sp. CH12 NFML W. 15, *Trichoderma aureoviride*, *Hypocrea lixii*, *Trichoderma* CHAPTER-4166.

## مستخلص البحث

ستي روقمانا ، ٢٠١٥ ، مقارنة تسلسل من العفن الترايكوديرما *sp.* استناداً إلى المتأشب مبادعة نسخها الداخلية (لها) باستخدام قاعدة البيانات نكبي NCBI ، بحث جامعي ، قسم الأحياء بكلية العلوم والتكنولوجيا في جامعة مولانا مالك إبراهيم الحكومية الإسلامية بمالانج .

المشرف: الأستاذة الدكتورة الحاجة ألفة أوتامي الماجستير ، الأستاذ الدكتور الحاج أحمد بارزي الماجستير .

### الكلمات الأساسية: الترايكوديرما ليرة سورية، الداخلية نسخ فاصل، NCBI.

تعتمد على تحديد أساس المورفولوجية تم العثور على قوالب الترايكوديرما *sp.* كمنتج سيلولاسي. القوالب من الثمالة قصب وتتطلب تأكيداً لذات الصلة تم العثور على الأنواع. بديل واحد لتأكيد نتائج تحديد الهوية في مورفولوجية، الأساليب الجزيئية، أي عن طريق مقارنة التسلسل العفن الترايكوديرما *spp.* تعتمد على ريبوسومال الداخلية نسخها الفواصل (البحث عن) لاستخدام قاعدة البيانات نكبي المتأشب. اختيار المتأشب به كعلامة جزيئية، نظراً لاختلاف تسلسل أو معدل تطورها مرتفعة جداً حتى داخل نفس الأنواع مقارنة بمناطق أخرى في المتأشب وحدة فرعية صغيرة وفرعية كبيرة، وكل العفن قد المتأشب به. تهدف هذه الدراسة مقارنة العفن تسلسل الترايكوديرما *spp.* استناداً إلى المتأشب مبادعة نسخها الداخلية (لها) باستخدام قاعدة البيانات نكبي.

العينة المستخدمة محض تريتشوديرما *sp.* يعزل نتائج العزلة من ثانوي قصب السكر الذي قام به ساركمان (٢٠١٣). التالية العينة من الحمض النووي تم عزلها باستخدام أسلوب كتاب يستخدم المعدل بوفير دويل & دويل (١٩٨٧)، ديامبليفيكاسي ITS1 الحمض النووي و ITS4 التمهيدي. نتائج تضخيم "الحمض النووي ديسيكوبينسينج" مع "بريزم أبي" xI٣٧٣٠ "الوراثية محلل"، تطبق بيوسيسنيم، الولايات المتحدة الأمريكية. البيانات التي تم الحصول عليها من عدة مراحل وقد تم القيام به من البيانات الموجودة في النموذج من الحمض النووي، وتسلسل الحمض النووي، بكر النتائج نتائج PCR، الحمض النووي تسلسل المقارنة والعفن الترايكوديرما *sp.* العزلة نتيجة مع الأنواع الأخرى.

وأظهرت النتائج جينوم الحمض النووي الترايكوديرما *sp.* الحجم ٢٣١٣٠ شركة برينيش بتروليوم، قد تركز ١٠٩.٩٢ مغ/ميكروليتر تشير إلى نقاء ١.٩١. نتائج تضخيم الحمض النووي العفن الترايكوديرما *sp.* المنتجة أمبليكون قياس حوالي ٦٠٠ هناك بينما المقارنة بين نتائج التسلسل الترايكوديرما *sp.* مع الأنواع الأخرى تشير إلى أن الترايكوديرما *spp.* عينات النتائج في معزل عن الثمالة قصب مجموعة واحدة مع *harzianum* الترايكوديرما، بيلوليفيروم ت، الترايكوديرما *SQR339*، *sp.* هيبوكريا الأسود والترايكوديرما *sp. CH12* نفلم دبليو ١٥، أوريوفيريدي الترايكوديرما، هيبوكريا ليزي، الترايكوديرما الفصل-٤١٦٦.

# **BAB I PENDAHULUAN**

## **1.1 Latar Belakang**

Kapang dikenal sebagai agen pendegradasi bahan organik yang kuat. Kemampuan tersebut didukung oleh aktivitas enzimatik dan karakteristik struktural yang dimiliki oleh kapang (Rakhmawati, 2010). Kapang juga memiliki beberapa keunggulan lain, diantaranya merupakan spesies yang mampu tumbuh di lingkungan yang sedikit nutrisi, kelembaban yang rendah dengan penyebaran yang luas, dan spora yang dihasilkan melimpah, sehingga dapat menghasilkan enzim yang tinggi (Salma dan Gunarto, 2007).

Beberapa enzim yang dapat dihasilkan oleh kapang, diantaranya enzim lipase, selulase, protease dan kitinase. Menurut Talanca (2002), kapang juga dapat menghasilkan enzim kitinase (pendegradasi kitin) yang menyebabkan kapang parasit bagi jamur yang lainnya. Kapang juga memiliki potensi selulolitik karena menghasilkan enzim selulase pada substrat yang mengandung selulosa. Enzim selulase yang menyebabkan kapang dapat tumbuh secara langsung di atas kayu yang terdiri atas selulosa sebagai polimer dari glukosa.

Kemampuan kapang dalam menghasilkan selulase merupakan salah satu bentuk kekuasaan Allah yang harus diyakini. Hal tersebut telah dijelaskan dalam kitab suci al-Qur'an surat Yunus ayat 61:

وَمَا تَكُونُ فِي شَأْنٍ وَمَا تَتْلُوا مِنْهُ مِنْ قُرْآنٍ وَلَا تَعْمَلُونَ مِنْ عَمَلٍ إِلَّا  
 كُنَّا عَلَيْكُمْ شُهُودًا إِذْ تُفِيضُونَ فِيهِ وَمَا يَعْزُبُ عَنْ رَبِّكَ مِنْ  
 مِثْقَالِ ذَرَّةٍ فِي الْأَرْضِ وَلَا فِي السَّمَاءِ وَلَا أَصْغَرَ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرَ  
 إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ ﴿٦١﴾

*“Dan tidaklah engkau (Muhammad) berada dalam suatu urusan, dan tidak membaca suatu ayat al-Qur’an serta tidak pula kamu melakukan suatu pekerjaan, melainkan kami menjadi Saksi atasmu ketika kamu melakukannya. Tidak lengah sedikitpun dari pengetahuan Tuhanmu biarpun sebesar dzarrah, baik dibumi ataupun di langit. Tidak ada sesuatu yang lebih kecil dan yang lebih besar dari pada itu, melainkan semua tercatat dalam kitab yang nyata (Lauh Mahfuzh)”*  
 (QS. Yunus/10:61)

Tafsir Ibnu Katsir (2014) menguraikan Surat Yunus/10 ayat 61 bahwa Allah memberi kabar kepada Nabi-Nya SAW, bahwa sesungguhnya Allah mengetahui semua keadaannya, keadaan umatnya dan keadaan semua makhluk dalam setiap saat, setiap menit dan setiap detik. Dan sesungguhnya tidak luput dari pengetahuan dan penglihatan-Nya, perbuatan sebesar biji *dzarrah* yang paling kecil atau yang lebih besar darinya, kecuali tercatat dalam Kitab yang nyata. Jika pengetahuan-Nya terhadap gerakan segala sesuatu seperti ini, maka bagaimana pengetahuan-Nya terhadap orang-orang yang dibebani dan diperintah untuk beribadah.

Kata “*dzarrah*” dalam al-Qur’an Surat Yunus/10 ayat 61 memiliki arti benda kecil yang tidak dapat dibagi lagi. *Dzarrah* adalah benda yang paling kecil dan tidak dapat diamati dengan mata telanjang. Adapun maksud kata *dzarrah* dalam ilmu biologi adalah makhluk hidup yang sangat kecil dan tidak dapat diamati dengan mata telanjang, disebut mikroorganisme. Kapang merupakan salah satu mikroorganisme yang tidak dapat dilihat dengan mata telanjang sehingga

dapat disimpulkan bahwa keberadaan kapang dibumi telah direncanakan dan disampaikan oleh Allah SWT dalam firman-Nya. Hal tersebut sesuai dengan uraian dalam kitab Tafsir Ibnu Katsir (2014) bahwa tidak ada sesuatupun yang luput dari pengetahuan dan penglihatan-Nya, meskipun sebesar biji dzarrah yang paling kecil atau yang lebih besar darinya, kecuali tercatat dalam Kitab yang nyata (*Lauh Mahfuzh*).

Keberadaan kapang telah dibuktikan oleh beberapa peneliti, salah satu kapang yang berhasil ditemukan adalah kapang *Trichoderma* sp. yang berhasil diidentifikasi secara konvensional oleh Surakhman (2013) yang telah berhasil mengisolasi kapang selulolitik pada 3 sampel ampas tebu dan berhasil mendapatkan 13 isolat kapang dengan karakteristik yang berbeda. Berdasarkan kenampakan secara morfologi baik makroskopis maupun mikroskopis, serta fisiologis, dapat diketahui kapang terbaik yang teridentifikasi dalam produksi selulase, diantaranya *Trichoderma* sp, *Botrytis* sp, *Gliocladium* sp. Ketiga kapang tersebut memiliki aktivitas selulase dari yang tertinggi yaitu isolat *Trichoderma* sp. dengan nilai 3,38 cm, *Botrytis* sp. dengan nilai 3,09 cm, *Gliocladium* sp. dengan nilai 1,32 cm. Penelitian tersebut membuktikan bahwa *Trichoderma* sp. memiliki aktivitas selulase tertinggi jika dibandingkan dengan spesies *Gliocladium* sp. dan *Botrytis* sp.

Penelitian Surakhman (2013) menunjukkan adanya identifikasi terhadap kapang *Trichoderma* sp. hingga tingkat genus. Menurut Dewi (2012), kejelasan identitas dari kapang sangat penting untuk digunakan dalam penelitian. Hal tersebut dikarenakan suatu penelitian tidak dapat diulang atau diuji kebenarannya jika identitas dari objek yang diteliti meragukan.

Sebagian besar spesies kapang dideskripsikan secara konvensional berdasarkan morfologi. Salah satu karakter morfologi yang dapat digunakan untuk identifikasi kapang adalah penampakan makroskopik koloni (Kurtzman, 2003), diantaranya; pengamatan berdasarkan warna, morfologi, serta tepi koloni pada medium padat serta keberadaan endapan (*sediment*), pelikel (*pellicle*), cincin (*ring*), dan pulau-pulau (*islets*) yang terdapat pada medium cair (Kirsop, 1984). Menurut Yarrow (1998), penampakan mikroskopik juga dapat digunakan untuk identifikasi kapang, diantaranya bentuk sel, kisaran ukuran sel, tipe pertunasan, keberadaan miselium palsu maupun sejati, dan tipe reproduksi seksual atau aseksual.

Uji fisiologi dan biokimia merupakan cara konvensional yang juga dapat digunakan untuk mengidentifikasi kapang (Ciardo, 2006). Menurut Barnett (2000), uji fisiologi dan biokimia untuk mengidentifikasi kapang adalah berdasarkan kemampuan memfermentasi berbagai jenis gula, kemampuan kapang dalam mengasimilasi berbagai jenis karbon dan nitrogen, kebutuhan akan vitamin, pertumbuhan pada suhu tertentu, ketahanan terhadap antibiotik sikloheksimida, uji urease dan uji *diazonium blue B* (Kurtzman, 2003).

Identifikasi konvensional berdasarkan morfologi, fisiologi maupun biokimia tersebut memiliki kelemahan diantaranya adalah waktu pengerjaan yang lama serta dapat menimbulkan kesalahan identifikasi terutama pada spesies yang berkerabat dekat (Geiser, 2004). Hal tersebut dikarenakan morfologi kapang yang sederhana, sehingga hanya sedikit karakter morfologi yang dapat digunakan untuk identifikasi (Geiser, 2004). Untuk mengatasi kelemahan tersebut telah dikembangkan metode identifikasi secara molekuler, sehingga dapat memenuhi

kebutuhan peneliti untuk mengidentifikasi kapang secara mudah, cepat dan akurat (Fell, 2000). Identifikasi secara molekuler dapat berupa pendataan sekuen DNA yang akan diteliti.

Pendataan sekuen DNA dari berbagai spesies mengalami perkembangan yang sangat pesat. Terjadi peningkatan dan kemajuan pada jumlah data yang telah diidentifikasi oleh para peneliti. Hal tersebut dikarenakan adanya perbaikan metode, teknologi serta alat yang digunakan dalam melakukan analisa biologi sehingga dapat menjaga efektifitas serta efisiensi waktu para peneliti. Dengan demikian, dapat memakan sedikit waktu dan biaya yang diperlukan untuk melakukan identifikasi gen pada suatu organisme (Muladno, 2002).

Analisis molekuler diperlukan untuk memperkuat dan mendukung identifikasi secara konvensional. Hal tersebut dikarenakan karakter molekuler lebih stabil terhadap pengaruh lingkungan (Serusiaux, 2009). Pendekatan molekuler dengan menggunakan sekuen DNA dapat digunakan untuk mengidentifikasi kapang dengan bantuan analisis sekuen DNA *internal transcribed spacer* (ITS). Hal tersebut dikarenakan daerah ITS memiliki variasi sekuen yang tinggi karena daerah tersebut merupakan daerah *noncoding* yang memiliki laju mutasi lebih tinggi dari daerah *coding* (James, 1996). Dengan demikian, analisis molekuler berupa perbandingan sekuen daerah ITS rDNA dapat dilakukan pada beberapa spesies yang berkerabat dekat.

Keunggulan dan keberadaan daerah ITS telah dibuktikan dengan beberapa penelitian yang telah dilakukan oleh beberapa peneliti sebelumnya, diantaranya; spesies *Trichoderma* sp. dari kompos berhasil diidentifikasi oleh Hermosa (2010) dengan menggunakan primer ITS1-ITS4. Hasil ampikon yang didapatkan

sepanjang 560-600 bp. Elsalam (2010), juga berhasil mengidentifikasi kapang *Trichoderma* sp. asal minyak di Saudi Arabia dengan menggunakan marker ITS rDNA. Hasil amplifikasi yang didapatkan adalah sepanjang 550-700 bp pada seluruh isolat *Trichoderma* spp. dengan menggunakan ITS1-ITS4. Penelitian Hermosa dan Elsalam membuktikan adanya daerah ITS pada kapang *Trichoderma* sp. dengan panjang sekitar 550-700. Suharjono (2010), juga menambahkan bahwa sekuen *complete* ITS rDNA memiliki panjang sekitar 600 nukleotida. *Trichoderma* sp. yang berhasil diketahui adalah berasal dari Purworejo, Brastagi dan Poncokusumo yang patogenik pada kutu sisik coklat hama pada tanaman jeruk.

Penelitian Suharjono (2010), juga menyatakan bahwa ITS rDNA merupakan bagian dari sekuen 28S rDNA. Sekuen 28S rDNA secara utuh lebih prediktif dan akurat untuk identifikasi kapang, namun sekuen 28S rDNA secara utuh tidak efisien karena memiliki sekuen nukleotida yang terlalu panjang. Oleh karena itu, dikembangkan kajian identifikasi berdasarkan perbeaan sekuen Internal Transcribe Spacer (ITS) rDNA.

Bioinformatika dapat membantu dalam mencari kejelasan identitas dari kapang *Trichoderma* sp. hasil isolasi dari ampas tebu yaitu dengan membandingkan data atau informasi yang telah diperoleh dengan bantuan analisis biologi molekuler menggunakan database NCBI, sehingga dapat memperkuat data morfologi yang telah diperoleh dari identifikasi kapang secara konvensional.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini, sebagai berikut:

1. Berapa ukuran DNA hasil PCR kapang *Trichoderma* sp. hasil isolasi dengan primer ITS1 dan ITS4?
2. Berapa ukuran seluruh sekuen DNA hasil PCR yang telah disekuensing?
3. Bagaimana hasil perbandingan dan index similaritas sekuen kapang *Trichoderma* sp. hasil isolasi dari ampas tebu dengan spesies lainnya?

## 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini, sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui ukuran DNA hasil PCR kapang *Trichoderma* sp. hasil isolasi dengan primer ITS1 dan ITS4?
2. Untuk mengetahui ukuran seluruh sekuen DNA hasil PCR yang telah disekuensing
3. Untuk mengetahui hasil perbandingn dan index similaritas sekuen kapang *Trichoderma* sp. hasil isolasi dari ampas tebu dengan spesies lainnya?

## 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dalam penelitian ini, diantaranya:

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang perkembangan dalam bidang molekuler dan bioinformatika
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dalam bidang mikrobiologi mengenai spesies *Trichoderma* sp. penghasil selulase yang berhasil diisolasi dari ampas tebu

3. Penelitian ini dapat memberikan informasi spesies *Trichoderma* sp. penghasil selulase untuk degradasi sampah organik.

### 1.5 Batasan Masalah

Batasan Masalah pada penelitian ini, diantaranya:

1. Identifikasi spesies dilakukan pada kapang penghasil selulase tertinggi hasil isolasi dari ampas tebu yaitu *Trichoderma* sp.
2. *Trichoderma* diremajakan pada media *potato dextrose agar* (PDA) selama 7 hari
3. Isolasi DNA kapang *Trichoderma* sp. dengan menggunakan modifikasi CTAB (Doyle & Doyle, 1987)
4. Penanda molekuler yang digunakan adalah *Internal Transcribe Spacer* (ITS) rDNA marker untuk kapang
5. Parameter dalam penelitian ini adalah hasil genom *Trichoderma* sp., hasil PCR *Trichoderma* sp., sekuen *Trichoderma* sp. dan hasil filogenetik

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Integrasi Sains dan Agama

##### 2.1.1 Kapang dalam Al-Qur'an

وَمَا ذَرَأْنَا لَكُمْ فِي الْأَرْضِ مُخْتَلِفًا أَلْوَانًا إِنَّ فِي ذَلِكَ  
لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَذَّكَّرُونَ



“ Dan (Dia juga mengendalikan) apa yang diciptakan untukmu di bumi ini dengan berbagai jenis dan macam warnanya. Sungguh, pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang mengambil pelajaran” (QS. An-Nahl/16:13)

Ibnu Katsir (2014) menguraikan tentang surat an-Nahl ayat 13 bahwa ketika Allah Ta'ala telah mengingatkan atas tanda-tanda yang ada di langit, Dia mengingatkan atas apa yang Dia ciptakan di bumi, berupa benda-benda yang menakjubkan dan berbagai macam sesuatu, diantaranya binatang-binatang, benda-benda tambang, tumbuh-tumbuhan, dan benda-benda mati, dengan berbagai macam warna dan bentuknya termasuk kegunaan dan keistimewaannya. Atas anugerah dan nikmat Allah, maka mereka kaum yang mengambil pelajaran mensyukurinya.

Kata “berbagai jenis” dalam al-Qur'an surat an-Nahl ayat 61 menyatakan bahwa Allah telah menciptakan makhluk hidup di bumi ini dengan berbagai bentuk, baik mikroskop maupun makroskopis. Kapang merupakan makhluk mikroskopis yang telah Allah ciptakan. Oleh karena itu, kajian tentang kapang perlu dilakukan.

Kajian tentang kapang perlu dilakukan dikarenakan kapang memiliki kemampuan untuk menghasilkan selulase yang berperan dalam berbagai proses biologis. Hal tersebut merupakan salah satu bentuk kekuasaan Allah yang harus diyakini. Allah berfirman dalam kitab suci al-Qur'an Surat Yunus/10 ayat 61:

وَمَا تَكُونُ فِي شَأْنٍ وَمَا تَتْلُوا مِنْهُ مِنْ قُرْءَانٍ وَلَا تَعْمَلُونَ مِنْ عَمَلٍ إِلَّا  
 كُنَّا عَلَيْكُمْ شُهُودًا إِذْ تُفِيضُونَ فِيهِ وَمَا يَعْزُبُ عَنْ رَبِّكَ مِنْ  
 مِثْقَالِ ذَرَّةٍ فِي الْأَرْضِ وَلَا فِي السَّمَاءِ وَلَا أَصْغَرَ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرَ  
 إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ ﴿٦١﴾

*“Dan tidaklah engkau (Muhammad) berada dalam suatu urusan, dan tidak membaca suatu ayat al-Qur'an serta tidak pula kamu melakukan suatu pekerjaan, melainkan kami menjadi Saksi atasmu ketika kamu melakukannya. Tidak lengah sedikitpun dari pengetahuan Tuhanmu biarpun sebesar dzarrah, baik di bumi ataupun di langit. Tidak ada sesuatu yang lebih kecil dan yang lebih besar dari pada itu, melainkan semua tercatat dalam kitab yang nyata (Lauh Mahfuzh)”* (QS.Yunus/10:61)

Tafsir Ibnu Katsir (2014) menguraikan Surat Yunus/10 ayat 61 bahwa Allah memberi kabar kepada Nabi-Nya SAW, bahwa sesungguhnya Allah mengetahui semua keadaannya, keadaan umatnya dan keadaan semua makhluk dalam setiap saat, setiap menit dan setiap detik. Dan sesungguhnya tidak luput dari pengetahuan dan penglihatan-Nya, perbuatan sebesar biji dzarrah yang paling kecil atau yang lebih besar darinya, kecuali tercatat dalam Kitab yang nyata. Jika pengetahuan-Nya terhadap gerakan segala sesuatu seperti ini, maka bagaimana pengetahuan-Nya terhadap orang-orang yang dibebani dan diperintah untuk beribadah.

Kata “dzarrah” dalam al-Qur'an Surat Yunus/10 ayat 61 memiliki arti benda kecil yang tidak dapat dibagi lagi. Dzarrah adalah benda yang paling kecil

dan tidak dapat diamati dengan mata telanjang. Adapun maksud kata *dzarrah* dalam ilmu biologi adalah makhluk hidup yang sangat kecil dan tidak dapat diamati dengan mata telanjang, disebut mikroorganisme. Kapang merupakan salah satu mikroorganisme yang tidak dapat dilihat dengan mata telanjang sehingga dapat disimpulkan bahwa keberadaan kapang di bumi telah direncanakan dan disampaikan oleh Allah SWT dalam firman-Nya. Hal tersebut sesuai dengan uraian dalam kitab Tafsir Ibnu Katsir (2014) bahwa tidak ada sesuatupun yang luput dari pengetahuan dan penglihatan-Nya, meskipun sebesar biji dzarrah yang paling kecil atau yang lebih besar darinya, kecuali tercatat dalam Kitab yang nyata (*Lauh Mahfuzh*).

Kata “*dzarrah*” juga terdapat dalam beberapa surat dalam al-Qur’an, diantaranya surat al-Zalzalah/98 ayat 7-8 dan an-Nisa/4 ayat 40. Maksud dari kata *dzarrah* dalam surat tersebut adalah sesuatu yang sangat kecil, namun dapat dipastikan keberadaannya. Dalam konteks ilmu biologi, *dzarrah* dapat disebut kapang. Kapang merupakan mikroorganisme yang telah dipastikan keberadaannya oleh beberapa peneliti. Salah satu kapang yang berhasil ditemukan adalah kapang selulolitik dari ampas tebu.

### 2.1.2 DNA dalam Al-Qur’an

قَالَ كَذَلِكَ قَالَ رَبُّكَ هُوَ عَلَىٰ هَٰئِهِمْ وَلِنَجْعَلَهُ آيَةً لِّلنَّاسِ  
 وَرَحْمَةً مِنَّا وَكَانَ أَمْرًا مَّقْضِيًّا

“Dia (Jibril) berkata, “Demikianlah.” Tuhanmu berfirman, “Hal itu mudah bagi-Ku, dan agar Kami menjadikannya suatu tanda (kebesaran Allah) bagi

manusia dan sebagai rahmat dari Kami; dan hal itu adalah urusan yang (sudah) diputuskan.”(QS.Maryam/19:21).

Kata “suatu tanda” dalam al-Qur’an Surat Maryam/19 ayat 21 memiliki arti bahwa ada suatu tanda kebesaran Allah pada makhluk ciptaannya. DNA merupakan tanda kekuasaan Allah yang ada pada makhluk hidup yang. DNA terdapat dalam semua makhluk hidup sebagai penyimpan utama dari informasi genetik. Kapang juga memiliki DNA sebagai penyimpan informasi genetik yang mengatur seluruh aktivitas di dalam sel. Oleh karena itu, DNA merupakan suatu tolak ukur yang baik untuk digunakan dalam suatu penelitian.

## **2.2 Kapang *Trichoderma* sp.**

### **2.2.1 Taksonomi Kapang *Trichoderma* sp.**

Kapang *Trichoderma* sp, merupakan mikroorganisme anggota Kingdom Fungi yang membentuk hifa. Jumlah spesies fungi yang telah teridentifikasi hingga tahun 1994 mencapai 70.000 spesies, dengan perkiraan penambahan 600 spesies setiap tahun. Dari jumlah tersebut, sekitar 10.000 spesies merupakan kapang (Carlie & Watkinson, 1994).

Fungi dapat dikelompokkan menjadi tiga berdasarkan morfologinya, yaitu khamir (yeast), kapang (mould), dan cendawan (mushroom). Khamir (yeast) merupakan fungi uniseluler yang dapat melakukan reproduksi aseksual dengan cara budding, fission, dan memproduksi konidia pada tangkai pendek (sterigmata). Khamir melakukan reproduksi seksual dengan menghasilkan spora seksual. Koloni khamir umumnya berbentuk bulat). Kapang adalah fungi multiseluler yang berfilamen (Deacon, 2006).

Kapang *Trichoderma* sp. merupakan fungi yang berasal dari filum Ascomycota. Karakter utama yang membedakan kapang filum Ascomycota dengan filum Zygomycota adalah struktur alat reproduksi seksual atau spora seksual. Spora seksual dari Ascomycota disebut askospora, sedangkan spora seksual dari Zygomycota disebut zigospora (Benson, 2001).

Menurut Soesanto (2008), klasifikasi *Trichoderma* sp. adalah sebagai berikut:

Kingdom Fungi

Phylum Ascomycota

Subphylum Pezizomycotina

Class Sordariomycetes

Order Hypocreales

Family Hypocreaceae

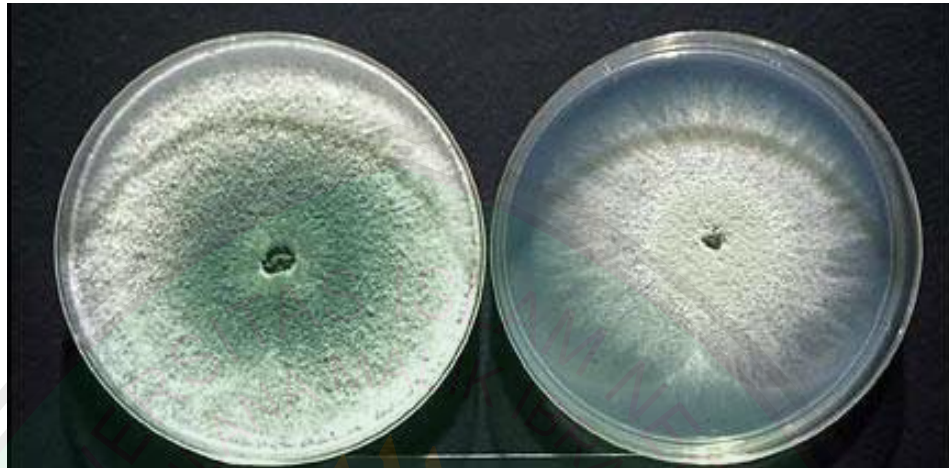
Genus *Trichoderma*

Spesies *Trichoderma* sp.

