

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1.Latar Belakang

Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama di seluruh dunia. Pada tahun 2012, sekitar 8,2 juta kematian disebabkan oleh kanker. Angka ini terus meningkat sebesar rata-rata 2.2% hingga tahun 2014 (Cronin, *et.al.*, 2018). Kanker paru, hati, perut, kolorektal, dan kanker payudara adalah penyebab terbesar kematian akibat kanker setiap tahunnya (Kemenkes RI, 2015; Cronin, *et.al.*, 2018). Kanker adalah istilah umum untuk mendefinisikan sejumlah penyakit yang ditandai oleh proliferasi sel tidak terkendali. Gangguan ini dihasilkan dari disfungsi jalur pengaturan sinyal pembelahan sel yang biasanya di bawah kontrol ketat. Kanker dapat menyebar dengan cepat dan menyerang jaringan dan organ (McCauley *et al.*, 2013).

Banyak obat antikanker yang digunakan dalam upaya penyembuhan kanker ataupun hanya sekedar peningkatan kualitas hidup penderita. Produk alami yang paling sering digunakan untuk mengobati berbagai penyakit kanker pada manusia yang telah berhasil diisolasi dari tanaman diantaranya *camptothecin*, *vincristine*, *vinblastine*, *taxol*, *podophyllotoxin*, *combretastatins*, dan lain-lain (Srivastava, *et.al.*, 2005). Semua senyawa aktif tersebut memiliki *mode of action* yang berbeda-beda dengan efek samping yang berbeda-beda pula. Taxol ditemukan sebagai senyawa yang paling ringan menimbulkan efek samping meskipun penggunaannya setiap hari dan kadarnya dinaikkan dengan batas ambang tertentu. *Myelosuppression* sebagai dampak yang sering ditemukan pada penggunaan obat kanker, ditemukan lebih ringan saat diakibatkan oleh penggunaan taxol jika dibandingkan dengan senyawa lain yang memiliki daya antiproliferasi sel yang sama. Pada penggunaan terapi dengan *camptothecin* misalnya, sering terjadi *hemorrhagic* setelah pemakaiannya. Sedangkan, efek penggunaan harian taxol hanya berkisar kesemutan pada ujung jari, mual, dan mati rasa. Adapun gejala *myelosuppression* masih

mampu diatasi oleh sistem tubuh sendiri dengan kehadiran *granulocyte colony-stimulating factor* sebagai protein penstimulus produksi leukosit dan trombosit pada sumsum tulang (Srivastava, *et.al.*, 2005). Federal Drug Administration (FDA) kemudian menjadikan taxol sebagai standar baku obat yang bisa digunakan dalam kemoterapi semua jenis kanker (McCauley *et al.*, 2013).

*National Cancer Institution* (NCI) di Amerika Serikat pada akhir 1950-an telah melakukan ekstraksi taxol dari kulit pohon *Taxus brevifolia* yang dikenal dengan nama dagang Paclitaxel. Struktur kimianya ditentukan tiga tahun kemudian. Di tahun-tahun berikutnya Paclitaxel ditunjukkan secara biologis aktif melawan Melanoma B16 hingga dikomersilkan untuk pengobatan kanker payudara dan ovarium. Penelitian terus berlanjut dan terbukti bahwa taxol memiliki efektivitas tinggi terhadap pencegahan proliferasi sel-sel tumor pada usus, rektum, karsinoma, saluran pernafasan, paru-paru, kulit, dan lain-lain. Setelah lebih dari sepuluh tahun digunakan pada bidang kesehatan, aplikasi pengobatannya semakin meluas hingga dapat mengobati AIDS jika dikombinasikan dengan obat lainnya (Yuan, *et.al.*, 2006).

