

AMPLIFIKASI DNA DAN SEKUENSING DAERAH ITS-1 rDNA *TRICHODERMA* Sp. LBKURCC22

Evariati Rambe^{*)}, Fajar Restuhadi, Titania Tjandrawati Nugroho

Program Studi Pascasarjana Kimia, Universitas Riau.
Jalan Binawidya, Panam Pekanbaru 28293
email:bundaemji@yahoo.com

Abstrak

Salah satu mikroorganisme biokontrol yang dikenal luas adalah jamur *Trichoderma* sp. Mikroorganisme ini adalah jamur penghuni tanah yang dapat diisolasi dari perakaran tanaman lapangan. *Trichoderma* sp. yang berhasil diisolasi dari hutan gambut cagar biosfer Giam Siak Kecil Bukit Batu (GSKBB) disimpan pada Koleksi Kultur Laboratorium Biokimia Universitas Riau dengan kode galur LBKURCC22. Identifikasi secara morfologi terhadap LBKURCC22 menunjukkan ciri yang dimiliki *Trichoderma* sp. Identifikasi secara morfologi belum memberikan kepastian spesies ataupun hubungan kekerabatan dengan spesies *Trichoderma* lainnya. Identifikasi isolat fungi di tingkat spesies telah terbukti sulit, karena tingkat kesamaan morfologi yang sangat tinggi, oleh karena itu perlu digunakan metode-metode molekuler untuk penentuan spesies fungi secara tepat. Metode molekuler untuk identifikasi spesies adalah berdasarkan penentuan sekuens DNA dan analisis filogenetik. Isolasi dan amplifikasi DNA merupakan langkah pertama untuk dapat menentukan sekuens DNA diikuti dengan analisis filogenetik. Salah satu analisis molekuler yang berkembang adalah penentuan sekuens ribosomal DNA (rDNA) pada daerah *Internal Transcribe Spacer* (ITS) *Trichoderma* sp. Pada penelitian ini dilakukan isolasi DNA kromosomal, penentuan berat molekulnya, amplifikasi dan sekuensing daerah ITS-1 rDNA *Trichoderma* sp LBKURCC22. Molekul DNA kromosomal *Trichoderma* sp LBKURCC22 berhasil diisolasi dari kultur berumur maksimum 3 hari, dan memberikan pita elektroforesis sebesar 12,475 pb. Amplifikasi PCR untuk daerah ITS-1 rDNA yang paling baik adalah menggunakan pasangan primer ITS5 dan ITS2, sehingga diperoleh produk amplifikasi berukuran 384 pb. Produk PCR dimurnikan, dan disekuens untuk memberikan sekuens ITS-1 dari rDNA *Trichoderma* sp LBKURCC22 yang akan dapat digunakan untuk analisis filogenetik.

Kata kunci: *Internal Transcribed Spacer, ITS-1, Ribosomal DNA, Trichoderma*

PENDAHULUAN

Salah satu mikroorganisme biokontrol yang dikenal luas adalah jamur *Trichoderma* sp. Mikroorganisme ini adalah jamur penghuni tanah yang dapat diisolasi dari tanah di sekitar perakaran tanaman. Spesies *Tricho-derma* disamping sebagai organisme peng-urai, dapat berfungsi sebagai agen hayati dan stimulator pertumbuhan tanaman. Beberapa spesies *Trichoderma* telah

dilaporkan sebagai agensia hayati seperti *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viridae*, dan *Trichoderma koningii* yang berspektrum luas pada berbagai tanaman pertanian (Harman *et al*, 2004).