### 2.2.2 Morfologi Kapang *Trichoderma* sp.

Koloni *Trichoderma* sp. berwarna putih, kuning, hijau muda, sampai hijau tua. Susunan sel *Trichoderma* sp. bersel banyak berderet membentuk benang halus yang disebut hifa. Hifa pada jamur ini berbentuk pipih, bersekat, dan bercabang-cabang membentuk anyaman yang disebut miselium. Percabangan hifa membentuk sudut siku-siku pada cabang utama. Konidiofor bercabang dan pada ujungnya terbentuk fialid (ujung percabangan) berjumlah 1-3, berbentuk pendek,

dengan kedua ujungnya meruncing dibandingkan dengan bagian tengah, berukuran 5-7  $\mu\text{m}$ . konidia berbentuk semi bulat hingga oval berukuran 2,8-3,2  $\mu\text{m}$ , berlendir dan berdinding halus (Gandjar, 1999).



**Gambar 2.1** Morfologi *Trichoderma* sp. (Harman, 2000)

Kapang adalah fungi multiseluler yang berfilamen. Kapang terdiri dari suatu thalus yang bercabang-cabang disebut hifa. Hifa yang saling berhubungan menjalin suatu struktur semacam jala yaitu miselium. Kapang melakukan reproduksi seksual dengan menghasilkan zigospora, askospora, dan basidiospora. Kapang melakukan reproduksi aseksual dengan menghasilkan arthrokonidia, blastokonidia, sporangiospora, kladidiospora, dan konidia (Deacon, 2006).

### 2.2.3 Ekologi Kapang *Trichoderma* sp.

Kapang *Trichoderma* sp. adalah salah satu kapang tanah yang tersebar luas yang hampir dapat ditemui di lahan-lahan pertanian dan perkebunan. *Trichoderma* bersifat saprofit pada tanah, kayu, dan beberapa jenis bersifat parasit pada kapang lain. *Trichoderma* sp. bersifat kosmopolit, dan dapat diisolasi dari tanah, biji-bijian, kertas, tekstil, rhizomer kentang, gula bit, rumput, jerami, serta kayu. Memiliki suhu pertumbuhan optimum 15<sup>0</sup>C – 30<sup>0</sup>C dan maksimum 30<sup>0</sup>C – 36<sup>0</sup>C (Gandjar, 1999).

Fungi dapat hidup sebagai saprofit yaitu memanfaatkan materi organik mati yang terlarut, menghancurkan sisa-sisa tumbuhan dan hewan yang kompleks, menguraikannya menjadi zat-zat kimia yang lebih sederhana dan kemudian dikembalikan ke dalam tanah yang selanjutnya meningkatkan kesuburannya. Fungi dapat hidup sebagai parasit yaitu tumbuh pada inang yang hidup lalu menimbulkan penyakit atau kerusakan (Pelczar, 2008).

Fungi *indigenous* adalah fungi yang sejak semula telah terdapat dalam lingkungan limbah dan dapat beradaptasi di lingkungan tersebut (Maharani, 2003). Darliana (2011), menjelaskan bahwa fungi *indigenous* mampu melakukan degradasi senyawa-senyawa organik yang terdapat dalam limbah pada kondisi yang sesuai dengan peruntukannya atau dengan kata lain fungi *indigenous* memiliki kemampuan untuk mendegradasi bahan pencemar dan menjadikannya sebagai sumber nutrisi untuk metabolisme dan kehidupannya.

#### **2.2.4 Fisiologi Kapang *Trichoderma* sp.**

*Trichoderma* spp. adalah jamur yang terdapat pada hampir semua tanah dan habitat beragam. Dalam tanah, *Trichoderma* spp. adalah jamur yang paling lazim sering ditemukan. Mereka disukai oleh kehadiran tingkat tinggi akar tanaman, dimana *Trichoderma* spp. mudah menginfeksi. Beberapa strain rizosfer sangat kompeten, yaitu mampu menginfeksi dan tumbuh di akar sebagaimana yang *Trichoderma* spp. lakukan. Strain rizosfer yang paling kuat kompeten dapat ditambahkan ke tanah atau bibit dengan metode apapun. Setelah *Trichoderma* spp. masuk dan kontak dengan akar, *Trichoderma* spp. menginfeksi permukaan akar atau korteks, tergantung pada strain. Dengan demikian, jika ditambahkan sebagai perlakuan benih, strain terbaik akan menginfeksi permukaan akar bahkan ketika

akar satu meter atau lebih di bawah permukaan tanah dan mereka bisa bertahan di angka berguna hingga 18 bulan setelah aplikasi. Namun, sebagian besar strain kurang memiliki kemampuan dalam hal ini (Harman, 2000).

Kapang *Trichoderma* sp. mengekskresikan enzim ekstraselular ke lingkungan untuk mengurai substrat yang kompleks agar memperoleh nutrisi-nutrien yang diperlukan. Transportasi nutrisi ke dalam sel kapang *Trichoderma* sp. dapat berlangsung melalui transportasi aktif. Adanya pertumbuhan oleh kapang *Trichoderma* sp. pada suatu substrat dapat juga diketahui karena, selain ada penambahan massa sel, proses metabolisme menyebabkan perubahan pada substrat, antara lain substrat menjadi lunak, basah-basah, timbul bau yang semula tidak tercium, timbulnya perubahan warna, atau kekeruhan pada suatu substrat cair. Pertumbuhan kapang *Trichoderma* sp. pada substrat sebenarnya adalah suatu proses fermentasi, yaitu kapang *Trichoderma* sp. mengurai komponen-komponen kompleks yang ada dalam substrat menjadi komponen-komponen sederhana yang dapat diserap sel dan digunakan untuk sintesis aneka bagian sel dan untuk energi kegiatannya (Gandjar, 2006).

Menurut Hidayat (2006), Karakteristik fisiologi kapang *Trichoderma* sp. adalah sebagai berikut:

1. Kandungan Air

Pada umumnya kapang *Trichoderma* sp. yang memiliki hifa lebih tahan terhadap kekeringan dibanding khamir atau bakteri. Namun demikian, batasan kandungan air total pada makanan yang baik untuk pertumbuhan kapang *Trichoderma* sp. dapat diestimasi, dan dikatakan bahwa kandungan air

dibawah 14-15% pada biji-bijian atau makanan kering dapat mencegah atau memperlambat pertumbuhan kapang *Trichoderma* sp.

## 2. Suhu

Kebanyakan kapang *Trichoderma* sp. termasuk dalam kelompok mesofilik, yaitu dapat tumbuh pada suhu normal. Suhu optimum pada kebanyakan kapang sekitar 25<sup>0</sup>C -30<sup>0</sup>C, namun beberapa tumbuh baik pada suhu 35 -37 C atau lebih. Sejumlah kapang termasuk dalam psikrotrofik, yaitu yang dapat tumbuh baik pada suhu dingin dan beberapa masih dapat tumbuh pada suhu dibawah pembekuan (-5-10 C). Hanya beberapa yang mampu tumbuh pada suhu tinggi (termofilik).

## 3. Kebutuhan Oksigen dan derajat keasaman

Kapang yang memiliki hifa seperti *Trichoderma* sp. biasanya bersifat aerob, yang membutuhkan oksigen untuk pertumbuhannya. Kebanyakan kapang dapat tumbuh pada interval pH yang luas (pH 2,0-8,5). Walaupun pada umumnya kapang lebih suka pada kondisi asam.

## 4. Kebutuhan Makanan (Nutrisi)

Kapang *Trichoderma* sp. pada umumnya mampu menggunakan bermacam-macam makanan, dari yang sederhana sampai yang kompleks. Kebanyakan kapang memiliki bermacam-macam enzim hidrolitik, yaitu amilase, pektinase, proteinase, dan lipase.

## 5. Senyawa Penghambat

Beberapa kapang *Trichoderma* sp. memproduksi komponen penghambat bagi mikrobia lain. Beberapa komponen kimia bersifat mikostatik, menghambat pertumbuhan kapang lain (misalnya asam sorbat, propional, asetat) atau bersifat fungisida yang mematikan kapang.

Rakhmawati (2009) menyatakan bahwa kandungan lignoselulosa yang terdapat pada jaringan biji kacang tanah tidak akan menghalangi serangan kapang karena kapang merupakan degrader lignoselulosa yang kuat dibandingkan bakteri dan protozoa. Hifa kapang teradaptasi secara spesial untuk tumbuh pada permukaan bahan padat dan dalam substrat sehingga dapat menambah penetrasi dengan kekuatan mekanik. Kemampuan kapang melakukan penetrasi sampai jaringan tanaman dengan hifa dan aktivitas enzimatisnya memperlemah struktur dinding sel tanaman yang mengandung lignoselulosa. Hifa kapang mampu melakukan penetrasi ke dalam jaringan dan menghancurkan dinding sel tanaman dengan berbagai enzim, mendegradasi struktur jaringan tanaman.

### 2.3 Identifikasi Kapang *Trichoderma* sp.

#### 2.3.1. Identifikasi secara konvensional Kapang *Trichoderma* sp.

Isolasi kapang *Trichoderma* sp. adalah memisahkan kapang *Trichoderma* sp. dengan kapang lain yang berasal dari campuran berbagai kapang. Mengisolasi kapang *Trichoderma* dengan cara menumbuhkan (menanam) dalam medium padat, sel-sel kapang *Trichoderma* sp. akan membentuk koloni yang tetap pada tempatnya. Sel kapang yang tertangkap pada medium padat pada beberapa tempat yang terpisah, maka sel atau kumpulan sel kapang yang hidup akan berkembang

menjadi suatu koloni yang terpisah (Waluyo, 2008). Isolasi meliputi mendapatkan, memurnikan, identifikasi, dan pengujian produksi (Hidayat, 2006).

Ada berbagai macam cara mengisolasi kapang *Trichoderma* sp. Isolasi harus memperhatikan beberapa hal penting : (1) sifat spesies kapang yang akan diisolasi, (2) tempat hidup atau asal kapang, (3) medium untuk pertumbuhan yang sesuai, (4) cara menanam kapang tersebut, (5) cara inkubasi kapang, (6) cara menguji bahwa kapang yang diisolasi telah berupa biakan murni dan sesuai dengan yang dimaksud, dan (7) cara memelihara agar kapang yang telah diisolasi tetap merupakan biakan murni (Waluyo, 2008).

Identifikasi kapang secara konvensional dapat dilakukan dengan mengamati karakter mikro dan makromorfologi kapang, kemudian dibandingkan dengan kunci identifikasi pada monograf. Karakter mikromorfologi kapang yang penting adalah ada tidaknya spora aseksual (Gambar 2.3) dan spora seksual (Gambar 2.4), ukuran spora aseksual dan seksual, tipe *conidiogenous cell*, ada tidaknya septa pada hifa, dan ukuran lebar hifa. Dan karakter makromorfologi koloni kapang meliputi warna koloni, tekstur koloni, keberadaan zonasi, *radial furrow*, dan *growing zone* (Pitt dan Hocking, 2009).

Menurut Barnett (2003), identifikasi adalah membandingkan isolat yang belum diketahui dengan taksa yang sudah ada untuk menetapkan identitasnya. Identifikasi kapang dapat dilakukan secara konvensional dan molekular. Identifikasi khamir secara konvensional dilakukan berdasarkan karakter morfologi, fisiologi, dan biokimia.

Sebagian besar spesies fungi dideskripsikan secara konvensional berdasarkan morfologi. Namun demikian, metode tersebut memiliki kelemahan karena morfologi kapang yang sederhana (Geiser 2004). Salah satu karakter morfologi yang dapat digunakan untuk identifikasi kapang adalah penampakan makroskopik koloni (Kurtzman, 2003). Penampakan makroskopik yang umumnya diamati adalah warna, profil, serta tepi koloni pada medium padat dan keberadaan endapan (*sediment*), pelikel (*pellicle*), cincin (*ring*), dan pulau-pulau (*islets*) pada medium cair (Kirsop, 1984). Selain penampakan makroskopik, penampakan mikroskopik juga dapat digunakan untuk identifikasi kapang. Penampakan mikroskopik yang umumnya diamati adalah bentuk sel, kisaran ukuran sel, tipe pertunasan, keberadaan miselium palsu atau sejati, dan tipe reproduksi seksual atau aseksual (Yarrow 1998).

Identifikasi kapang secara konvensional juga dapat menggunakan berbagai uji fisiologi dan biokimia, karena umumnya spesies kapang dapat dibedakan berdasarkan karakter fisiologi dan biokimia (Ciardo, 2006). Uji fisiologi dan biokimia yang digunakan untuk identifikasi kapang antara lain adalah: kemampuan memfermentasi berbagai jenis gula, kemampuan mengasimilasi berbagai jenis karbon dan nitrogen, kebutuhan akan vitamin, pertumbuhan pada suhu tertentu, ketahanan terhadap antibiotik sikloheksimida, uji urease (Barnett, 2000), dan uji *diazonium blue B* (Kurtzman, 2003). Identifikasi konvensional berdasarkan morfologi, fisiologi maupun biokimia memerlukan waktu pengerjaan yang lama dan dapat menimbulkan kesalahan identifikasi terutama pada spesies yang berkerabat dekat (Geiser, 2004).

Hidayat (2006), menjelaskan bahwa teknik goresan tidak efektif untuk kapang dan tidak dianjurkan. Isolasi tergantung pada pengamatan sejumlah kecil sampel hifa atau spora, dianggap murni oleh mata, lensa pembesar atau stereomikroskop dan diletakkan sampel pada media agar sebagai inokulum titik. Kemurnian dinampakkan oleh keseragaman koloni yang terbentuk setelah inkubasi. Penampakan kultur campuran tergantung pada laju pertumbuhan kapang yang ada. Jika laju beragam, kultur campuran sering menunjukkan adanya gumpalan pada titik inokulum. Campuran sering diindikasikan oleh koloni dengan sektor pertumbuhan. Sektor akan menunjukkan perbedaan miselia, spora ataupun warna.

### **2.3.2. Identifikasi secara Molekuler Kapang *Trichoderma* sp.**

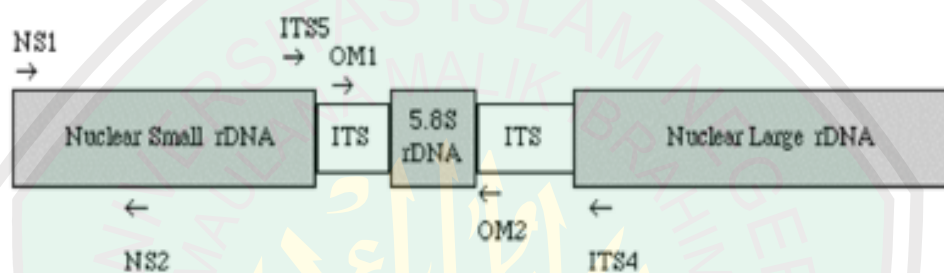
Kebutuhan untuk mengidentifikasi kapang dengan mudah, cepat, dan akurat semakin dibutuhkan seiring perkembangan zaman, oleh karena itu telah dikembangkan metode identifikasi secara molekular untuk mengatasi kelemahan identifikasi konvensional (Fell, 2000). Perkembangan yang cepat sedang terjadi dalam pendataan sekuen DNA dari berbagai spesies. Kemajuan dan peningkatan jumlah data yang telah diidentifikasi oleh para peneliti selalu meningkat dari waktu ke waktu. Hal ini disebabkan adanya perbaikan metode, teknologi dan alat yang digunakan dalam melakukan analisa biologi sehingga analisa penelitian biologi molekuler di tingkat laboratorium menjadi lebih efektif dan efisien. Perbaikan-perbaikan ini ditunjukkan dengan semakin sedikit waktu dan biaya yang diperlukan untuk melakukan identifikasi gen pada suatu organisme (Muladno, 2002).

### 2.3.3. *Internal Transcribed Spacer (ITS) rDNA*

*Deoxyribonucleic acid* (DNA) adalah penyimpan utama dari informasi genetik. Informasi genetik ini disalin dan dipindahkan ke molekul RNA, sekuen nukleotida yang mengandung kode untuk sekuen asam amino yang khas. Protein kemudian disintesis dalam suatu proses translasi dari RNA. Pada organisme tinggi seperti manusia, ternak dan tumbuhan DNA biasanya terdapat di dalam inti sel dan beberapa organ lain di dalam sel seperti mitokondria dan kloroplas. Molekul DNA adalah dua rangkaian nukleotida yang tersusun secara linier dan saling berikatan membentuk susunan berpilin (*double helix*). Satu rangkaian nukleotida merupakan susunan dari banyak nukleotida yang diikat satu sama lain oleh ikatan fosfodiester sedangkan kedua rangkaian nukleotida tersebut direkatkan oleh ikatan hidrogen. Setiap nukleotida disusun oleh tiga komponen, yaitu molekul gula pentosa, gugus fosfat, dan basa nitrogen (Nicholas, 1993).

Salah satu karakter molekuler yang dapat digunakan adalah genom nuklear. Bagian Genom nuklear atau inti yang sering digunakan untuk menyimpulkan suatu filogenetik adalah DNA ribosomal yang disebut rDNA. rDNA adalah daerah genom inti pengkode RNA ribosomal (Osterbauer, 2002). Ribosomal DNA adalah suatu daerah dalam nuklear DNA yang mengkode ribosom. Ribosom merupakan organel sel yang berperan dalam sintesis protein dan terdiri dari subunit kecil (18S) dan subunit besar (28S). Urutan nukleotida rDNA berisi dua daerah *non-coding* (ITS1 dan ITS2) dan gen 5,8S rDNA. Urutan nukleotida pada gen 5,8S rDNA sangat *conserved*, tetapi dua daerah ITS lainnya tidak ditranslasi menjadi protein dan sangat bervariasi (Articus, 2004).

Unit rDNA pada bagian antara daerah 18S dan daerah 5.8S terdapat beberapa ratus pasang basa DNA yang disebut ITS1 dan di antara daerah 5.8S dengan 28S terdapat daerah ITS2 (Jorgensen, 1987). Sekuen ITS rDNA terdiri dari daerah yang evolusioner dan mempunyai derajat variasi yang lebih tinggi dibandingkan daerah lain di rDNA. ITS rDNA merupakan DNA *Barcode* untuk kapang (Kelly, 2011).



Gambar 2.2 Letak Daerah Internal Transcribed Spacer (ITS) rDNA

Daerah DNA pengkode yang sangat terkonservasi (18S, 28S rDNA) merupakan daerah evolusi utama yang sering digunakan sebagai pembanding tingkat spesies dan genus terkait. Setiap unit rDNA dalam satu rangkaian kromosom memiliki daerah pengkode yaitu 18S, 5.8S, dan 28S yang mengapit ITS1 dan ITS2 (Soltis & Soltis 1998). Gen 18S rDNA, berikut dua daerah ITS dan gen 5.8S rDNA memiliki panjang total 2600 bp, terpisah dari gen 28S rDNA yang memiliki panjang 3300 bp (McCulloug, 1998).

Daerah *internal transcribed spacers* (ITS) merupakan daerah sekuen DNA yang tidak menyandikan protein fungsional dan berada di daerah RNA ribosom (rRNA). Daerah ini dapat digunakan sebagai penanda genetika karena memiliki variasi sekuens yang cukup tinggi bahkan dalam spesies yang sama, dan semua kapang memiliki ITS rDNA. Oleh karena itu, ITS banyak digunakan untuk

analisis filogenetik, proses evolusi, dan penentuan identitas taksonomi (Purnamasari, 2012). Menurut Soltis & Soltis (1998) ITS pada daerah 18S-28S rDNA nuklear menjadi fokus utama untuk digunakan pada rekonstruksi filogenetik. Hal ini dikarenakan daerah ITS memiliki tingkat variasi yang tinggi dibandingkan dengan daerah lainnya pada rDNA subunit kecil dan subunit besar.

#### **2.3.4. Penerapan Bioinformatika dalam Studi Filogenetik**

Bioinformatika, sesuai dengan asal katanya yaitu "bio" dan "informatika", adalah gabungan antara ilmu biologi dan ilmu teknik informasi (TI). Pada umumnya, Bioinformatika didefinisikan sebagai aplikasi dari alat komputasi dan analisa untuk menangkap dan menginterpretasikan data-data biologi. Ilmu ini merupakan ilmu baru yang merangkul berbagai disiplin ilmu termasuk ilmu komputer, matematika dan fisika, biologi, dan ilmu kedokteran, dimana kesemuanya saling menunjang dan saling bermanfaat satu sama lainnya. Ilmu bioinformatika lahir atas inisiatif para ahli ilmu komputer berdasarkan artificial intelligence. Mereka berpikir bahwa semua gejala yang ada di alam ini bisa dibuat secara artificial melalui simulasi dari gejala-gejala tersebut. Untuk mewujudkan hal ini diperlukan data-data yang menjadi kunci penentu tindak-tanduk gejala alam tersebut, yaitu gen yang meliputi DNA atau RNA. Bioinformatika ini penting untuk manajemen data-data dari dunia biologi dan kedokteran modern. Perangkat utama Bioinformatika adalah program software dan didukung oleh kesediaan internet (Utama, 2003).

Nuswantara (2000), menambahkan bahwa bioinformatika adalah organisasi dan analisis kompleks data yang dihasilkan dari analisa molekuler dan teknik biokimia. Disamping itu bioinformatika merupakan teknologi untuk koleksi, penyimpanan analisis, interpretasi, pelepasan dan aplikasi untuk informasi biologi. Analisa dilakukan dengan cara membandingkan data yang masuk dengan ribuan data lain yang tersedia di dalam pangkalan data.

Seiring dengan perkembangan bioinformatika yang amat pesat, informasi-informasi baru dalam bidang ini terus bermunculan. Pangkalan data urutan DNA, RNA dan protein sangat berperan untuk mendukung berbagai kegiatan penelitian bioteknologi termasuk menggali berbagai potensi biologis di tengah beraneka ragamnya organisme (Nuswantara, 2000). Secara rutin para peneliti mengirimkan urutan-urutan DNA, RNA atau asam amino kepada bank data dan diolah menurut kebutuhan. Hasil yang diperoleh umumnya berupa analisis kesamaan dan beberapa jenis statistik dari urutan basanya yang dilakukan secara cepat oleh komputer dengan membandingkan data yang di input dengan data yang disimpan oleh bank data (Nuswantara, 2000). Pada suatu proyek penelitian biology molekuler khususnya yang berkaitan dengan analisis urutan DNA, RNA atau asam amino, esensi keberadaan bank data DNA sangat besar sehingga keberhasilan eksperimen sangat bergantung pada tersedianya pangkalan-pangkalan data ini. Tanpa pangkalan data urutan-urutan DNA tidak dapat disimpulkan (Lewitter, 1987).

Selain analisa kesamaan, bank data biasanya menyediakan pula fasilitas perangkat lunak yang dapat mengolah DNA, RNA atau protein menjadi bentuk dua dimensi hingga struktur tiga dimensi yang dapat diputar dan dilihat dari berbagai sudut (Lewitter, 1987).

Analisis keragaman untuk asam nukleat dan protein dalam bentuk dendogram merupakan salah satu fasilitas lain dari bank data. Perangkat analisis lainnya adalah untuk pembuatan harr plot, peta restriksi, analisis hidrofobisitas suatu protein dan masih banyak fasilitas lain yang dapat mempermudah kerja seorang peneliti (Nuswantara, 2000).

Sekuen sebagian digunakan untuk menemukan potensi homolog yang akan digunakan untuk menduga fungsi dari query sekuen yang merupakan target sekuen yang dibutuhkan untuk menganalisis atau untuk membantu dalam permodelan pada struktur 3 dimensi (Rashidi and Lukas, 2000).

Setelah informasi terkumpul dalam database, langkah berikutnya adalah menganalisa data. Pencarian database umumnya berdasar hasil alignment/pensejajaran sekuen, baik sekuen DNA maupun protein. Metode ini digunakan berdasar kenyataan bahwa sekuen DNA/protein bisa berbeda sedikit tetapi memiliki fungsi yang sama. Misalnya protein hemoglobin dari manusia hanya sedikit berbeda dengan yang berasal dari ikan paus. Kegunaan dari pencarian ini adalah ketika mendapatkan suatu sekuen DNA/protein yang belum diketahui fungsinya maka dengan membandingkannya dengan yang ada dalam database bisa diperkirakan fungsi daripadanya (Witarto, 2003).

Algoritma untuk pattern recognition seperti Neural Network, Genetic Algorithm dll telah dipakai dengan sukses untuk pencarian database ini. Salah satu perangkat lunak pencari database yang paling berhasil dan bisa dikatakan menjadi standar sekarang adalah BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Perangkat lunak ini telah diadaptasi untuk melakukan alignment terhadap berbagai sekuen seperti DNA (blastn), protein (blastp), dsb. Baru-baru versi yang fleksibel untuk dapat beradaptasi dengan database yang lebih variatif telah dikembangkan dan disebut Gapped BLAST serta PSI (*Position Specific Iterated*)-BLAST. Sementara itu perangkat lunak yang digunakan untuk melakukan alignment terhadap sekuen terbatas di antaranya yang lazim digunakan adalah CLUSTAL dan CLUSTAL W (Witarto, 2003).

Kebutuhan untuk mengumpulkan, menyimpan, dan menganalisis data-data biologi dari data DNA, RNA, maupun protein memacu kemajuan bioinformatika. Kemajuan bioinformatika ini telah berperan dalam mempercepat perkembangan cabang ilmu lain, salah satunya adalah dalam perkembangan ilmu sistematika makhluk hidup. Secara fundamental, sistematika bertujuan untuk memahami dan mendeskripsikan keanekaragaman suatu organisme serta merekonstruksi hubungan kekerabatan dengan organisme lainnya (Gravendeel, 1998).

Sistematika yang cakupannya lebih luas meliputi taksonomi, studi evolusi, dan filogenetik (Stuessy, 1990). Analisis sistematika dilakukan melalui konstruksi sejarah evolusi dan hubungan evolusi antara keturunan dengan nenek moyangnya berdasarkan pada kemiripan karakter sebagai dasar dari perbandingan. Jenis

analisis yang diketahui dengan baik adalah analisis filogenetika atau disebut kladistik yang berarti klade atau kelompok keturunan dari satu nenek moyang yang sama (Brinkman & Leipe, 2001).

Filogenetik merupakan salah satu metode yang paling sering digunakan dalam sistematika untuk memahami keanekaragaman makhluk hidup melalui rekonstruksi hubungan kekerabatan (phylogenetic relationship). Pohon filogenetik merupakan grafik yang digunakan untuk menggambarkan hubungan kekerabatan antartaksa yang terdiri atas sejumlah nodus dan cabang dengan hanya satu cabang yang menghubungkan dua nodus paling berdekatan. Setiap nodus mewakili unit-unit taksonomi dan setiap cabang mewakili hubungan antar unit yang menggambarkan hubungan keturunan dengan leluhur. Pola percabangan yang terbentuk dari suatu pohon filogenetik disebut topologi (Li & Graur, 1991).

