

**EKSTRAKSI DNA DAN AMPLIFIKASI ITS rDNA ISOLAT FUNGI
ENDOFIT LBKURCC67 UMBI TANAMAN DAHLIA
(*DAHLIA VARIABILIS*)**

Senjavi Rakhmana¹, Saryono², Titania T. Nugroho²

¹**Mahasiswa Program Studi S1 Kimia**

²**Bidang Biokimia Jurusan Kimia**

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau

Kampus Binawidya Pekanbaru, 28293, Indonesia

senjavirakhmana@rocketmail.com

ABSTRACT

Endophyte fungi lives in the plant tissues without causing harm to their host and has known that can produce secondary metabolite and extracellular enzyme. Fungi LBKURCC67 is an endophyte fungi that was isolated from tubers of yellow flowered *Dahlia variabilis* in Padang Panjang, West Sumatera. Species of fungi LBKURCC67 isolate was not known exactly because the morphology identification has been previously is appropriate for genus level. The accurate identification to known species is molecular with phylogenetic analysis. Before determine species in molecular analysis, it must extraction and amplification DNA. This research aims to optimization of DNA extraction and rDNA amplification in Internal Transcribed Spacer (ITS) regions with Polymerase Chain Reactions (PCR) methods. The DNA of fungi LBKURCC67 isolate was extract with Wizard Genomic DNA Purification kit ex Promega Corp. (Madison, USA) from cultur mycelium. The result shows extraction DNA was success from fourth days mycelia. Optimum condition for rDNA amplification with PCR were used ITS5 and ITS4 primers and 41°C annealing temperature. Electrophoresis analysis shows molecular weight of DNA isolate is 16.951 bp and molecular weight of PCR product is 583 bp.

Keywords: Endophyte, ITS, PCR, rDNA.

ABSTRAK

Fungi endofit hidup dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan sel inangnya dan diketahui menghasilkan metabolit sekunder dan enzim ekstraseluler. Fungi LBKURCC67 merupakan fungi endofit yang diisolasi dari umbi tanaman dahlia berbunga kuning (*Dahlia variabilis*) di Padang Panjang, Provinsi Sumatera Barat. Spesies isolat fungi LBKURCC67 belum diketahui secara pasti karena identifikasi morfologi yang pernah dilakukan lebih tepat untuk tingkat genus. Identifikasi spesies yang lebih tepat adalah identifikasi molekuler dengan menggunakan DNA. Sebelum penentuan spesies dalam identifikasi molekuler, tahap yang harus dilakukan adalah ekstraksi dan amplifikasi DNA. Penelitian ini bertujuan untuk ekstraksi DNA dan

amplifikasi rDNA daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). DNA isolat fungi LBKURCC67 diekstraksi menggunakan *Wizard Genomic DNA Purification kit ex* Promega Corp. (Madison, USA) dari miselium. Hasil penelitian menunjukkan ekstraksi DNA berhasil dilakukan dari miselium yang berumur 4 hari. Kondisi optimum amplifikasi rDNA dengan metode PCR adalah menggunakan primer ITS5 dan ITS4 dengan suhu *annealing* 41°C. Analisis elektroforesis menunjukkan berat molekul isolat DNA adalah 16.951 pb dan berat molekul produk PCR adalah 583 pb.

Kata kunci: Endofit, ITS, PCR, rDNA.

PENDAHULUAN

Mikroba endofit adalah mikroba yang seluruh atau sebagian hidupnya berada di dalam jaringan hidup tanaman inang tanpa menimbulkan gejala yang merugikan bagi tanaman inang itu sendiri (Kumala dkk., 2003). Pada penelitian sebelumnya, telah diisolasi jamur endofit dari umbi dahlia berbunga kuning di Padang Panjang, Provinsi Sumatera Barat yang diidentifikasi secara morfologi sebagai *Ulocladium chartarum* LBKURCC67 (Lestari, 2014).

Tanaman dahlia (*Dahlia variabilis*) merupakan bunga berumbi yang digunakan sebagai tanaman hias atau bunga potong. Tanaman dahlia dapat digunakan sebagai obat-obatan manusia karena memiliki potensi dalam menghasilkan senyawa bioaktif. Ekstrak umbi dahlia diketahui mengandung senyawa fenolik, flavonoid, dan saponin yang memiliki aktivitas antimikroba *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, dan *Staphylococcus aureus* (Suryadi, 2007).

