

Comparison of Three Different DNA Isolation Methods To Degradate The Trichoderma Fungi Cell Wall

Widya Ruchi¹, Dwi Hilda Putri¹, Azwir Anhar¹, Siska Alicia Farma¹

¹Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Padang
Jl. Prof. Dr. Hamka Air Tawar Barat Padang, 25131

Email: widyaruchi1@gmail.com

Abstract. Trichoderma fungi cell walls are composed of chitin compounds that are very sturdy and resistant to enzyme activity. The specific techniques and methods are needed to degrade of fungi cell wall. This study aims to analyze the best DNA isolation method in lysing fungal cell walls by comparing several isolation methods. The methods are using DNeasy Plant Mini Kit, DNeasy Plant Mini Kit combination with heating, and DNeasy Plant Mini Kit combination in a physical way (grinding the sample using mortar and pestle in liquid nitrogen). This research was conducted in March to September 2018 at the Microbiology Laboratory, Laboratory of Biotechnology and Genetics, as well as the Integrated Research Laboratory, FMIPA, UNP. Data were analyzed qualitatively by agarose gel electrophoresis and quantitatively by calculating the purity and concentration of DNA using Nanodrop. The results showed that the DNeasy Plant Mini Kit combination method by physical means gave the highest concentration of DNA isolation of 2.4 µg / ml with a purity value of 1.857. In the DNeasy Plant Mini Kit method and the DNeasy Plant Mini Kit combination method with heating, the DNA concentrations obtained were 1.211 µg / ml and 0.933 µg / ml respectively with a purity value of 1.728 and 1.708. The results of the electrophoresis test showed a thin band of DNA bands in samples isolated by a combination of kit methods and physical methods, whereas in the other two samples no DNA bands were found. It can be concluded that the method of DNA isolation that can be used as a reference to degrade Trichoderma mushroom cell walls is a combination of kit and liquid nitrogen method with a note that additional levels of isolates are needed.

Key word: DNA isolation, cell wall, Trichoderma



This is an open access article distributed under the Creative Commons 4.0 Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. ©2019 by author

1. PENDAHULUAN

Trichoderma adalah jenis jamur mikroskopis yang termasuk dalam kelas Deuteromycetes (Eveleigh, 1985). Jamur ini tersebar luas dan hampir dapat ditemui di lahan-lahan pertanian dan perkebunan. Trichoderma bersifat saprofit pada tanah dan kayu. Beberapa jenis Trichoderma dapat bersifat parasit pada kapang lain (Gandjar,

1999). Jamur ini juga mampu berperan sebagai *Plant Growth Promoting Fungi* (PGPF) yang dapat memacu pertumbuhan tanaman (Vinale, 2008).

Jamur *Trichoderma* dapat diisolasi dari berbagai jenis rizosfer tanaman, salah satunya tanaman padi. Tanaman padi merupakan tanaman utama bidang pertanian yang terdiri dari berbagai macam varietas (Nurnayetti, 2013). Perbedaan varietas padi mengindikasikan adanya variasi jenis mikroba (khususnya jamur *Trichoderma*) di daerah rizosfernya (Hastuti, 2009).

Penelitian yang dilakukan oleh Sartika dkk. (2017), berhasil mengisolasi tiga jenis *Trichoderma* dari rizosfer tanaman padi varietas Silampung, Situ Bagendit dan Ketan Rancong Rolang yang berasal dari areal persawahan padi gogo di Pasaman Barat. Syahputra dkk. (2017) juga berhasil mengisolasi tujuh jenis *Trichoderma* dari rizosfer tanaman padi varietas Talang Surian, Sirandah Umbilin, Sirandah Bukik, Sirandah Batuampa, Remaja, Cisokan Unggul, dan Cisokan Balang yang berasal dari beberapa daerah di Kabupaten Solok. Salah satunya adalah jamur yang teridentifikasi secara morfologi sebagai *Trichoderma* sp. RE.