Analisis filogenetik tidak terlepas dari evolusi biologis. Evolusi adalah proses bertahap, suatu organisme yang memungkinkan spesies sederhana menjadi lebih kompleks melalui akumulasi perubahan dari beberapa generasi. Keturunan akan mempunyai beberapa perbedaan dari nenek moyangnya sebab sedang berubah dalam sebuah evolusi (Estabrook, 1984). Karakter morfologi telah lama digunakan dalam banyak penelitian filogenetik. Dalam pendekatan filogenetik, sebuah kelompok organisme yang anggotanya memiliki banyak kesamaan karakter atau ciri dianggap memiliki hubungan yang sangat dekat dan diperkirakan diturunkan dari satu nenek moyang. Nenek moyang dan semua keturunannya akan membentuk sebuah kelompok monofiletik (Hidayat & Pancoro, 2008).

Filogenetik molekuler mengombinasikan teknik biologi molekuler dengan statistik untuk merekonstruksi hubungan kekerabatan. Pemikiran dasar penggunaan sekuen DNA dalam studi filogenetik adalah bahwa terjadi perubahan basa nukleotida menurut waktu, sehingga akan dapat diperkirakan kecepatan evolusi yang terjadi dan akan dapat direkonstruksi hubungan evolusi antara satu kelompok organisme dengan yang lainnya. Sekuen DNA telah menarik perhatian para praktisi taksonomi dunia untuk dijadikan karakter dalam penelitian filogenetik karena beberapa fakta, salah satunya yaitu sekuen DNA menawarkan data yang akurat melalui pengujian homologi yang lebih baik terhadap karakter-karakter yang ada (Baldwin, 1995).

#### **2.2.2.1 Data Base NCBI**

Kemajuan teknik biologi molekuler dalam mengungkap sekuens biologis dari protein (sejak awal 1950-an) dan asam nukleat (sejak 1960-an) mengawali perkembangan basis data dan teknik analisis sekuens biologis. Basis data sekuens protein mulai dikembangkan pada tahun 1960-an di Amerika Serikat, sementara basis data sekuens DNA dikembangkan pada akhir 1970-an di Amerika Serikat dan Jerman (pada European Molecular Biology Laboratory, Laboratorium Biologi Molekular Eropa). Penemuan teknik sekuensing DNA yang lebih cepat pada pertengahan 1970-an menjadi landasan terjadinya ledakan jumlah sekuens DNA yang berhasil diungkapkan pada 1980-an dan 1990-an, menjadi salah satu pembuka jalan bagi proyek-proyek pengungkapan genom, meningkatkan kebutuhan akan pengelolaan dan analisis sekuens, dan pada akhirnya menyebabkan lahirnya bioinformatika (Gunardi, 2008).

Istilah *bioinformatics* mulai dikemukakan pada pertengahan era 1980-an untuk mengacu pada penerapan komputer dalam biologi. Namun demikian, penerapan bidang- bidang dalam bioinformatika (seperti pembuatan basis data dan pengembangan algoritma untuk analisis sekuens biologis) sudah dilakukan sejak tahun 1960-an (Gunardi, 2008).

Bioinformatika adalah ilmu yang mempelajari penerapan teknik komputasional untuk mengelola dan menganalisis informasi biologis. Bidang ini mencakup penerapan metode-metode matematika, statistika, dan informatika untuk memecahkan masalah- masalah biologis, terutama dengan menggunakan sekuens DNA dan asam amino serta informasi yang berkaitan dengannya. Contoh topik utama bidang ini meliputi basis data untuk mengelola informasi biologis, penyejajaran sekuens (sequence alignment), prediksi struktur untuk meramalkan bentuk struktur protein maupun struktur sekunder RNA, analisis filogenetik, dan analisis ekspresi gen. Secara umum, Bioinformatika dapat digambarkan sebagai: segala bentuk penggunaan komputer dalam menangani informasi- informasi biologi. Dalam prakteknya, definisi yang digunakan oleh kebanyakan orang bersifat lebih terperinci. Bioinformatika menurut kebanyakan orang adalah satu sinonim dari komputasi biologi molekuler (penggunaan komputer dalam menandai karakterisasi dari komponenkomponen molekul dari makhluk hidup) (Gunardi, 2008).

Perkembangan internet juga mendukung berkembangnya bioinformatika. Basis data bioinformatika yang terhubung melalui internet memudahkan ilmuwan mengumpulkan hasil sekuensing ke dalam basis data tersebut maupun memperoleh sekuens biologis sebagai bahan analisis. Selain itu, penyebaran

program-program aplikasi bioinformatika melalui internet memudahkan ilmuwan mengakses program-program tersebut dan kemudian memudahkan pengembangannya (Gunardi, 2008).

Sejalan dengan perkembangan biologi molekuler yang pesat tersebut, maka data hasil eksperimen laboratorium/basah semakin lama menjadi berlimpah. Diperlukan suatu ilmu baru, untuk mengolah data tersebut menjadi informasi yang berguna. Ilmu Bioinformatika lahir dari kebutuhan tersebut. Bioinformatika adalah ilmu gabungan antara biologi dan teknik informatika/ilmu komputer. Tugas bioinformatika adalah untuk memecahkan permasalahan biologi molekuler secara komputasi. Permasalahan tersebut dapat berupa hal-hal mendasar, seperti memecahkan mekanisme enzim, metabolisme protein, atau identifikasi mikroba. Namun, permasalahan biomedis, seperti desain obat, primer, dan vaksin, juga dapat dipecahkan (Claverie, 2006).

Bioinformatika berfungsi sebagai repositori informasi genetik, DNA, RNA, dan protein dari eksperimen lab basah. Pada umumnya, informasi tersebut disimpan dalam database *open source*, seperti MySQL. Repositori Database yang digunakan adalah Genbank dari Amerika Serikat, situs web di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, *European Bioinformatics Institute* (EBI), situs web di <http://www.ebi.ac.uk/>. *Database Databank of Japan* (DDBJ), situs web di <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>. Ketiga Database tersebut saling menukar data secara ekstensif, dalam suatu kolaborasi internasional (Claverie, 2006).

Kegunaan Bioinformatika, yang merupakan eksperimen komputasi, memiliki dua landasan teoritis yang kuat. Pertama, sebagai induksi dari hukum umum dari sintesis berbagai observasi eksperimen. Kedua, sebagai aplikasi dari

hukum-hukum tersebut tanpa menggunakan eksperimen basah, kecuali jika hal tersebut memang tidak dimungkinkan. Kemampuan *tools* bioinformatika telah semakin mumpuni, dan hal ini telah berhasil menghilangkan eksperimen basah yang tidak perlu (Ouzounis, 2002).



## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kualitatif. Untuk mengetahui nama spesies isolat *Trichoderma* sp. yang telah diisolasi dari ampas tebu oleh Watik Surakhman (2013) yang berperan sebagai penghasil selulase.

#### **3.2 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni 2014 sampai Mei 2015. Peremajaan isolat kapang dilakukan di laboratorium Mikrobiologi UIN MALIKI Malang. Isolasi DNA, uji kualitatif dan kuantitatif DNA, dan PCR dilakukan di laboratorium Genetik dan Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Proses Sequencing dilakukan oleh 1<sup>st</sup> BASE LABORATORIES Malaysia.

#### **3.3 Alat dan Bahan**

##### **3.3.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini, sebagai berikut:

Cawan petri, mortal steril dingin, mikropipet, Erlenmeyer, gelas ukur, beaker glass, autoklaf, jarum ose, *hot plate and stirrer*, Bunsen, *incubator*, LAF (*Laminar Air Flow*), timbangan analitik, *water bath*, *microcentrifuge tube*, *vortex*, *centrifuge*, *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*, *refrigerator* (4°C), *refrigerator* (-20°C),

*Polymerase Chain Reaction (PCR), Ice box, PCR tube, centrifuge, sendok, alat pencetak gel, perangkat elektroforesis horizontal, UV transilluminator, Computer.*

### 3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini, sebagai berikut:

PDA (*Potato Dextrose Agar*), ddH<sub>2</sub>O (*aqua bidestilata*), *loading dye*, 1 kb DNA *Ladder*, BSA (*Buffer Serum Albumin*), agarosa, Pewarna *Ethidium Bromide* (EtBr), tissue, aquades, buffer CTAB (*Cetiltrimetilamonium Bromide*), *chloroform isoamylalcohol*, *ammonium asetat*, etanol absolute, etanol 70 %, TE (Tris-EDTA) buffer pH 7,6 .

PCR mix (10 µl):

- |   |         |
|---|---------|
| 1. Primer F ( 10 pmol/ µl)                    | 0,5 µl  |
| ITS-1 ((ITS1-5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') |         |
| 2. Primer R ( 10 pmol/ µl)                    | 0,5 µl  |
| ITS-4 (ITS4-5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') |         |
| 3. ddH <sub>2</sub> O                         | 2,75 µl |
| 4. PCR Master Mix                             | 5 µl    |
| 5. BSA 10 mg/ mL                              | 0,25 µl |
| 6. DNA  | 1 µl    |

## 3.4 Prosedur Penelitian

### 3.4.1 Peremajaan Kapang

Peremajaan kapang *Trichoderma* sp. dilakukan untuk preparasi sampel sebelum dilakukannya teknik identifikasi secara molekuler. Peremajaan kapang *Trichoderma* sp. dilakukan dengan mencampurkan 4,68 gr *Potato Dextrose Agar*

(PDA) ke dalam 120 ml aquades. Dipanaskan dan diaduk dengan *Hotplate and Stirrer*. Setelah homogen, ditutup dengan kapas dan *plastic wrap*. Distrerilisasi seluruh alat dan bahan yang akan digunakan dalam proses peremajaan dengan *autoclave*. Untuk proses peremajaan, dituang media ke dalam cawan petri di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Didiamkan selama 30 menit hingga memadat dan dilanjutkan dengan peremajaan isolat murni *Trichoderma* sp. Didiamkan dalam suhu ruang selama 7 hari hingga sampel cukup untuk proses isolasi DNA.

### **3.4.2 Teknik Molekuler untuk Perbandingan Sekuen Kapang**

#### **3.4.2.1. Isolasi DNA**

Proses isolasi DNA dilakukan dengan metode CTAB yang telah dimodifikasi dari Doyle & Doyle, 1987 oleh Borges (2009). Proses Isolasi DNA dimulai dengan pengambilan kapang yang telah berhasil diremajakan dalam medium agar menggunakan ose. Kemudian digerus dalam mortal steril dingin dan ditambahkan 500 µl bufer CTAB dan divortex. Selanjutnya ditutup dengan {parafilm dan diinkubasi dalam waterbath 65<sup>0</sup>C, 45 menit (setiap 10 menit divortex)} dan disentrifugasi 13000 rpm selama 10 menit pada suhu 25<sup>0</sup>C. Supernatan yang dihasilkan dipindahkan ke dalam tube 1,5 mL steril, ditambahkan 1 x vol *chloroform isoamylalcohol* dan dicampur (*mix*). Dilanjutkan proses sentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 5 menit pada suhu 25<sup>0</sup>C. Diulangi langkah tersebut sebanyak 1 kali agar lebih maksimal dan dilanjutkan dengan pemindahan supernatan ke dalam tabung 1,5 mL steril. Ditambahkan 100 µl *ammonium asetat* dan dicampur, kemudian ditambahkan 2,5 x vol *etanol absolute* dan dicampur. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu -20<sup>0</sup>C dan disentrifugasi 13000 rpm, 10 menit, 4<sup>0</sup>C. Didapatkan pelet DNA.

Proses isolasi dilanjutkan dengan pemberian 500 µl etanol 70 % pada pelet DNA dan dicampur. Disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 10 menit pada suhu 4<sup>0</sup>C. Kemudian dikering anginkan pelet pada suhu 55<sup>0</sup>C dan ditambahkan 50 µl TE buffer pH 7,6. Didapatkan DNA genome *Trichoderma* sp

#### **3.4.2.2. Uji Kuantitatif DNA Kapang *Trichoderma* sp.**

Uji kuantitatif kemurnian dan konsentrasi DNA rantai ganda (double stranded) dapat diukur dengan menggunakan alat nano drop spektrofotometer dengan menggunakan bantuan software ND-1000.

#### **3.4.2.3. Amplifikasi DNA Kapang *Trichoderma* sp. dengan PCR**

Amplifikasi DNA dilakukan dengan preparasi hasil isolasi DNA ke dalam PCR mix (10 µl) terlebih dahulu, dilanjutkan dengan pengaturan langkah-langkah (*protocol*) pada mesin PCR. Dimasukkan sampel ke dalam mesin PCR dan *running* dengan *protocol* yang telah diatur. Ditunggu sampai proses *running* selesai.

Amplifikasi DNA dengan menggunakan mesin PCR berlangsung dengan urutan sebagai berikut:

Tahap I : Pra-amplifikasi PCR (Hot Start) selama 5 menit pada suhu 95<sup>0</sup>C;

Tahap II : Amplifikasi PCR dilakukan sebanyak 35 siklus reaksi, dengan pemisahan utas DNA genom (denaturasi) pada suhu 95<sup>0</sup>C selama 30 detik.

Penempelan primer (annealing) pada suhu 55<sup>0</sup>C 1 menit; sintesis (Extention) pada suhu 72<sup>0</sup>C selama 1 menit;

Tahap III : Pasca amplifikasi (post extention) pada suhu 72<sup>0</sup>C selama 6 menit.

Primer yang digunakan untuk proses amplifikasi adalah primer universal kapang untuk mengamplifikasi daerah Internal Transcribed Spacer (ITS) rDNA dengan forward sepanjang 19 bp yaitu ITS-1 ((ITS1-5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') dan reverse sepanjang 20 bp yaitu ITS-4 (ITS4-5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3').

#### **3.4.2.4. Uji Kualitatif DNA Kapang *Trichoderma* sp.**

Metode standar yang digunakan untuk identifikasi, separasi dan purifikasi fragmen DNA adalah menggunakan elektroforesis gel agarosa. Running Elektroforesis yang dilakukan, menggunakan elektroforesis horizontal dengan konsentrasi gel agarose 1 % untuk proses visualisasi hasil DNA genom dan 1,5 % untuk visualisasi hasil amplifikasi DNA kapang *Trichoderma* sp. Voltase yang digunakan adalah sebesar 50 V selama 60 menit. Marker yang digunakan adalah marker lambda DNA/EcoR1+HindIII markers promega untuk genome dan 1 kb vermentas untuk marker hasil DNA PCR. Proses running elektroforesis pertama, dilakukan dengan tujuan melihat hasil DNA genome hasil isolasi, dan running Elektroforesis kedua untuk melihat ampikon hasil amplifikasi dengan PCR dan dilanjutkan dengan pemaparan dengan UV Transiluminator untuk pendokumentasian dengan bantuan software Quantity One.

**Pembuatan gel agarosa 1%.** Sebanyak 0,4 gr agarosa ditambah 40 mL TBE 1X, lalu dipanaskan hingga larut atau homogen. Dituangkan ke dalam cetakan yang dilengkapi dengan sisir. Didiamkan selama kira-kira 30 menit hingga gel membeku. Dimasukkan ke dalam alat elektroforesis yang telah berisi buffer TBE 1X hingga gel terendam. Sedangkan Pembuatan gel agarosa 1,5%. Sebanyak 0.6 gr agarosa ditambah 40 mL TBE 1X.

**Elektroforesis Gel Agarosa.** Sebanyak 2  $\mu\text{L}$  sampel DNA dicampurkan dengan 1  $\mu\text{L}$  *loading buffer* diatas parafilm dengan menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam sumur elektroforesis. Sedangkan marker yang digunakan adalah sebanyak 3  $\mu\text{L}$ .

#### **3.4.2.5. Sekuencing DNA Kapang *Trichoderma* sp.**

Analisis sekuens DNA amplikon hasil PCR gen ITS rDNA dilakukan dengan *automated DNA sequencer* (ABI PRISM 3730xl Genetic Analyzer, Applied Biosystem, USA) setelah dilakukan purifikasi terlebih dahulu dan dilakukan tahap *cycle sequencing* menggunakan *kit* Big Dye® TerminatorR v3.1 (Applied Biosystem). Purifikasi amplikon dilakukan di PT. Genetika Sains Indonesia, sedangkan *cycle sequencing* dan pengumpulan data sekuen dilakukan di 1<sup>st</sup> Base Laboratories Malaysia.

#### **3.4.3 Analisis Data**

Data hasil sekuensing *ITS* dibaca dengan Sequence Scanner 1.0. Kecocokan *ITS* dengan Query yang diperoleh dari *Gene Bank* diketahui dengan program BLAST. Perubahan basa nukleotida yang terjadi dilihat dengan program bioedit 7.0.9.0. *Contig* antara sekuen *forward* dan *reverse* dilakukan dengan program bioedit 7.0.9.0. *Multiple allignment* antara sekuen *ITS* dibuat dengan program MEGA 6.0.

Rekonstruksi atau pembuatan pohon filogenetik menggunakan program MEGA 6.0. Menurut Saitou and Nei (1987) *Neighbor joining* (NJ) akan menghasilkan pohon filogenetik yang menerapkan prinsip minimum evolution serta cukup efisien dalam memilih topologi (pohon filogenetik) yang benar. Selain itu NJ juga dapat diaplikasikan pada hampir semua jenis data jarak evolusioner.

Evaluasi pohon filogenetik dilakukan dengan menggunakan analisis *bootstrap* sebanyak 1000 ulangan.

#### **3.4.3.1. Pembacaan sekuen hasil sekuensing**

Pembacaan sekuen hasil sekuensing *Trichoderma* sp. dapat dilihat dengan bantuan Software *Sequence Scanner*. Langkah-langkah untuk membuka file hasil sekuen, sebagai berikut:

1. Dibuka file yang berektensi .ab1 dengan *Sequence Scanner*
2. Diperiksa seluruh grafik dengan menggulung (*scroll*) sampai ujung
3. Disimpan hasil sekuensing ke dalam format FASTA

#### **3.4.3.2. Penggabungan hasil sekuensing Forward dan Reverse**

Penggabungan hasil sekuensing forward dan reverse sekuen *Trichoderma* sp. dilakukan untuk merekonstruksi serangkaian bagian DNA yang saling tumpang tindih. Analisis contig (penggabungan 2 sekuen) dapat digunakan untuk merakit kembali serangkaian bagian DNA tersebut dalam satu bentuk tunggal tanpa celah. Software yang digunakan untuk analisis contig adalah dengan menggunakan Bioedit, Langkah-langkah untuk analisis contig dengan Bioedit, sebagai berikut:

1. Dibuka *software* Bioedit
2. Dibuka “*New Alignment*” pada program Bioedit
3. Diklik menu: *File | Import | Sequence alignment file*. Pilih kedua file yang akan dianalisis *contig*
4. Disimpan dengan nama baru dalam format FASTA.
5. Dipilih salah satu sekuen dengan mengklik nama sekuen tersebut

6. Dilakukan “*Reverse Complement*” melalui menu : *Sequence | Nucleid Acid | Reverse Complement*
7. Dilakukan “*Pairwise Alignment*” melalui menu : *Sequence | Pairwise alignment | Align two sequence (allow ends to slide)*
8. Ditampilkan sekuen *consensus* dari hasil *contig* dengan menu : *Alignment | Create consensus sequence*
9. Diklik sekuen *consensus* kemudian dipilih menu : *Edit | Copy Sequences to Clipboard* (fasta format)
10. Dibuka file teks baru dari menu : *File | New text*. Paste sekuen *consensus*.
11. Dirubah ke dalam format FASTA dengan menambahkan tanda “lebih besar dari” ( > ) diikuti dengan nama sekuen dan sekuen DNA pada baris kedua.

#### **3.4.3.3. Pencarian *Database* Spesies lain dengan Gen Bank**

Salah satu perangkat lunak pencari database yang paling berhasil dan bisa dikatakan menjadi standar sekarang adalah BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Kegunaan pencarian ini adalah ketika mendapatkan suatu sekuen DNA yang belum diketahui fungsinya maka dengan membandingkannya dengan yang ada dalam database bisa diperkirakan fungsi daripadanya (Witarto, 2002). Langkah-langkah untuk melakukan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*), sebagai berikut:

1. Diketik <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (*website* Genbank Amerika Serikat)
2. Diklik “BLAST” pada home NCBI
3. Dipilih nucleotide blast untuk memilih program analisis
4. Dimasukkan urutan DNA hasil sekuensing dalam program tersebut dengan cara memblok data sekuens (dalam format FASTA) dan *dicopy paste* pada form yang tersedia
5. Diklik “RUN BLAST” dan ditunggu hasilnya

#### **3.4.3.4. Pensejajaran dan Filogenetik Sekuen DNA**

Pensejajaran dan *Phylogenetic* Sekuen DNA *Trichoderma* sp. dengan spesies lain menggunakan software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics analysis) 6.0. Langkah-langkah pensejajaran dan *Phylogenetic* Sekuen DNA, sebagai berikut:

1. Dibuka file FASTA dengan MEGA 6.0
2. Disimpan dengan file fasta (nama.FASTA)
3. Ditutup program MEGA 6.0
4. Dibuka kembali dengan MEGA 6.0
5. Ditekan alignment dengan Crustal W | OK
6. Ditunggu hasil alignment, kemudian dihapus file bagian luar, dengan *men-drag* filenya dan ditekan *delete* (hasil alignment kanan-kiri harus rata)
7. Ditekan *data | phylogenetic analysis*
8. Dibuka file analisis

9. Ditekan *phylogenetic* | *neighborjoining* (dipilih bootstrap 1000, model evolusi jukes kantor)
10. Diklik *Compute*
11. Dilihat hasil filogenetik

#### **3.4.3.5. Perhitungan Similaritas dan Jarak Genetik *Trichoderma* sp. dengan spesies lain**

Perhitungan nilai similaritas dan jarak genetik dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Dengan tetap menggunakan program MEGA 5.0, ditekan *distance*
2. Dipilih *bootstrap* dan model evolusi *jukes kantor*
3. Diklik *Compute*
4. Dianalisis file hasil jarak genetik
5. Ditekan convert ke excel (tekan XL | print matrix | distance)

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Hasil Isolasi DNA *Trichoderma* sp. dan PCR

Isolasi DNA merupakan tahap yang sangat berperan penting dalam analisis biologi molekuler serta menunjang keberhasilan suatu penelitian. Oleh karena itu, tahap isolasi inilah yang menentukan tahapan-tahapan berikutnya. Jika hasil kualitas dan kuantitas DNA hasil isolasi tidak baik atau bagus, maka proses berikutnya seperti amplifikasi dan *sequencing* DNA tidak dapat dilakukan. Namun, sebelum proses isolasi DNA dilakukan persiapan sampel yang akan diisolasi, yaitu peremajaan kapang *Trichoderma* sp. dengan suhu dan substrat yang sesuai sehingga bisa digunakan untuk isolasi DNA. Menurut Anam (2009), Isolasi DNA pada dasarnya dapat dilakukan dengan merusak dinding dan membran sel serta membran inti. Kemudian dilanjutkan dengan ekstraksi, pengendapan, dan pemurnian. Oleh karena itu, perlu dipertimbangkan pemilihan metode isolasi yang sesuai dengan sampel sumber DNA untuk menghasilkan kualitas dan kuantitas DNA yang maksimal.

Isolat kapang yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat murni *Trichoderma* sp. yang berhasil diisolasi dari ampas tebu oleh Watik Surakhman (2013) sebagai penghasil enzim selulase tertinggi. Peremajaan isolat kapang *Trichoderma* sp. dilakukan dengan menumbuhkan isolat kapang pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA). Kapang tersebut diinkubasi selama 7 hari pada suhu kamar hingga muncul hifa yang cukup untuk dilakukan isolasi DNA kapang dengan menggunakan pendekatan molekuler.

Metode isolasi DNA yang dilakukan pada saat penelitian memungkinkan hasil isolat DNA yang berbeda. Hal ini bergantung pada efektifitas metode tersebut dalam menghasilkan isolat DNA baik dari segi kualitas maupun kuantitasnya serta efisiensi waktu pengerjaan. Hasil yang diperoleh tergantung pada teknik isolasi yang digunakan dan ketelitian cara pengerjaan. Teknik molekuler bervariasi dalam cara pelaksanaan untuk mendapatkan data, baik tekniknya maupun tingkatan target data yang diinginkan sesuai kemudahan pelaksanaan, ketersediaan sumber daya manusia, fasilitas, dan dana (Ardiana, 2009).

Proses Isolasi DNA (lampiran 2) kapang *Trichoderma* sp. ini dilakukan dengan menggunakan *protocol* berbasis CTAB yang merupakan modifikasi metode isolasi DNA Doyle & Doyle (1987). Metode isolasi berbasis CTAB ini merupakan metode yang memiliki prosedur yang sederhana dan waktu pengerjaan yang tidak terlalu lama (Kress, 2005).

Perusakan membran sel dilakukan dengan cara kimia dan fisika. Perusakan secara kimia dilakukan dengan penambahan buffer ekstraksi yaitu buffer CTAB, sedangkan proses perusakan secara fisik dilakukan dengan penggerusan dalam mortal steril, vortex dan pemanasan dalam waterbath 65°C serta sentrifugasi yang bertujuan memisahkan DNA dari membran sel. Menurut Yuwono (2005), prinsip sentrifugasi adalah memisahkan organel berdasarkan ukuran dan densitasnya. Selain itu, pemisahan didasarkan atas pengendapan partikel yang tersuspensi dalam satu wadah. Penambahan kloroform adalah untuk mengendapkan kontaminan (pengotor) seperti protein dan lemak. Larutan tersebut digunakan dalam proses ekstraksi.

Hasil isolasi menunjukkan bahwa DNA genom isolat kapang *Trichoderma* sp. dapat diekstraksi dengan baik menggunakan modifikasi isolasi DNA berbasis CTAB menurut Doyle and Doyle (1987) berdasarkan Borges (2009). Santoso (2005), mengatakan bahwa bufer CTAB dengan kandungan garam yang tinggi dapat memisahkan polisakarida dari membran sel. Menurut Ardiana (2009), menyatakan bahwa penggunaan bufer CTAB adalah sebagai pengganti nitrogen cair untuk mengisolasi DNA sehingga dapat menghasilkan produk DNA yang berkualitas tinggi. Van Heusden (2000), juga menjelaskan bahwa CTAB merupakan larutan yang memiliki kadar ionik tinggi sehingga dapat membentuk suatu kompleks dengan protein dan polisakarida, namun tidak mengendapkan asam nukleat. Hasil isolasi DNA kapang *Trichoderma* yang telah berhasil diisolasi dapat dilihat pada gambar 4.1:



**Gambar 4.1** Hasil elektroforesis Isolasi DNA genom *Trichoderma* sp.  
M(marker), Sumur A (DNA sampel.)

Hasil uji kualitatif. dengan elektroforesis menunjukkan ukuran DNA genome kapang *Trichoderma* sp adalah sepanjang 23130 bp. Hasil visualisasi *gel documentation* pada sampel isolat *Trichoderma* sp. terlihat tipis namun tidak terlihat banyaknya smear. Menurut Sauer (1998), pola bayangan *smear* di bawah pita DNA yang menunjukkan DNA tidak utuh sehingga menyebabkan timbulnya fragmen-fragmen yang berbeda ukuran dan tertahan pada gel sesuai dengan ukurannya. Pola bayangan *smear* juga dapat menunjukkan adanya kontaminasi dari RNA sedangkan hasil isolasi yang baik ditandai dengan pita yang dihasilkan jelas dan tidak adanya pola bayangan smear di bawah pita DNA.