Dilaporkan oleh Nugroho (2003) bahwa spesies *Trichoderma* sp. dapat menghasilkan berbagai metabolit sekunder seperti kitinase yang berperan sebagai anti fungi patogen. Analisis genom mengungkapkan sifat miko-parasit yang dihasilkan oleh enzim kitinase

pada spesies *Trichoderma* sp. dapat menyebabkan degradasi dinding sel jamur patogen (Gruber *et al.* 2011). Kitinase dapat mengkatalisis reaksi degradasi kitin dengan memotong ikatan glikosida antara residu N-asetilglukosamin yang merupakan monomer penyusun kitin. Selulosa kitin adalah sumber organik kedua yang sangat melimpah di alam. Polimer ini banyak digunakan dalam industri komersial seperti bidang kesehatan, kosmetik, pertanian dan pengolahan air (Nagy *et al.*, 2007). Kitinase ini dapat ditemukan dalam berbagai organisme, serta dapat dihasilkan oleh bakteri dan jamur yang diperoleh dari berbagai sumber seperti tanah.

Daerah hutan gambut biosfir Giam Siak Kecil Bukit-Batu Riau yang selanjutnya disebut GSKBB merupakan cagar biosfer. Daerah ini memiliki karakteristik hamparan rawa gambut yang dialiri oleh dua sungai yaitu Bukit Batu dan Siak Kecil serta diapit oleh 2 Kabupaten, yaitu Kabupaten Bengkalis dan Kabupaten Siak serta bagian barat Dumai (Pemda Riau, 2010). GSKBB merupakan salah satu kawasan yang memiliki keanekaragaman flora dan fauna termasuk diantaranya jenis fungi yang melimpah dan belum semuanya teridentifikasi dengan jelas. Menurut Rifai (1969) lingkungan berbeda akan mempengaruhi aktifitas enzim yang dihasilkan.

Trichoderma sp. penghasil kitinase telah diisolasi dari hutan gambut GSKBB dan disimpan di Laboratorium Biokimia, FMIPA, Universitas Riau dengan kode galur LBKURCC22 (Suhayana, 2012). Identifikasi secara morfologi terhadap LBKURCC22 menunjukkan ciri yang dimiliki LBKURCC22 menyerupai *Trichoderma* sp. (Suhayana 2012). Identifikasi secara morfologi belum memberikan kepastian spesies ataupun hubungan kekerabatan dengan spesies *Trichoderma*. Identifikasi isolat *Trichoderma* di tingkat spesies telah terbukti sulit karena tingkat kesamaan morfologi yang sangat tinggi. Saat ini ditemukan bahwa 50% identifikasi yang hanya berdasarkan morfologi ternyata salah pada *Trichoderma* sehingga diperlukan cara-cara molekuler untuk penentuan spesies *Trichoderma* secara tepat (Kubicek *et al.*, 2003).

Salah satu analisis molekuler yang dikembangkan oleh Druzhinina *et al.*, (2005) adalah menggunakan sekuens DNA ribosomal (rDNA) pada daerah *Internal Transcribe*

Spacer (ITS) *Trichoderma* sp. Analisis molekuler tersebut telah menghasilkan program *TrichOKey* yang dapat digunakan untuk identifikasi secara tepat spesies *Trichoderma*.

Sekuensing ribosomal DNA *Trichoderma* sp. diharapkan dapat digunakan untuk analisis filogenetik. Analisis ini digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar spesies. Hasil analisis membantu dalam memberikan informasi kemungkinan kesamaan metabolit sekunder yang dihasilkan dengan spesies lainnya. Segmen kromosom perlu diamplifikasi dengan tehnik PCR (Sambrook dan Russel, 2001) agar dapat diperoleh sekuens yang baik

BAHAN DAN METODA

Bahan-bahan yang digunakan adalah kultur *Trichoderma* sp. LBKURCC22 koleksi kultur laboratorium Biokimia FMIPA, Universitas Riau yang diisolasi dari hutan gambut biosfir GSKBB. Litikase *SIGMA-Aldrich* nomor katalog L-2524, larutan *Ethidium Bromide* Bio-rad (No katalog 161-0433), *Kit Wizard genomic Purification* (Promega, No katalog A-1120), 1 Kb DNA Ladder (Promega, No. Kat. G-5711), dan GoTaq™ PCR Core System I (Promega, No. Kat. M7660), Primer-primer ITS2, ITS4 dan ITS5 (PT. Sentra Biosains Dinamika, Jakarta) serta bahan kimia atau bahan preparatif lainnya sesuai prosedur kerja.