Identifikasi fungi LBKURCC67 telah dilakukan secara morfologi berupa warna, diameter koloni, dan pigmen koloni. Hal ini lebih tepat untuk mengidentifikasi hingga tingkat genus, dan belum dapat memberikan kepastian untuk identifikasi pada tingkat spesies.

Menurut Wang dkk. (2008) genus *Ulocladium* memiliki kekerabatan yang sangat dekat dengan genus *Alternaria* karena memiliki kemiripan warna pigmen dan tempat hidup, akibatnya dapat terjadi kekeliruan dalam identifikasi spesies fungi LBKURCC67. Identifikasi yang tepat untuk mengetahui spesies dan kekerabatannya yaitu analisis molekuler dengan menggunakan sekuens DNA ribosomal (rDNA) pada daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer*) (Mulyatni dkk., 2011).

Daerah *internal transcribed spacers* (ITS) merupakan daerah sekuens 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 fungi memiliki ITS rDNA. Oleh karena itu, ITS banyak digunakan untuk analisis filogenetik, proses evolusi, dan penentuan identitas taksonomi (Purnamasari dkk., 2012).

METODE PENELITIAN

a. Peremajaan fungi

Fungi LBKURCC67 yang digunakan dalam penelitian ini

merupakan fungi endofit yang telah diisolasi dari umbi tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*) berbunga kuning di Padang Panjang, Provinsi Sumatera Barat, dan dikoleksi di Laboratorium riset enzim, fermentasi, dan biomolekuler jurusan kimia FMIPA Universitas Riau. Sampel diremajakan dengan media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA).

Inokulasi fungi endofit LBKURCC67 dilakukan dengan metode *spread plate*, yaitu isolat fungi pada agar miring dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 mL. Suspensi fungi diambil 100 µL kemudian diinokulasikan dalam cawan petri yang berisi SDA, dan permukaan agar diratakan dengan *spreader* yang telah steril. Kemudian diinkubasi hingga miselia memiliki jumlah cukup dan belum tumbuh sporanya. Saat miselia pada kondisi tersebut dilanjutkan ke tahap ekstraksi DNA.

b. Ekstraksi DNA

DNA jamur endofit diekstraksi dari kultur miselia menggunakan metode *Wizard Genomic DNA Purification kit ex* Promega Corp. (Madison, USA). Miselia dikerik dan dimasukkan ke tabung mikro, dan ditambahkan EDTA 0,5 M (pH 8) dan enzim litikase. Selanjutnya inkubasi selama 60 menit (37°C), dan disentrifuga. Endapannya ditambahkan pelisis inti sel (*Nuclei lysis solution*), dan larutan pengendap protein (*Protein precipitation solution*). Sampel disentrifuga, dan supernatan yang mengandung DNA dipindahkan ke tabung mikro yang telah berisi isopropanol, dan disentrifuga kembali. Setelah pelet DNA kering, etanol 70% juga ditambahkan. Kemudian

penambahan larutan rehidrasi DNA dan larutan RNase, dan diinkubasi. Isolat DNA yang didapatkan, disimpan dalam lemari es pada suhu 2-8°C.

c. Amplifikasi PCR

Amplifikasi daerah ITS rDNA isolat sampel dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan pasangan primer ITS5 dan ITS4 sesuai dengan peta posisi yang dirancang oleh White dkk., (1990). Amplifikasi dilakukan dengan volume total 50 µl, terdiri dari 2 µl sampel DNA, 5 µl dNTP, 10 µl bufer PCR *Go Taq Colourless*, 10 µl masing-masing primer, 3 µl MgCl₂ 0,25 µl *Go Taq* DNA polimerase, dan sisanya akuades steril.

