

ISOLASI DNA DAN AMPLIFIKASI PCR DAERAH ITS rDNA FUNGI ENDOFIT UMBI TANAMAN DAHLIA (*Dahlia variabilis*) LBKURCC69

Fitri Rahayu¹, Saryono², Titania T. Nugroho²

¹Mahasiswa Program Studi S1 Kimia

²Bidang Biokimia Jurusan Kimia

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau

Kampus Binawidya Pekanbaru, 28293, Indonesia

fitheri.rahayu@gmail.com

ABSTRACT

Endophytic fungi lives within healthy plant tissues without causing damage to the host plant. Endophytic fungi LBKURCC69 was one of the endophytic fungi that was isolated from the tubers of dahlia plant (*Dahlia variabilis*). Morphological identification showed that endophytic fungi LBKURCC69 was *Phialophora fastigiata*. This identification can't provide an accurate result because many species of fungi with the same morphological features, that causing misidentification. More accurate species identification can be done by molecular identification using rDNA ITS region. Electrophoresis results indicated that chromosomal DNA of endophytic fungi LBKURCC69 was successfully isolated and has a molecular weight of 6124 bp. DNA amplification of endophytic fungi LBKURCC69 on rDNA ITS regions was successfully performed using ITS4 and ITS5 primers with 45°C annealing temperature and produces DNA fragments with a molecular weight of 537 bp.

Keywords : endophytic, dahlia, ITS, rDNA.

ABSTRAK

Fungi endofit hidup berkoloni di dalam jaringan tanaman yang sehat tanpa menimbulkan kerugian pada tanaman inangnya. Fungi endofit LBKURCC69 merupakan salah satu fungi endofit yang berhasil diisolasi dari umbi tanaman dahlia (*Dahlia variabilis*). Identifikasi morfologi menunjukkan bahwa fungi endofit LBKURCC69 adalah *Phialophora fastigiata*. Identifikasi ini belum bisa memberikan kepastian spesies yang akurat karena banyaknya fungi dengan ciri morfologi yang sama, sehingga sering terjadi kesalahan identifikasi. Identifikasi spesies yang lebih akurat dapat dilakukan dengan identifikasi molekular menggunakan daerah ITS rDNA. DNA kromosomal fungi endofit LBKURCC69 berhasil diisolasi dengan berat molekul 6124 pb. Amplifikasi PCR DNA fungi endofit LBKURCC69 pada daerah ITS-1 dan ITS-2 rDNA berhasil dilakukan menggunakan pasangan primer ITS4 dan ITS5 dengan suhu *annealing* 45°C dan menghasilkan fragmen DNA dengan berat molekul 537 pb.

Kata kunci : endofit, dahlia, ITS, rDNA.

PENDAHULUAN

Mikroba endofit merupakan mikroba yang hidup di dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan efek negatif serta mampu menghasilkan senyawa yang sama dengan yang dihasilkan oleh tanaman inangnya. Sekitar 300.000 jenis tanaman yang tersebar di muka bumi ini masing-masing mengandung satu atau lebih mikroba endofit yang terdiri dari bakteri dan fungi (Radji, 2005).

Mikroba endofit dapat diisolasi dari berbagai jenis tanaman, salah satunya adalah dari tanaman dahlia (*Dahlia variabilis*). Tanaman dahlia merupakan tanaman berumbi yang banyak tumbuh di daerah dataran tinggi Indonesia. Tanaman ini memiliki bunga yang bervariasi dan warna bunga yang beragam (Sikumbang dkk., 2009). Penelitian terdahulu berhasil mengisolasi fungi endofit dari umbi tanaman dahlia. Umbi dahlia dengan warna bunga yang berbeda mengandung fungi endofit yang berbeda pula.

Penelitian yang dilakukan oleh Lorenita (2011) berhasil mengisolasi 4 isolat fungi endofit dari umbi tanaman dahlia (Padang Luar, Sumatera Barat), yaitu *Monilia* sp. LBKURCC40 dari umbi dahlia berbunga jingga, *Aureobasidium* sp. LBKURCC41 dari umbi dahlia berbunga kuning, *Moniliella* sp. LBKURCC42 dari umbi dahlia berbunga merah hati dan *Sporothrix* sp. LBKURCC43 dari umbi dahlia berbunga ungu. Penelitian yang dilakukan oleh Lestari (2014) juga berhasil mengisolasi 3 isolat fungi endofit dari umbi tanaman dahlia (Padang Panjang, Sumatera Barat), salah satunya adalah fungi yang teridentifikasi secara morfologi sebagai *Phialophora fastigiata* LBKURCC69.