Kultur *Trichoderma* sp. LBKURCC22 yang telah diisolasi dari hutan biosfir GSKBB Riau diremajakan pada media PDA. Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan kit enzim litikase dan bahan-bahan dari kit *Wizard genomic DNA Purification*. Hasil ekstraksi DNA kromosomal dielektroforesis menggunakan gel agarosa 0,8% dan hasilnya difoto dengan *Camera digital SONY super steadyshop DSC-W80 MPEGMOVIE-VX*. DNA yang diperoleh digunakan sebagai *template* untuk diamplifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR), pada daerah ITS-1 rDNA menggunakan pasangan primer ITS5 (primer *forward* atau maju) dan ITS2 (primer *reverse* atau mundur). Amplifikasi PCR dilakukan dengan menggunakan alat *Thermal cycler model Techne TC-312*. Reaksi PCR untuk *Trichoderma* sp. LBKURCC22 diawali dengan *hot start* pada

suhu 95°C selama 5 menit, proses denaturasi selama 1,5 menit pada suhu 94°C, 1 menit pada 45°C atau 44°C sebagai suhu *annealing*, dan 3 menit pada 72°C sebagai suhu pemanjangan, diikuti 35 siklus. Proses ini diakhiri dengan pemanjangan rantai DNA selama 5 menit. Amplifikasi dilakukan dengan volume total 50 µL, terdiri dari sampel DNA 3 µL, aquadest steril 16,5 µL, dNTP 5 µL, bufer PCR 5 µL, masing-masing primer 10 µL, dan *Taq* DNA polimerase 0,5 µL. Hasil fragmen PCR berupa daerah ITS-1 rDNA *Trichoderma* sp. LBKURCC22 yang telah diamplifikasi ini kemudian ditentukan urutan DNANYa dengan bantuan Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta, menggunakan mesin pensekuens Applied Biosystems model 3100/3130XL-17215-029. Hasil penentuan sekuens DNA yang dikirim oleh Lembaga Biologi Molekuler Eijkman berupa data urutan DNA beserta spektogramnya. Hasil sekuens ini kemudian dikoreksi ulang secara manual dengan membaca puncak-puncak yang ada pada spektogram. Setelah dilakukan pembacaan secara visual kemudian hasil sekuens DNA dicocokkan secara manual dalam arah yang berlawanan dari kedua rantai DNA menggunakan program BioEdit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA

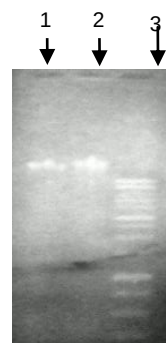
Miselium terbaik yang digunakan untuk isolasi DNA *Trichoderma* sp. LBKURCC22 berasal dari kultur berumur 3 hari. Isolasi dilakukan dengan menggunakan *kit Wizard Genomic ex Promega Corp.* Hasil isolasi selanjutnya dinyatakan berhasil ketika pita DNA terdeteksi pada gel elektroferesis dengan bantuan sinar UV. Pita DNA berukuran 12.475 pb jalur 1 dan 2 tampak pada gambar 1, menandakan DNA kromosomal *Trichoderma* sp. LBKURCC22 berhasil diisolasi.

Amplifikasi Polymerase Chain Reaction (PCR)

Daerah inti dari rDNA *Trichoderma* sp. LBKURCC22 yang mengandung ITS-1 di-amplifikasi dengan PCR menggunakan pasangan primer ITS5 dan ITS2, atau pasangan primer ITS5 dan ITS4. Primer ITS5 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') diguna-

kan sebagai primer *forward* (maju) dan primer ITS2 (5' GCTGCGTTCTTCTTCATC-GATGC 3') dan ITS4 (5'TCCTCCGCTTAT-TGATATGC 3') sebagai primer *reverse* (mundur). Pasangan primer ITS5 dan ITS2 digunakan untuk mengamplifikasi daerah ITS-1 dari rDNA, sedangkan pasangan primer ITS5 dan ITS4 digunakan untuk mengamplifikasi daerah ITS-1, 5,8S rDNA dan ITS-2.

