

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Ageratum conyzoides L. yang dikenal dengan nama daerah babadotan di Indonesia, merupakan salah satu tumbuhan herba yang banyak mendapat perhatian oleh para peneliti saat ini, karena *A. conyzoides* merupakan tumbuhan yang tumbuh tersebar di daerah tropis. *A. conyzoides* L. sudah sangat populer digunakan sebagai tanaman obat, misalnya saja di Afrika Tengah *A. conyzoides* digunakan sebagai obat pneumonia, di India spesies ini digunakan sebagai anti-bakteri, anti-fungi, anti-disentri dan anti-lisis, sedangkan di Asia, Amerika Selatan dan Afrika, ekstrak aqueous dari tumbuhan ini digunakan untuk anti-mikroba (Ming, 1999).

A. conyzoides L. secara luas telah banyak diteliti di berbagai negara dalam bidang kesehatan diantaranya adalah Afrika, Amerika Selatan dan India. Penelitian di berbagai daerah ternyata memiliki perbedaan hasil dan aplikasinya sebagai tanaman obat, di Indonesia sendiri penelitian ini masih sedikit dilakukan, padahal jenis tumbuhan ini mudah di jumpai di Indonesia. Menurut Suganda (2008), aktivitas biologi dan kandungan senyawa kimia (metabolit sekunder) yang ada pada tumbuhan secara kualitas dan kuantitas tidak terlepas dari berbagai macam faktor lingkungan tempat tumbuh seperti: faktor biotik, tanah dan nutrisi, air, temperatur, cahaya dan ketinggian tempat tumbuh.

Akar *A. conyzoides* L. mengandung senyawa kimia terpenoid yang terdiri dari *Ageratochromene* (*precocene 2*), dan *7-methoxy-2,2-dimethylchromene* (*precocene 1*). Ekstrak akar *A. conyzoides* L. juga mengandung senyawa fenolik yang terdiri dari Flavonoid *1-(7-hydroxy-5-methoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-yl)*. Ekstrak metanol dan ekstrak alkaloid akar tumbuhan *A. conyzoides* dapat menghambat pertumbuhan mikroba patogen seperti *Staphylococcus aureus* (Desiarianty, 2009 & Utami, 2011). Menurut Long *et al.* (2003), aktivitas bakteri patogen juga dapat di hambat oleh bakteri (mikroorganisme) yang hidup di dalam jaringan tumbuhan yang dihuninya, yang umumnya dikenal dengan sebutan bakteri endofit. Bakteri endofit ini juga dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang sama seperti senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tumbuhan inangnya (Khaerani, 2009). Endofit masuk ke dalam jaringan tanaman umumnya melalui akar atau bagian lain dari tanaman (Carrol, 1988). Pada situasi ini tanaman merupakan sumber makanan bagi mikroorganisme endofit dalam melengkapinya siklusnya (Clay, 1988).

Pada umumnya bakteri endofit tersebut dipelajari melalui bentuk morfologi, struktur sel, dan sifat biokimia dengan cara isolasi dan karakterisasi melalui kultur (Reeve, 1994; Yusuf *et al.*, 2002). Permasalahan yang dihadapi ialah tidak semua jenis mikroba dapat dikultur. Persentase jumlah mikroba yang dapat dikulturkan hanya sebesar satu persen (1%) dari total populasi mikroba yang ada di alam (Suwanto, 1994; Yusuf *et al.*, 2002). Kegagalan teknik kultivasi, terutama disebabkan karena kebutuhan nutrisi dan kondisi pertumbuhan bakteri sangat beragam dan kebergantungan intrinsik dari berbagai

mikroorganisme (Felske *et al.*, 1998; Yusuf *et al.*, 2002), padahal jenis mikroba yang belum bisa dikulturkan juga merupakan komponen utama dari komunitas mikroba secara keseluruhan. Oleh karena itu teknik kultivasi tidak dapat dijadikan sebagai standar untuk mempelajari keragaman bakteri (Borneman *et al.*, 1996; Yusuf *et al.*, 2002).