Trichoderma sp. RE. merupakan jamur yang berhasil diisolasi dari tanaman padi varietas Remaja. Identifikasi morfologi secara makroskopis dan mikroskopis telah dilakukan terhadap jamur ini untuk identifikasi spesies, namun identifikasi ini belum bisa memberikan kepastian spesies yang akurat karena beberapa jamur 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) (Iwen dan Rupp, 2002). Isolasi DNA 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 jamur dengan jamur lainnya.

Isolasi DNA dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan DNA dari bahan lain seperti protein, lemak, dan karbohidrat. Prinsip utama dalam isolasi DNA ada tiga yakni penghancuran (lisis), ekstraksi atau pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA. Langkah pertama yang dilakukan dalam isolasi DNA adalah melisiskan dinding atau membran sel (Holme dan Hazel, 1998).

Struktur sel jamur kapang termasuk *Trichoderma* memiliki kesamaan dengan tumbuhan, yaitu adanya dinding sel. Dinding sel jamur kapang tersusun atas senyawa

kitin yang sangat kokoh dan resisten terhadap aktivitas enzim (Moore-Landecker, 1996). Untuk itu diperlukan teknik dan metode spesifik untuk mendegradasi dinding sel jamur.

Dalam penelitian ini ada beberapa metode yang digunakan untuk isolasi DNA *Trichoderma*, yaitu metode *DNeasy Plant Mini Kit*, kombinasi metode *DNeasy Plant Mini Kit* dengan pemanasan, dan kombinasi metode *DNeasy Plant Mini Kit* dengan cara fisik (menggerus sampel dengan menggunakan *mortar* dan *pestle* dalam nitrogen cair). Beberapa metode tersebut diuji tingkat efektifitasnya dalam mengisolasi DNA untuk mendapatkan hasil yang terbaik secara kuantitas dan kualitas DNA yang dihasilkan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis metode isolasi DNA yang terbaik dalam melisiskan dinding sel jamur.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu: autoklaf, erlenmeyer, *beaker glass*, batang pengaduk, kompor listrik, jarum inokulasi, lampu bunsen, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *volumetric*, tabung eppendorf, mikropipet, tip, termos, lumpang, alu, *vortex*, *sentrifuge*, LAF (*laminar air flow*), timbangan analitik, inkubator, mesin PCR, *microwave*, mesin elektroforesis, *UV illuminator* dan *Nanodrop*.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu : isolat jamur *Trichoderma* sp. RE, medium Potato Dekstrosa Agar (PDA), kapas, kasa, aluminium *foil*, *wrapping*, kertas label, alat tulis, nitrogen cair, *DNeasy Plant Mini Kit*, alkohol 70%, hipoklorit 2,5 %, es batu, *dream tag*, ddH₂O, *primer forward* (ITS 1) dan *primer reverse* (ITS 4), DNA *template*, agarosa, TAE 1X, EtBr, *marker VC* 100 bp, *loading dye*, dan kertas parafilm.

2.2 Metode

2.2.1 Regenerasi Isolat *Trichoderma* sp. RE

Isolat jamur diambil dengan jarum ose, kemudian di *streak plate* pada agar miring PDA yang telah mengeras. Setelah itu mulut tabung reaksi disumbat dengan kapas yang dibalut dengan kain kasa dan ditutup rapat dengan aluminium *foil* dan plastik *wrapping*. Jamur diinkubasi secara terbalik pada suhu ruang selama 2-4 hari.

