

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang sangat potensial untuk pengembangan obat herbal yang berbasis pada tumbuhan. Sekitar 25.000-30.000 spesies tumbuhan yang merupakan 10% tumbuhan dunia dan 90% tumbuhan di asia, sebanyak 7.000 spesies dari jumlah tersebut digunakan masyarakat Indonesia sebagai bahan baku obat (Dolok et al., 2023). Berbagai obat bahan alam biasa diguna-kan secara populer berasal dari suku Zingiberaceae, seperti jahe, kunyit, dan temulawak (Destryana et al., 2024).

Pemanfaatan tumbuhan sebagai obat juga banyak digunakan oleh sebagian masyarakat di Provinsi Papua, salah satunya di kabupaten yang terletak di Teluk Cendrawasih yaitu Kabupaten Biak. Salah satu tumbuhan yang dimanfaatkan masyarakat Biak sebagai bahan pengobatan tradisional adalah tumbuhan Sampare (*Glochidion philippicum* (Cav.) C.B. Rob.) . *G. philippicum* merupakan salah satu tumbuhan yang berada di Provinsi Papua dari keluarga Euphorbiaceae yang dimanfaatkan secara tradisional oleh masyarakat lokal sebagai obat untuk penyakit malaria (Khairuddin et al., 2021). Kelompok *Glochidion* juga memiliki banyak manfaat lain di bidang medis, diantaranya sebagai obat disentri, diare, batuk, dan perlindungan kulit (Linh et al., 2024). Berdasarkan hasil skrining fitokimia, simplisia dan ekstrak daun *G. philippicum* mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan quinon. Daun *G. philippicum* juga memiliki aktivitas sitotoksik dan antijamur (Oktalia et al., 2017). Sampai saat ini belum ada laporan penelitian mengenai isolasi senyawa aktif spesifik daun *G. philippicum*.

Ekstraksi dan pemurnian zat metabolit aktif dari tanaman membutuhkan biomassa yang besar, sehingga untuk mengurangi hal tersebut, dapat dilakukan dengan mengisolasi mikroba endofit pada bagian tanaman yang dapat memproduksi senyawa aktif (Baron and Rigobelo, 2022). Untuk mengatasi hal tersebut, dapat



aksi fungi endofit dari tanaman sehingga menjadi lebih banyak ekstraksi tanamannya (Asomadu et al., 2024).

anaman telah dimanfaatkan secara luas hingga skala industri, di diambil dan digunakan sebagai bahan kimia pertanian, antibiotik,

antioksidan (Baron and Rigobelo, 2022; Mamangkey et al.,

2022). Senyawa-senyawa yang diisolasi dari jamur endofit juga teridentifikasi pada beberapa spesies tumbuhan serta menunjukkan aktivitas biologis yang serupa meskipun ada yang diisolasi dari sumber yang berbeda, sehingga mengukuhkan jamur endofit sebagai alternatif sumber senyawa bioaktif (Mamangkey et al., 2022; Singh and Kumar, 2023). Beberapa metode identifikasi molekuler yang dikenal saat ini, antara lain, analisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*) konvensional, PCR real time, dan Microsatellite Analysis. Identifikasi molekuler dengan metode PCR dapat dilakukan dengan menggunakan ITS (*Internal Transcribed Spacer*) ribosomal DNA (rDNA). Sekuen rDNA region ITS memiliki variasi sekuen relatif tinggi pada gen rDNA tiap spesies, sehingga sangat baik digunakan untuk identifikasi tingkat genus hingga spesies. Isolasi DNA dan amplifikasi PCR pada daerah ITS rDNA merupakan tahap awal yang perlu dilakukan dalam identifikasi molekuler (dos Reis, Lorenzi, and do Vale 2022; Mishra et al. 2017; Singh et al. 2020)

Berdasarkan uraian di atas, maka akan dilakukan identifikasi molekuler untuk mengidentifikasi spesies fungi endofit dari tanaman *G. philippicum* dengan metode PCR.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah fungi endofit daun *Glochidion philippicum* (Cav.) C.B.Rob. memiliki aktivitas sebagai antibakteri? Bagaimana identifikasi fungi endofit daun *Glochidion philippicum* (Cav.) C.B.Rob. secara molekuler dengan menggunakan ITS (*Internal Transcribed Spacer*)?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri dan mengidentifikasi fungi endofit fungi endofit daun *Glochidion philippicum* (Cav.) C.B.Rob. secara molekuler dengan menggunakan ITS (*Internal Transcribed Spacer*).