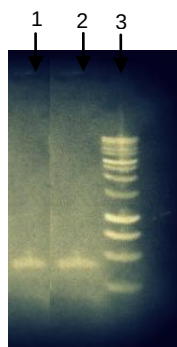
Untuk memastikan hasil PCR berhasil, dilakukan elektroferesis pada gel agarosa 1,2% dan diwarnai dengan EtBr agar berfluoresens bila disinari sinar UV (Gambar 2). Hasil amplifikasi PCR diperoleh dengan mengukur jarak migrasi standar (Tabel 2). Persamaan regresinya adalah $y = -0.024x + 4.098$ sehingga diperoleh berat molekul 384 pb untuk DNA *Trichoderma* sp. LBKURCC22 dengan kombinasi primer ITS5 dan ITS2.



Gambar 1. Hasil elektroferesis isolat DNA *Trichoderma* sp. LBKURCC22 (jalur 1 dan 2) dan standard DNA ladder (jalur 3)

Pengurutan DNA produk amplifikasi PCR

Hasil amplifikasi PCR dimurnikan dan disekuensing atau ditentukan urutan DNANYa dengan menggunakan jasa penentuan sekuens DNA dari Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta. Data-data urutan DNA *Trichoderma* sp. LBKURCC22 hasil perbaikan secara manual dapat dilihat pada Gambar 3. Pengurutan data DNA hasil spektogram secara manual sangat dibutuhkan karena mesin alat punya kelemahan dalam membaca puncak yang jaraknya sangat dekat. Hasil urutan DNA ribosomal pada daerah ITS (*Internal Transcribe Spacer*) ini merupakan salah satu cara yang efektif digunakan untuk identifikasi secara molekuler pada mikroba.



Gambar 2. Hasil elektroforesis produk amplifikasi ITS-1 rDNA *Trichoderma* sp. LBKURCC22 (jalur 1 dan 2) dan Standard DNA ladder (jalur 3)

Setiap makhluk hidup baik yang prokariot maupun eukariot memiliki DNA. *Deoxiribonucleic acid* (DNA) atau asam deoksiribosa nukleat merupakan tempat penyimpanan informasi genetik. Secara umum peran DNA dalam sel adalah sebagai materi genetik yang menyimpan cetakan informasi segala aktivitas sel. Alasan inilah yang memicu metode identifikasi setiap makhluk hidup secara molekuler, termasuk salah satunya adalah jamur *Trichoderma* sp LBKURCC22. Langkah awal untuk melakukan identifikasi secara molekuler adalah melakukan isolasi DNA dari jamur Tabel . Migrasi produk amplifikasi produk PCR DNA *Trichoderma* sp LBKURCC22 dan standar DNA pada gel elektroforesis 1,2%

Karakterisasi DNA merupakan bagian dalam tahap identifikasi karena masing-masing spesies jamur memiliki karakter berbeda satu sama lainnya. Untuk melakukan karakterisasi ini, isolat *Trichoderma* sp LBKURCC22 perlu dituntun dengan menggunakan primer. Hal ini sesuai dengan analisis molekuler yang dikembangkan oleh Druzhinina (2005) yaitu sekuensing ribosomal DNA pada daerah *Internal Transcribe Spacer* (ITS) pada *Trichoderma* sp. Amplifikasi PCR DNA dilakukan untuk menggandakan fragmen-fragmen gen yang terletak pada daerah ITS yang terdiri dari daerah ITS-1 dan ITS-2. Posisi target amplifikasi dengan primer yang digunakan disesuaikan dengan temuan White *et al*, (1990).