2.2.2 Isolasi DNA menggunakan *DNeasy Plant Mini Kit*

Isolasi DNA dilakukan dengan cara jamur yang berumur 4 hari diambil sebanyak 0,1 gram, lalu dimasukkan ke dalam tabung eppendorf volume 1,5 ml yang berisi 400 µl buffer AP 1, lalu suspensi divorteks sampai homogeny dan ditambahkan RNAse 4 µl, kemudian dipanaskan lagi pada suhu 65°C selama 10 menit sambil dibolak balik 2 sampai 3 kali. Setelah itu *buffer P3* ditambahkan sebanyak 130 µl ke dalam tabung, kemudian

dihomogenkan dan diletakkan di *freezer* selama 5 menit. Suspensi selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit hingga terpisah antara supernatan dan pelet. Supernatan dipindahkan ke dalam *QIAshredder spin column*, lalu disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 12000 rpm. Kemudian, supernatan dipindahkan ke dalam tabung eppendorf dan dihitung volumenya. *Buffer AW 1* ditambahkan sebanyak 1,5 kali volume larutan yang ada di eppendorf. Sebanyak 650 µl campuran dipindahkan ke dalam *mini spin column*, kemudian disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm, setelah itu cairan yang ada pada tabung dibuang. Sentrifugasi diulangi selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm untuk sampel yang tersisa. Setelah itu, *buffer AW 2* ditambahkan sebanyak 500 µl, lalu disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 12000 rpm. Kemudian, *mini spin column* dimasukkan ke dalam tabung eppendorf steril. Terakhir, *buffer AE* ditambahkan sebanyak 100 µl, lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang, kemudian sentrifugasi lagi 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Setelah itu, DNA hasil isolasi disimpan pada suhu – 20°C.

2.2.3 Isolasi DNA dengan Kombinasi Metode *DNeasy Plant Mini Kit* dan Pemanasan

Isolasi DNA dilakukan dengan cara jamur yang berumur 4 hari diambil sebanyak 0,1 gram, lalu dimasukkan ke dalam tabung eppendorf volume 1,5 ml yang berisi 400 µl *buffer AP 1*, lalu suspensi divorteks sampai homogen. Suspensi dipanaskan pada suhu 70°C selama 30 menit sambil dibolak balik, lalu ditambahkan *RNAse* 4 µl dan dipanaskan lagi pada suhu 65°C selama 10 menit sambil dibolak balik 2 sampai 3 kali. Prosedur kerja untuk ekstraksi dan pemurnian DNA sama dengan sebelumnya.

2.2.4 Isolasi DNA dengan Kombinasi Metode *DNeasy Plant Mini Kit* dan Perlakuan Fisik

Isolasi DNA dilakukan dengan cara jamur yang berumur 4 hari diambil sebanyak 0,1 gram, lalu dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Tabung eppendorf yang berisi jamur dicelupkan ke dalam nitrogen cair selama 30 detik (sampai tabung membeku), kemudian jamur digerus menggunakan lumpang dan alu. Jamur yang sudah digerus dimasukkan ke dalam tabung eppendorf volume 1,5 ml yang berisi 400 µl *buffer AP 1*, lalu suspensi divorteks sampai homogen. Prosedur kerja untuk ekstraksi dan pemurnian DNA sama dengan sebelumnya.

2.2.5 Penentuan Kuantitas DNA

Kuantitas DNA hasil isolasi diuji menggunakan Nanodrop untuk melihat konsentrasi dan kemurniannya. Pengukuran konsentrasi DNA dengan nanodrop dilakukan pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan protein diukur pada panjang

gelombang 280 nm. Batas kemurnian yang diterima dalam analisis molekuler adalah pada rasio A260/A280 1,7-2.0.

2.2.6 Penentuan Kualitas DNA

2.2.6.1 Amplifikasi DNA

Daerah ITS rRNA jamur *Trichoderma* diamplifikasi menggunakan *primer forward* ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3') dan *primer reverse* ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Reaksi PCR untuk 1 isolat jamur dilakukan dalam 25 µl reaksi, yang terdiri dari 12,5 µl Dream taq PCR, 2 µl masing-masing primer ITS 1 dan ITS 4, dan 2 µl DNA *template*. Selanjutnya reaksi ditambahkan dengan ddH₂O sampai volume 25 µl. Tahapan reaksi yang digunakan adalah denaturasi awal 94°C selama 3 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri atas denaturasi 94°C selama 30 detik, penempelan primer (*annealing*) pada suhu 58,1°C selama 30 detik dan elongasi pada suhu 72°C selama 1 jam 30 menit. Reaksi ditutup dengan elongasi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit.