DNA genom kapang hasil isolasi dihitung konsentrasinya menggunakan alat spektrofotometer. Hasil uji kuantitatif dengan spektrofotometer dapat dilihat pada tabel 4.1 :

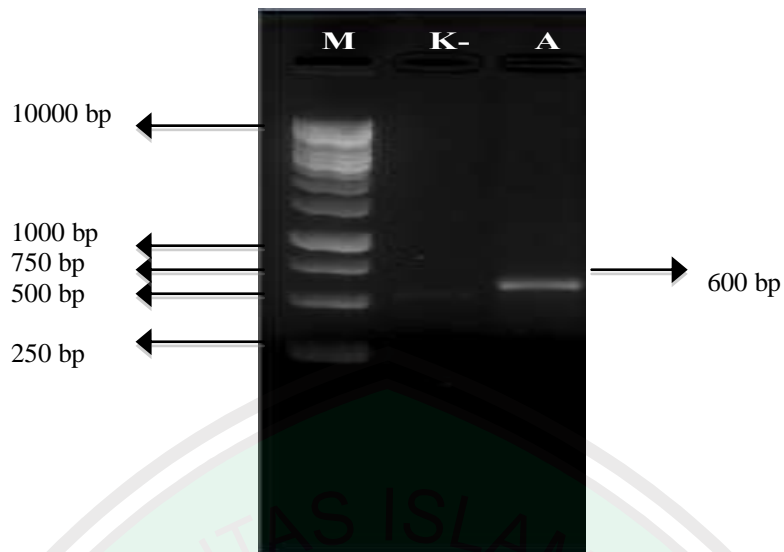
**Tabel 4.1** Hasil uji kuantitatif DNA Sampel dengan spektrofotometer

No.	Nama Sampel	Kemurnian	Konsentrasi (ng/ $\mu$ l)
1.	<i>Trichoderma</i> sp.	1,91	92,56

Berdasarkan hasil uji kuantitatif DNA dengan spektrofotometer dapat diketahui bahwa konsentrasi DNA pada sampel *Trichoderma* sp. cukup tinggi yaitu 92,56 dengan kemurnian DNA 1,91. Hasil uji kuantitatif dengan spektrofotometer menunjukkan nilai kemurnian DNA pada sampel adalah baik atau murni. Menurut Fatchiyah (2012), DNA dapat dikatakan murni apabila telah mencapai nilai kemurnian berkisar antara 1.8-2.0.

Menurut Arief (2011), bahan ekstraksi DNA sangat mempengaruhi tingkat kemurnian ekstrak genom yang dihasilkan, karena tingkat akurasi dan efektivitas bahan pereaksi yang berbeda. Selain itu, ekstraksi genom dilakukan dengan tepat baik pada tahapan ultrasentrifugasi dan penambahan bahan pereaksi serta terjaganya kondisi steril baik steril dari kontaminan mikroba lain maupun DNase yang ada pada tangan pekerja merupakan salah satu faktor yang menjadi penyebab tingkat kemurnian DNA. Tenriulo (2001) juga menambahkan bahwa prinsip dasar ekstraksi DNA adalah proses pemisahan DNA dari komponen lainnya, sehingga harus bebas kontaminasi baik RNA maupun protein.

Berdasarkan hasil dari kualitas dan kuantitas DNA, tahap amplifikasi pada penelitian ini dapat dilakukan. Amplifikasi DNA *Trichoderma* sp. dalam penelitian ini dilakukan dengan metode PCR menggunakan satu pasang primer yaitu ITS1-ITS4. Dewi (2012), menyatakan bahwa primer forward dan reverse berfungsi membatasi daerah DNA yang akan diamplifikasi. Primer ITS1 dan ITS4 merupakan urutan basa penanda untuk daerah genom inti pengkode rDNA. Menurut Muladno (2002) dan Graham (1997), urutan basa penanda (primer) dan kuantitasnya (kandungan penanda dalam tiap rekasi) ini sangat berpengaruh terhadap keberhasilan amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR. Hasil amplifikasi daerah ITS dengan primer ITS1-ITS4 dapat dilihat pada gambar 4.2:



**Gambar 4.2** Hasil Amplifikasi DNA *Trichoderma* sp dengan Menggunakan ITS1-ITS4. M (marker 1 kb), K-control *negative*), A (DNA sampel)

Hasil Amplifikasi DNA pada gambar 4.2 menunjukkan amplicon (hasil amplifikasi) berupa pita DNA setelah diuji menggunakan metode elektroforesis gel agarosa 1,5 %. Hasil amplifikasi sampel kapang *Trichoderma* sp. menunjukkan profil pita jelas dan tipis. Amplifikasi DNA *Trichoderma* sp. dengan target gen *Internal Transcribe Spacer* memberikan hasil 1 pita yaitu pita spesifik berukuran sekitar 600 bp.

Hasil amplifikasi DNA kapang *Trichoderma* hasil isolasi sesuai dengan beberapa penelitian sebelumnya, diantaranya; Hermosa (2010) dengan menggunakan primer ITS1-ITS4. Hasil amplicon yang didapatkan sepanjang 560-600 bp. Elsalam (2010), juga berhasil mengidentifikasi kapang *Trichoderma* sp. asal minyak di Saudi Arabia dengan menggunakan marker ITS rDNA. Hasil amplifikasi yang didapatkan adalah sepanjang 550-700 bp pada seluruh isolat *Trichoderma* spp. dengan menggunakan ITS1-ITS4. Penelitian Hermosa dan Elsalam membuktikan adanya daerah ITS pada kapang *Trichoderma* sp. dengan panjang sekitar 550-700. Suharjono (2010), juga menambahkan bahwa sekuen

*complete* ITS rDNA memiliki panjang sekitar 600 nukleotida. *Trichoderma* sp. yang berhasil diketahui adalah berasal dari Purworejo, Brastagi dan Poncokusumo yang patogenik pada kutu sisik coklat hama pada tanaman jeruk..

Suharjono (2010), juga menjelaskan bahwa sekuen *complete* ITS rDNA memiliki panjang sekitar 600 nukleotida. ITS rDNA merupakan bagian dari sekuen 28S rDNA. Sekuen 28S rDNA secara utuh lebih prediktif dan akurat untuk identifikasi kapang, namun sekuen 28S rDNA secara utuh tidak efisien karena memiliki sekuen nukleotida yang terlalu panjang. Ediningsari (2008) menambahkan bahwa perbandingan sekuen pada gen penyandi ribosomal DNA dapat digunakan sebagai karakter untuk identifikasi molekuler suatu organisme. Hal ini dikarenakan gen ini memiliki sekuen yang tidak berubah (*conserved*) dan dapat berubah-ubah (*variable*).

#### **4.2 Sekuen DNA *Trichoderma* sp.**

Sekuen DNA kapang *Trichoderma* sp. dapat diketahui setelah proses sekuensing. Sekuen DNA *Trichoderma* sp. hasil sekuensing dapat dilihat kualitasnya berdasarkan grafik (*elektroforegram*) (lampiran 5) yang mewakili pembacaan basa nukleotida. Basa-basa nitrogen merupakan puncak elektroforegram pada *software sequence scanner* hasil sekuensing DNA berdasarkan daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS). Sekuen ITS rDNA pada kapang *Trichoderma* diterjemahkan dengan bantuan mesin sekuensing dan *software sequence scanner*. Proses sekuensing daerah ITS rDNA *Trichoderma* sp. dengan primer forward dan reverse berhasil mendapatkan sekuen forward 589 bp dan reverse 591 bp.

Hasil elektroforegram (lampiran 5) sekuen *Trichoderma* sp. menunjukkan bahwa kualitas DNA yang cukup baik, hal itu berarti sekuen tersebut masih dapat terbaca karena hanya beberapa bagian puncak elektroforegram (lamp yang bertumpukan dan mengalami pemisahan yang tidak sempurna. Oleh karena itu, untuk memperbaiki hasil sekuensing agar lebih akurat, maka langkah selanjutnya adalah menggabungkan kedua sekuen tersebut.

```

Trichoderma sp
CTTCCGTAGGGTGACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGT
GAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGA
CCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCAAACCTCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTT
TTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTC
AACACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATG
TGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATT
CTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCG
TTGGGGATCGGCCCTGCCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGC
AGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGT
TAAACACCCAACCTTCTGAAATGTGACCTCGG

```

**Gambar 4.4** Sekuen Lengkap Gen ITS rDNA *Trichoderma* Sp. Hasil Contig Forward Dan Reverse

Gambar 4.4 adalah hasil contig atau penyatuan dari kedua sekuen forward dan reverse *Trichoderma* sp. hasil sekuensing. Contig merupakan tahap penyatuan sekuen forward dan reverse dari *Trichoderma* sp., sehingga sekuen yang mengalami cacat (error) dapat diperbaiki, dengan harapan tahap ini akan membantu sekuen forward dan reverse *Trichoderma* sp. menjadi sekuen lengkap daerah ITS rDNA. Software BioEdit dapat melakukan contig kedua sekuen tersebut sehingga dapat menghasilkan sekuen satu unit rDNA dengan mencari daerah (bertumpukan) *overlapping* dari kedua sekuen hasil sekuensing (Dewi, 2012).

Langkah awal yang dilakukan pada proses *contig* adalah dengan menghapus bagian ujung sekuen *forward* dan *reverse* yang memiliki kualitas kurang bagus. Pada sekuen *Trichoderma* sp. ini, didapatkan hasil *contig* sepanjang 570 panjang basa. Untuk menyatukan kedua sekuen *forward* maupun *reverse* sekuen *Trichoderma* sp. ini, dilakukan *reverse-complement* pada salah satu sekuen, dalam analisis ini dilakukan pada sekuen *reverse*. Menurut Dewi (2012), Hal tersebut dilakukan untuk meminimalisir ketidakcocokan antara sekuen *forward* dan *reverse* sekuen *Trichoderma* sp. dengan membalikkan salah satu sekuen. Software bioedit ini dapat membantu pemilihan nukleotida yang memiliki kualitas lebih tinggi dibandingkan sekuen yang lainnya berdasarkan elektroforegram yang telah diperlihatkan dengan bantuan *sequence scanner*.

Langkah selanjutnya adalah BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (lampiran 7), dengan tujuan memastikan primer yang dipakai saat amplifikasi yaitu ITS1-ITS4 dapat memotong tepat daerah atau *fragment* Internal Transcribed Spacer (ITS) pada kapang *Trichoderma* sp. serta untuk mengidentifikasi dan membandingkan antar spesies kapang, baik *Trichoderma* sp. hasil isolasi dari ampas tebu dan spesies kapang lain yang tersimpan dalam database NCBI yang berkerabat dekat dengan *Trichoderma* sp. berdasarkan *fragment* yang sama. Pemilihan spesies pembanding adalah berdasarkan proses BLAST dan beberapa jurnal.

Analisis filogenetik sekuen kapang *Trichoderma* sp. hasil isolasi dari ampas tebu dilakukan dengan membandingkannya dengan sekuen kapang *Trichoderma* sp. lain dari *genbank*. Jumlah sekuen yang dianalisis yaitu 14 sekuen yang terdiri atas 1 sekuen sampel kapang *Trichoderma* sp. hasil isolasi dari ampas

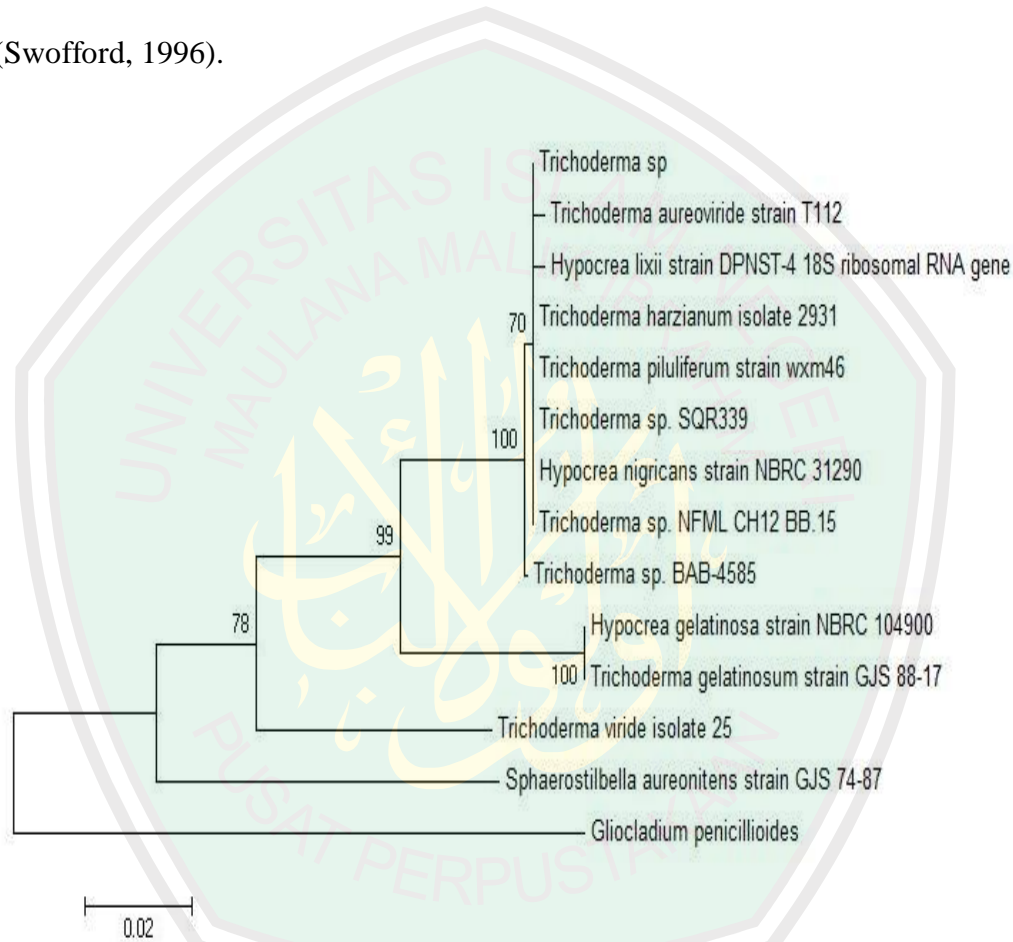
tebu dan 11 sekuen spesies *Trichoderma* / *Hypocreae* beserta 2 spesies dari genus lain yaitu *Sphaerostilbella aureonitens* dan *Gliocladium*, sehingga dapat terbentuk pohon filogenetik berdasarkan perbandingan sekuen dari Daerah rDNA (ITS1, 5.8S, dan daerah ITS2).

Perbandingan sekuen kapang *Trichoderma* sp. dapat diketahui dengan melakukan penyejajaran seluruh sekuen yang akan dianalisis terlebih dahulu. Penyejajaran (lampiran 8) dilakukan dengan tujuan untuk menentukan tingkat homologi dari urutan basa DNA sampel yang dianalisis dengan spesies pembanding. Hasil penyejajaran menunjukkan tingkat homologi yang tinggi diantara sampel yang diamati. Pada hasil penyejajaran muncul *gap* (ditandai oleh garis putus-putus) yang disebabkan oleh sifat dari daerah ITS1 dan ITS2 yang variatif. *Gap* menunjukkan terjadinya proses mutasi baik berupa delesi maupun insersi (Dewi, 2012). Dari hasil penyejajaran juga terlihat bahwa daerah ITS merupakan daerah dengan evolusi cepat, diperlihatkan oleh banyaknya perbedaan basa di daerah tertentu pada sekuen antara masing-masing spesies.

Selanjutnya hasil penyejajaran sekuen DNA ITS dianalisis menggunakan program MEGA 6.0 untuk merekonstruksi pohon filogenetik. Data dianalisis menggunakan metode *neighborjoining*. Hal tersebut dikarenakan *neighborjoining* dapat digunakan pada semua data dengan berapapun jarak evolusioner. Menurut Saitou dan Nei (1987), NJ dapat menunjukkan pohon filogenetik dengan prinsip *minimum evolution* dan efisien dalam memilih topologi yang benar. NJ dapat diaplikasikan pada semua jenis data yang memiliki perbedaan evolusioner. Rumus sederhana yang digunakan oleh NJ adalah parameter Kimura-2. Parameter Kimura-2 merupakan model perhitungan algoritmik untuk mengetahui jarak

evolusioner atau perubahan nukleotida yang terjadi sehingga dapat terbentuk pohon filogenetik antar spesies.

Pohon filogenetik yang telah direkonstruksi diuji secara statistik untuk meningkatkan nilai kepercayaan. Pada penelitian kali ini, pohon filogenetik diuji secara statistik menggunakan metode *bootstrap* sebanyak 1000 ulangan (Swofford, 1996).



**Gambar 4.5** Hasil Analisis Filogenetik *Trichoderma* sp. dengan Spesies Lain

Rekonstruksi atau pembuatan pohon filogenetik berdasarkan marka molekuler ITS dapat dilihat dengan metode *neighbor joining* yang menunjukkan pemisahan sesi ke dalam 2 kelompok besar. Kelompok pertama yang digunakan sebagai outgroup terdiri dari *Gliocladium penicillioides* dan *Sphaerostibella aureonitens* sebagai spesies pembanding yang berbeda genus. Menurut Hidayat

(2008), penambahan *outgroup* dilakukan guna mendapatkan informasi yang meyakinkan dari sekuen yang berhubungan.

Kelompok kedua sebagai *ingroup* dibagi menjadi 2 kelompok. Kelompok pertama didukung dengan nilai *bootstrap* 78 % yang diduduki oleh *Trichoderma viride* sedangkan kelompok yang kedua didukung dengan nilai *bootstrap* 99 % terdiri dari dua sub kelompok dengan nilai *bootstrap* 100 % yaitu *Hypocrea gelatinosa* dan *Trichoderma gelatinosum* serta sampel *Trichoderma* sp. hasil isolasi dari ampas tebu, *Trichoderma harzianum*, *T.piluliferum*, *Trichoderma* sp. SQR339, *Hypocrea nigricans*, *Trichoderma* sp. NFML CH12 BB. 15, *Trichoderma aureoviride*, *Hypocrea lixii* dengan nilai *bootstrap* 70%, dan *Trichoderma* BAB-4585 dengan nilai *bootstrap* 100%.

Nilai *bootstrap* diantara 70-100 menunjukkan bahwa percabangan dan pohon filogenetik tidak akan berubah. Sebaliknya, jika nilai *bootstrap* kurang dari 70 maka peluang terjadinya susunan percabangan sangat tinggi, sehingga ketika dilakukan analisis pohon filogenetik yang dibentuk masih dapat berubah-ubah (Simpson, 2006).

Nilai *bootstrap* tersebut memperlihatkan cukup tingginya tingkat kepercayaan cabang yang terbentuk. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa genus *Trichoderma* kemungkinan besar merupakan genus atau kelompok yang berasal dari satu nenek moyang dengan kelima spesies, diantaranya; *Trichoderma harzianum*, *T.piluliferum*, *Trichoderma* sp. SQR339, *Hypocrea nigricans*, dan *Trichoderma* sp. NFML CH12 BB. 15. *Trichoderma aureoviride*, *Hypocrea lixii*, *Trichoderma* BAB-4585. Menurut Hidayat (2005), kelompok monofiletik merupakan kelompok yang anggotanya berasal dari satu nenek moyang. Anggota

dalam kelompok monofiletik diasumsikan membawa sifat atau pola genetik dan biokimia yang sama.

Ubaidillah & Sutrisno (2009), juga menjelaskan bahwa metode *bootstrap* yaitu metode pengacakan ulang karakter-karakter menjadi set data baru dengan jumlah karakter yang sama seperti set data awal dan selanjutnya dilakukan rekonstruksi pohon filogenetik baru. Penggunaan metode bootstrap dalam menentukan tingkat kepercayaan pohon berdasarkan kenyataan bahwa distribusi karakter dalam data sangat dipengaruhi oleh efek acak sehingga semakin besar nilai *bootstrap* yang digunakan maka semakin tinggi tingkat kepercayaan topologi pohon hasil rekonstruksi tersebut.

Filogenetik sampel *Trichoderma* sp. hasil isolasi dengan spesies lain, similaritas antar sampel dan jarak genetik dapat dilihat dengan menggunakan software MEGA 6.0 (lampiran 9). Nilai similaritas adalah berbanding terbalik dengan jarak genetik. Semakin kecil jarak genetik antar spesies, maka semakin besarlah nilai similaritasnya.

Menurut Nei (1987) jarak genetik menunjukkan tingkat perbedaan gen diantara populasi atau spesies. Pramarta (2014) juga menambahkan bahwa jarak genetik dapat menunjukkan kedekatan atau tidaknya hubungan kekerabatan antara sekuen nukleotida yang diamati. Menurut Shamir (2001), analisis jarak genetik dapat menunjukkan jarak genetik antara sampel dengan masing-masing individu yang menjadi spesies pembanding.

Sampel *Trichoderma* sp. memiliki similaritas (kesamaan) *fragment Internal Transcribed Spacer* (ITS) 100% dengan *Trichoderma harzianum*, *T.piluliferum*, *Trichoderma* sp. SQR339, *Hypocrea nigricans*, dan *Trichoderma*

sp. NFML CH12 BB. 15. dengan jarak genetik 0,00 yang berarti bahwa sekuens dari kedua individu tersebut adalah sama persis. Sedangkan nilai similaritas *Trichoderma* sp. hasil isolasi dengan *Trichoderma aureoviride*, *Hypocrea lixii* dan *Trichoderma* BAB-4585 adalah 99,78 % dengan nilai jarak genetik 0,002. Berdasarkan penelitian Setiyatwan (2007), menunjukkan adanya aktivitas enzim selulase oleh *Trichoderma harzianum* dengan cara meningkatkan Kualitas Nutrisi *Duckweed* Melalui Fermentasi. Hal tersebut memperkuat adanya identifikasi secara morfologi bahwa *Trichoderma* sp. hasil isolasi dari ampas tebu merupakan kapang penghasil selulase.

Analisis selanjutnya adalah perbandingan dengan spesies outgroup yaitu *Gliocladium penicillioides* dan *Sphaerostibella aureonitens*. Spesies *Trichoderma* sp. hasil isolasi dari ampas tebu dengan spesies *outgroup* menunjukkan hubungan yang lebih jauh dibandingkan dengan spesies *ingroup* berdasarkan nilai jarak genetik dan similaritas. Jarak genetik dan nilai similaritas yang dimiliki oleh *Trichoderma* sp. hasil isolasi dari ampas tebu dengan *Gliocladium penicillioides* adalah 0.203 dan 79.677. Sedangkan jarak genetik dan similaritas yang dimiliki oleh kapang *Trichoderma* sp. dengan *Sphaerostibella aureonitens* 0.134 dan 86.556. Hal tersebut dapat menandakan adanya perbedaan yang besar antara spesies *outgroup* dengan *ingroup*.

## BAB V

### PENUTUP

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa:

1. DNA genom hasil isolasi DNA kapang *Trichoderma* sp. dapat diamplifikasi dengan primer ITS1 dan ITS4 dengan ampikon sepanjang 600 bp.
2. Ukuran seluruh sekuen DNA hasil PCR yang telah disekuensing adalah 570 bp.
3. Hasil perbandingan sekuen kapang *Trichoderma* sp. hasil isolasi dari ampas tebu dengan database NCBI berdasarkan ITS rDNA menunjukkan adanya kemiripan 100% dan jarak genetik 0.00 antara sekuen *Trichoderma* sp. hasil isolasi dari ampas tebu dengan *Trichoderma harzianum*, *T. piluliferum*, *Trichoderma* sp. SQR339, *Hypocrea nigricans*, dan *Trichoderma* sp. NFML CH12 BB. 15.

#### 5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan untuk penelitian selanjutnya yaitu perlu dilakukan identifikasi berdasarkan sekuen gen pengkode selulase *Trichoderma* sp. sehingga dapat ditemukan kemiripan 100% hanya dengan satu spesies kapang serta menambah data sekuen pada bank data.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah. 2014. Tafsir Ibnu Katsir. Jakarta: Pustaka Imam Syafi'i.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z . 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. Vol. 25:3389-3402.
- Ardiana, D.W. 2009. Teknik Isolasi DNA Genom Tanaman Pepaya dan Jeruk dengan Menggunakan Modifikasi Buffer CTAB. *Jurnal Teknik Pertanian*. Vol. 14. No. 1.
- Arief, I.I. 2011. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Indigenus Asal Daging Sapi Sebagai Probiotik dan Identifikasinya dengan Analisis Urutan Basa Gen 16S rRNA. *Skripsi*. IPB.
- Arnata, I W. 2009. Teknologi Bioproses Pembuatan Bioetanol dari Ubi Kayu Menggunakan *Trichoderma Viride*, *Aspergillus Niger* dan *Saccharomyces Cerevisiae*. *Thesis Master*. Bogor: IPB.
- Articus, K. 2004. Phylogenetic Studies in *Usnea* (Parmeliaceae) and Allied Genera. *Comprehenship Summaries of Uppsala Disertations From the Faculty of Science and Technology (Acta Universitatis Upsaliensis)*.
- Atcha, Boonmee. 2009. *Screening of Rice Straw Degrading Microorganisms and Their Cellulase Activities*. Thailand: Khon Kaen University
- Baldwin BG. 1995. The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: a Valuable Sources of Evidence on Angiospermae Phylogeny. *Ann.Missouri Bot. Gard* 247- 277.
- Barnett, J.A., R.W. Payne, and D. Yarrow. 2000. *Yeast: Characteristics and Identification. 3rd Ed*. Cambridge: Cambridge university press.
- Barnett, H.L. & B.B. Hunter. 2003. *Illustrated Genera Of Imperfect Fungi. 4th ed*. USA: Prentice Hall, Inc.
- Benson, H.J. 2001. *Microbiological Application: Laboratory Manual In General Microbiology*. New York: The McGraw-Hills Company, Inc.
- Borges, A. *et al*. 2009. CTAB Methods For Dna Extraction Of Sweetpotato For Microsatellite Analysis. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*. v.66, n.4, p.529-534
- Brinkman F, Leipe D. 2001. *Phylogenetic Analysis*. Canada: University of British Columbia.
- Carlile, M.J. & S.C. Watkinson. 1994. *The Fungi*. London: Academic Press Ltd.

- Chakraborty B.N., Chakraborty U., Saha A , P.L Dey and Sunar K. 2010 .Molecular Characterization of *Trichoderma viride* and *Trichoderma harzianum* Isolated from Soils of North Bengal Based on rDNA Markers and Analysis of Their PCR-RAPD Profiles. *Global J. Biotech. Biochem.* 5 , 55-61.
- Ciaro, D.E., G. Schar, E.C. Bottger, M. Altwegg & P.P. Bosshard. 2006. Internal Transcribed Spacer Sequencing Versus Biochemical Profiling For Identification Of Medically Important Yeasts. *Journal of Clinical Microbiology.* 44(1).
- Claverie, Jean Michel., Notredame, Cedric. (2006). *Bioinformatics for Dummies.* John Willey and Sons, New Jersey.
- Darlina, Ina. 2011. Isolasi dan Identifikasi Jamur Indigenous dari Limbah Cair Batik. *Wawasan TRIDHARMA*, No.4.
- Deacon, J.W. 2006. *Fungal Biology.* 4<sup>th</sup> ed. Oxford: Blackwell Publishing.
- Dewi, C.L.H. 2012. *Analisis Biomolekuler Gen Internal Transcribed Spacer (ITS) Dalam Studi Filogenetik Zingiber Loerzingii Valetton (Zingiberaceae).* Bogor. IPB
- Ediningsari, Anisa R. 2008. Identifikasi khamir dari perairan mangrove dan laut cagar alam pulau rambut berdasarkan Daerah Internal Transcribed Spacer (ITS). *Skripsi.* Depok: Fakultas MIPA Universitas Indonesia.
- Elsalam, K. A. Abd. 2003. *Minireview Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design.* vol. 2. 91–95.
- Estrabrook G. 1984. Phylogenetic trees and character state trees. Di dalam: Duncan T and T Stuessy, editor. *Perspectives on the Reconstruction Evolutionary History Cladistics.* Columbia University Press.
- E.A. Iturriaga, J.M. Diaz-Minguez,, C. Castro, E. Monte and I. Garcia-Acha, 2000. Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol 66: 1890–1898.
- Fatchiyah, Wirdyarti, S., Arumningtyas, E. L., Permana, S. 2012. *Buku Praktikum Teknik Analisis Biologi Molekuler.* Malang: UB Press.
- Fell, J.W., T. Boekhout, A. Fonseca, G. Scorzetti & A. Statzell-Tallman. 2000. Biodiversity and Systematics of Basidiomycetous Yeasts as Determined by Large-Subunit rDNA D1/D2 Domain Sequence Analysis. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology.* Vol. 50.