1.4 Manfaat Penelitian



Salah satu manfaat penelitian ini untuk menginformasikan mengenai aktivitas endofit sekaligus mengidentifikasi spesies fungi endofit pada daun sehingga dapat dimanfaatkan sebagai kandidat sumber metabolit antibiotika masa depan.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Tanaman

Sampare (*Glochidion philippicum* (Cav.) C.B.Rob.) adalah tumbuhan khas Papua yang tumbuh di liar di hutan. Tumbuhan ini merupakan salah satu tumbuhan dari keluarga Euhorbiaceae yang dikenal secara tradisional oleh masyarakat lokal dapat menyembuhkan penyakit malaria (Khairuddin dkk, 2021). *G. philippicum* dapat tumbuh subur di daerah beriklim hutan tropis, dengan habitat ditanah yang agak kering, gembur, dilahan terbuka, dikebun, diladang atau di tepi jalan, mulai dari dataran rendah sampai ketinggian berkisar 8-5 m dpl. Beberapa penelitian menunjukkan simplisia dan ekstrak daun *G. philippicum* mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan quinon, serta memiliki aktivitas sitotoksik, antibakteri dan antijamur (Khairuddin dkk., 2021; Manurung, 2020; Oktalia dkk., 2017).



Gambar 1. Tanaman *G. philippicum*
(Khairuddin et al., 2021)



1. Taksonomi Tanaman *G. philippicum*

Regnum : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Classis : Magnoliopsida

Ordo : Euphorbiales

Familia : Phyllanthaceae

Genus : Glochidion

Species : *Glochidion philippicum* (Cav.) C.B.Rob. (Khairuddin et al., 2021)

2. Habitat dan Morfologi Tanaman *G. philippicum*

Hutan berdaun lebar yang selalu hijau; pada ketinggian dari 100 - 1.500 meter. Tanaman ini kebanyakan tumbuh di Asia - China, Taiwan, Malaysia, Indonesia, Philippines to New Guinea, Australia bagian utara, dan Pulau Solomon. (Jackes & Robertson, 2022)



Gambar 2. Morfologi tanaman *G. philippicum* (Jackes & Robertson, 2022)

Pohon kecil ini memiliki cabang yang menyebar luas dan daunnya dipikul secara bergantian di sepanjang cabang, berada di satu tempat diatur secara spiral. Karena banyak cabang tampak pendek, mereka sering disalahartikan sebagai daun an bawah daun puber. Bunga-bunga yang tidak signifikan kelompok di ketiak, ini diikuti oleh lobus tertekan, buah bergaris ai roda kecil keju atau, labu biru Queensland kecil, hijau keabu-15 lobus kecil. Saat bagian luar terbelah maka akan keluar biji



berwarna jingga sampai merah, warnanya karena aril. Tanaman ini disebarkan di kampus oleh burung yang memakan bijinya. (Jackes & Robertson, 2022)

3. Kandungan Kimia Tanaman *G. philippicum*

Beberapa penelitian menunjukkan simplisia dan ekstrak daun *G. philippicum* mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan quinon, serta memiliki aktivitas sitotoksik, antibakteri dan antijamur (Khairuddin dkk., 2021; Manurung, 2020; Oktalia dkk., 2017).

4. Kegunaan dan Khasiat Tanaman *G. philippicum*

Glochidion philippicum merupakan tanaman yang belum banyak dieksplorasi di bidang farmasi, sehingga data mengenai kegunaan tanaman secara farmakologis masih sangat sedikit. Beberapa data yang ditemukan dari family Glochidion ini adalah secara tradisional digunakan oleh masyarakat lokal sebagai obat untuk penyakit malaria.

2.2 Mikroba Endofit

Mikroba endofit merupakan mikroorganisme yang berkoloni interseluler atau intraseluler dalam tanaman yang sehat tanpa menimbulkan gejala atau penyakit pada inangnya dengan melindungi inang dari patogen, hama, dan serangga dengan mensintesis metabolit bioaktif. Fungi endofit merupakan fungi yang hidup didalam jaringan tumbuhan (Inangnya) tanpa menimbulkan gejala atau penyakit pada jaringan tumbuhannya. Fungi endofit dapat ditemukan pada tumbuhan dan dapat diisolasi dari daun, batang, bunga, buah, dan biji . Jamur endofit merupakan hal yang menarik, dikarenakan potensinya sebagai sumber metabolit sekunder dan terbukti berguna untuk penemuan obat yang baru (Ababutain et al., 2021; Fitriarni and Kasiamdari, 2018; Phukan et al., 2018).