Reaksi diawali dengan *hot start* pada suhu 95°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 1,5 menit, *annealing* pada suhu 41°C selama 1 menit, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 3 menit. Proses PCR berlangsung sebanyak 35 siklus dan diakhiri dengan ekstensi pada suhu 72°C selama 5 menit.

d. Elektroforesis

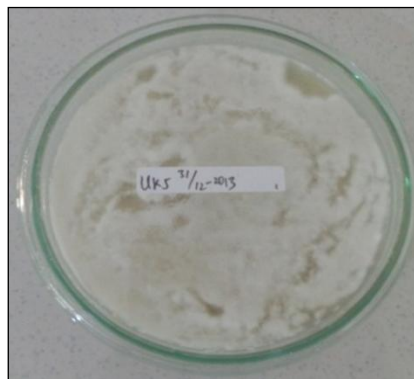
Keberhasilan ekstraksi DNA dan PCR dianalisis dengan elektroforesis pada gel agarosa 0,8 % untuk hasil ekstraksi DNA, dan gel agarosa 1,2 % untuk hasil amplifikasi PCR. Proses elektroforesis dijalankan dengan kondisi gel direndam dalam larutan *Tris Acetate EDTA* (TAE) 1X dan dialiri arus listrik sebesar 110 V. Setelah elektroforesis selesai, gel direndam dengan Etidium bromida, lalu dianalisa dengan sinar UV transiluminator. Berat molekul fragmen ditentukan dengan DNA *Ladder* 1 Kb (Promega Corp., Madison USA).

HASIL DAN PEMBAHASAN

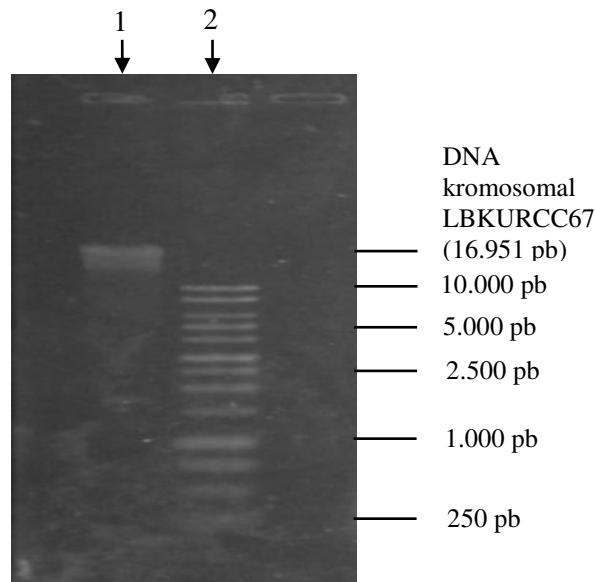
a. Ekstraksi DNA

Kultur fungi endofit LBKLURCC67 yang diambil untuk ekstraksi DNA adalah miselium yang sudah terbentuk sempurna dan sporanya belum tumbuh, yaitu miselium yang berumur 4 hari dapat dilihat pada Gambar 1.

Hal ini disebabkan saat hari ke-5, spora fungi telah mulai tumbuh sehingga enzim akan sulit memecah dinding sel yang tebal dan sulit untuk mengekstraksi DNA-nya. Ekstraksi DNA kromosomal berhasil dilakukan dengan baik, dibuktikan adanya pita yang terlihat jelas pada gel elektroforesis yang dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 1. Morfologi koloni isolat fungi endofit LBKURCC67 berumur 4 hari sebelum ekstraksi DNA.



Gambar 2. Hasil elektroferesis isolat DNA kromosomal LBKURCC667. Jalur 1: DNA kromosomal LBKURCC67, diperoleh pita dengan ukuran 16.951 pb. Jalur 2: Standar 1 Kb DNA *Ladder* (Promega-G5711) dengan 13 pita-pita tunggalnya.

Berat molekul isolat DNA fungi endofit LBKURCC67 yang diperoleh adalah sebesar 16.951 pb. Amplifikasi dengan menggunakan PCR memerlukan kualitas DNA yang baik dengan program yang sesuai (Putra, 2013). DNA dengan kualitas baik merupakan DNA yang murni dengan ditunjukkan satu buah pita pada gel elektroforesis. DNA yang pemurniannya tidak sempurna kemungkinan masih mengandung polisakarida atau kontaminan lain. Kontaminan dalam jumlah yang signifikan dapat mempengaruhi penempelan primer pada DNA cetakan saat PCR (Pharmawati, 2009).