- Gandjar, I., R.A. Samson, K. van den Tweel-Vermeulen, A. Oetari, & I. Santoso. 1999. *Pengenalan Kapang Tropik Umum*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Gandjar, I., 2006. *Mikrobiologi Dasar dan Terapan*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Geiser, D.M. 2004. A Higher Level Phylogenetic Clasification of The Fungi. *Mycological research*. Vol. 111: 509-547.
- Graham A, Newton CR. 1997. *PCR (Polimerase Chain Reaction)*. Ed Ke-2. New York: Springer Verlag.
- Gravendeel B. 1998. Phylogeny Of Coelogyne Lindl. (Orchidaceae) Based On Morphology And Cpdna RFLP Data. *Acta Bot. Neerl*. Vol. 47. No. 23.
- Gunardi, A. J. 2008. Internet-based Analysis Tools and Bioinformatics. *Thesis*: Oxford University.
- Harman. 2000. Plant Disease. *The American Phytopathological Society*. Vol. 84. 377-393.
- Hermosa, M.R. *et al.* 2000. Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 66. No. 5
- Hidayat T, Yukawa T, Ito M. 2005. Molecular Phylogenetics of Subtribe Aeridinae (Orchidaceae): Insights from Plastid matK and Nuclear Ribosomal ITS Sequences. *J Plant Res*. 18:271-284.
- Hidayat, Nur. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta: Andi
- Hidayat T, Pancoro A. 2008. Kajian Filogenetika Molekuler dan Peranannya dalam Menyediakan Informasi Dasar untuk Meningkatkan Kualitas Sumber Genetik Anggrek. *Jurnal AgroBiogen*. Vol. 4. 35-40.
- Ismail N. dan Andi T. 2010. *Potensi Agen Hayati Trichoderma sp. Sebagai Agen Pengendali hayati*. *Seminar Regional Inovasi Teknologi Pertanian, Mendukung Program Pembangunan Pertanian Provinsi Sulawesi Utara*: hal 177-189. Sulawesi Utara: Balai Pengkajian Teknologi Pertanian (BPTP).
- James, S.A., M.D. Collins, I.N. Roberts. 1996. Use of an rRNA Internal Transcribed Spacer of the Genera *Zygosaccharomyces* and *Torulasporea*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 46. No.1: 189-194.

- Jorgensen, R.A., Cuellar, R.E., Thomson, W.F., Kavanagh, T.A. 1987. Structure and Variation in Ribosomal RNA Gene of Pea. *Plant Molecular Biology*. Vol. 8: 3.
- Kelly, L.J; Hollingsworth, P.M.; Coppins, B.J.; Ellis, C.J.; Harrold, P., Tosh, J., & Yahr, R. 2011. DNA Barcoding of Lichenized Fungi Demonstrates High Identification Success in a Floristic Context. *New phytologist* (191):288-300.
- Kirsop, B. and Henry, J. 1984. Development of a miniaturized cryopreservation method for the maintenance of a wide range of yeasts. *Cryo-Letters* 5, 191–200.
- Kress WJ, Liu AZ, Newman M, Li QJ. 2005. The Molecular Phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): A Complex and Polyphyletic Genus of Gingers. *American Journal of Botany*. Vol. 92: 167-178.
- Kurtzman, C.P., T. Boekhout, V. Robert, J.W.Fell, T. Deak. 2003. Methods to identify yeasts. Dalam: Ediningsari, Anisa R. 2008. Identifikasi khamir dari perairan mangrove dan laut cagar alam pulau rambut berdasarkan Daerah Internal Transcribed Spacer (ITS). *Skripsi*. Depok: Fakultas MIPA Universitas Indonesia.
- Lewitter F1 1987 Online use of the GenBank Genetic Sequence Data Bank. Development in Industrial Microbiology. *Journal of Industrial Microbiology Suppl*. Vol. 27. No.1
- Li, N., Chen, X., Zhu, D.Y. 2007. Effect of the Fungi on the Rooting of *Huperzia Serrata* and mechanism. *Jiangsu agritechology science*. Vol. 5 :181-184.
- Li, W.H and D. Graur. 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sunderland: Sinauer associates, Inc. Publisers.
- Maharani, A.A.. 2003. Pengaruh Penambahan NPK dalam Biodegradasi Lumpur Minyak Bumi Terhadap Jumlah Jamur dan Kadar Hidrokarbon Poliaromatik. *Artikel*, Bandung.
- McCulloug MJ, KV Clemons, JH McCusker, DA Stevens. 1998. Intergenic Transcribed Spacer PCR Ribotyping for Differentiation of *Saccharomyces* Species and Interspecific Hybrids. *J. Clin Microbiol* . Vol. 36.
- Muladno. 2002. *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika*. Bogor: Pustaka Wirausaha Muda.

- Nicholas FW. 1993. *Veterinary Genetics*. New York: Oxford University Press.
- Nuswantara S. 2000. Internet untuk biologi molekuler. *Warta Biotek*. Vol.14 No 2 Juni 2000.
- N. Saitou and M. Nei. 1987. The Neighbor-Joining Method: A New Method For Recon- Structing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.*, Vol. 4:406–425.
- Osterbauer NK, Rehms L. 2002. Detecting Single Seeds of Small Broomrape (Orobanche Minor) With A Polymerase Chain Reaction. *Plant Health Progress*. [terhubung berkala]. <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/broomrape.html>
- Ouzounis, Christos. (2002). Editorial: Bioinformatics and Theoretical Foundations of Molecular Biology. *Oxford Journal of Bioinformatics* vol.18 no.3, 377-378.
- Pelczar, Michael J. dan E.C.S. Chan. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI-Press.
- Pitt, J.I. dan A.D. Hocking. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. New York: Springer Science and Business Media.
- Polans, N.O. Saar, D. E. 2015. *ITS Sequence Variation in wild Species and Cultivars of Pea*. Dekalb, IL: Northern Illinois Univ.
- Pramarta, I. G. R. 2014. Identifikasi Spesies Potyvirus Penyebab Penyakit Mosaik Pada Tanaman Cabai Rawit (*Capsicum Frutescens* L.) Melalui Sikuen Nukleotida Gen Coat Protein. *Tesis*. Denpasar: Universitas Udayana.
- Purnamasari, M. I., Prihatna, C., Gunawan, A. W., Suwanto, A. 2012. Isolasi dan Identifikasi Molekuler *Ganoderma* spp. yang Berasosiasi dengan Penyakit Busuk Pangkal Batang di Kelapa Sawit. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. Vol. 8. No. 1.
- Purwadaria, T. Marbun, P. Sinurat, A dan Ketaren, P. 2003. Perbandingan Aktivitas Enzim Selulase Dari Bakteri Dan Kapang Hasil Isolasi Dari Rayap. *Jitv*. Vol. 8. No. 4.
- Rahman, 2014. *Analisa Kekerabatan 14 Spesies Primata Dengan Program Mega 4*. Bengkulu: UNIB
- Rakhmawati, Anna. 2009. *Isolasi dan Identifikasi Kapang Kontaminan pada Kacang Tanah yang Dijual Di Pasar Beringharjo Edisi Khusus: 3C..* Yogyakarta: Berk. Penel. Hayati.

- Rashidi, H.H. & L.K. Buehler. 2000. *Bioinformatics Basics*. Applications in Biological Science and Medicine. CRC Press. London. pp 173.
- Salma, S., dan Gunarto, L. 2007. Enzim Selulase dari *Trichoderma* spp. *Jurnal Agrobio*. Vol. 1 (2): 2.
- Santoso PJ. 2005. Modified CTAB-based DNA isolation procedure for fruit crops. *Jurnal Stigma*. Vol. 16: 1-4.
- Sambrook, J., Russell, D. 2001. *Molecular Cloning : a Laboratory Manual*, 3rd Ed. New York: Coln Spring Harbor Laboratory.
- Sauer, P., M. Muller, dan J. Kang. 1998. Quantitation DNA. *Qiagen News*. Vol. 2 : 23-26.
- Serussiaux, E., B, Goffinet, J. Miadlikowska., & O, Vitikainen. 2009. Taxonomy, Phylogeny, & Biogeography of The Lichen Genus *Peltigera* in Papua New Guinea. *Fungal Diversity*. (38): 185-244.
- Setiyawatwan, H. 2007. Peningkatan Kualitas Nutrisi Duckweed Melalui Fermentasi Menggunakan *Trichoderma harzianum*. *Jurnal Ilmu Ternak*. Vol. 7. No. 2.
- Sette, L.D., Passaridi, M.R.Z., Delarmelina, C., Salati, F., Duarti, M.C.T. 2006. Molecular characterization and antimicrobial activity endophytic fungi from coffe plants. *World journal micobiol biotechnol*. Vol. 22:1185-1195.
- Simpson. M.G. 2006. *Plant Systematic*. California: Elsevier Academic Press.
- Soesanto, L. 2008. *Pengantar Pengendalian Hayati Penyakit Tanaman*. Jakarta: Rajawali Pers.
- Soltis DE, Soltis PS. 1998. Choosing an Approach and an Appropriate Gene for Phylogenetic Analysis. Di dalam: Soltis DE, Soltis Ps, Doyle JJ, editor. *Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing*. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers.
- Stuessy TF. 1990. *The Systematic Evaluation of Comparative Data*. New York: Columbia University Press
- Suharjono, Agung P.W., Marhendra, Triwiratno A., Wuryantini. S., R. Lina O. 2010. Sistematis Filogenetik Isolat-isolat Kapang Indigenous Indonesia sebagai Entomopatogen Kutu Sisik (*Lepidosaphes beckii* Newman) Hama Tanaman Jeruk. *Biota*. Vol. 15. No. 2.
- Surakhman, Watik. 2013. Isolasi dan Uji Potensi Kapang *Indigenous* Selulolitik pada Ampas Tebu (*Bagasse*). *Skripsi*. Malang: UIN MALIKI Malang.

- Swofford DL, Olsen GJ, Waddel PJ, Hills DM. 1996. *Phylogenetics Inference*. Rhode Island: Brown University.
- Talanca, A.H. 2002. Potensi Jamur *Trichoderma* Spp. Merombak Limbah Pertanian Menjadi Bahan Organik. *Prosiding Seminar Ilmiah Dan Pertemuan*. Isbn : 979-95026-5-9 76
- Tenriulo, A., Suryati, E., Parenrengi, A., dan Rosmiat. 2001. Ekstraksi Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* dengan Metode Fenol Kloroform. *Marina Chimica Acta*. Vol. 2. (2): 6-10.
- Ubaidillah R, Sutrisno H. 2009. *Pengantar Biosistemik: Teori dan Praktik*. Jakarta: LIPI Press.
- Utama, A. 2003. *Peran Bioinformatika dalam Dunia Kedokteran*. Jakarta: Ilmu Komputer..
- Van Heusden WA, van Ooijen JW, Vrieling- van Ginkel R, Verbeek WHJ, Wietsma WA, and Kik C. 2000. *A genetic map of an interspecific cross in Allium based on amplified fragment length polymorphism (AFLPTM) markers*.
- Waluyo, Lud. 2008. *Teknik Metode Dasar Mikrobiologi*. Malang: UMM press.
- Witarto, AB. 2003. *Bioinformatika Mengawinkan Teknologi Informasi dengan Bioteknologi*. Jakarta: Ilmu Komputer.
- Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. Dalam: Kurtzman, C.P. & J.W. Fell. (eds.). 1998. *The yeasts: A taxonomic study*. 4rd ed. Elsevier, Amsterdam: 69--100.
- Yi-Ping PC. 2005. *Bioinformatics Technologies Introduction to Bioinformatics*. Verlag-Berlin-Heidelberg: Spinger Science & Business Media.

**LAMPIRAN 1 DIAGRAM ALIR KEGIATAN SECARA UMUM**

**Peremajaan Isolat Murni *Trichoderma* sp. (7 Hari pada Medium PDA)**

**Isolasi DNA *Trichoderma* sp (Modifikasi Doyle & Doyle 1987)**

**Uji Kualitatif DNA *Trichoderma* sp.**

**Uji Kuantitatif DNA *Trichoderma* sp.**

**Proses Amplifikasi DNA menggunakan metode PCR dengan primer ITS1**

**ITS4**

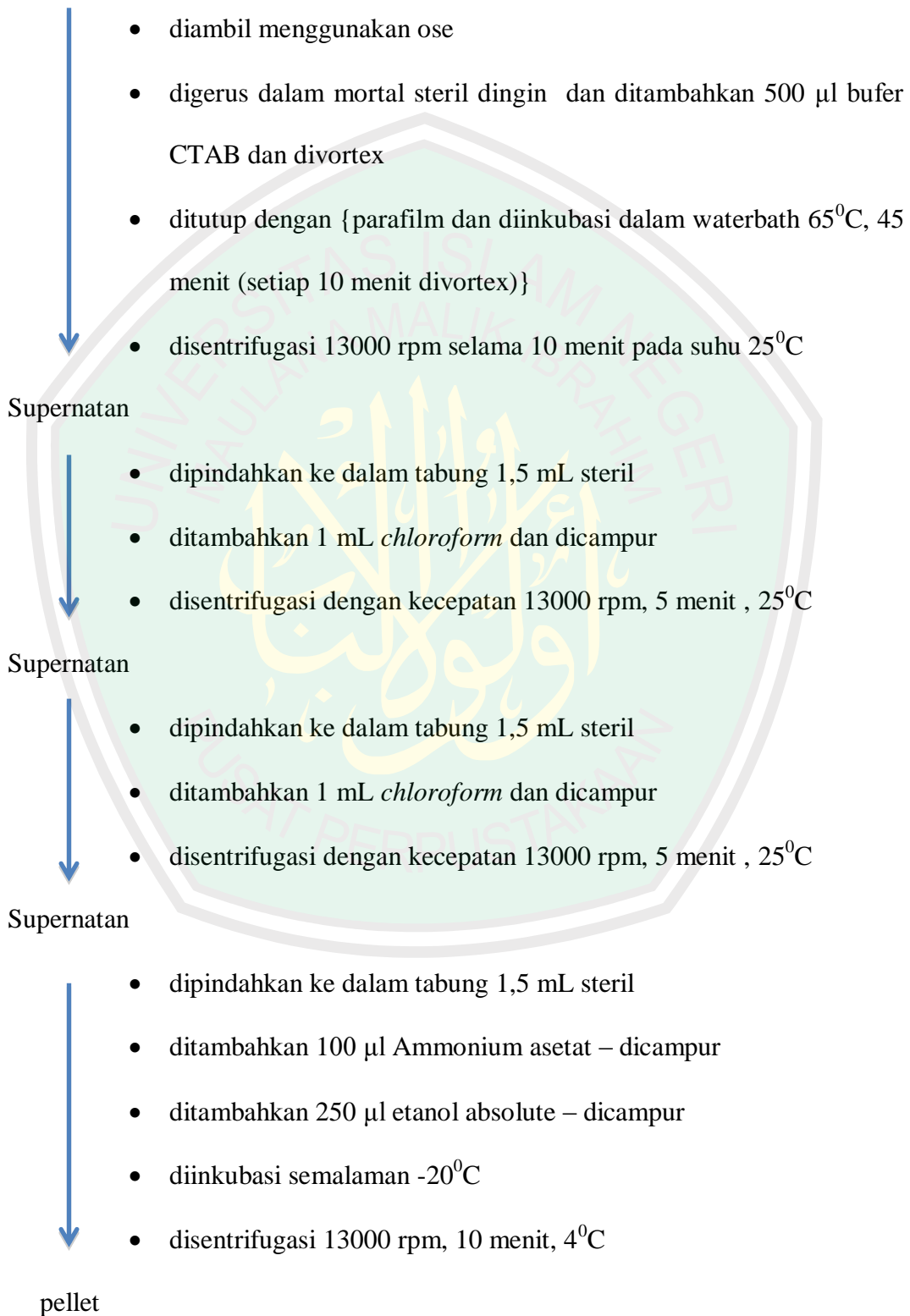
**Uji Kualitatif ampikon**

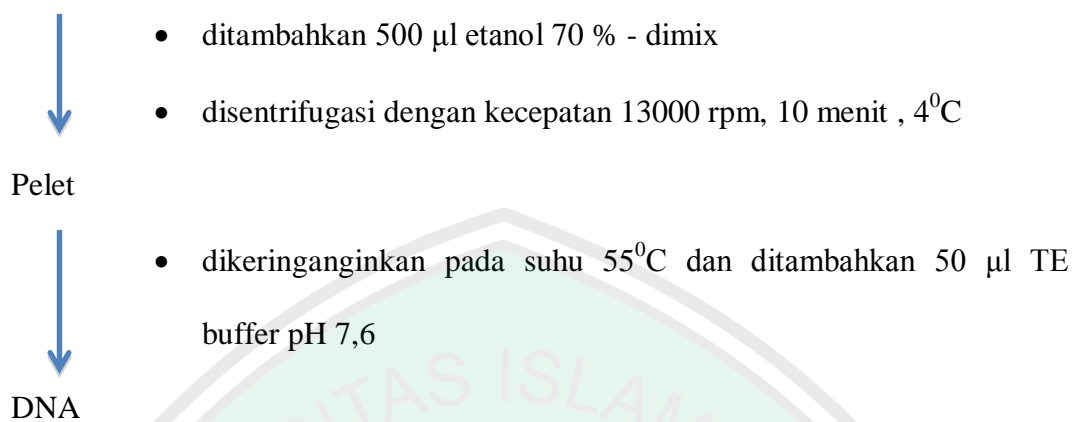
**Purifikasi dan sequencing DNA *Trichoderma* sp.**

**Analisis Filogenetik *Trichoderma* sp.**

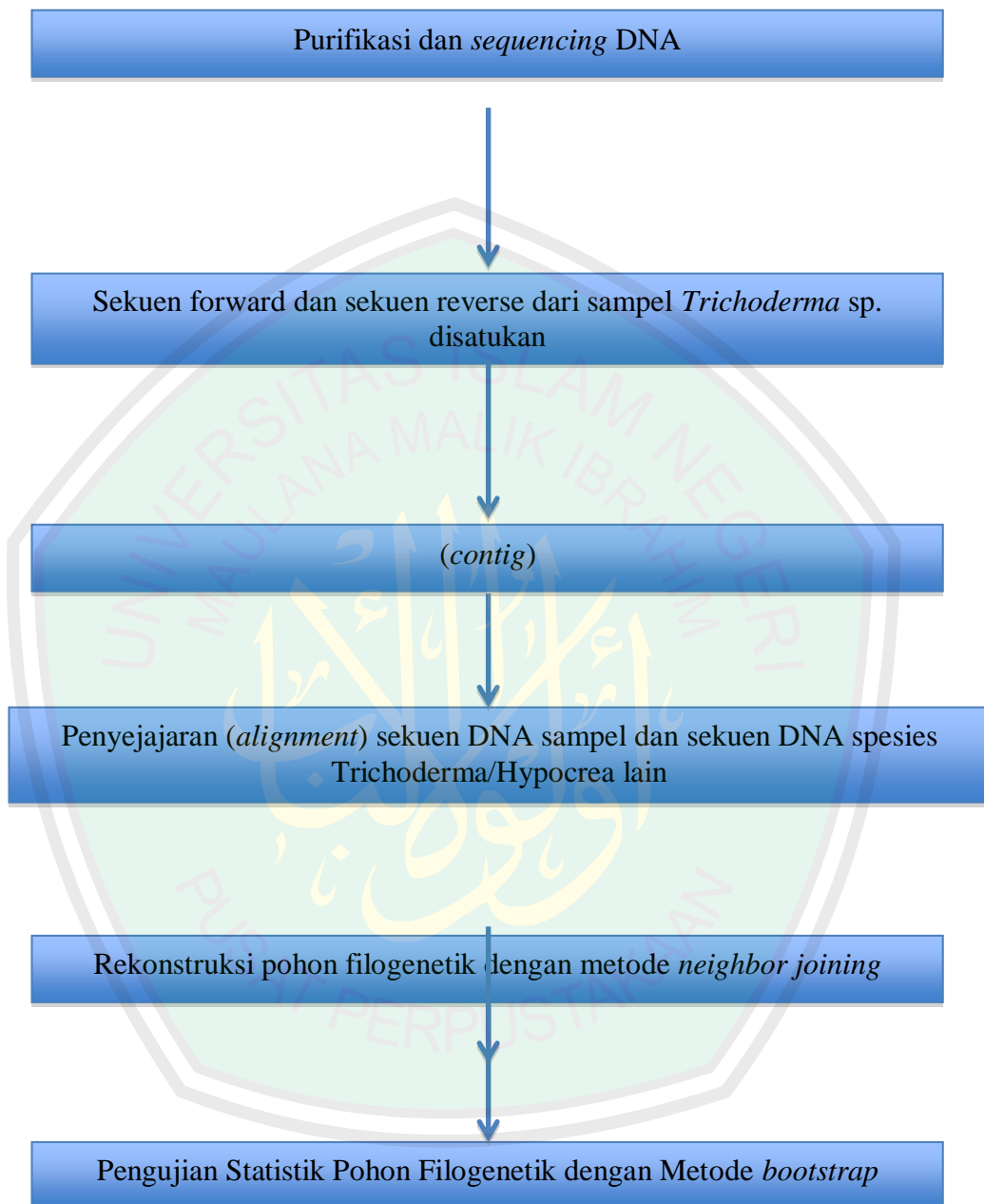
## LAMPIRAN 2 TAHAP ISOLASI DNA (MODIFIKASI DOYLE & DOYLE, 1987)

Kapang dalam medium agar





### LAMPIRAN 3 TAHAP PURIFIKASI, SEQUENCING DNA, DAN ANALISIS FILOGENETIK



**LAMPIRAN 4 SEKUEN DNA ITS TRICHODERMA/HYPOCREA DARI  
GENBANK**

No.	Jenis	Nomor Akses
1	<i>Trichoderma harzianum</i> , isolate 2931	AJ224017.1
2	<i>Trichoderma viride</i> , isolate 25	AJ223773.1
3	<i>Trichoderma aureoviride</i> strain T112	HQ596956.1
4	<i>Trichoderma piluliferum</i> strain wxm46	HM037966.1
5	<i>Trichoderma</i> sp. SQR339	GQ497170.1
6	<i>Hypocrea nigricans</i> strain NBRC 31290	JN943373.1
7	<i>Trichoderma</i> sp. BAB-4585	KR154938.1
8	<i>Trichoderma</i> sp. NFML_CH12_BB.15	KM458790.1
9	<i>Sphaerostilbella aureonitens</i> strain GJS 74-87	FJ442633.1
10	<i>Gliocladium penicillioides</i>	AF048733.1
11	<i>Hypocrea gelatinosa</i> strain NBRC 104900	JN943358.1
12	<i>Trichoderma gelatinosum</i> strain GJS 88-17	AY737775.1
13	<i>Hypocrea lixii</i> strain DPNST-4	JN713922.1

## LAMPIRAN 5 ELEKTROFOREGRAM HASIL SEKUENSING DENGAN SEQUENCE SCANNER

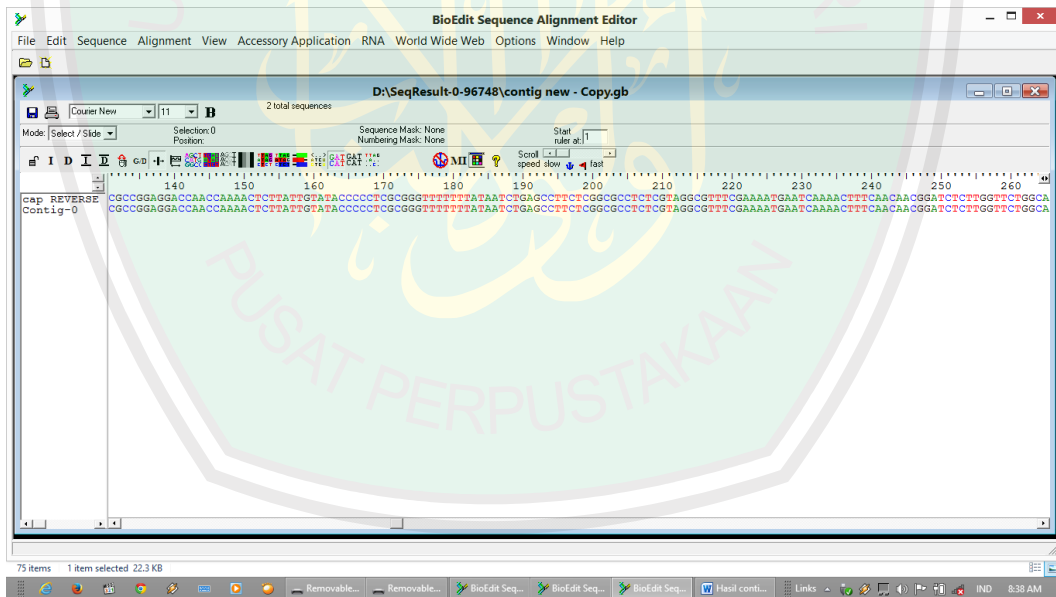
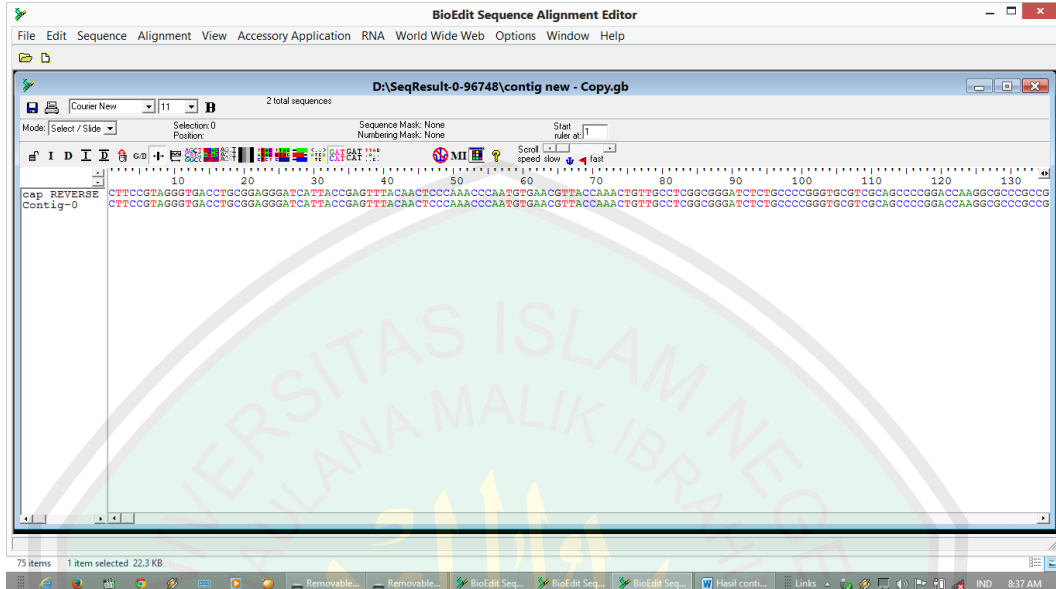