Seiring dengan berkembangnya penelitian dan pengetahuan terkait kemampuan antikanker dari taxol, permintaan pun menjadi semakin tinggi. Namun sayangnya, produksi taxol dari satu pohon *Taxol* sangat rendah sekali. Pada 0.0001%–0.008% berat kering kulit batang pohon yang berumur 100 – 200 tahun hanya dapat menghasilkan 0.015% taxol, atau dengan kata lain untuk menghasilkan 1 kg taxol dibutuhkan 7.000 kg kulit batang *Taxus* yang setara dengan 2.000–2.500 pohon (Yuan, *et.al.*, 2006). Padahal, seorang pasien penderita kanker memerlukan 2–2.5 g *Taxol* atau setara dengan sekitar 6–8 pohon *Taxus* (Malik *et al.*, 2011) pada sekali pengobatan. Meskipun, tidak hanya kulit batang dan rantingnya saja yang mampu menghasilkan senyawa taxol, akar, dan daunnya pun memiliki kemampuan yang sama (Shen *et al.*, 2000).

Taxol hanya dihasilkan dari genus *Taxus* saja (Kikuchi dan Yatagai, 2003). Padahal, *Taxus* merupakan pohon kelompok Gymnospermae dan berumah dua (dioecious) sehingga memiliki fase regenerasi dan pertumbuhan yang lambat dengan persebaran alami yang terbatas. Menurut Hidayat *et.al.* (2014) bahkan persebaran spora dari kanus *Taxus* sering mengalami keterhambatan dibandingkan jenis konifer lainnya sehingga persebarannya semakin terbatas. Di wilayah Asia saja hanya beberapa negara yang memilikinya yakni *Taxus cuspidata* di Jepang, *Taxus chinensis* di Cina, dan *Taxus sumatrana* di Indonesia, Taiwan, Vietnam, Nepal, dan Tibet dengan kesuluruhannya memasuki status terancam punah (Huang *et al.*, 2007).

*Taxus* memiliki biji dengan ukuran kecil dan keras merupakan karakter jenis pengisi “soil seed bank”. Tipe ini memiliki masa dormansi yang sangat panjang. Pada penelitian Susilo (2012) yang memperbanyak *Taxus* melalui biji dan cangkok pucuk secara eksitu, tidak didapatkan satupun biji yang berkecambah ataupun stek yang berkembang selama satu tahun masa percobaan. *Taxus* menjadi salah satu yang paling sulit dikembangbiakan dari semua jenis Gymnospermae (Susil, 2012). Dengan demikian, dibutuhkan metode lain dalam pengambilan senyawa taxol ini yakni dengan kapang endofit.

Kapang endofit merupakan mikroba yang hidup di jaringan internal tumbuhan yang tidak menyebabkan kerusakan bagi inang. Telah banyak penelitian yang mengungkapkan bahwa mikroba endofit mampu mensintesis metabolit tertentu yang dihasilkan oleh tumbuhan inang (Kuncora dan Sugiarto, 2011). Penelitian tentang kapang endofit *Taxus sumatrana* pernah dilakukan oleh beberapa peneliti. Namun, penelitian terkait kapang endofit *Taxus sumatrana* untuk produksi Taxol belum pernah dilaporkan. Hal ini memberikan peluang besar untuk meneliti hal tersebut.

Berbagai metode untuk mendapatkan bahan aktif melalui proses fermentasi dan *screening* banyak dikembangkan untuk mempermudah

manusia dalam menemukan senyawa bioaktif yang bermanfaat, terutama zat anti kanker. Tetapi, metabolit sekunder yang berkemungkinan terdapat di dalam kapang endofit tidak dapat semua terekspresikan pada semua kondisi kultur maupun lingkungan asalnya dikarenakan suatu sistem gen yang bisa memblok atau disebut *knock out*. Genom jamur dapat mengungkapkan kandungan metabolit yang lebih banyak dari kluster gen biosintesis metabolit sekunder. Maka pendekatan dengan sistem genomik ini menjadi peluang besar dalam identifikasi metabolit di dalam kapang endofit *T.sumatrana*. Pendekatan genomik memiliki banyak keunggulan yaitu lebih akurat, cepat, ekonomis dan tidak dipengaruhi faktor lingkungan. (Jeewon, *et. al.*, 2013). Pendekatan genomik untuk *screening* kapang endofit penghasil taxol banyak dilakukan oleh para peneliti dan berkesimpulan bahwa teknik genomik merupakan teknik terbaik dalam *screening* metabolit kapang. (Zhang *et. al.*, 2008).