Kombinasi primer dan suhu annealing yang digunakan saat amplifikasi sangat menentukan produk PCR. Hal ini terbukti ketika amplifikasi DNA *Trichoderma* sp. LBKURCC22 diujicobakan menggunakan pasangan

primer-primer ITS4 dan ITS5, atau ITS2 dan ITS5. Sebagai langkah awal primer yang diuji cobakan adalah pasangan ITS4 dan ITS5 karena primer ini umumnya mengamplifikasi daerah ITS-1 dan ITS-2, pada suhu annealing 45°C. Namun hasil elektroforesis DNA menunjukkan bahwa tidak ada produk PCR yang terbentuk jika suhu annealing 45°C. Hal ini menunjukkan bahwa primer ini tidak berhasil menuntun proses amplifikasi PCR karena primer yang kurang dapat berhibridisasi dengan template pada proses annealing pada suhu 45°C tersebut. Kembali kepada target awal amplifikasi daerah ITS-1 maka langkah selanjutnya primer yang diuji cobakan adalah pasangan ITS2 dan ITS5 dengan suhu annealing yang diturunkan satu derajat menjadi 44°C. Analisis elektroforesis menunjukkan bahwa pada suhu annealing 44°C diperoleh produk PCR dengan ukuran yang sesuai. Produk yang dihasilkan adalah produk yang spesifik untuk penggunaan primer tersebut.

Amplifikasi dengan kombinasi primer ITS2 dan ITS5 memiliki produk yang spesifik dengan berat molekul 384 pb. Ukuran ini merupakan ukuran yang sesuai untuk ukuran pasangan primernya karena pada pasangan primer ITS2 dan ITS5 memiliki rentang ukuran molekul sekitar 315 pb (White *et al*, 1990). Meskipun yang berhasil diamplifikasi adalah daerah ITS-1 dan sebagian sekuens 5,8S rDNA, sekuens ini dianggap sudah memadai karena daerah ITS-1 rDNA *Trichoderma* adalah daerah yang dapat digunakan untuk membedakan spesies fungi (Siddiquee *et al*, 2007).

Daerah ITS-1 pada *Trichoderma* sp LBKURCC22 merupakan daerah ribosomal DNA yang berada antara 18S rDNA dengan 5,8S rDNA. Perubahan pada daerah ITS-1 rDNA inilah yang dimanfaatkan untuk membedakan antar spesies *Trichoderma* sp LBKURCC22 dengan *Trichoderma* sp lainnya. Metode identifikasi inilah yang dianggap lebih memberikan kepastian bila dibandingkan dengan metoda identifikasi secara morfologi pada spesies *Trichoderma* sp (Kubicek *et al*, 2003). Inilah salah satu alasan untuk menggunakan metode sekuensing ribosomal DNA (rDNA) pada daerah ITS (Druzhinina *et al*, 2005). Hasil analisis sekuensing yang diperoleh dari lembaga Eijkman untuk pasangan primer ITS2 dan ITS5 sudah cukup baik. Verifikasi untuk

daerah hulu (5') ke daerah hilir (3') juga masing-masing ITS5 dan ITS2 juga terbaca dengan baik. Verifikasi ini sangat penting untuk memastikan urutan basa daerah ITS-1 dari rDNA pada *Trichoderma* sp LBKUR-CC22 sudah benar, karena apabila 1 atau 2

basa saja berbeda pada daerah ini akan menyebabkan kesalahan dalam proses identifikasi. Data urutan DNA inilah yang nantinya akan digunakan untuk analisis filogenetik sekuens daerah ITS-1 dengan menggunakan program bioinformatika.