**LAMPIRAN 6 HASIL PROSES PENYATUAN SEKUEN ITS SAMPEL  
*Trichoderma sp.* DENGAN BIOEDIT, (MERAH) BASA T, (HITAM) BASA  
G, (HIJAU) BASA A, (BIRU) BASA C.**



BioEdit Sequence Alignment Editor

File Edit Sequence Alignment View Accessory Application RNA World Wide Web Options Window Help

D:\SeqResult-0-96748\contig new - Copy.gb

2 total sequences

Mode: Select / Slide Selection: 0 Position: Sequence Mask: None Numbering Mask: None Start ruler at: 1

270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390

cap REVERSE TGGCATCGATGAAGAACCCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCATCGAAATCTTTGAACGCACATTGCGCCGCCAGTATTCGGCGGGDARGCCTGCCAGCGTCAATTCACCC

Contig-0 TGGCATCGATGAAGAACCCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCATCGAAATCTTTGAACGCACATTGCGCCGCCAGTATTCGGCGGGDARGCCTGCCAGCGTCAATTCACCC

75 items 1 item selected 22.3 KB

BioEdit Sequence Alignment Editor

File Edit Sequence Alignment View Accessory Application RNA World Wide Web Options Window Help

D:\SeqResult-0-96748\contig new - Copy.gb

2 total sequences

Mode: Select / Slide Selection: 0 Position: Sequence Mask: None Numbering Mask: None Start ruler at: 1

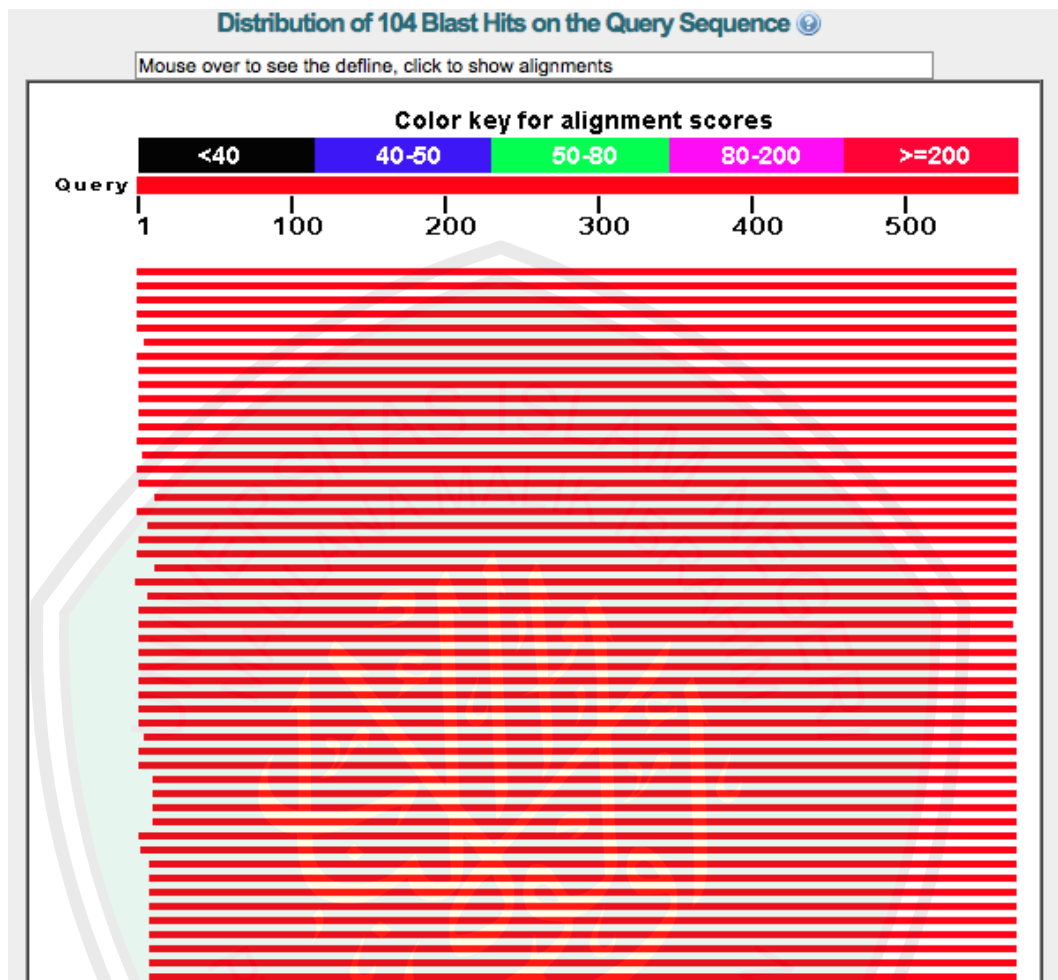
440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570

cap REVERSE CCTTGGCGGGTGGCCCTCCCGAAATACAGTGGGGTCCCGCGAGCCTTCCCGCGCAGTAGTTTGGACACTCGCATCGGGAGCGCGCGCTCCACAGCCGTTAAACACCCAAATCTGAAATGTGAACCTCGG

Contig-0 CCTTGGCGGGTGGCCCTCCCGAAATACAGTGGGGTCCCGCGAGCCTTCCCGCGCAGTAGTTTGGACACTCGCATCGGGAGCGCGCGCTCCACAGCCGTTAAACACCCAAATCTGAAATGTGAACCTCGG

75 items 1 item selected 22.3 KB

## LAMPIRAN 7 HASIL BLAST SEKUEN *Trichoderma* sp. DENGAN NCBI



NCBI Blast:Nucleotide Sequence (571 letters)

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Sequences producing significant alignments:

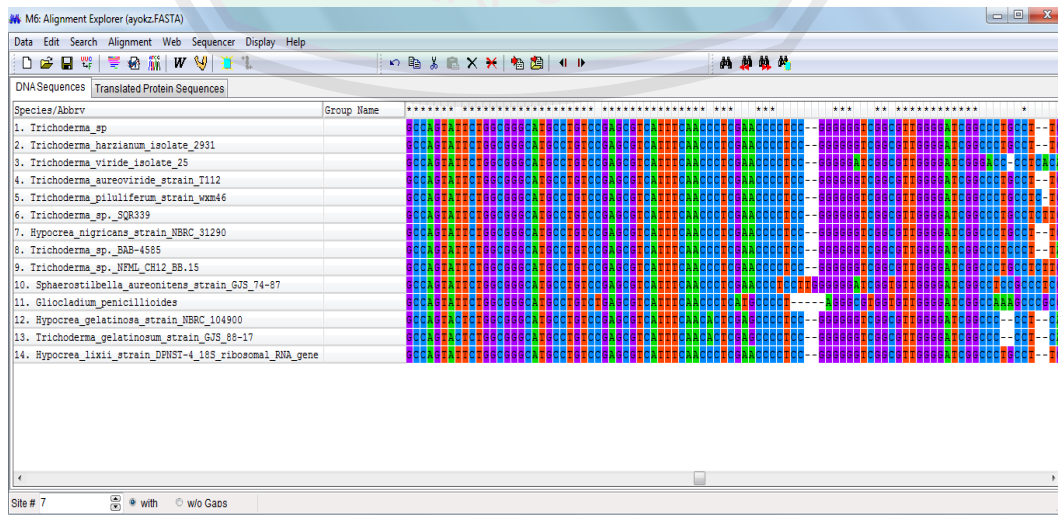
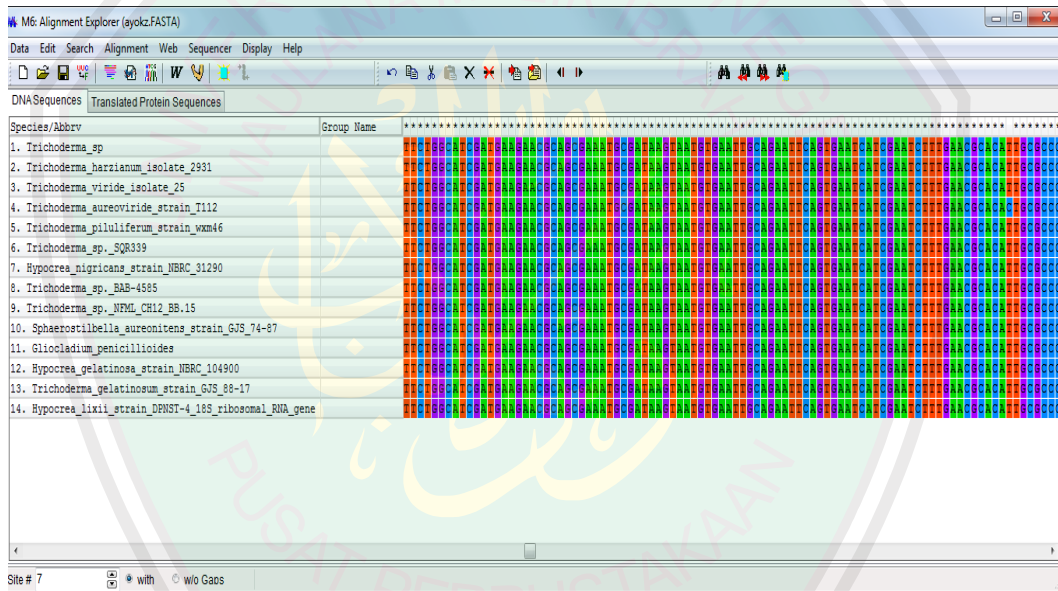
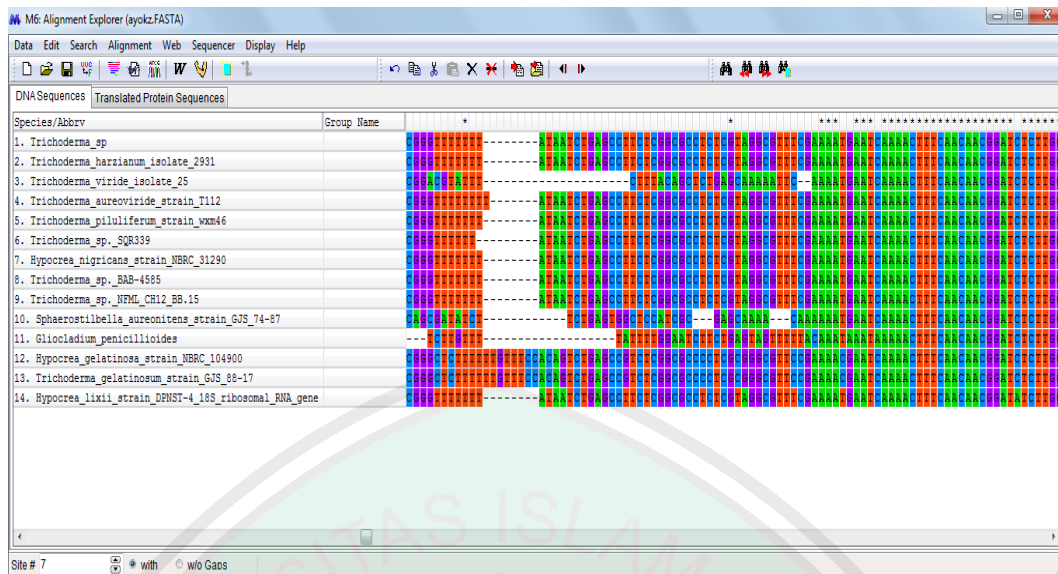
Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trichoderma harzianum strain 1228 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene</a>	1048	1048	99%	0.0	99%	<a href="#">KF435043.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Hypocrea lixii strain VB1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene</a>	1048	1048	99%	0.0	99%	<a href="#">HQ011501.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Hypocrea lixii strain wxm145 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene</a>	1042	1042	99%	0.0	99%	<a href="#">HM047765.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Hypocrea lixii strain DPNST-4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene</a>	1038	1038	99%	0.0	99%	<a href="#">JN713922.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Hypocrea lixii strain BHU51 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene</a>	1038	1038	99%	0.0	99%	<a href="#">JN618343.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Hypocrea lixii strain BHU221 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene</a>	1038	1038	99%	0.0	99%	<a href="#">JN604833.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trichoderma harzianum strain PRT-THL06 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene</a>	1037	1256	99%	0.0	99%	<a href="#">KC582837.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trichoderma harzianum voucher TrH_JSB971 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene</a>	1037	1037	99%	0.0	99%	<a href="#">KC589354.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Fungal sp. Griff. DX-FIL3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene</a>	1035	1035	99%	0.0	99%	<a href="#">KC857270.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trichoderma harzianum strain ITEM 908 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene</a>	1035	1035	99%	0.0	99%	<a href="#">KC819133.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trichoderma aureoviride strain T59 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene</a>	1035	1035	99%	0.0	99%	<a href="#">HQ596942.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trichoderma harzianum isolate T65-NI 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene</a>	1035	1035	99%	0.0	99%	<a href="#">U78881.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trichoderma sp. NFML_CH12_BB.15 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene</a>	1033	1033	99%	0.0	99%	<a href="#">KM458790.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trichoderma harzianum strain TR068 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene</a>	1033	1033	99%	0.0	99%	<a href="#">KC993075.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trichoderma harzianum strain CEN262 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene</a>	1033	1176	99%	0.0	99%	<a href="#">KC576684.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Hypocrea lixii isolate S17TH 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene</a>	1033	1346	99%	0.0	99%	<a href="#">GJ048855.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trichoderma harzianum isolate H-03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene</a>	1031	1031	97%	0.0	100%	<a href="#">KF144641.1</a>

**LAMPIRAN 8 HASIL PENYEJAJARAN SEKUEN ITS SAMPEL  
*Trichoderma* sp. DAN SPESIES TRICHODERMA LAIN.  
(Merah) Basa T, (Ungu) Basa G, (Hijau) Basa A, (Biru) Basa C.**









## BAB V

### PENUTUP

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa:

1. DNA genom hasil isolasi DNA kapang *Trichoderma* sp. dapat diamplifikasi dengan primer ITS1 dan ITS4 dengan ampikon sepanjang 600 bp.
2. Ukuran seluruh sekuen DNA hasil PCR yang telah disekuensing adalah 570 bp.
3. Hasil perbandingan sekuen kapang *Trichoderma* sp. hasil isolasi dari ampas tebu dengan database NCBI berdasarkan ITS rDNA menunjukkan adanya kemiripan 100% dan jarak genetik 0.00 antara sekuen *Trichoderma* sp. hasil isolasi dari ampas tebu dengan *Trichoderma harzianum*, *T. piluliferum*, *Trichoderma* sp. SQR339, *Hypocrea nigricans*, dan *Trichoderma* sp. NFML CH12 BB. 15.

#### 5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan untuk penelitian selanjutnya yaitu perlu dilakukan identifikasi berdasarkan sekuen gen pengkode selulase *Trichoderma* sp. sehingga dapat ditemukan kemiripan 100% hanya dengan satu spesies kapang serta menambah data sekuen pada bank data.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah. 2014. Tafsir Ibnu Katsir. Jakarta: Pustaka Imam Syafi'i.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z . 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. Vol. 25:3389-3402.
- Ardiana, D.W. 2009. Teknik Isolasi DNA Genom Tanaman Pepaya dan Jeruk dengan Menggunakan Modifikasi Buffer CTAB. *Jurnal Teknik Pertanian*. Vol. 14. No. 1.
- Arief, I.I. 2011. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Indigenus Asal Daging Sapi Sebagai Probiotik dan Identifikasinya dengan Analisis Urutan Basa Gen 16S rRNA. *Skripsi*. IPB.
- Arnata, I W. 2009. Teknologi Bioproses Pembuatan Bioetanol dari Ubi Kayu Menggunakan *Trichoderma Viride*, *Aspergillus Niger* dan *Saccharomyces Cerevisiae*. *Thesis Master*. Bogor: IPB.
- Articus, K. 2004. Phylogenetic Studies in *Usnea* (Parmeliaceae) and Allied Genera. *Comprehenship Summaries of Uppsala Disertations From the Faculty of Science and Technology (Acta Universitatis Upsaliensis)*.
- Atcha, Boonmee. 2009. *Screening of Rice Straw Degrading Microorganisms and Their Cellulase Activities*. Thailand: Khon Kaen University
- Baldwin BG. 1995. The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: a Valuable Sources of Evidence on Angiospermae Phylogeny. *Ann.Missouri Bot. Gard* 247- 277.
- Barnett, J.A., R.W. Payne, and D. Yarrow. 2000. *Yeast: Characteristics and Identification. 3rd Ed*. Cambridge: Cambridge university press.
- Barnett, H.L. & B.B. Hunter. 2003. *Illustrated Genera Of Imperfect Fungi. 4th ed*. USA: Prentice Hall, Inc.
- Benson, H.J. 2001. *Microbiological Application: Laboratory Manual In General Microbiology*. New York: The McGraw-Hills Company, Inc.
- Borges, A. *et al*. 2009. CTAB Methods For Dna Extraction Of Sweetpotato For Microsatellite Analysis. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*. v.66, n.4, p.529-534
- Brinkman F, Leipe D. 2001. *Phylogenetic Analysis*. Canada: University of British Columbia.
- Carlile, M.J. & S.C. Watkinson. 1994. *The Fungi*. London: Academic Press Ltd.

- Chakraborty B.N., Chakraborty U., Saha A , P.L Dey and Sunar K. 2010 .Molecular Characterization of *Trichoderma viride* and *Trichoderma harzianum* Isolated from Soils of North Bengal Based on rDNA Markers and Analysis of Their PCR-RAPD Profiles. *Global J. Biotech. Biochem.* 5 , 55-61.
- Ciaro, D.E., G. Schar, E.C. Bottger, M. Altwegg & P.P. Bosshard. 2006. Internal Transcribed Spacer Sequencing Versus Biochemical Profiling For Identification Of Medically Important Yeasts. *Journal of Clinical Microbiology.* 44(1).
- Claverie, Jean Michel., Notredame, Cedric. (2006). *Bioinformatics for Dummies.* John Willey and Sons, New Jersey.
- Darlina, Ina. 2011. Isolasi dan Identifikasi Jamur Indigenous dari Limbah Cair Batik. *Wawasan TRIDHARMA*, No.4.
- Deacon, J.W. 2006. *Fungal Biology.* 4<sup>th</sup> ed. Oxford: Blackwell Publishing.
- Dewi, C.L.H. 2012. *Analisis Biomolekuler Gen Internal Transcribed Spacer (ITS) Dalam Studi Filogenetik Zingiber Loerzingii Valetton (Zingiberaceae).* Bogor. IPB
- Ediningsari, Anisa R. 2008. Identifikasi khamir dari perairan mangrove dan laut cagar alam pulau rambut berdasarkan Daerah Internal Transcribed Spacer (ITS). *Skripsi.* Depok: Fakultas MIPA Universitas Indonesia.
- Elsalam, K. A. Abd. 2003. *Minireview Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design.* vol. 2. 91–95.
- Estrabrook G. 1984. Phylogenetic trees and character state trees. Di dalam: Duncan T and T Stuessy, editor. *Perspectives on the Reconstruction Evolutionary History Cladistics.* Columbia University Press.
- E.A. Iturriaga, J.M. Diaz-Minguez,, C. Castro, E. Monte and I. Garcia-Acha, 2000. Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol 66: 1890–1898.
- Fatchiyah, Wirdyarti, S., Arumningtyas, E. L., Permana, S. 2012. *Buku Praktikum Teknik Analisis Biologi Molekuler.* Malang: UB Press.
- Fell, J.W., T. Boekhout, A. Fonseca, G. Scorzetti & A. Statzell-Tallman. 2000. Biodiversity and Systematics of Basidiomycetous Yeasts as Determined by Large-Subunit rDNA D1/D2 Domain Sequence Analysis. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology.* Vol. 50.

- Gandjar, I., R.A. Samson, K. van den Tweel-Vermeulen, A. Oetari, & I. Santoso. 1999. *Pengenalan Kapang Tropik Umum*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Gandjar, I., 2006. *Mikrobiologi Dasar dan Terapan*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Geiser, D.M. 2004. A Higher Level Phylogenetic Clasification of The Fungi. *Mycological research*. Vol. 111: 509-547.
- Graham A, Newton CR. 1997. *PCR (Polimerase Chain Reaction)*. Ed Ke-2. New York: Springer Verlag.
- Gravendeel B. 1998. Phylogeny Of Coelogyne Lindl. (Orchidaceae) Based On Morphology And Cpdna RFLP Data. *Acta Bot. Neerl*. Vol. 47. No. 23.
- Gunardi, A. J. 2008. Internet-based Analysis Tools and Bioinformatics. *Thesis*: Oxford University.
- Harman. 2000. Plant Disease. *The American Phytopathological Society*. Vol. 84. 377-393.
- Hermosa, M.R. *et al.* 2000. Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 66. No. 5
- Hidayat T, Yukawa T, Ito M. 2005. Molecular Phylogenetics of Subtribe Aeridinae (Orchidaceae): Insights from Plastid matK and Nuclear Ribosomal ITS Sequences. *J Plant Res*. 18:271-284.
- Hidayat, Nur. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta: Andi
- Hidayat T, Pancoro A. 2008. Kajian Filogenetika Molekuler dan Peranannya dalam Menyediakan Informasi Dasar untuk Meningkatkan Kualitas Sumber Genetik Anggrek. *Jurnal AgroBiogen*. Vol. 4. 35-40.
- Ismail N. dan Andi T. 2010. *Potensi Agen Hayati Trichoderma sp. Sebagai Agen Pengendali hayati*. *Seminar Regional Inovasi Teknologi Pertanian, Mendukung Program Pembangunan Pertanian Provinsi Sulawesi Utara*: hal 177-189. Sulawesi Utara: Balai Pengkajian Teknologi Pertanian (BPTP).
- James, S.A., M.D. Collins, I.N. Roberts. 1996. Use of an rRNA Internal Transcribed Spacer of the Genera *Zygosaccharomyces* and *Torulasporea*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 46. No.1: 189-194.

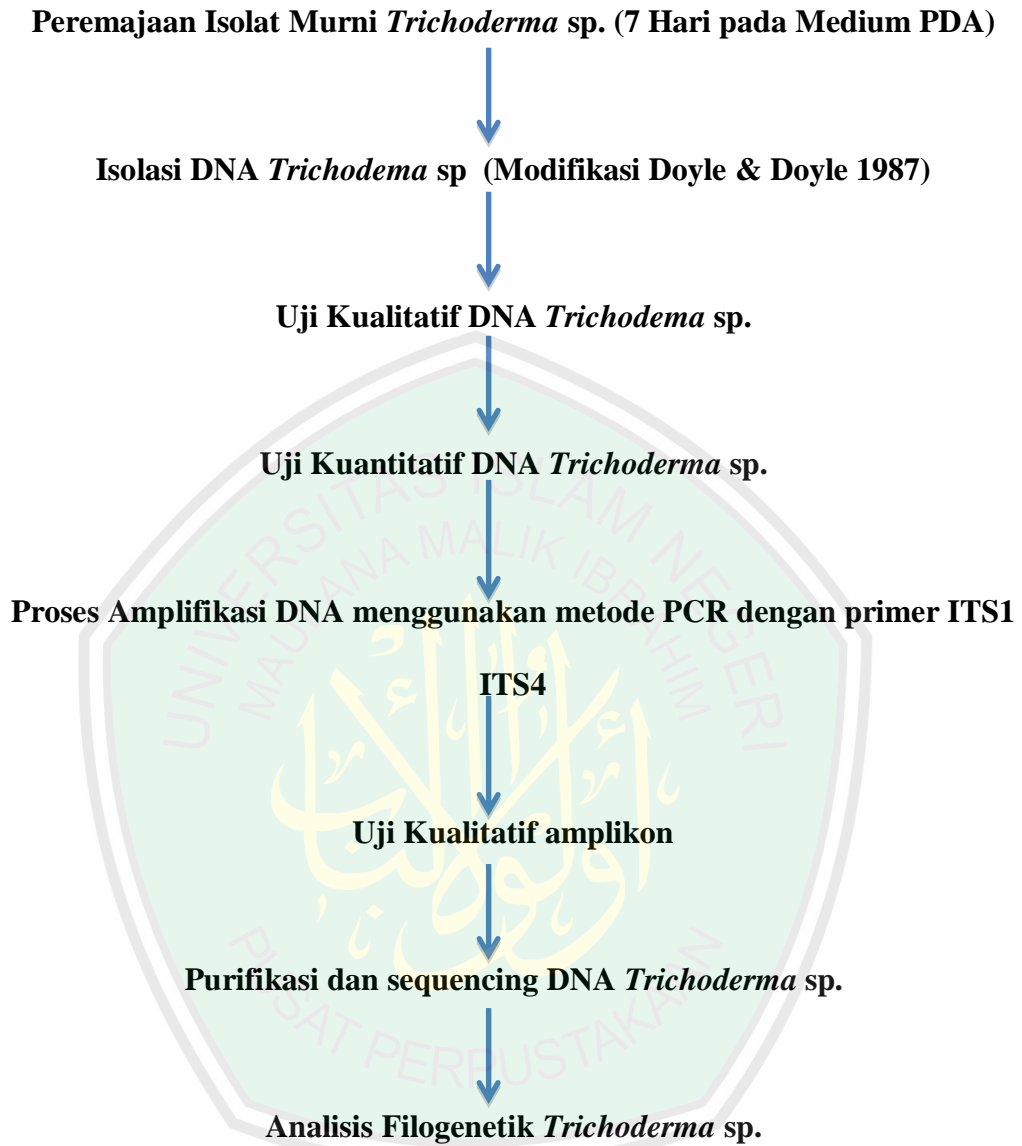
- Jorgensen, R.A., Cuellar, R.E., Thomson, W.F., Kavanagh, T.A. 1987. Structure and Variation in Ribosomal RNA Gene of Pea. *Plant Molecular Biology*. Vol. 8: 3.
- Kelly, L.J; Hollingsworth, P.M.; Coppins, B.J.; Ellis, C.J.; Harrold, P., Tosh, J., & Yahr, R. 2011. DNA Barcoding of Lichenized Fungi Demonstrates High Identification Success in a Floristic Context. *New phytologist* (191):288-300.
- Kirsop, B. and Henry, J. 1984. Development of a miniaturized cryopreservation method for the maintenance of a wide range of yeasts. *Cryo-Letters* 5, 191–200.
- Kress WJ, Liu AZ, Newman M, Li QJ. 2005. The Molecular Phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): A Complex and Polyphyletic Genus of Gingers. *American Journal of Botany*. Vol. 92: 167-178.
- Kurtzman, C.P., T. Boekhout, V. Robert, J.W.Fell, T. Deak. 2003. Methods to identify yeasts. Dalam: Ediningsari, Anisa R. 2008. Identifikasi khamir dari perairan mangrove dan laut cagar alam pulau rambut berdasarkan Daerah Internal Transcribed Spacer (ITS). *Skripsi*. Depok: Fakultas MIPA Universitas Indonesia.
- Lewitter F1 1987 Online use of the GenBank Genetic Sequence Data Bank. Development in Industrial Microbiology. *Journal of Industrial Microbiology Suppl.* Vol. 27. No.1
- Li, N., Chen, X., Zhu, D.Y. 2007. Effect of the Fungi on the Rooting of *Huperzia Serrata* and mechanism. *Jiangsu agritechology science*. Vol. 5 :181-184.
- Li, W.H and D. Graur. 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sunderland: Sinauer associates, Inc. Publisers.
- Maharani, A.A.. 2003. Pengaruh Penambahan NPK dalam Biodegradasi Lumpur Minyak Bumi Terhadap Jumlah Jamur dan Kadar Hidrokarbon Poliaromatik. *Artikel*, Bandung.
- McCulloug MJ, KV Clemons, JH McCusker, DA Stevens. 1998. Intergenic Transcribed Spacer PCR Ribotyping for Differentiation of *Saccharomyces* Species and Interspecific Hybrids. *J. Clin Microbiol* . Vol. 36.
- Muladno. 2002. *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika*. Bogor: Pustaka Wirausaha Muda.