2.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah metode analisis sederhana yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi senyawa kimia dalam tumbuhan, selain dari



LT merupakan jenis kromatografi cair-padat. Fase diamnya dapat ca atau logam yang dilapisi dengan silika gel, aluminium oksida, elulosa, pati poliamida, atau Saphadex. Campuran yang akan sikan sebagai bercak atau pita pada fase diam tersebut (Coskun,

Proses kromatografi dilakukan dalam sebuah bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang dalam kondisi jenuh. Setelah proses pengembangan selesai, lempeng kromatogram diambil dan dikeringkan, kemudian disemprot dengan reagen penampak bercak. Posisi bercak pada lempeng dinyatakan dengan nilai Rf atau hRf ($hRf = 100 \times \text{nilai Rf}$). Nilai Rf adalah rasio antara jarak yang ditempuh oleh senyawa dari titik asal dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut dari titik asal. Nilai Rf dan warna noda yang diperoleh pada KLT dapat memberikan identifikasi senyawa yang terkandung (Kowalska and Sajewicz, 2022; Pyka, 2014).

Deteksi bercak dengan cara fisika, digunakan sinar UV. Pendeteksi dengan menggunakan sinar UV akan menghasilkan penampakan senyawa yang mengalami fluoresensi. Senyawa yang mengabsorpsi sinar UV akan tampak sebagai daerah gelap dibawah UV. Panjang gelombang UV yang sering digunakan yaitu 254 nm (paling rendah) dan 366 nm (paling tinggi). Pada sinar UV 254 lempeng akan berfluoresensi sedangkan noda akan berwarna gelap karena adanya interaksi antara sinar UV dengan indikator fluoresensi yang terdapat pada lempeng. Pada sinar UV 366, noda akan berfluoresensi dan lempeng akan berwarna gelap karena adanya daya interaksi antara sinar UV dan gugus kromofor yang terikat oleh aksamokrom yang ada pada noda tersebut (Prabu et al., 2015; Qin et al., 2021; Singh and Kumar, 2023). Deteksi bercak dengan cara kimia, dengan mereaksikan bercak menggunakan pereaksi spesifik melalui penyemprotan lalu dipanaskan dengan tujuan untuk mengoksidasi sampel organik yang akan tampak sebagai bercak berwarna. Prinsip penampakan noda pereaksi semprot spesifik H_2SO_4 10% adalah berdasarkan kemampuan asam sulfat yang bersifat reduktor dalam merusak gugus kromofor dari zat aktif simplisia sehingga panjang gelombangnya akan bergeser kearah yang lebih panjang (UV menjadi Vis) sehingga noda menjadi tampak oleh mata. Dan juga digunakan pereaksi semprot $FeCl_3$ yang berfungsi sebagai pereaksi spesifik terhadap senyawa fenol, dimana warna yang dihasilkan adalah warna hijau, biru atau hitam (LibreTexts Chemistry, 2024; Singh and Kumar, 2023)



Genetik Fungi

merupakan bagian ilmu yang mempelajari tentang hubungan antara berbagai macam organisme dengan menganalisis molekul organisme. Analisis ini dilakukan untuk mencari hubungan *family* dalam dunia mikroba terutama bakteri dan fungi yang telah terdata sebelumnya.

1. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA genom dilakukan dengan mengikuti protokol ekstraksi DNA yang terdapat dalam Qiyagen® Kit. Kultur semalam sel fungsi yang diinokulasi dalam medium cair digunakan untuk ekstraksi DNA.

2. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase Chain Reaction (PCR) digunakan untuk mengamplifikasi sekuens DNA genom. DNA genom ini digunakan sebagai template awal yang cukup untuk sekuensing. Terdapat 3 langkah utama dalam *PCR* yaitu denaturasi, pelekatan, dan ekstensi. Hal ini membutuhkan beberapa komponen cetakan DNA, dua primer, Taq polymerase, dNTP yang merupakan blok bangunan untuk sintesis DNA baru dengan bantuan DNA polimerase, larutan buffer, kation divalen, dan kation monovalen.

3. Elektrofesis Gel Agarosa

Elektrofesis gel agarosa adalah metode yang digunakan untuk memisahkan fragmen DNA berdasarkan ukuran atau pemisahan protein berdasarkan muatan. Molekul asam nukleat dipisahkan dengan menerapkan medan listrik untuk memindahkan molekul bermuatan negatif melalui matriks agarosa. Molekul yang lebih pendek bergerak lebih cepat dan bermigrasi melalui pori-pori gel. Pewarna ethidium bromida akan menginterkalasi antara pasangan-pasangan DNA dan berpendar dengan pita DNA berwarna orange di bawah pencahayaan UV dan bersifat karsinogenik.