Fungi *Phialophora fastigiata* LBKURCC69 merupakan fungi endofit yang berhasil diisolasi dari umbi tanaman dahlia berbunga merah muda (Lestari, 2014). Identifikasi morfologi secara makroskopis dan mikroskopis telah dilakukan terhadap fungi endofit ini untuk identifikasi spesies, namun identifikasi ini belum bisa memberikan kepastian spesies yang akurat karena beberapa fungi memiliki ciri morfologi yang sama. Oleh karena itu, hasil identifikasi yang diperoleh masih perlu diverifikasi dengan metode lainnya, yaitu metode identifikasi molekuler.

Identifikasi molekuler dapat dilakukan menggunakan daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer*) ribosomal DNA (rDNA). Isolasi DNA dan amplifikasi PCR pada daerah ITS rDNA merupakan tahap awal yang perlu dilakukan dalam identifikasi molekuler. Sekuens DNA pada daerah ITS rDNA berevolusi lebih cepat dibandingkan daerah gen lainnya sehingga akan bervariasi pada setiap spesies (White dkk., 1990). Hal ini akan mempermudah dalam identifikasi spesies dengan membandingkan tingkat kemiripan (homologi) sekuens DNA daerah ITS yang dimiliki suatu fungi dengan fungi lainnya.

METODE PENELITIAN

a. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Mettler AE 200*, *Vortex Mixer H-VM-300*, unit gel elektroforesis horizontal, *Hotplate Cimarec*, *Thermal Cycler* model *Techne TC-312*, *Microcentrifuge* model *Biofuge ex Heraeus* (Germany), *Thermostat Controlled Waterbath Shaker* merek Sibata (WS-120), *UV*

Transilluminator, Autoklaf All American model No. 1941X, *Shaker Heidolph* model UNIMAX 1010 dan mesin sekuensing model 3100/3130XL-17215-029 (Lembaga Eijkman).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah media *Sabouraud-4%-Dextrose Agar* (SDA) (Merck, Cat. No. 1.13741.0100); agarosa 100 g ex Promega, Madison, WI, USA; *Wizart Genomic Purification Kit* ex. Promega, Madison, WI, USA (Cat. No. 65771); enzim litikase *Arthrobacter luteus* ex. SIGMA-Aldrich Chemical Co. St. Louis, USA (Cat. No. L2524); *PCR Core System 1* ex. Promega, Madison, WI. USA (Cat. No. M7660); primer ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') dan primer ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') produksi PT. Sentra Biosains Dinamika, Jakarta; 1 kb DNA *Ladder* ex. Promega, Madison, WI. USA (Cat. No. G5711); *Ethidium Bromide* 10 mg/mL ex. Bio-rad, (Cat. No. 161-0433).

b. Isolasi DNA

Isolat fungi endofit LBKURCC69 diremajakan pada media padat *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dengan metode *spread plate*. Isolasi DNA dilakukan pada miselium berumur 4 hari dengan metode *kit Wizart Genomic ex Promega Corp*. Metode ini menggunakan enzim litikase untuk memecah dinding sel dan membran sel fungi.

Miselium sebanyak 0,3 g dikerik dari cawan petri menggunakan spatula steril dan dimasukkan ke dalam tabung mikro, kemudian ditambahkan 293 μ L 50 mM EDTA (pH 8) dan 7,5 μ L enzim

litikase (20 mg/mL). Campuran dihomogenkan dengan cara membolak-balik tabung mikro, kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 60 menit. Campuran didinginkan pada suhu kamar dan disentrifuga pada 13.000xg selama 2 menit. Supernatan dibuang dan endapan diambil. Endapan ditambahkan larutan pelisis inti sel (*Nuclei Lysis Solution*) sebanyak 300 μ L dan dihomogenkan kembali dengan membolak-balik tabung mikro.

Campuran ditambahkan larutan pengendap protein (*Protein Precipitation Solution*) sebanyak 100 μ L kemudian dikocok dengan cara dibolak-balik pada kecepatan tinggi selama 20 detik. Sampel didiamkan di es selama 5 menit, kemudian disentrifuga pada 12.000xg selama 3 menit. Endapan dibuang, sedangkan supernatan yang mengandung DNA dipindahkan ke dalam tabung mikro baru yang telah berisi 300 μ L isopropanol pada suhu kamar. Sampel dihomogenkan dengan membolak-balik tabung mikro. Sampel disentrifuga pada 13.000xg selama 5 menit. Supernatan dibuang, sedangkan pelet DNA dikeringkan dengan membalikkan tabung diatas tisu.