- Nicholas FW. 1993. *Veterinary Genetics*. New York: Oxford University Press.
- Nuswantara S. 2000. Internet untuk biologi molekuler. *Warta Biotek*. Vol.14 No 2 Juni 2000.
- N. Saitou and M. Nei. 1987. The Neighbor-Joining Method: A New Method For Recon- Structing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.*, Vol. 4:406–425.
- Osterbauer NK, Rehms L. 2002. Detecting Single Seeds of Small Broomrape (Orobanche Minor) With A Polymerase Chain Reaction. *Plant Health Progress*. [terhubung berkala]. <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/broomrape.html>
- Ouzounis, Christos. (2002). Editorial: Bioinformatics and Theoretical Foundations of Molecular Biology. *Oxford Journal of Bioinformatics* vol.18 no.3, 377-378.
- Pelczar, Michael J. dan E.C.S. Chan. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI-Press.
- Pitt, J.I. dan A.D. Hocking. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. New York: Springer Science and Business Media.
- Polans, N.O. Saar, D. E. 2015. *ITS Sequence Variation in wild Species and Cultivars of Pea*. Dekalb, IL: Northern Illinois Univ.
- Pramarta, I. G. R. 2014. Identifikasi Spesies Potyvirus Penyebab Penyakit Mosaik Pada Tanaman Cabai Rawit (*Capsicum Frutescens* L.) Melalui Sikuen Nukleotida Gen Coat Protein. *Tesis*. Denpasar: Universitas Udayana.
- Purnamasari, M. I., Prihatna, C., Gunawan, A. W., Suwanto, A. 2012. Isolasi dan Identifikasi Molekuler *Ganoderma* spp. yang Berasosiasi dengan Penyakit Busuk Pangkal Batang di Kelapa Sawit. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. Vol. 8. No. 1.
- Purwadaria, T. Marbun, P. Sinurat, A dan Ketaren, P. 2003. Perbandingan Aktivitas Enzim Selulase Dari Bakteri Dan Kapang Hasil Isolasi Dari Rayap. *Jitv*. Vol. 8. No. 4.
- Rahman, 2014. *Analisa Kekerabatan 14 Spesies Primata Dengan Program Mega 4*. Bengkulu: UNIB
- Rakhmawati, Anna. 2009. *Isolasi dan Identifikasi Kapang Kontaminan pada Kacang Tanah yang Dijual Di Pasar Beringharjo Edisi Khusus: 3C..* Yogyakarta: Berk. Penel. Hayati.

- Rashidi, H.H. & L.K. Buehler. 2000. *Bioinformatics Basics*. Applications in Biological Science and Medicine. CRC Press. London. pp 173.
- Salma, S., dan Gunarto, L. 2007. Enzim Selulase dari *Trichoderma* spp. *Jurnal Agrobio*. Vol. 1 (2): 2.
- Santoso PJ. 2005. Modified CTAB-based DNA isolation procedure for fruit crops. *Jurnal Stigma*. Vol. 16: 1-4.
- Sambrook, J., Russell, D. 2001. *Molecular Cloning : a Laboratory Manual*, 3rd Ed. New York: Coln Spring Harbor Laboratory.
- Sauer, P., M. Muller, dan J. Kang. 1998. Quantitation DNA. *Qiagen News*. Vol. 2 : 23-26.
- Serussiaux, E., B, Goffinet, J. Miadlikowska., & O, Vitikainen. 2009. Taxonomy, Phylogeny, & Biogeography of The Lichen Genus *Peltigera* in Papua New Guinea. *Fungal Diversity*. (38): 185-244.
- Setiyawatwan, H. 2007. Peningkatan Kualitas Nutrisi Duckweed Melalui Fermentasi Menggunakan *Trichoderma harzianum*. *Jurnal Ilmu Ternak*. Vol. 7. No. 2.
- Sette, L.D., Passaridi, M.R.Z., Delarmelina, C., Salati, F., Duarti, M.C.T. 2006. Molecular characterization and antimicrobial activity endophytic fungi from coffe plants. *World journal micobiol biotechnol*. Vol. 22:1185-1195.
- Simpson. M.G. 2006. *Plant Systematic*. California: Elsevier Academic Press.
- Soesanto, L. 2008. *Pengantar Pengendalian Hayati Penyakit Tanaman*. Jakarta: Rajawali Pers.
- Soltis DE, Soltis PS. 1998. Choosing an Approach and an Appropriate Gene for Phylogenetic Analysis. Di dalam: Soltis DE, Soltis Ps, Doyle JJ, editor. *Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing*. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers.
- Stuessy TF. 1990. *The Systematic Evaluation of Comparative Data*. New York: Columbia University Press
- Suharjono, Agung P.W., Marhendra, Triwiratno A., Wuryantini. S., R. Lina O. 2010. Sistematis Filogenetik Isolat-isolat Kapang Indigenous Indonesia sebagai Entomopatogen Kutu Sisik (*Lepidosaphes beckii* Newman) Hama Tanaman Jeruk. *Biota*. Vol. 15. No. 2.
- Surakhman, Watik. 2013. Isolasi dan Uji Potensi Kapang *Indigenous* Selulolitik pada Ampas Tebu (*Bagasse*). *Skripsi*. Malang: UIN MALIKI Malang.

- Swofford DL, Olsen GJ, Waddel PJ, Hills DM. 1996. *Phylogenetics Inference*. Rhode Island: Brown University.
- Talanca, A.H. 2002. Potensi Jamur *Trichoderma* Spp. Merombak Limbah Pertanian Menjadi Bahan Organik. *Prosiding Seminar Ilmiah Dan Pertemuan*. Isbn : 979-95026-5-9 76
- Tenriulo, A., Suryati, E., Parenrengi, A., dan Rosmiat. 2001. Ekstraksi Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* dengan Metode Fenol Kloroform. *Marina Chimica Acta*. Vol. 2. (2): 6-10.
- Ubaidillah R, Sutrisno H. 2009. *Pengantar Biosistemik: Teori dan Praktik*. Jakarta: LIPI Press.
- Utama, A. 2003. *Peran Bioinformatika dalam Dunia Kedokteran*. Jakarta: Ilmu Komputer..
- Van Heusden WA, van Ooijen JW, Vrieling- van Ginkel R, Verbeek WHJ, Wietsma WA, and Kik C. 2000. *A genetic map of an interspecific cross in Allium based on amplified fragment length polymorphism (AFLPTM) markers*.
- Waluyo, Lud. 2008. *Teknik Metode Dasar Mikrobiologi*. Malang: UMM press.
- Witarto, AB. 2003. *Bioinformatika Mengawinkan Teknologi Informasi dengan Bioteknologi*. Jakarta: Ilmu Komputer.
- Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. Dalam: Kurtzman, C.P. & J.W. Fell. (eds.). 1998. *The yeasts: A taxonomic study*. 4rd ed. Elsevier, Amsterdam: 69--100.
- Yi-Ping PC. 2005. *Bioinformatics Technologies Introduction to Bioinformatics*. Verlag-Berlin-Heidelberg: Spinger Science & Business Media.

## LAMPIRAN 1 DIAGRAM ALIR KEGIATAN SECARA UMUM



## LAMPIRAN 2 TAHAP ISOLASI DNA (MODIFIKASI DOYLE & DOYLE, 1987)

Kapang dalam medium agar

- diambil menggunakan ose
- digerus dalam mortal steril dingin dan ditambahkan 500  $\mu$ l bufer CTAB dan divortex
- ditutup dengan {parafilm dan diinkubasi dalam waterbath 65<sup>0</sup>C, 45 menit (setiap 10 menit divortex)}
- disentrifugasi 13000 rpm selama 10 menit pada suhu 25<sup>0</sup>C

Supernatan

- dipindahkan ke dalam tabung 1,5 mL steril
- ditambahkan 1 mL *chloroform* dan dicampur
- disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm, 5 menit, 25<sup>0</sup>C

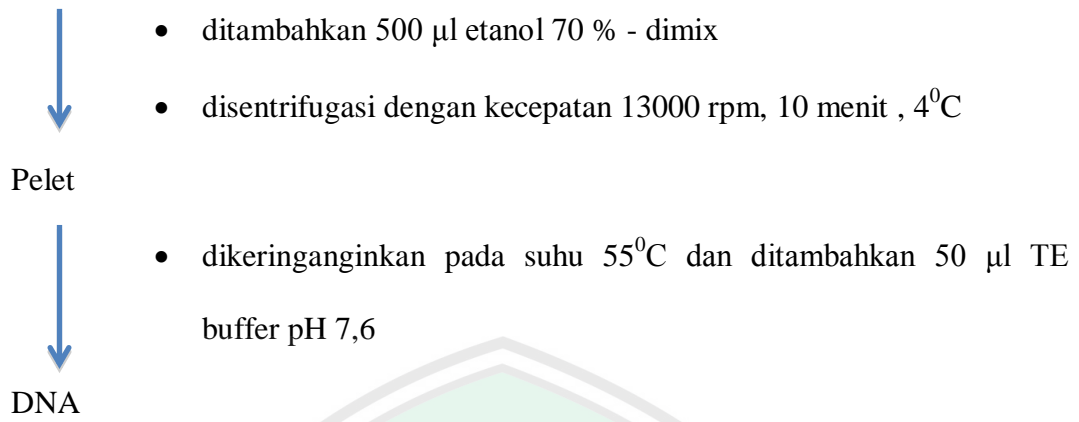
Supernatan

- dipindahkan ke dalam tabung 1,5 mL steril
- ditambahkan 1 mL *chloroform* dan dicampur
- disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm, 5 menit, 25<sup>0</sup>C

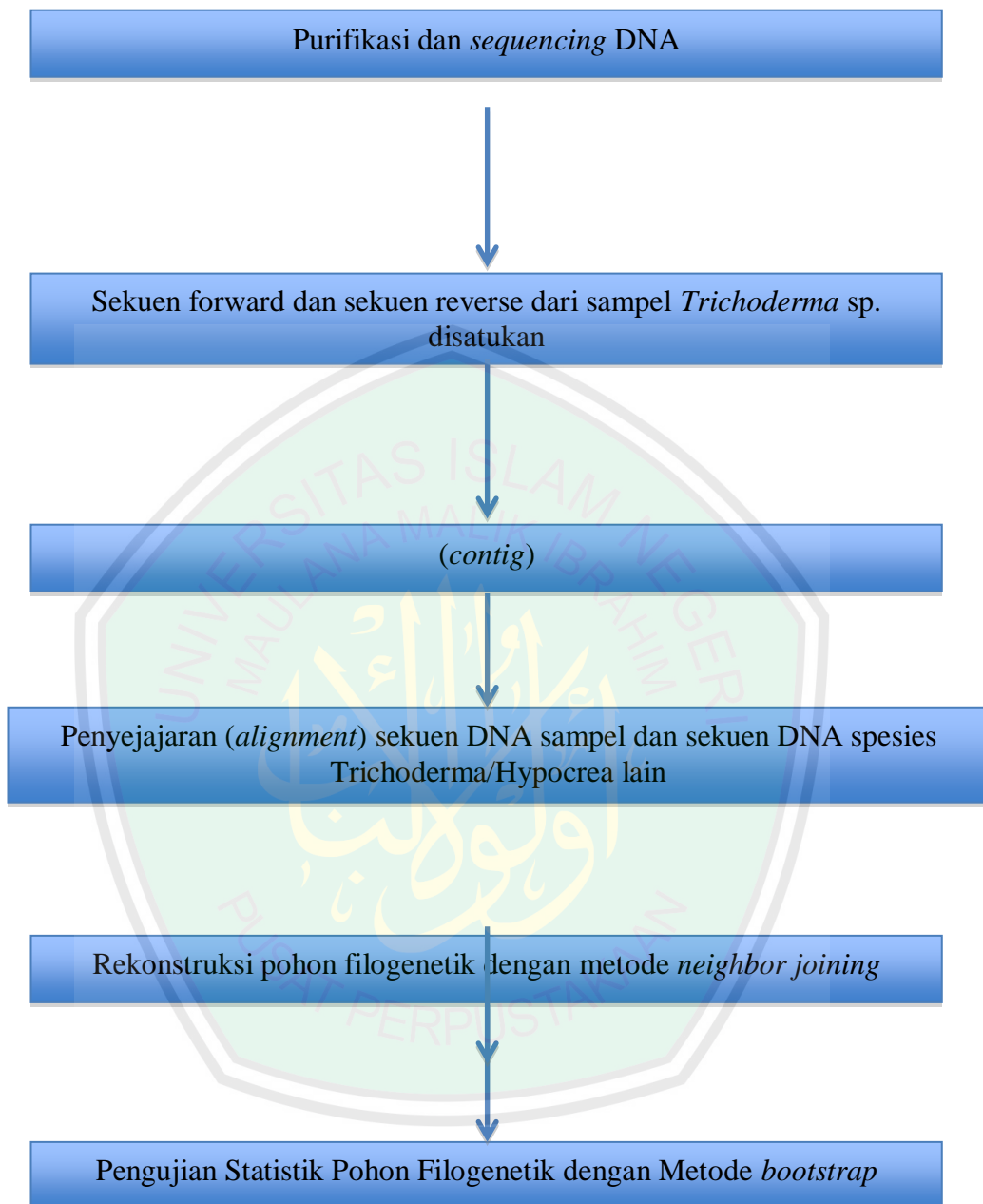
Supernatan

- dipindahkan ke dalam tabung 1,5 mL steril
- ditambahkan 100  $\mu$ l Ammonium asetat – dicampur
- ditambahkan 250  $\mu$ l etanol absolute – dicampur
- diinkubasi semalaman -20<sup>0</sup>C
- disentrifugasi 13000 rpm, 10 menit, 4<sup>0</sup>C

pellet



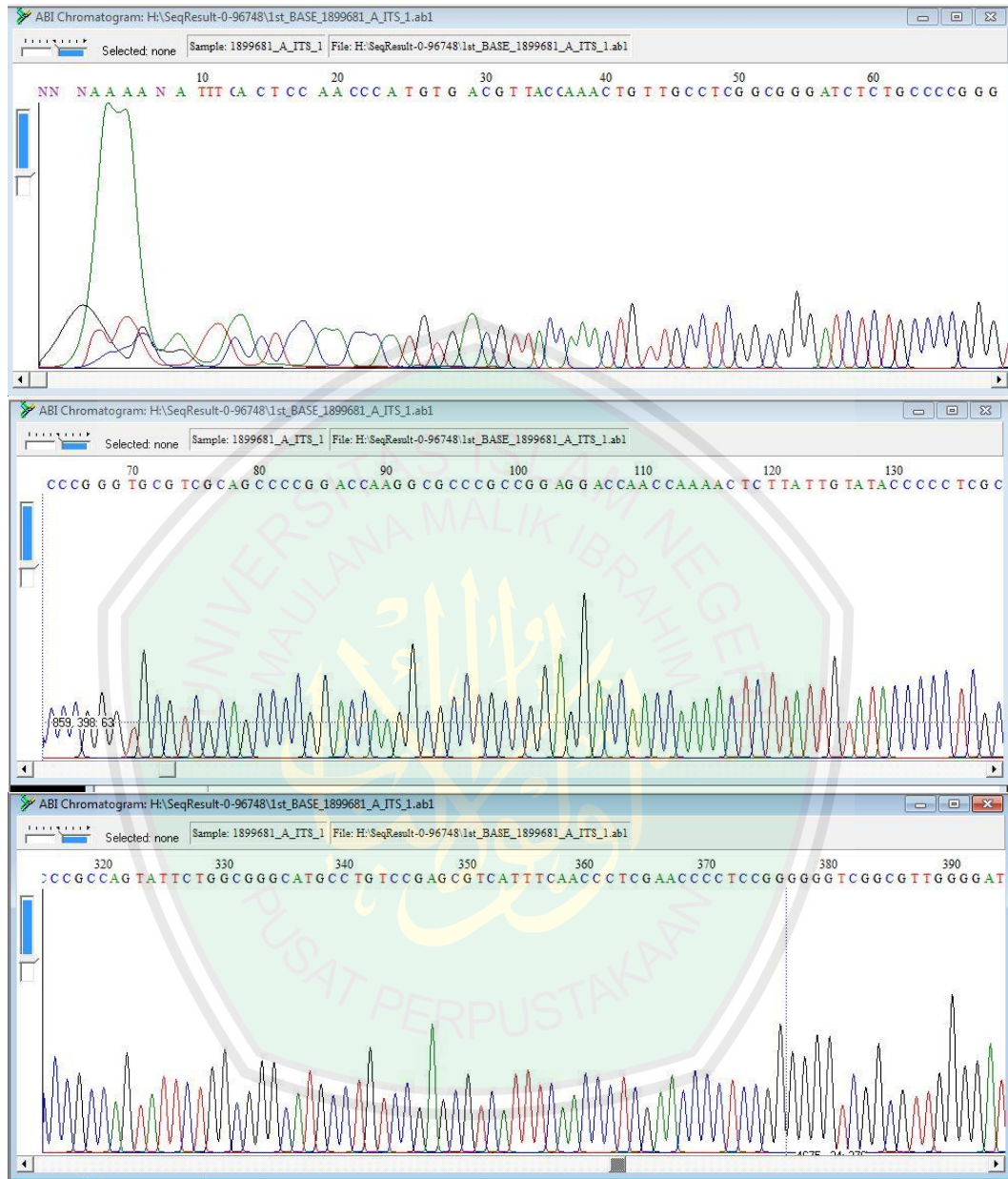
### LAMPIRAN 3 TAHAP PURIFIKASI, SEQUENCING DNA, DAN ANALISIS FILOGENETIK

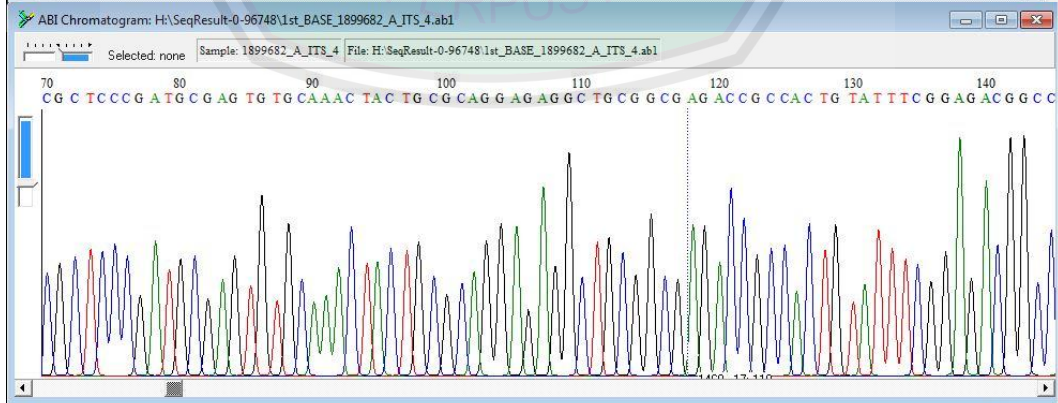
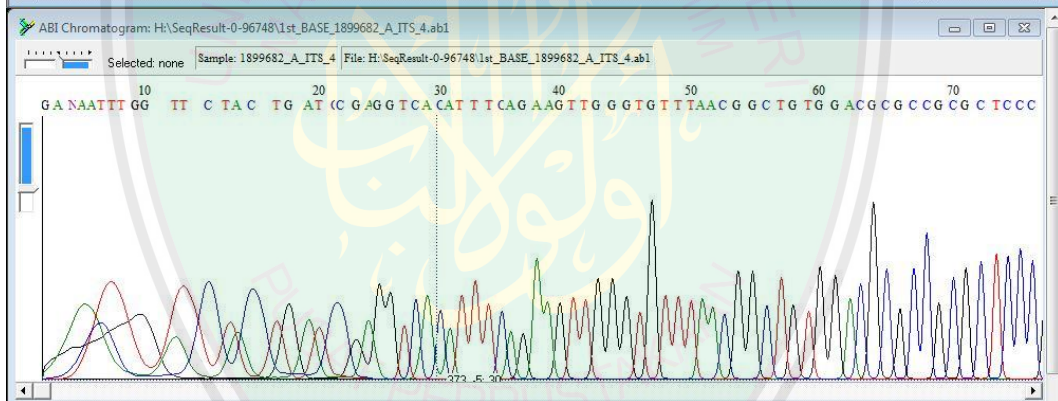
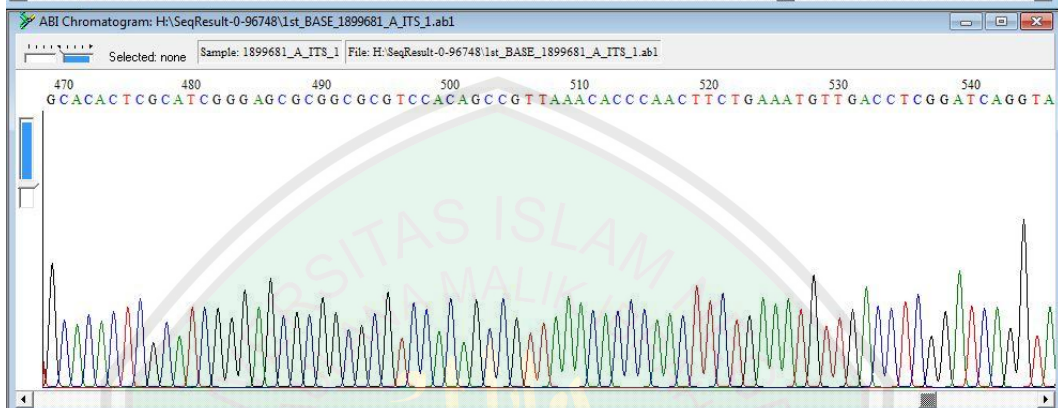
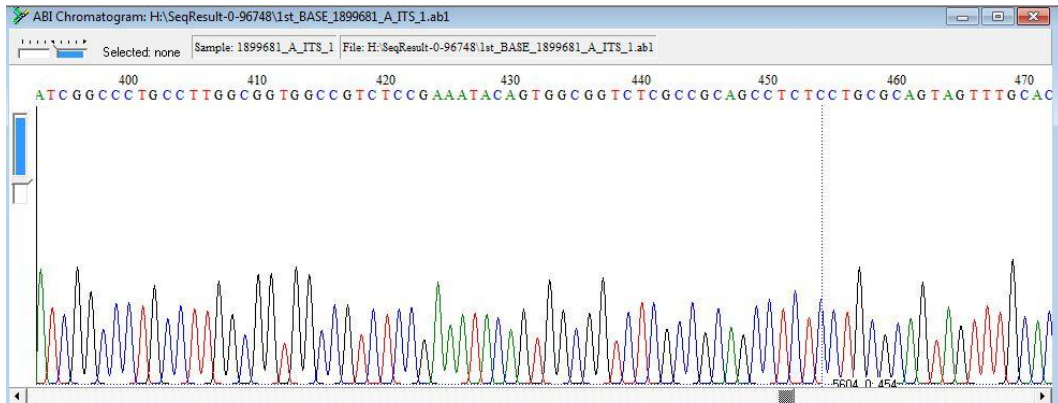


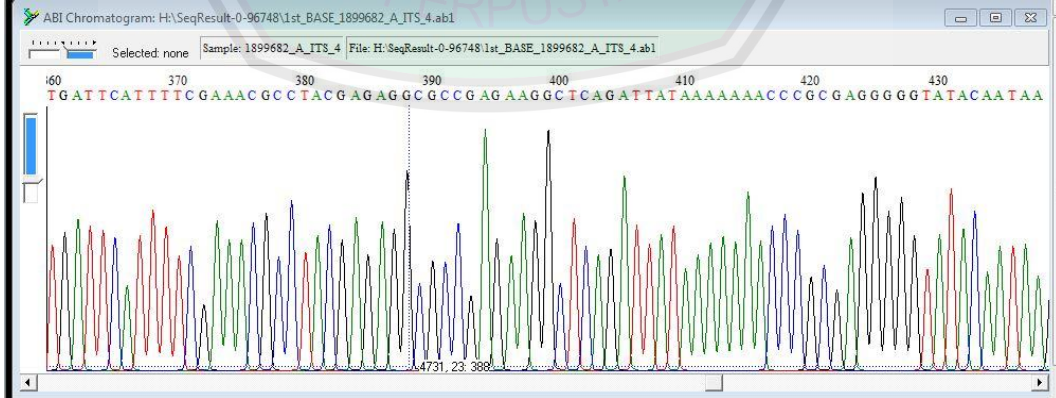
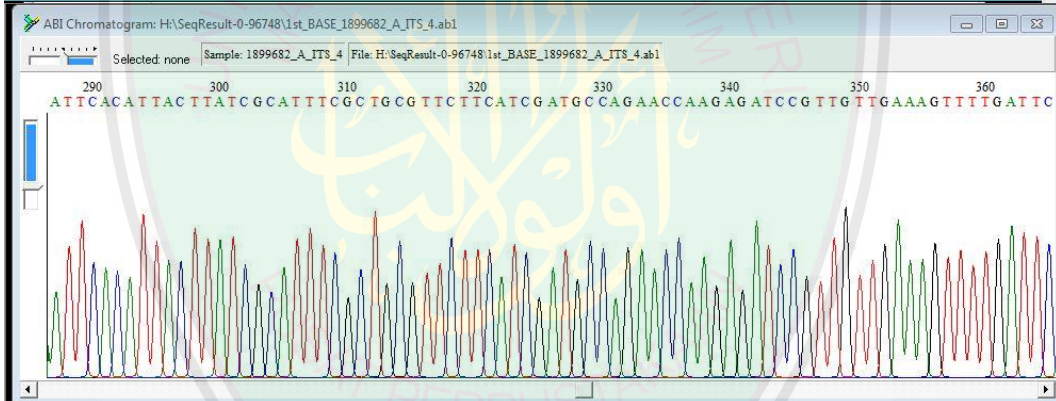
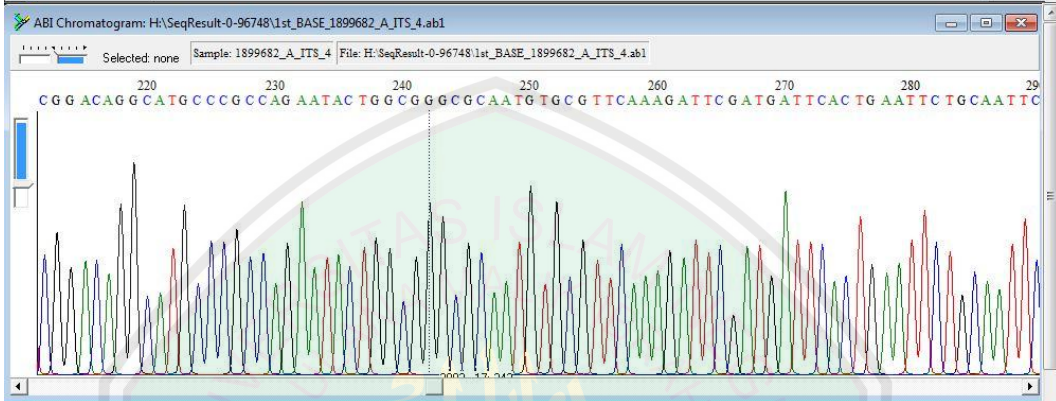
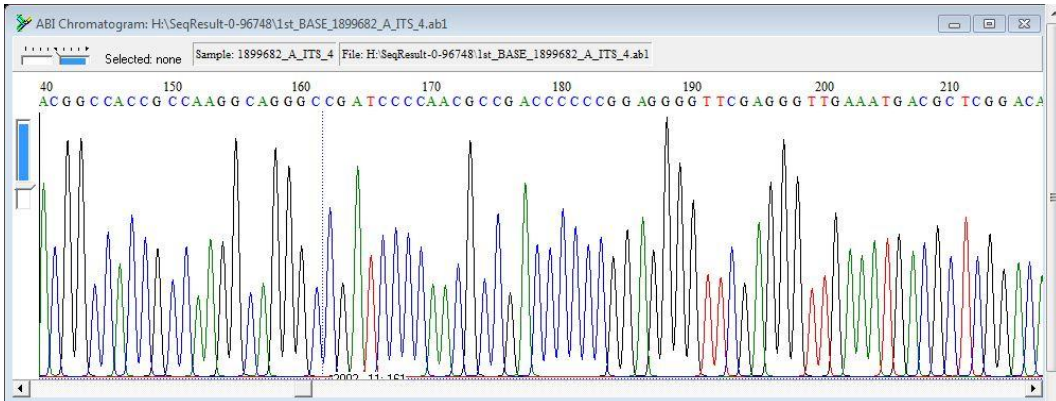
**LAMPIRAN 4 SEKUEN DNA ITS TRICHODERMA/HYPOCREA DARI  
GENBANK**