4. Purifikasi Produk PCR

Langkah pemurnian produk PCR digunakan untuk memurnikan produk PCR hasil amplifikasi berupa untai tunggal atau untai ganda dari komponen lain yang terikat dalam reaksi, seperti kelebihan primer, nukleotida, DNA polimerase, minyak dan garam.

5. Analisis Sekuens Gen ITS rDNA

Sekuens gen ITS rDNA dari strain terisolasi ditentukan setelah ekstraksi DNA genomic dan amplifikasi PCR. Perbandingan urutan dengan strain homolog di



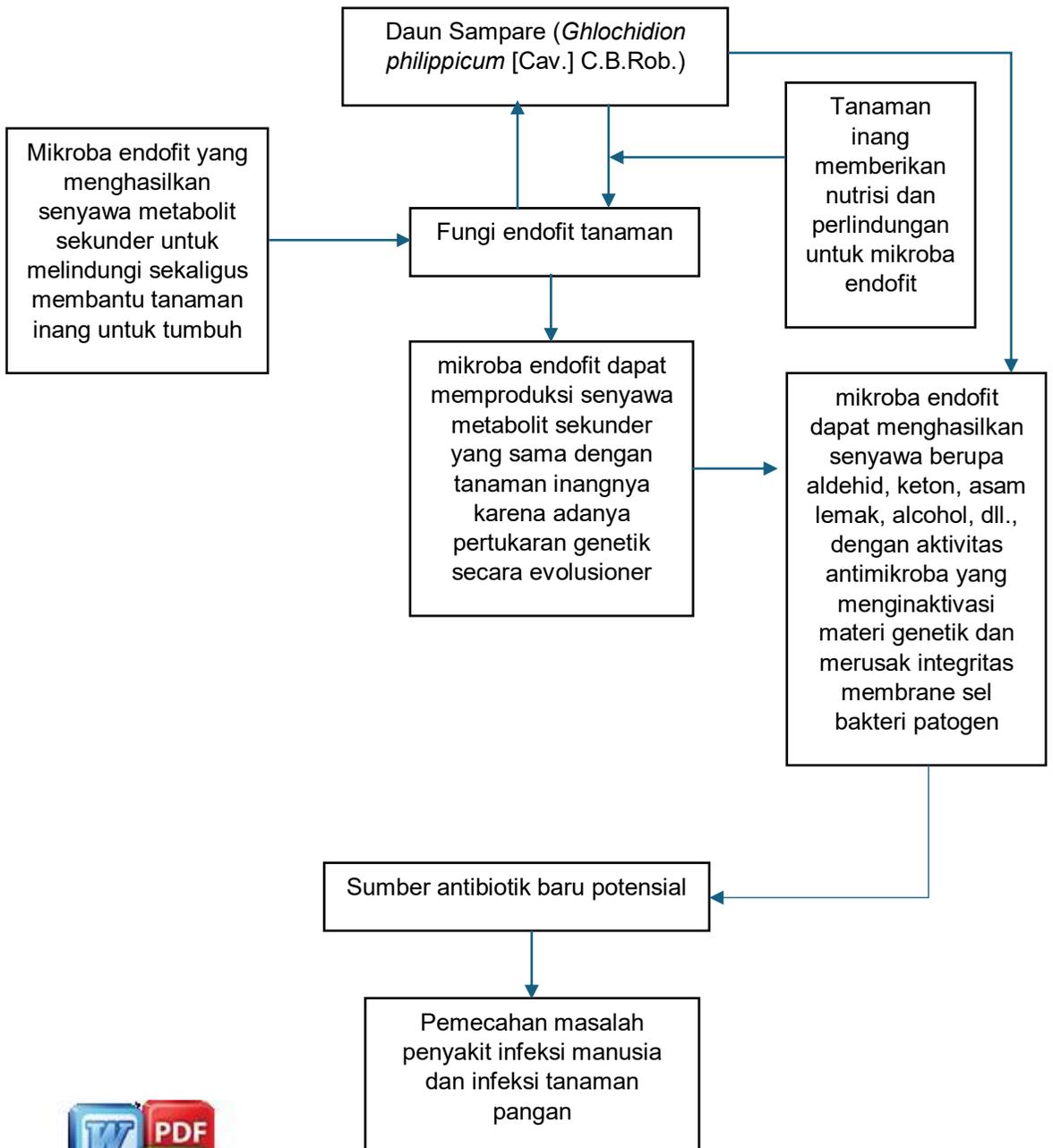
1 dengan menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* genetik disimpulkan dari *BLAST* di *National Center Biotechnology*