No	Jumlah pasangan basa	Log pasangan basa	Migrasi standar (mm)	Migrasi sampel (mm)
1.	3.000	3,4771	20	62*
2.	2.500	3,3979	30	
3.	2.000	3,3010	35	
4.	1.500	3,1761	40	
5.	1.000	3,0000	45	
6.	750	2,8751	50	
7.	500	2,6989	56	
8.	250	2,3979	66	

Catatan: *hasil migrasi DNA hasil amplifikasi PCR sampel *Trichoderma* sp LBKURCC22

Urutan DNA *Trichoderma* sp LBKURCC22 menggunakan primer ITS5 (5' → 3')

3'TCGTGTGAGTTTGATTCTTTTCGAACGCCTACGAGAGGCGCCGAGAAGGCTCAGATTATCGCGAGGGGGT
ATACAATAAGAGTTTTGGTTGGTTGGTCTCGGCGGGCGCCTTGGTCCGGGGCTGCGACGCACCCGGGGCAG
AGATCCCGCCGAGGCAACAGTTTGGTAACGTTACATTGGGTTTGGGAGTTGTAACTCGGTAATGATCCCTCC
GCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTACGACTTTTACTCCA 5'

Urutan DNA *Trichoderma* sp LBKURCC22 menggunakan primer ITS2 (5' → 3')

TTACCGAGTTACACTCCCAACCATGTGAACAGTTACCAAACTAGTTGCTAGCGGATCTTGCCCCGGGTGCGT
CGCATCCCCGACCTTGGCGCCGCGGATGACCAACCAAACTCTTATTGTATACCCCAACGCGGTTTTATTA
TAATCTGAGCCTTCTCGGCGCTCTCGTAGGCAGTTTCGAAAATGAATCAGAACTTCAACAACGGATCTCTTG
TTCTGGCATCGATGAATAAC

Gambar 3. Urutan DNA ITS-1 rDNA *Trichoderma* sp. LBKURCC22 hasil perbaikan secara manual

KESIMPULAN

Molekul DNA kromosomal *Trichoderma* sp LBKURCC22 berhasil diisolasi sebesar 12,475 pb. Waktu isolasi yang paling baik adalah saat miselia berumur maksimum 3 hari. Amplifikasi PCR untuk daerah ITS-1 rDNA *Trichoderma* sp. LBKURCC22 yang paling baik adalah menggunakan primer ITS5 dan ITS2 dengan temperatur annealing 44°C sehingga diperoleh produk amplifikasi sebesar 384 pb. Hasil sekuensing ITS-1 rDNA

Trichoderma sp LBKURCC22 terbaca dengan baik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Lembaga Penelitian Universitas Riau, sesuai Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Program Penelitian Guru Besar 105/UN.19.2/PL/2012, berdasarkan DIPA Universitas Riau tahun 2012, Nomor: 0680/023-04.2.16/04/2012 kepada Prof. Titania T Nugroho, PhD

DAFTAR PUSTAKA

- Cohen-Kupiec, R., Chet, I. 1998. The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion Biotechnology* **9**: 270-277.
- Danielson, R.M., Davey, C.B. 2002. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil Biology Chemistry* **5**:495-504).
- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., Komoń, M., Bissett, J., Szakacs, G., & Kubicek, C. P. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* sp and *Hypocrea* sp. *Fungal Genetics and Biology* **42(10)**, 813-828.
- Fatchiyah. 2006. *Gel Elektroforesis*. Malang: Brawijaya Press
- Fukamizo, T. 2000. Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application. *Current Protein Peptide Science* **1**: 105-124.
- Gijzen, M., Kuflu, K., Qutob, D., Chernys, J.T. 2001. A class I chitinase from soybean seed coat. *Jurnal Experimental Botang* **52**: 2283-2289.
- Glick, B.R., Pasternak, J.J., Patten, C.L. 2010. *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA* (ed.4). Washington, DC: ASM Press.
- Gooday, G. W. 1990. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. *Biodegradation*, **1(2)**, 177-190.
- Gruber, S., Kubicek, C. P., & Seidl-Seiboth, V. 2011. Differential regulation of orthologous chitinase genes in mycoparasitic *Trichoderma* species. *Applied and environmental microbiology* **77(20)**, 7217-7226
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 43–56
- Hermosa, M., Grondona, I., Iturriaga, E. A., Diaz-Minguez, J., Castro, C., Monte, E., & Garcia-Acha, I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology* **66(5)**, 1890-1898.
- Kubicek, C. P., Bissett, J., Druzhinin, I., Kullnig-Gradinger, C., Szakacs, G. 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma* a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genetic Biology* **38**, 310-319.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. 2005. *Lehninger principles of biochemistry*. Vol. 1: WH Freeman & Co.
- Muslim, C. 2003. *Biologi molekuler sel*. UNIB press, Bengkulu.
- Nagy, V., Seidl, V., Szakacs, G., Komoń-Zelazowska, M., Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. 2007. Application of DNA bar codes for screening of industrially important fungi: the haplotype of *Trichoderma harzianum* sensu stricto indicates superior chitinase formation. *Applied and Environmental Microbiology* **73(21)**, 7048-7058.
- Nugroho, T.T., Ali, M., Ginting, C., Wahyuningsih, Dahliaty, A., Devi, S., Sukmarisa, Y. 2003. Isolasi dan karakterisasi sebagian kinitase *Trichoderma viride* TNJ63. *Jurnal Natur Indonesia* **5(2)**, 101-106.