Pelet DNA ditambahkan etanol 70 % sebanyak 300 μ L, kemudian tabung dibolak-balik beberapa kali untuk mencucinya. Pelet DNA disentrifuga pada 13.000xg selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet DNA dikeringkan dengan membiarkan tabung terbuka selama 10-15 menit. Pelet DNA ditambahkan 25 μ L larutan dehidrasi DNA dan 1 μ L larutan RNase. Dasar tabung dipukul pelan-pelan dan divorteks selama 5 detik. Isolat DNA diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 15 menit, selanjutnya didiamkan pada suhu kamar selama 24 jam. Isolat DNA disimpan di lemari es pada suhu 2-8⁰C.

Hasil isolasi DNA dapat dideteksi menggunakan elektroforesis gel agarosa. Konsentrasi gel agarosa yang digunakan adalah 0,8 % dalam buffer TAE (*Tris Acetate EDTA*). Total volume sampel yang akan dielektroforesis adalah 10 μL , yaitu isolat DNA sebanyak 6 μL dicampur dengan 3 μL loading bufer dan 1 μL akuades steril. DNA standar dibuat dengan mencampurkan 3 μL DNA ladder dengan 0,6 μL dye. Gel agarosa hasil elektroforesis direndam dalam larutan etidium bromida dan diamati dengan bantuan sinar UV menggunakan *UV transilluminator*.

c. Amplifikasi PCR

Amplifikasi PCR daerah ITS-1 dan ITS-2 rDNA dilakukan menggunakan pasangan primer ITS4 dan ITS5 dengan suhu *annealing* 45°C. Primer ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTG ATATGC-3') digunakan sebagai primer *reverse* dan ITS5 (5'-GGAAGTAAAA GTCGTAACAAGG-3') digunakan sebagai primer *forward*.

Total volume untuk amplifikasi PCR adalah 50 μL , terdiri atas isolat DNA sebanyak 3 μL , primer ITS4 dan ITS5 masing-masing 10 μL , dNTP 2 mM sebanyak 5 μL , *Gotec Colourless* sebanyak 5 μL , MgCl_2 sebanyak 3 μL , akuades steril sebanyak 8,75 μL dan *Taq* DNA polimerase sebanyak 0,25 μL .

Reaksi amplifikasi berlangsung dalam 3 tahap untuk setiap siklus. Reaksi diawali dengan *hot start* pada suhu 95°C selama 5 menit. Tahap pertama adalah proses denaturasi pada suhu 94°C selama 1,5 menit. Tahap kedua adalah proses *annealing* pada suhu 45°C selama 1 menit. Tahap ketiga adalah pemanjangan rantai DNA pada suhu 72°C selama 3 menit. Dalam penelitian

ini, amplifikasi PCR berlangsung sebanyak 35 siklus.

Hasil amplifikasi PCR dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,2 % yang direndam dalam larutan etidium bromida dan pita-pita DNA diamati dengan bantuan sinar UV menggunakan *UV Transilluminator*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

a. Isolasi DNA

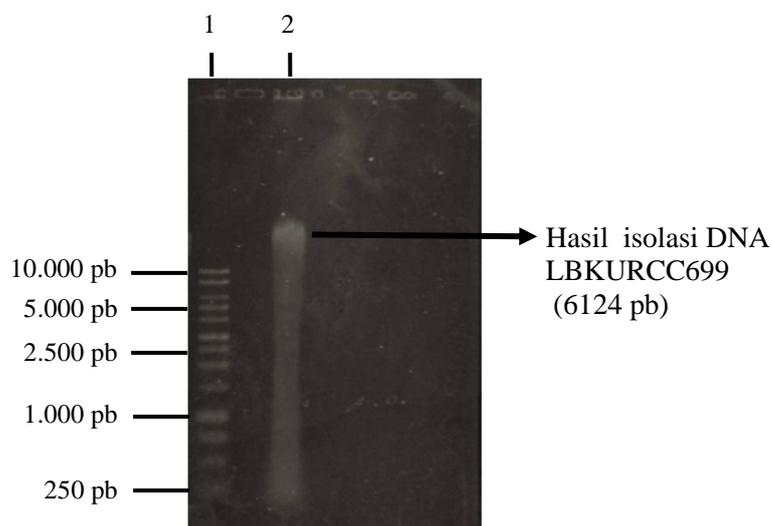
Keberhasilan isolasi DNA diketahui melalui elektroforesis gel agarosa. Gel agarosa dibawah sinar UV akan memperlihatkan adanya pita-pita DNA yang menandakan bahwa DNA telah berhasil diisolasi. Berdasarkan Gambar 1 diketahui bahwa DNA fungi endofit LBKURCC69 telah berhasil diisolasi dari miselia berumur 4 hari.