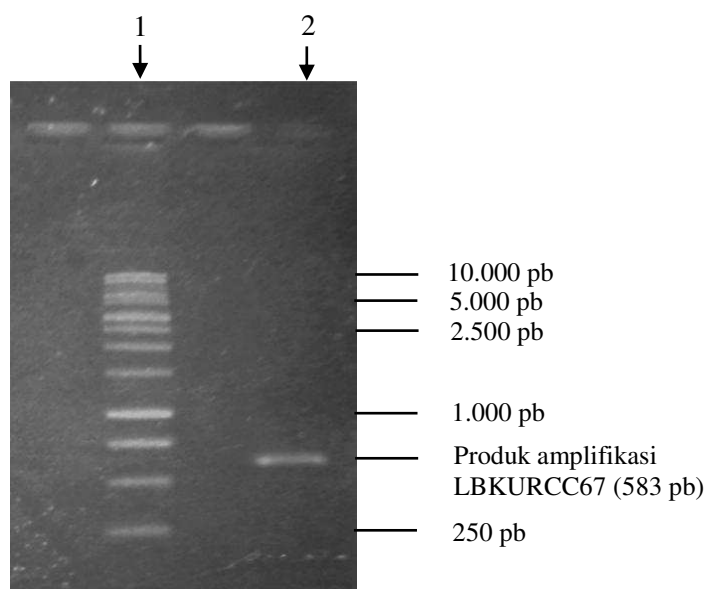
b. Amplifikasi PCR

Keberhasilan produk amplifikasi PCR isolat DNA LBKURCC67 pada

daerah ITS-1 dan ITS-2 rDNA diketahui melalui analisa elektroforesis gel agarosa 1,2%. Amplifikasi PCR isolat DNA LBKURCC67 menggunakan suhu *annealing* 41°C dengan pasangan primer ITS5 dan ITS4 memberikan hasil yang baik dengan ditunjukkan adanya pita tunggal DNA pada gel agarosa yang dapat dilihat pada Gambar 3.

Berat molekul produk amplifikasi PCR isolat fungi endofit LBKURCC67 adalah 583 pb. Ukuran molekul dengan kombinasi primer pada daerah ITS yang digunakan merupakan ukuran yang sesuai, karena dengan kombinasi primer ITS5 dan ITS4 pada daerah ITS-1 dan ITS-2 memiliki kisaran ukuran molekul 563-602 pb (White dkk., 1990).

Amplifikasi PCR dalam penelitian ini berhasil dilakukan karena menggunakan primer yang cocok dan



Gambar 3. Foto hasil elektroforesis produk amplifikasi PCR DNA isolat fungi endofit LBKURCC67 pada suhu *annealing* 41°C dengan menggunakan pasangan primer ITS5 dan ITS4. Jalur 1: 1 kb DNA Ladder (Promega-G5711) dengan pita-pita tunggalnya. Jalur 2: Produk amplifikasi rDNA LBKURCC67, diperoleh pita dengan ukuran 583 pb.

kondisi suhu *annealing* yang sesuai terhadap *template* DNA. Jika suhu *annealing* terlalu rendah maka kemungkinan akan terjadi ikatan non spesifik sehingga dihasilkan produk yang tidak dikehendaki, dan jika terlalu besar maka primer tidak dapat berikatan dengan *template* DNA sehingga tidak akan ada produk yang dihasilkan (Jamsari, 2007).

Penelitian Radji dkk. (2009) menunjukkan bahwa amplifikasi menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dari isolat fungi endofit dari tanaman *Garcinia porrecta* dan *Garcinia forbesii* berhasil dilakukan pada kondisi suhu *annealing* 45°C dan menggunakan pasangan primer NS1 dan NS4 untuk daerah 18S rDNA.