2.2.6.1 Elektroforesis DNA

Analisis produk PCR dilakukan dengan teknik elektroforesis menggunakan gel agarose 1,2 % (0,6 g bubuk agarose dalam 50 ml *buffer* TAE 1X). Larutan dipanaskan hingga bening dan ditambahkan 1 µl EtBr. Selanjutnya larutan dihomogenkan dan dimasukkan kedalam cetakan, lalu ditunggu sampai agar memadat. Kemudian agar yang telah padat dimasukkan ke dalam bak elektroforesis yang telah berisi 500 ml TAE 1X. Sebanyak 2 µl produk PCR yang akan dianalisis dicampur dengan 1 µl *loading buffer*, selanjutnya dimasukan ke dalam setiap sumur pada gel agarose. Selain produk PCR, pada proses elektroforesis juga disertakan DNA *marker*. Elektroforesis dilakukan pada tegangan listrik 100 volt selama 30 menit. Visualisasi dan analisis DNA dilakukan di *UV Transilluminator* dan hasilnya difoto dengan menggunakan kamera hp Xiaomi model MI 4W.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Bagian yang mencolok dari jamur adalah miselium, yang terbentuk dari kumpulan hifa yang bercabang-cabang membentuk suatu jala. Hifa berisi protoplasma yang dikelilingi oleh suatu dinding yang kuat (Carlile dan Watkinson,1994). Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah miselium jamur berumur empat hari. Hifa yang tua (berumur lebih dari 4 hari) mempunyai tambahan bahan pada dinding selnya, yaitu senyawa melanin dan lemak sehingga akan menyulitkan proses isolasi DNA (Gandjar dkk., 2006).

Isolasi DNA dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan DNA dari bahan lain seperti protein, lemak, dan karbohidrat. Prinsip utama dalam isolasi DNA ada tiga yakni penghancuran (lisis), ekstraksi atau pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Corkill dan Rapley, 2008). Prinsip isolasi DNA pada berbagai jenis sel atau jaringan untuk setiap organisme pada dasarnya sama namun memiliki modifikasi dalam hal teknik dan bahan yang digunakan. Modifikasi paling sering dilakukan dalam tahap pelisisan dinding atau membran sel karena tidak semua organisme memiliki dinding sel dan juga terdapat perbedaan kandungan dinding sel antar kelompok organisme.

Pemecahan dinding sel (lisis) jamur *Trichoderma* merupakan tahapan awal isolasi DNA yang bertujuan untuk mengeluarkan isi sel (Holme dan Hazel, 1998). Tahap penghancuran sel atau jaringan jamur *Trichoderma* pada penelitian ini dilakukan dengan beberapa cara yakni dengan hanya menggunakan *DNeasy Plant Mini Kit*, kombinasi *DNeasy Plant Mini Kit* dengan cara fisik (menggerus sampel dengan menggunakan *mortar* dan *pestle* dalam nitrogen cair) dan cara lainnya dengan mengkombinasikan *DNeasy Plant Mini Kit* dengan metode pemanasan. DNA hasil isolasi kemudian dianalisis kuantitas serta kualitasnya. Hasil kuantifikasi dengan menghitung konsentrasi dan tingkat kemurnian menggunakan alat nanodrop dapat dilihat pada Tabel 1.