Pendekatan ini dilakukan melalui metode-metode molekuler yakni isolasi DNA, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), elektroforesis, dan sikuensing (Roppa, *et.al.*, 2016). Pada penelitian ini, metode PCR menjadi metode utama untuk mengetahui keberadaan gen penghasil taxol yang divalidasi dengan teknik sikuensing. Proses validasi dimaksudkan untuk mengetahui bagian sikuen yang teramplifikasi dan tergambarakan melalui pita elektroforesis apakah benar gen sasaran atau bukan. Adapun gen yang dimaksud dalam penelitian ini adalah Baccatin III 3-Amino 3-Phenylpropanoid (BAPT).

Gen penanda ini digunakan setelah diketahui gen-gen kunci pensintesis senyawa taxol. Senyawa prekursor bermula akan mensintesis gen TS dan menghasilkan enzim taxa-4(5), 11(12)-diene sintase (ts). Dua enzim kunci lainnya yakni debenzoyltaxane-2'- $\alpha$ -O-benzyol transferase (dbat) dan baccatin III 13-O-(3-amino-3-phenylpropanoyl) transferase (bapt) yang disintesis dari gen Baccatin III 3-Amino 3-Phenylpropanoid (BAPT) (Zhou *et al.*, 2007; Zhang *et al.* , 2008; Xiong *et al.*, 2013). Namun menurut Xiong *et al.* (2013), gen TS dan DBAT memang menjadi

gen esensial untuk menghasilkan taxol tetapi tidak dapat dijadikan diagnosis dalam produksi taksol. Hal ini disebabkan oleh enzim baccatin III yang telah mampu dihasilkan oleh gen DBAT harus ditambahkan terlebih dahulu ekor tambahan phenylpropanoid pada gugus C-13 untuk selanjutnya mensintesis enzim penghasil taxol (Walker, *et.al.*, 2001). Hal ini hanya dapat dilakukan oleh enzim BAPT. Selain itu, sintesis taxol pada kapang endofit dapat berkemungkinan melalui jalur sintesis yang lebih singkat dibandingkan dengan *Taxus* (Zhang, *et.al.*, 2008). Dengan hal ini, marka molekuler BAPT dapat menjadi indikator identifikasi gen penghasil taxol yang lebih akurat dibandingkan dengan marka molekul lainnya.

## 1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah, “Apakah gen Baccatin III 3-Amino 3-Phenylpropanoid terdeteksi pada kapang endofit yang diisolasi dari kulit batang *Taxus sumatrana* melalui pendekatan genomik?”

Dikembangkan juga beberapa pertanyaan penelitian yang didasarkan pada rumusan masalah tersebut, diantaranya Berapa macam kapang endofit yang berhasil diisolasi dari kulit batang *Taxus sumatrana*?

- 1.2.1. Bagaimana karakteristik morfologi kapang endofit yang diisolasi dari kulit batang *Taxus sumatrana*?
- 1.2.2. Isolat kapang endofit mana saja yang terdeteksi memiliki gen Baccatin III 3-Amino 3-Phenylpropanoid (BAPT)?
- 1.2.3. Bagaimana hubungan kekerabatan gen *bapt* dari kapang endofit *Taxus sumatrana* dengan kapang endofit yang memiliki gen BAPT lainnya?