- Nugroho, T.T., Restuhadi, F., Saryono, Chainulfifah, Dahliaty, A, Ito, T.R., Faisal. (2008). Species reidentification of Riau *Trichoderma* biocontrolstrains utilizing molecular methods. *Proceeding Seminar UNRI-UKM ke-5*, Pekanbaru, 19-20 Agustus 2008.
- Ohno, T., Armand, S., Hata, T., Nikaidou, N., Henrissat, B., Mitsutomi, M., Watanabe, T. 1996. A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. *Jurnal of Bacteriology* **178**: 5065-5070.
- Pemda Riau. 2010. *Information Natural Resource Conservation In Riau Province*. Pekanbaru, Pemda Riau.
- Promega. 2002. Wizard Genomic DNA Purification Kit. *Technical manual*, Promega Corp, USA
- Reithner, B., Ibarra-Laclette, E., Mach, R. L., & Herrera-Estrella, A. 2011. Identification of Mycoparasitism-Related Genes in *Trichoderma atroviride*. *Applied and Environmental Microbiology* **77(13)**, 4361-4370
- Rossi-Rodrigues, B.C.I. 2009. Comparative growth of trichoderma strains in different nutritional sources, using bioscreen c automated system. *Brazilian Jurnal Microbiology* **40**:404-410.
- Sambrook, J., Russel, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ed.3. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Samuels, G. J., Dodd, S. L., Lu, B. S., Petrini, O., Schroers, H. J., & Druzhinina, I. S. 2006. The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology* **56(1)**, 67-133.
- Siddiquee, S., Abdullah, F., Guan, T. S., Aziz, E. R. 2007. Phylogenetic relationships of *Trichoderma harzianum* based on the sequence analysis of the Internal Transcribed Spacer Region-1 of the rDNA. *Journal of Applied Sciences Research* **3**, 896-903.
- Skjåk-Braek, G., Anthonsen, T., & Sandford, P. A. 1989. *Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties, and applications*: Kluwer Academic Pub.
- Suhyana, J. 2012. Isolasi *Trichoderma* sp. penghasil kitinase dari rizhosphere hutan gambut sekunder shelter sundak Giam Siak Kecil-Bukit Batu (GSKBB), Riau *skiripsi* S1. Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Riau.
- Toha, A.H.A. 2001. Deoxyribo nucleac acid: keanekaragaman, ekspresi, rekayasa dan efek pemanfaatannya. Alfabeta, Bandung.
- Westermeier. 2004. *Electrophoresis in Practice: A Guide to Theory and Practice*. New Jersey: John Wiley & Sons inc.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Dalam : PCR protocol : A guide to methods and applications*. H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White).
- Yuwono T. 2005. *Biologi Molekuler*. Jakarta: Erlangga.