3.1 Kuantitas DNA

Tabel 1. Nilai kuantitas DNA genom

Metode	Konsentrasi C ($\mu\text{g/ml}$)	Kemurnian
Kit ekstraksi DNA (<i>DNeasy Plant Mini Kit</i>)	2,4	1,857
Kombinasi Kit Ekstraksi DNA dengan <i>Thermal Lysis</i>	1,15	1,719
Kombinasi Kit Ekstraksi DNA dengan Cara Fisik	0,933	1,725

Pada penelitian ini konsentrasi DNA yang diperoleh cukup rendah, untuk sampel 1 (metode kombinasi antara *DNeasy Plant Mini Kit* dengan cara fisik) yakni 2,4 $\mu\text{g/ml}$. Pada sampel 2 (metode kombinasi *DNeasy Plant Mini Kit* dengan pemanasan) dan sampel 3 (metode *DNeasy Plant Mini Kit*) konsentrasi DNA yang didapatkan lebih rendah yaitu berturut-turut 1,211 dan 0,933. Tinggi atau rendahnya konsentrasi DNA yang dihasilkan dalam proses isolasi dikarenakan perbedaan perlakuan dalam memecahkan dinding sel dan juga dapat disebabkan oleh beberapa faktor lain.

Pertama, faktor suhu inkubasi. Setelah dilakukan pemecahan dinding sel, sampel yang dicampur dengan larutan *lysis buffer* diinkubasi pada suhu tertentu. Larutan tersebut berfungsi untuk menghancurkan jaringan dan membran sel, mengeliminasi kontaminan, sehingga yang didapatkan pada tahapan ini adalah DNA genom yang terdapat dalam sel, yaitu DNA inti dan mitokondria. Jika suhu inkubasi yang digunakan terlalu tinggi maka dapat merusak DNA, sedangkan jika suhu terlalu rendah maka membran serta jaringan sel tidak dapat hancur. Larutan *lysis buffer* bekerja dengan optimal pada suhu yang tidak terlalu rendah. Pada penelitian ini suhu inkubasi untuk metode *DNeasy Plant Mini Kit* dan kombinasi metode *DNeasy Plant Mini Kit* dengan cara fisik adalah 65 °C, sedangkan untuk kombinasi metode *DNeasy Plant Mini Kit* dan pemanasan suhu inkubasinya adalah 70 °C dan suhu dikurangi menjadi 65 °C setelah penambahan RNase.

Kedua, lama waktu inkubasi. Jika terlalu lama diinkubasi maka dapat merusak DNA dan jika terlalu sebentar tidak dapat menghancurkan membran dan jaringan sel. Oleh karena itu, baik suhu dan waktu, kedua-duanya harus diatur dengan sebaik mungkin agar diakhir isolasi didapatkan DNA dalam konsentrasi yang diharapkan. Lama waktu inkubasi pada penelitian ini untuk metode *DNeasy Plant Mini Kit* dan kombinasi metode *DNeasy Plant Mini Kit* dengan cara fisik sekitar 15 menit, sedangkan untuk kombinasi metode *DNeasy Plant Mini Kit* dan pemanasan suhu inkubasinya sekitar 45 menit. Suhu dan lama waktu inkubasi disesuaikan dengan prosedur yang ada pada kit isolasi DNA.

Kombinasi pengaturan suhu dan lama inkubasi yang tepat dapat menghasilkan konsentrasi isolat DNA sesuai yang diharapkan, sehingga isolat DNA dapat digunakan untuk melakukan tahapan lanjutan seperti PCR. Namun selain konsentrasi DNA kemurnian juga merupakan syarat penting agar tahapan PCR dapat berhasil.

Kemurnian DNA merupakan rasio antara A260 dengan A280. Isolat DNA dikatakan murni jika nilai rasio A260/A280 berkisar antara 1,8 sampai 2,0 (Muladno, 2002). Pada penelitian ini sampel yang memiliki kemurnian diantara 1,8-2,0 adalah sampel nomor 1 (kombinasi metode *DNeasy Plant Mini Kit* dengan cara fisik), sedangkan sampel 2 (kombinasi metode *DNeasy Plant Mini Kit* dengan pemanasan) dan 3 (metode *DNeasy Plant Mini Kit*) memiliki nilai kemurnian lebih kecil dari 1,8 yang mengindikasikan adanya kontaminan pada DNA hasil isolasi. Kontaminan itu dapat berupa etanol 70% ataupun jumlah DNA terlalu sedikit.