Isolasi DNA merupakan tahap awal dalam identifikasi molekuler. Keberhasilan isolasi DNA sangat mempengaruhi kualitas DNA yang diperoleh. Pada Gambar 1 dapat dilihat bahwa terdapat pita DNA pada gel elektroforesis. Pita DNA hasil isolasi yang diperoleh tidak berupa pita tunggal, melainkan berbentuk noda memanjang. Pita DNA yang berbentuk noda memanjang pada gel elektroforesis ini disebut *smear*. Hal ini kemungkinan besar disebabkan karena polisakarida yang dihasilkan oleh fungi tersebut ikut terekstraksi saat isolasi DNA dilakukan.

Pada beberapa jenis fungi, polisakarida yang dihasilkan berupa lendir yang disekresikan ke sekeliling hifa. Polisakarida ini sering terekstraksi bersama DNA sehingga membentuk noda memanjang sesuai jalur yang dilaluinya pada gel elektroforesis, seperti pada *Schizophyllum* (Agusta, 2009). Selain itu, hal ini juga dapat

mengindikasikan bahwa RNA sebagai pengotor ikut terekstraksi selama proses isolasi berlangsung (Eticha dkk., 2013). Meskipun demikian, isolat DNA ini

tetap dapat digunakan untuk amplifikasi PCR karena isolat DNA dengan kualitas yang baik tidak menjadi syarat mutlak dalam PCR (Sambrook dkk., 2001).



Gambar 1. Hasil elektroforesis isolat DNA fungi endofit LBKURCC69. Jalur 1 = pita DNA standar, Jalur 2 = pita DNA fungi endofit LBKURCC69.

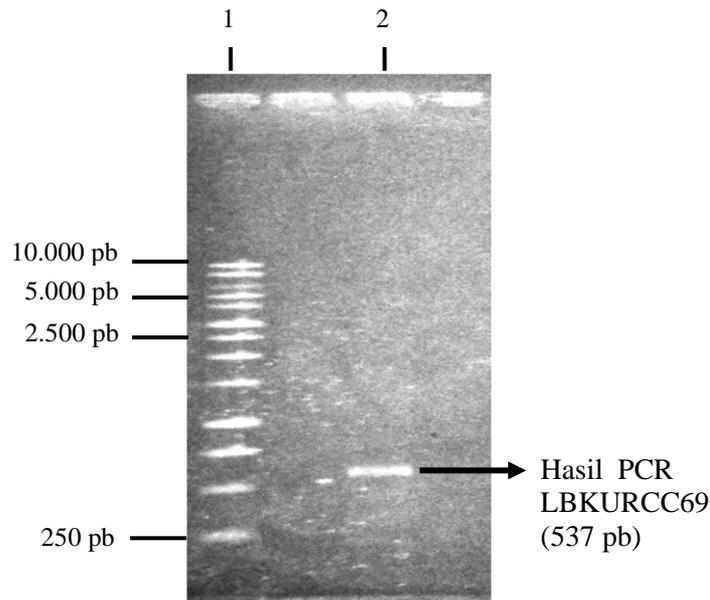
b. Amplifikasi PCR

Isolat DNA fungi endofit LBKURCC69 berhasil diamplifikasi pada daerah ITS-1 dan ITS-2 rDNA menggunakan pasangan primer ITS4 dan ITS5 pada suhu *annealing* 45°C. Keberhasilan amplifikasi diketahui dengan adanya pita-pita DNA pada gel agarosa setelah dilakukan elektroforesis.

Keberhasilan amplifikasi PCR dipengaruhi oleh penggunaan pasangan primer yang sesuai dan suhu *annealing* yang tepat untuk setiap fungi. Penelitian yang dilakukan Hutapea (2007) menunjukkan bahwa amplifikasi PCR fungi *Trichoderma* sp.TNC52 berhasil dilakukan menggunakan pasangan primer ITS4 dan ITS5 pada suhu *annealing* 45°C, amplifikasi PCR fungi *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30 berhasil dilakukan

menggunakan pasangan primer ITS4 dan ITS5 pada suhu *annealing* 47°C (Dewi, 2014), serta amplifikasi PCR fungi *Penicillium* sp.LBKURCC20, LBKURCC21, LBKURCC27 dan *Trichoderma* sp.LBKURCC28 berhasil dilakukan menggunakan pasangan primer ITS4 dan ITS5 dengan suhu *annealing* 45°C (Fitri, 2013).