Primer 16S rDNA adalah subunit ribosom yang dapat digunakan sebagai penanda, pembeda dan sebagai *evolutionary marker* pada bakteri (Richana *et al.*, 2008). Gen 16S rDNA merupakan pilihan karena gen tersebut terdapat pada semua prokariota dan memiliki sekuen konservatif serta sekuen lainnya yang sangat bervariasi pada tiap spesiesnya (Madigan *et al.*, 1997). 16S rDNA dapat digunakan sebagai penanda molekuler karena molekul ini bersifat ubiquitus dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme. Molekul ini juga dapat berubah sesuai jarak evolusinya, sehingga dapat digunakan sebagai kronometer evolusi yang baik. Molekul 16S rDNA memiliki beberapa daerah yang memiliki urutan basa yang relatif konservatif dan beberapa daerah urutan basanya variatif. Perbandingan urutan basa yang konservatif berguna untuk mengkonstruksi pohon filogenetik universal karena mengalami perubahan relatif lambat dan mencerminkan kronologi evolusi bumi. Sebaliknya, urutan basa yang bersifat variatif dapat digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan galur-galur dalam satu spesies. Jika urutan basa 16S rDNA menunjukkan derajat kesamaan yang rendah antara dua taksa, deskripsi suatu takson baru dapat dilakukan tanpa hibridisasi DNA-DNA (Stackebrandt & Goebel, 1995).

Untuk keperluan analisis keragaman bakteri berdasarkan gen 16S rDNA perlu dilakukan tahap kloning. Tahap ini merupakan pengerjaan yang mempunyai tingkat kesulitan tinggi. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang kloning, diantaranya kloning gen 16S rDNA. Berdasarkan latar belakang di atas, maka perlu dilakukan dan dikembangkan penelitian **“Kloning Gen 16S rDNA Bakteri Endofit Akar *Ageratum conyzoides* L.”**.

B. Rumusan Masalah

Bagaimanakah tingkat keberhasilan kloning gen 16S rDNA Bakteri endofit akar *Ageratum conyzoides*?

C. Pertanyaan Penelitian

1. Bagaimana efisiensi transformasi DNA bakteri endofit akar *A. conyzoides* yang diisolasi dari daerah yang ternaungi dengan DNA bakteri endofit akar *A. conyzoides* yang diisolasi dari daerah yang tidak ternaungi pada bakteri *E. coli* DH5 α ?
2. Bagaimanakah verifikasi hasil kloning bakteri endofit akar *A. conyzoides* yang telah ditransformasikan ke dalam bakteri *E. coli* DH5 α ?

D. Batasan Masalah

Penelitian ini dibatasi pada hal-hal sebagai berikut :

1. Isolasi bakteri endofit di ambil dari sampel akar *A. conyzoides* L. yang tumbuh di daerah yang ternaungi (di bawah *covering*) dan *A. conyzoides* yang tumbuh di daerah yang tidak ternaungi di kebun botani UPI.
2. Metode isolasi yang digunakan adalah isolasi DNA langsung dari alam (*unculturable method*).
3. Penanda genetik yang digunakan adalah penanda 16S rDNA.
4. Primer yang digunakan amplifikasi gen 16S rDNA adalah 63f dan 1387r (Marchesi *et al.* 1998).
5. “Cloning vector” yang digunakan adalah pGEMT *Easy*

E. Tujuan

Berdasarkan judul penelitian diatas, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberhasilan hasil kloning gen 16S rDNA bakteri endofit akar *A. conyzoides* L.

F. Manfaat

Hasil penelitian ini dapat digunakan untuk mengetahui keragaman bakteri di alam melalui analisis filogeni molekuler.

G. Asumsi

1. Tidak semua bakteri dapat dikulturkan (Suwanto, 1994; Yusuf *et al.*, 2002).

2. Aplikasi molekuler dapat digunakan untuk melihat keragaman mikroba (Madigan *et al.*, 1997).
3. Primer *63-forward* dan *1387-reverse* dapat digunakan untuk memperbanyak gen 16S rDNA (Marchesi, 1998).