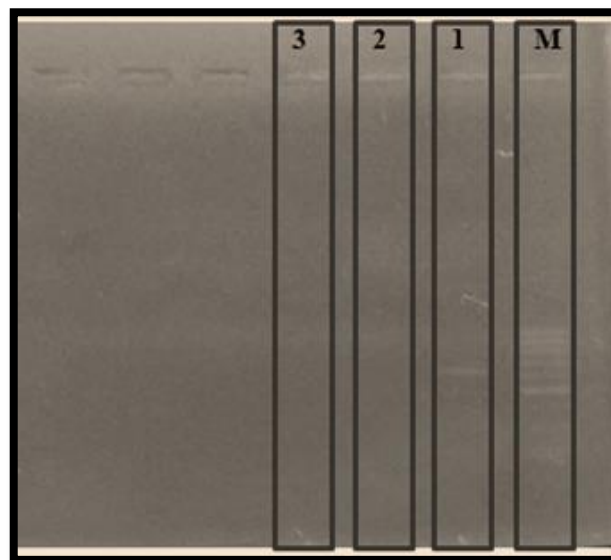
Sambrook dan Russell (2001) mengatakan bahwa hasil isolasi DNA dikatakan murni jika nilai rasio A260/A280 adalah antara 1,8 sampai 2,0. Jika nilai rasio A260/A280 kurang dari 1,8, maka hal ini menunjukkan bahwa isolat DNA yang dihasilkan masih mengandung kontaminan berupa fenol dan pelarut yang digunakan terlalu banyak. Sedangkan jika nilai rasio A260/A280 lebih dari 2,0 maka isolat DNA yang dihasilkan

masih mengandung kontaminan berupa protein dan senyawa lainnya (Sambrook dan Russell, 2001).

Konsentrasi dan kemurnian DNA genom yang rendah juga dapat disebabkan karena kadar sampel yang diisolasi terlalu sedikit. Selain itu, faktor alat dan bahan yang digunakan juga akan sangat berpengaruh pada kualitas dan kuantitas DNA. Alat-alat seperti tabung eppendorf, tabung PCR, tips, harus steril sebelum digunakan untuk mengisolasi DNA.

3.2 Kualitas DNA

Kualitas DNA hasil isolasi dapat diketahui melalui elektroforesis gel agarosa. Gel agarosa dibawah sinar UV akan memperlihatkan adanya pita-pita DNA. Kualitas pita DNA yang dihasilkan melalui visualisasi DNA dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Visualisasi DNA Jamur *Trichoderma*. M = Marker 50 bp; 1 = Sampel diisolasi dengan kombinasi metode *DNeasy Plant Mini Kit* dan cara fisik; 2 = Sampel diisolasi dengan kombinasi metode *DNeasy Plant Mini Kit* dan pemanasan; 3 = Sampel diisolasi dengan metode *DNeasy Plant Mini Kit*

Hasil isolasi DNA menggunakan kombinasi metode kit dengan nitrogen cair menghasilkan pita DNA berupa garis tunggal yang tipis, sedangkan pada dua metode lainnya pita DNA tidak terbentuk. Hal ini berkaitan dengan konsentrasi DNA yang didapatkan relatif rendah. Semakin tinggi konsentrasi DNA yang didapatkan, maka pita yang terbentuk semakin tebal dan terang (Sambrook dan Russel, 2001). Pita DNA hasil isolasi yang seharusnya diperoleh berupa pita tunggal dengan panjang sekitar 500 bp.