Fragmen DNA yang diperoleh dari hasil isolasi memiliki berat molekul yang lebih besar dibandingkan fragmen DNA hasil amplifikasi. Hal ini dikarenakan bagian DNA yang diisolasi adalah DNA kromosomal yang berukuran besar, sedangkan bagian DNA yang diamplifikasi adalah daerah ITS rDNA yang ukurannya relatif lebih kecil. Pasangan primer ITS4 dan ITS5 dapat digunakan untuk mengamplifikasi DNA pada daerah ITS-1 dan ITS-2 rDNA dengan berat molekul berkisar



Gambar 2. Hasil elektroforesis produk amplifikasi PCR isolat DNA fungi endofit LBKURCC69. Jalur 1 = pita DNA standar, Jalur 2 = pita DNA fungi endofit LBKURCC69.

antara 563-602 pb (White dkk., 1990). Hal ini sesuai dengan hasil amplifikasi yang diperoleh, yaitu berat molekul DNA hasil amplifikasi PCR adalah sebesar 537 pb. Pada Gambar 2 terlihat pita DNA yang diperoleh berupa pita tunggal. Hal ini menandakan bahwa DNA hasil amplifikasi sudah cukup murni.

KESIMPULAN

DNA kromosomal fungi endofit LBKURCC69 berhasil diisolasi dari miselia fungi berumur 4 hari dengan berat molekul 6124 pb. Amplifikasi PCR pada daerah ITS-1 dan ITS-2 rDNA dapat dilakukan menggunakan pasangan primer ITS4 dan ITS5 dengan suhu *annealing* 45°C. Hasil amplifikasi PCR menghasilkan fragmen DNA sebesar 537 pb.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Riau yang telah membantu biaya penelitian ini melalui Dana Hibah Tim Pasca Sarjana DIKTI atas nama Prof. Dr. Saryono, M.S tahun anggaran 2013 dengan nomor kontrak 381/UN19.2/PL/2013. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Saryono, M.S dan Prof. Titania T. Nugroho yang telah membimbing, memotivasi serta membantu dalam penelitian dan penulisan karya ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agusta, A. 2009. *Biologi dan Kimia Jamur Endofitik*. Penerbit ITB, Bandung.
- Dewi, A. 2014. Analisis Filogenetik *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30 Menggunakan Sekuens ITS-1 dan ITS-2 rDNA.

- Tesis*. FMIPA Universitas Riau, Pekanbaru.
- Ethica, S. N., Nataningtyas, D. R., Lestari, P., Istini, Semiarti, E., Widada, J., Raharjo, T. J. 2013. Comparative evaluation of conventional versus rapid methods for amplifiable genomic DNA isolation of cultured *Azospirillum* sp. JG3. *Indonesian Journal of Chemistry*. **13** (3) : 248-253.
- Fitri, R. M. 2013. Optimasi Isolasi Kromosomal DNA dan Amplifikasi PCR DNA Ribosomal Fungi *Penicillium* sp. LBKURCC20, LBKURCC21, LBKURCC27 dan *Trichoderma* sp. LBKURCC28. *Skripsi*. FMIPA Universitas Riau, Pekanbaru.
- Hutapea, T. R. I. 2007. Karakterisasi DNA dan Sekuensing Daerah ITS rDNA *Trichoderma* sp. TNC52. *Skripsi*. FMIPA Universitas Riau, Pekanbaru.
- Lestari, S. 2014. Isolasi dan Uji Kualitatif Enzim Amilase, Katalase, dan Inulinase Jamur Endofit Dari Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*). *Skripsi*. FMIPA Universitas Riau, Pekanbaru.
- Lorenita, M. 2011. Isolasi Jamur Endofitik Dari Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*) Padang Luar, Sumatera Barat. *Skripsi*. FMIPA Universitas Riau, Pekanbaru.
- Radji, M. 2005. Peranan bioteknologi dan mikroba endofit dalam pengembangan obat herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. **2** (3) : 113-126.
- Sambrook, J., Russell, D. 2001. *Molecular Cloning : a Laboratory Manual, 3rd Ed.* Coln Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sikumbang, S., Hindersah, R. 2009. *Tanaman Dahlia : Potensi Bahan Alam Karbohidrat dan Senyawa Bioaktif*. Unri Press, Pekanbaru.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications*.