Isolat fungi *Oncobasidium theobromae* dari tanaman kakao di Jember berhasil diamplifikasi daerah ITS rDNA-nya pada kondisi suhu *annealing* 50°C dan menggunakan pasangan primer ITS5 dan ITS4 (Mulyatni, dkk., 2011). Hal ini menunjukkan suhu *annealing* yang cocok dan pasangan primer yang sesuai untuk *template* DNA sampel isolat fungi mempengaruhi produk PCR yang dihasilkan. Jika produk PCR yang dihasilkan baik maka analisa selanjutnya untuk sekuensing hingga filogenetiknya akan baik pula, sehingga spesies yang ingin diketahui akan lebih akurat hasilnya.

KESIMPULAN

Ekstraksi DNA kromosomal isolat fungi endofit LBKURCC67 berhasil dilakukan dari miselium berumur 4 hari dan berat molekul DNA kromosomalnya adalah 16.951 pb. Amplifikasi rDNA daerah ITS dari

isolat fungi endofit LBKURCC67 dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dapat dilakukan pada kondisi suhu *annealing* 41°C dan menggunakan pasangan primer ITS4 dan ITS5. Berat molekul hasil amplifikasi rDNA isolat fungi endofit LBKURCC67 adalah 583 pb.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Lembaga Penelitian Universitas Riau atas pemberian bantuan biaya riset melalui Dana Hibah Tim Pasca Sarjana DIKTI Tahun Anggaran 2013 dengan nomor kontrak 381/UN19.2/PL/2013 a.n. Prof. Dr. Saryono, M.S. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Bapak Prof. Dr. Saryono, M.S. dan ibu Prof. Titania T. Nugroho, Ph.D yang telah membimbing, memotivasi serta membantu penelitian dan penulisan karya ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Jamsari. 2007. *Bioteknologi Pemula Prinsip Dasar dan Aplikasi Analisis Molekuler*. UNRI Press, Pekanbaru.
- Kumala, S., Agustina, E., Wahyudi, P. 2006. Uji aktivitas antimikrob metabolit sekunder kapang endofit tanaman trengguli (*Cassia fistula* L). *Jurnal Bahan Alam Indonesia ISSN. 2 (6)*: 46-48.
- Lestari, S. 2014. Isolasi dan uji kualitatif enzim amilase, katalase, dan inulinase jamur endofit dari umbi tanaman dahlia (*Dahlia*

- variabilis*). *Skripsi*. Jurusan Kimia FMIPA. Universitas Riau. Pekanbaru.
- Mulyatni, A. S., Priyatmojo, A., Purwantara, A. 2011. Sekuen *Internal Transcribed Spacer* (ITS) DNA ribosomal *Oncobasidium theobromae* dan jamur sekerabat pembeding. *Menara Perkebunan*. **79** (1): 1-5.
- Putra, G. P. D., Adiartayasa, W., Sritamin, M. 2013. Aplikasi teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) terhadap variasi gejala penyakit *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) pada beberapa jenis daun tanaman jeruk. *Jurnal Agroekoteknologi Tropika*. **2** (2): 2301-6515.
- Pharmawati, M. 2009. Optimalisasi ekstraksi DNA dan PCR-RAPD pada *Grevillea* spp. (*Proteaceae*). *Jurnal Biologi*. **8** (1): 12-16.
- Purnamasari, M. I., Prihatna, C., Gunawan, A. W., Suwanto, A. 2012. Isolasi dan identifikasi secara molekuler *Ganoderma* spp. yang berasosiasi dengan penyakit busuk pangkal batang di kelapa sawit. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. **8** (1): 9-15.
- Radji, M., Nugraheni, F. A., Sumiati, A. 2009. Molecular identification of endophytic fungi isolated from *Garnicia porrecta* and *Garnicia forbesii*. *Jurnal Farmasi Indonesia*. **4**: 156-160.
- Suryadi, A.E. 2007. Ekstraksi dan uji aktivitas antimikrob ekstrak umbi dahlia (*Dahlia variabilis*). *Skripsi*. Jurusan Kimia FMIPA. Universitas Riau. Pekanbaru.
- Wang, Y., Bruno, L. C., Zang, X. G. 2008. Two new species of *Ulocladium* from Southwest China. *Mycologia*. **100** (3): 455-459.
- White, T. J., Burns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. In: *PCR protocol: A guide to methods and applications* (Eds: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J.) Academic Press, San diego, California, 315-322.