Penggunaan sekuens gen ITS rDNA untuk mempelajari filogeni ni sejauh ini merupakan penanda genetik yang paling umum jumlah alasan, seperti (i) kehadirannya di hampir semua fungi,

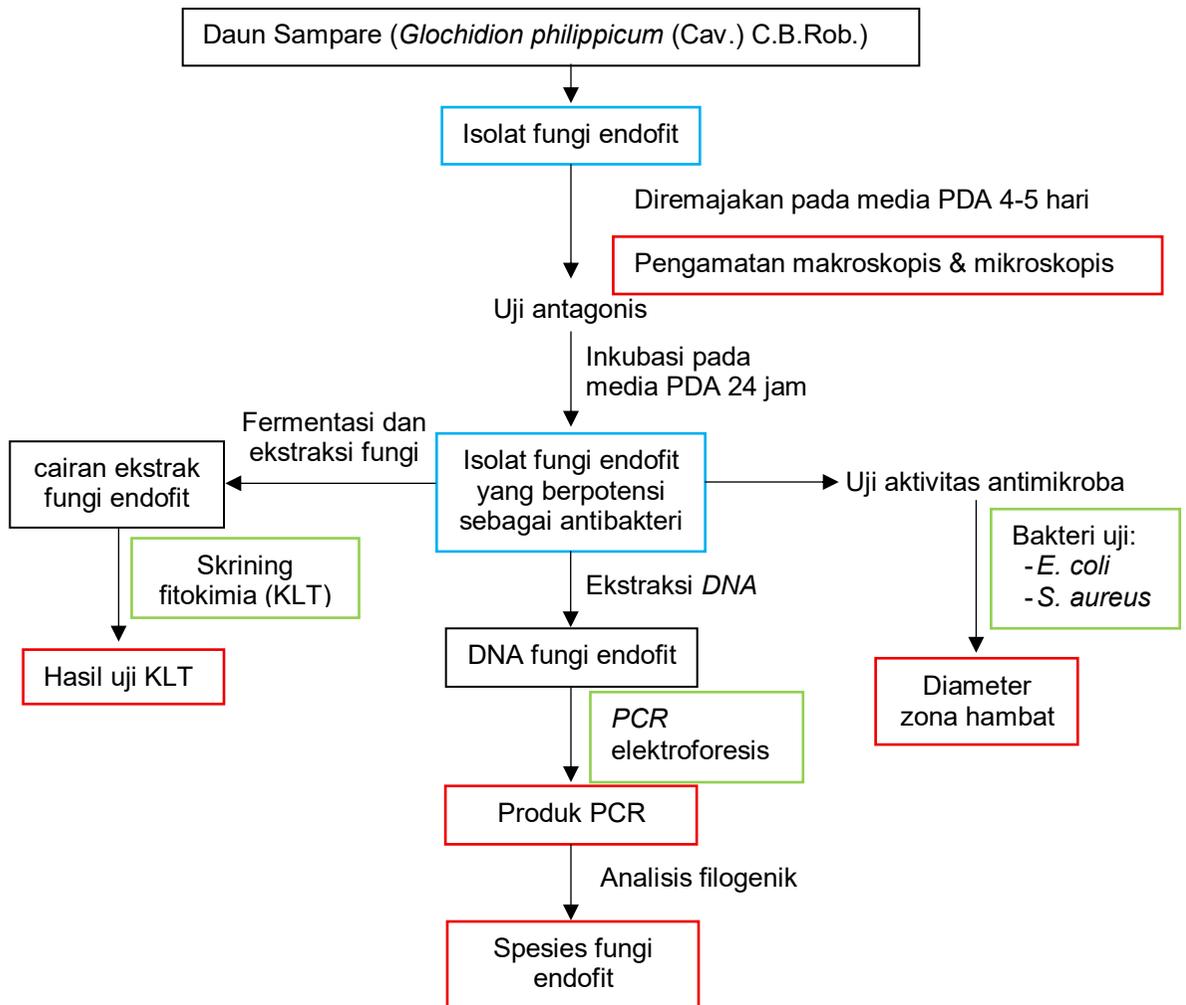
sering sebagai sebuah keluarga multigene, atau operon; (ii) fungsi gen ITS rDNA dari waktu ke waktu tidak berubah, menunjukkan bahwa perubahan urutan random merupakan ukuran yang lebih akurat dari waktu (evolus); (iii) gen ITS rDNA (1.500 bp) yang cukup besar untuk tujuan informatika.



2.5 Kerangka Teori



2.6 Kerangka Konsep



Keterangan:

Variabel bebas

erikat

ontrol



Optimized using
trial version
www.balesio.com