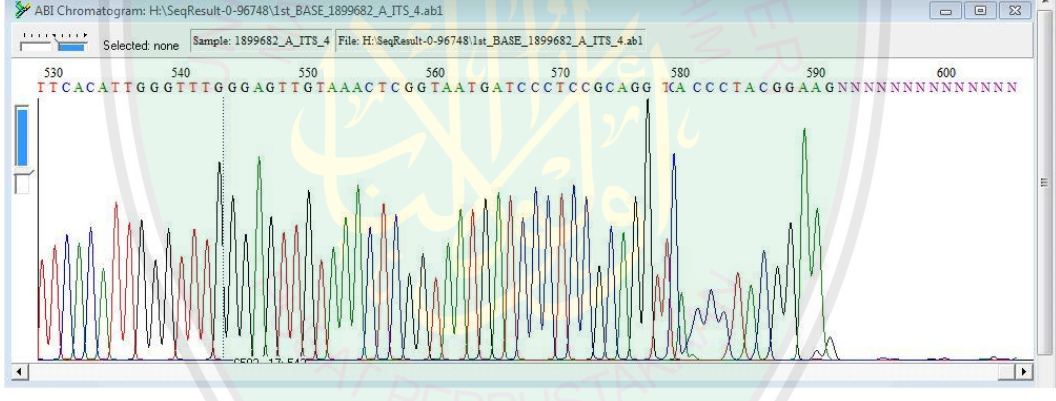
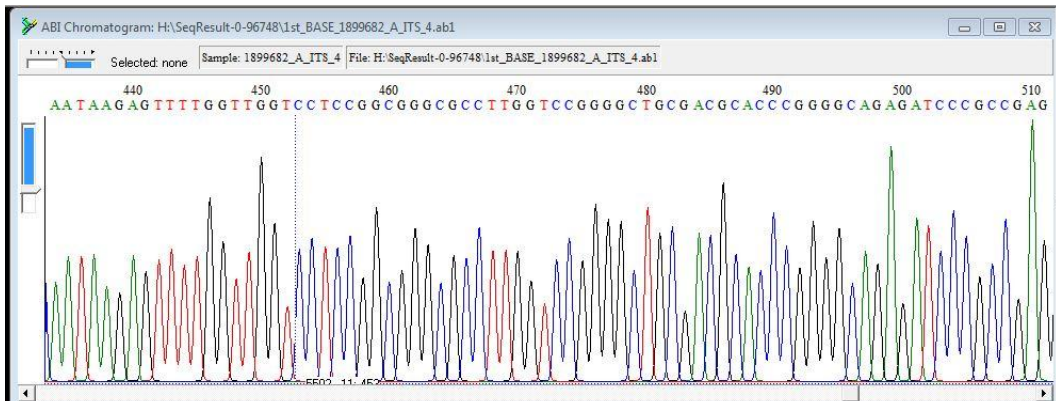
No.	Jenis	Nomor Akses
1	<i>Trichoderma harzianum</i> , isolate 2931	AJ224017.1
2	<i>Trichoderma viride</i> , isolate 25	AJ223773.1
3	<i>Trichoderma aureoviride</i> strain T112	HQ596956.1
4	<i>Trichoderma piluliferum</i> strain wxm46	HM037966.1
5	<i>Trichoderma</i> sp. SQR339	GQ497170.1
6	<i>Hypocrea nigricans</i> strain NBRC 31290	JN943373.1
7	<i>Trichoderma</i> sp. BAB-4585	KR154938.1
8	<i>Trichoderma</i> sp. NFML_CH12_BB.15	KM458790.1
9	<i>Sphaerostilbella aureonitens</i> strain GJS 74-87	FJ442633.1
10	<i>Gliocladium penicillioides</i>	AF048733.1
11	<i>Hypocrea gelatinosa</i> strain NBRC 104900	JN943358.1
12	<i>Trichoderma gelatinosum</i> strain GJS 88-17	AY737775.1
13	<i>Hypocrea lixii</i> strain DPNST-4	JN713922.1

## LAMPIRAN 5 ELEKTROFOREGRAM HASIL SEKUENSING DENGAN SEQUENCE SCANNER

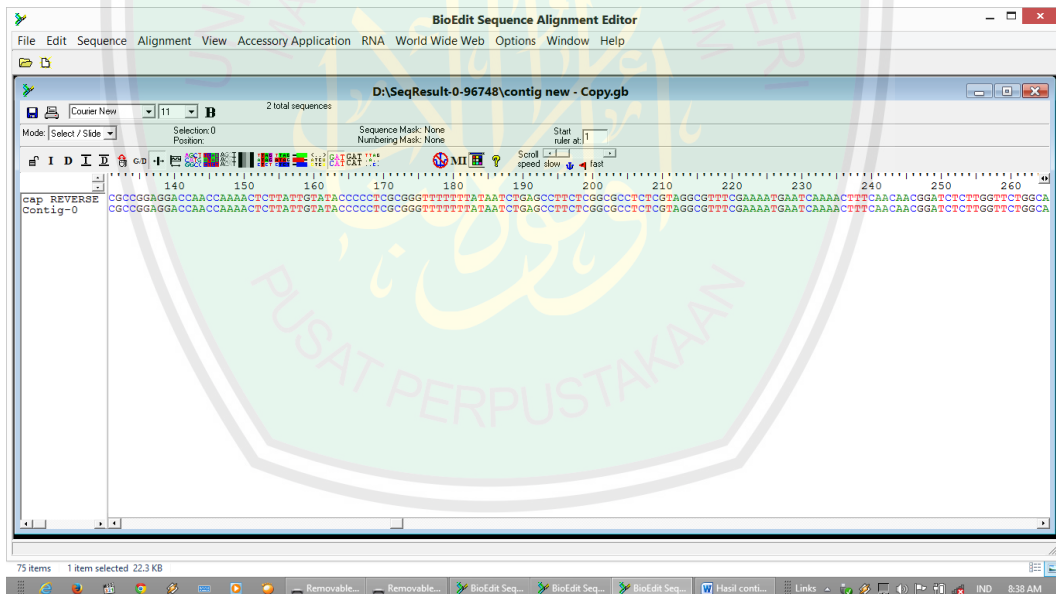
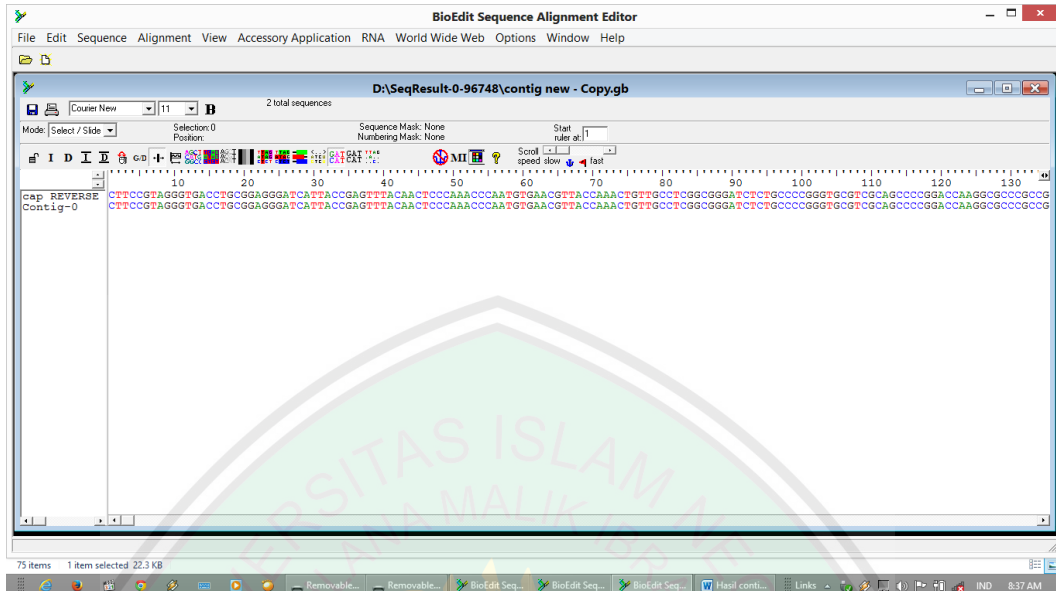


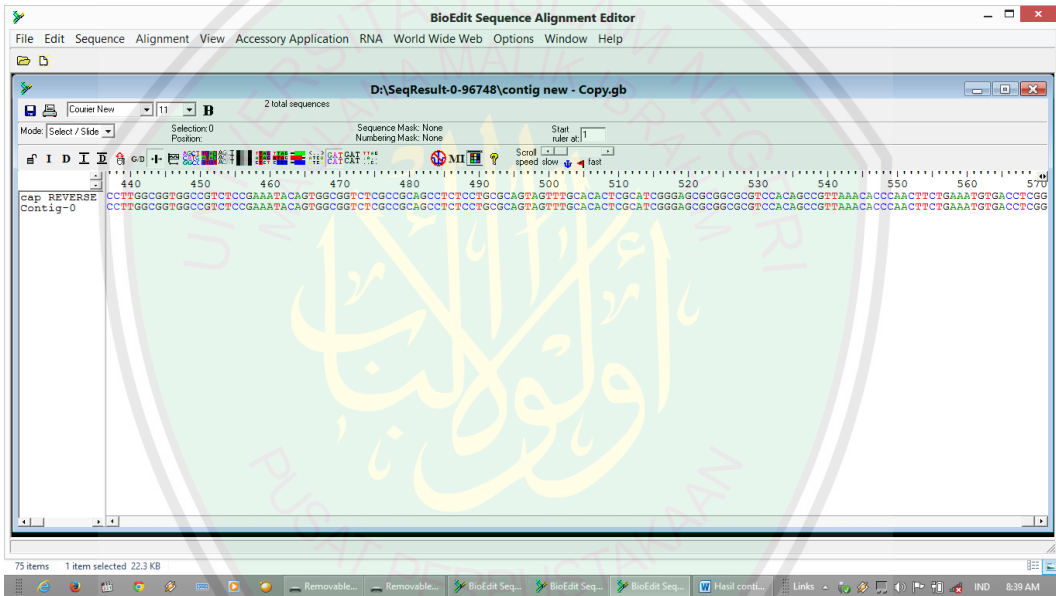
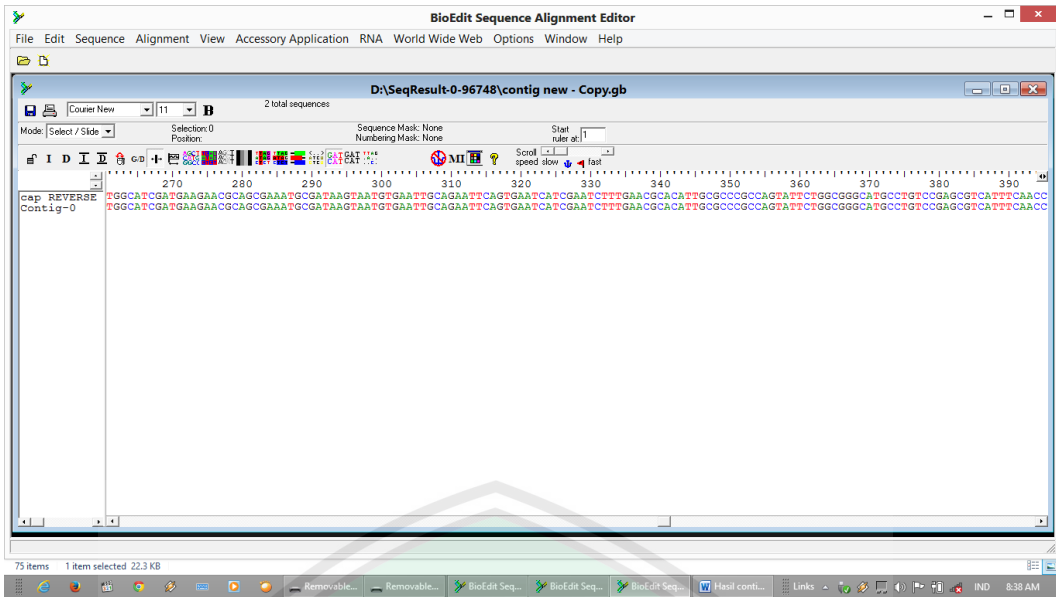




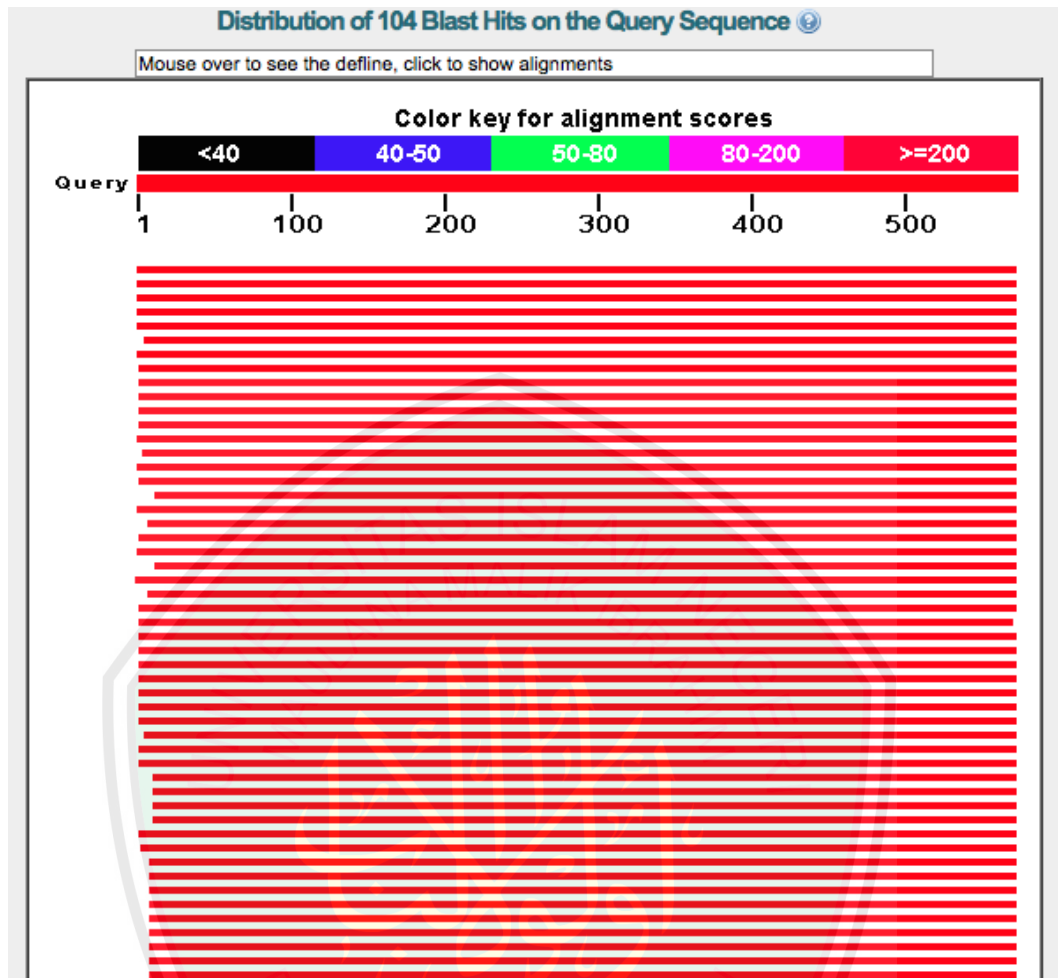


**LAMPIRAN 6 HASIL PROSES PENYATUAN SEKUEN ITS SAMPEL *Trichoderma* sp. DENGAN BIOEDIT, (MERAH) BASA T, (HITAM) BASA G, (HIJAU) BASA A, (BIRU) BASA C.**





## LAMPIRAN 7 HASIL BLAST SEKUEN *Trichoderma* sp. DENGAN NCBI



NCBI Blast:Nucleotide Sequence (571 letters)

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

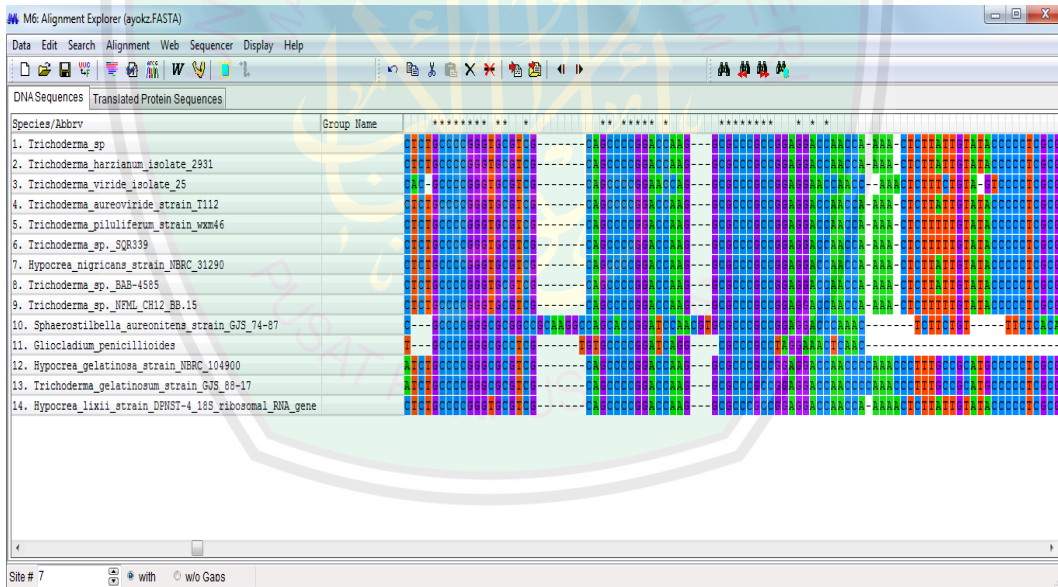
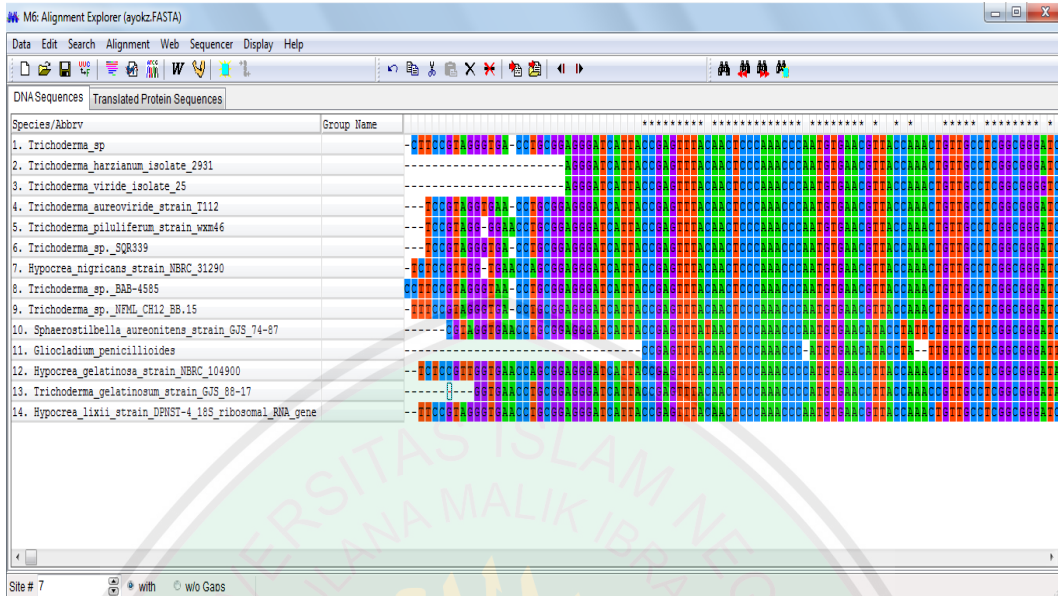
Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trichoderma harzianum strain 1228 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1048	1048	99%	0.0	99%	<a href="#">KF435043.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Hypocrea lixii strain VB1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1048	1048	99%	0.0	99%	<a href="#">HQ011501.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Hypocrea lixii strain wxm145 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1042	1042	99%	0.0	99%	<a href="#">HM047765.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Hypocrea lixii strain DPNST-4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1038	1038	99%	0.0	99%	<a href="#">JN713922.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Hypocrea lixii strain BHU51 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1038	1038	99%	0.0	99%	<a href="#">JN618343.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Hypocrea lixii strain BHU221 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1038	1038	99%	0.0	99%	<a href="#">JN604833.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trichoderma harzianum strain PRT-THL06 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1037	1256	99%	0.0	99%	<a href="#">KC582837.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trichoderma harzianum voucher TriH_JSB971 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1037	1037	99%	0.0	99%	<a href="#">KC589354.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Fungal sp. Griff. DX-FIL3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1035	1035	99%	0.0	99%	<a href="#">KC857270.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trichoderma harzianum strain ITEM 908 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1035	1035	99%	0.0	99%	<a href="#">KC819133.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trichoderma aureoviride strain T59 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1035	1035	99%	0.0	99%	<a href="#">HQ596942.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trichoderma harzianum isolate T65-NI 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1035	1035	99%	0.0	99%	<a href="#">U78881.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trichoderma sp. NFML_CH12_BB.15 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1033	1033	99%	0.0	99%	<a href="#">KM458790.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trichoderma harzianum strain TR068 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1033	1033	99%	0.0	99%	<a href="#">KC993075.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trichoderma harzianum strain CEN262 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2</a>	1033	1176	99%	0.0	99%	<a href="#">KC576684.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Hypocrea lixii isolate S17TH 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1033	1346	99%	0.0	99%	<a href="#">GJ048855.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trichoderma harzianum isolate H-03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2</a>	1031	1031	97%	0.0	100%	<a href="#">KF144641.1</a>

**LAMPIRAN 8 HASIL PENYEJAJARAN SEKUEN ITS SAMPEL**  
***Trichoderma* sp. DAN SPESIES TRICHODERMA LAIN.**  
**(Merah) Basa T, (Ungu) Basa G, (Hijau) Basa A, (Biru) Basa C.**







## LAMPIRAN 9 PERHITUNGAN SIMILARITAS DAN JARAK GENETIK ANTAR SPESIES DENGAN MEGA 6.0

Trichoderma_sp															
Trichoderma_harzianum_isolate_2931	-0.000														
Trichoderma_viride_isolate_25	0.096	0.096													
Trichoderma_aureoviride_strain_T112	0.002	0.002	0.099												
Trichoderma_piluliferum_strain_wxm46	-0.000	-0.000	0.096	0.002											
Trichoderma_sp_SQR339	-0.000	-0.000	0.096	0.002	-0.000										
Hypocrea_nigricans_strain_NBRC_31290	-0.000	-0.000	0.096	0.002	-0.000	-0.000									
Trichoderma_sp_BAB-4585	0.002	0.002	0.094	0.004	0.002	0.002	0.002								
Trichoderma_sp_NFML_CH12_BB.15	-0.000	-0.000	0.096	0.002	-0.000	-0.000	-0.000	0.002							
Sphaerostilbella_aureonitens_strain_GJS_74-87	0.134	0.134	0.111	0.137	0.134	0.134	0.134	0.137	0.134						
Gliocladium_penicillioides	0.203	0.203	0.212	0.206	0.203	0.203	0.203	0.206	0.203	0.197					
Hypocrea_gelatinosa_strain_NBRC_104900	0.059	0.059	0.106	0.062	0.059	0.059	0.059	0.057	0.059	0.150	0.206				
Trichoderma_gelatinosum_strain_GJS_88-17	0.059	0.059	0.106	0.062	0.059	0.059	0.059	0.057	0.059	0.150	0.206	-0.000			
Hypocrea_ixii_strain_DPNST-4_16S_ribosomal_RNA_gene	0.002	0.002	0.099	0.004	0.002	0.002	0.002	0.004	0.002	0.137	0.206	0.062	0.062		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
Trichoderma_sp	100														
Trichoderma_harzianum_isolate_2931	100														
Trichoderma_viride_isolate_25	90.4	90.4													
Trichoderma_aureoviride_strain_T112	99.78	99.78	90.15												
Trichoderma_piluliferum_strain_wxm46	100	100	90.4	99.78											
Trichoderma_sp_SQR339	100	100	90.4	99.78	100										
Hypocrea_nigricans_strain_NBRC_31290	100	100	90.4	99.78	100	100									
Trichoderma_sp_BAB-4585	99.78	99.78	90.649	99.559	99.78	99.78	99.78								
Trichoderma_sp_NFML_CH12_BB.15	100	100	90.4	99.78	100	100	100	99.78							
Sphaerostilbella_aureonitens_strain_GJS_74-87	86.556	86.556	88.886	86.293	86.556	86.556	86.556	86.293	86.556						
Gliocladium_penicillioides	79.677	79.677	78.807	79.388	79.677	79.677	79.677	79.388	79.677	80.251					
Hypocrea_gelatinosa_strain_NBRC_104900	94.056	94.056	89.394	93.818	94.056	94.056	94.056	94.294	94.056	84.962	79.388				
Trichoderma_gelatinosum_strain_GJS_88-17	94.056	94.056	89.394	93.818	94.056	94.056	94.056	94.294	94.056	84.962	79.388	100			
Hypocrea_ixii_strain_DPNST-4_16S_ribosomal_RNA_gene	99.78	99.78	90.15	99.559	99.78	99.78	99.78	99.559	99.78	86.293	79.388	93.818	93.818		