## 1.3. Batasan Masalah

Penelitian yang akan dilakukan dibatasi berdasarkan hal berikut,

- 1.3.1. Kapang endofit yang diteliti berasal dari kultur kulit batang *Taxus sumatrana* yang dicuplik dari Kebun Raya Cibodas, Bogor, Jawa Barat

- 1.3.2. Kapang endofit dikultur dalam medium PDA (*Potato dextrose agar*), M1D, dan S7
- 1.3.3. Analisis DNA dilakukan berdasarkan isolasi DNA, amplifikasi sekuen DNA, elektroforesis, dan analisis bioinformatika.

#### **1.4. Tujuan Penelitian**

Tujuan yang ingin dicapai dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keberadaan gen Baccatin III 3-Amino 3-Phenylpropanoid sebagai penghasil taxol dari kapang endofit yang diisolasi dari kulit batang *Taxus sumatrana*.

#### **1.5. Manfaat Penelitian**

Hasil dari penelitian ini diharapkan mampu memberikan manfaat dalam bidang keilmuan sebagai berikut,

- 1.5.1. Memberikan kontribusi terkait penemuan Baccatin III 3-Amino 3-Phenylpropanoid sebagai penghasil taxol dari kapang endofit yang diisolasi dari kulit batang *Taxus sumatrana*
- 1.5.2. Memberikan informasi terkait isolasi dan keberadaan gen Baccatin III 3-Amino 3-Phenylpropanoid pada kapang endofit *Taxus sumatrana*

#### **1.6. Struktur Organisasi**

Secara umum, gambaran terkait isi skripsi ini dapat dilihat dalam struktur organisasi penyusunan skripsi berikut:

##### 1) Bab I Pendahuluan

Bab pendahuluan merupakan bab yang menjelaskan gambaran umum terkait alasan pengambilan judul, pengangkatan masalah, dan solusi yang diharapkan dapat mengatasinya. Ketiga hal tersebut dijelaskan melalui latar belakang masalah, rumusan masalah beserta pertanyaan penelitian dan batasan penelitian. Hal tersebut dimaksudkan dengan penjelasan terkait tujuan dan manfaat yang disajikan juga.

## 2) Bab II Kajian Pustaka

Bagian ini memberikan konteks yang jelas terhadap setiap permasalahan yang diangkat dan menjadi latar belakang penulisan melalui teori-teori dan temuan terdahulu dari sumber rujukan. Teori dan penemuan yang dijelaskan pada bab ini diantaranya terkait kapang mencakup ciri-ciri, klasifikasi, dan simbiosis yang terjadi pada kapang endofit; teori tentang *Taxus sumatrana* meliputi deskripsi, sebarana dan upaya konservasi, serta pemanfaat; serta teori terkait taxol yang meliputi jalur biosintesis, gen BAPT sebagai gen penanda molekuler, serta perkembangan metode-metode penapisan yang telah dilakukan.

## 3) Bab III Metode Penelitian

Bab ini menjelaskan metode prosuderal yang dilakukan di dalam penelitian dan dijelaskan secara terperinci mencakup jenis penelitian, populasi dan sampel, waktu dan lokasi penelitian, alat dan bahan, prosedur penelitian, teknik analisis data, dan alur penelitian yang dilakukan.

## 4) Bab IV Temuan dan Pembahasan

Pada bab ini, temuan penelitian diungkapkan melalui pengolahan dan analisis data sebagai hasil pengaplikasian prosedur penelitian pada Bab III. Disusun berdasarkan rumusan masalah dan pertanyaan penelitian yang telah dibuat dengan harapan tujuan yang ingin dicapai dapat terpenuhi. Setiap temuan yang dihasilkan, dianalisis dengan mempertimbangkan relevansi teori-teori yang sebelumnya.

## 5) Bab V Simpulan, Implikasi, dan Rekomendasi

Bab ini berisi simpulan yang berisi hasil temuan utama sebagai jawaban dari rumusan masalah dan pemaknaannya secara singkat. Selain itu, bab ini berisi implikasi dan rekomendasi sebagai pengajuan penulis akan hal-hal penting yang dapat dimanfaatkan dan peluang untuk dikembangkan pada penelitian selanjutnya.