Berdasarkan hasil diatas, dari ketiga metode isolasi yang digunakan metode kombinasi kit dengan nitrogen cair dapat dijadikan sebagai metode rujukan dalam

mengisolasi DNA jamur khususnya *Trichoderma*. Metode ini dapat diaplikasikan dengan catatan dibutuhkan penambahan kadar isolat yang digunakan. Sedangkan isolasi DNA dengan metode *DNeasy Plant Mini Kit* dan metode kombinasi kit dengan pemanasan tidak disarankan mengingat kuantitas dan kualitas DNA hasil isolasi yang cukup rendah. Perbedaan hasil dari beberapa metode yang dilakukan pada penelitian ini bergantung pada efektifitas metode tersebut dalam mendegradasi sel dan menghasilkan isolat DNA baik dari segi kualitas maupun kuantitasnya (Karp dkk., 1997 dalam Ardiana, 2009).

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil perbandingan beberapa metode isolasi DNA dalam melisis dinding sel jamur, metode kombinasi kit dengan nitrogen cair dapat dijadikan sebagai metode rujukan dalam mengisolasi DNA jamur khususnya *Trichoderma* karena metode ini mampu menghasilkan DNA dengan kuantitas dan kualitas yang lebih baik dibandingkan kedua metode lainnya dengan catatan dibutuhkan penambahan kadar isolat yang digunakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ardiana DW. (2009). Teknik Isolasi DNA Genom Tanaman Pepaya dan Jeruk dengan Menggunakan Modifikasi Bufer CTAB. *Buletin Teknik Pertanian*, 14(1), 12-16.
- Carlile MJ dan Watkinson SC. (1994). *The Fungi*. London: Academic Press.
- Corkill G dan Rapley R. (2008). *The Manipulation of Nucleic Acids*. USA: Humana Press.
- Eveleigh DE. (1985). *Trichoderma*. Menlo Park, CA: The Benjamin Cummings Publishing Company Inc.
- Gandjar I, Sjamsuridzal W, dan Oetari A. (2006). *Mikologi Dasar dan Terapan*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Gandjar IR. (1999). *Pengenalan Kapang Tropik Umum*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Hastuti R. (2009). Isolasi dan Identifikasi Jamur Indigenus Rhizosfer Tanaman Kentang dari Lahan Pertanian Kentang Organik di Desa Pakis, Magelang. *Bioma*, 11(2), 45-53.
- Holme DJ dan Hazel P. (1998). *E-book: Analytical Biochemistry Third Edition*. England: Pearson Education.
- Iwen PC dan Rupp SH. (2002). Utilization of The Internal Transcribed Spacer Regions as Molecular Targets to Detect and Identify Human Fungal Pathogens. *Medical Mycology*, 40(1), 87-109.
- Jamsari. (2007). *Bioteknologi Pemula (Prinsip Dasar dan Aplikasi Analisis Molekuler)*. Pekanbaru: UNRI Press.

- Moore-Landecker E. (1982). *Fundamentals of The Fungi, Second Edition*. New Jersey: Prentice-Hall, Inc.
- Muladno. (2002). *Teknologi Rekayasa Genetika*. Bogor: Pustaka Wirausaha Muda.
- Nurnayetti A. (2013). Keunggulan Kompetitif Padi Sawah Varietas Lokal Di Sumatera Barat. *Jurnal Pengkajian dan Pengembangan Teknologi Pertanian*, 16(2), 102-110.
- Sambrook J dan Russel. (2001). *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sartika ID, Azwir A, dan Irdawati. (2017). Respon Tinggi Benih Padi Gogo Situ Bagendit (*Oryza sativa* L.) Terhadap Beberapa Asal Isolat *Trichoderma* spp. *Journal Biosains*, 1(2), 7.
- Syahputra M, Azwir A, dan Irdawati. (2017). Isolasi *Trichoderma* spp. dari Beberapa Rizosfer Tanaman Padi Asal Solok. *Journal Biosains*, 1(2), 9.
- Vinale FS, Krishnapillai G, Emilio LM, Roberta W, Sheridan L dan Matteo. (2008). *Trichoderma-Plant-Pathogen Interactions*. *Soil Biology Biochemistry*, 40(1), 1-10.
- White TJ, Bruns T, Lee S dan Taylor J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications*.