

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Angka kematian yang diakibatkan oleh kanker menduduki peringkat ke tiga di Indonesia bahkan ke dua di dunia (Dhama, dkk. 2013). Menurut data Kementerian Kesehatan RI terdapat sekitar 347.792 orang pada tahun 2013 yang didiagnosis dokter mengidap penyakit kanker (Kemenkes RI, 2015). Hal ini mendorong berbagai pihak untuk mengupayakan pengobatan penyakit kanker yang diawali oleh lembaga *National Cancer Institute* (NCI) di Amerika Serikat yang berfokus pada eksplorasi tumbuhan yang berpotensi sebagai sumber bahan aktif antikanker.

Senyawa organik atau bahan aktif yang terdapat pada tumbuhan akan secara alamiah dibentuk/dihasilkan melalui proses fisiologis dan metabolisme dalam sistem jaringan tumbuhan. Makhluk hidup akan membangun jaringan sebagai respons dalam menghadapi perubahan kondisi fisik dan lingkungannya dalam sebuah ekosistem. Hal ini diperlukan sebagai mekanisme untuk berkembang dan bertahan hidup (proteksi diri). Salah satu respons tersebut, yaitu dengan cara memproduksi senyawa organik yang bersifat aktif (Hanson, 2003).

Senyawa organik yang bersifat aktif (bioaktif) merupakan senyawa yang terkandung dalam tubuh hewan maupun tumbuhan yang memiliki efek fisiologis bagi kehidupan manusia. Prabowo, dkk. (2014) menyatakan bahwa penelitian tentang senyawa bioaktif telah banyak dilakukan untuk tujuan kesehatan manusia dan dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan, antibakteri, antiinflamasi, dan antikanker. Senyawa antikanker adalah zat yang mampu menunda, memperlambat, mengganggu dan mencegah perbanyakan sel kanker. Senyawa-senyawa bioaktif ini diproduksi dalam tubuh hewan dan tumbuhan untuk mempertahankan diri dari predator maupun perbaikan gen yang akan diturunkan ke generasi berikutnya.

Senyawa bioaktif ini umumnya merupakan metabolit yang sangat bermanfaat bagi manusia (Rimbawan, dkk. 2008).

Penelitian mengenai senyawa bioaktif dari tumbuhan yang berpotensi sebagai antikanker terus dilakukan hingga NCI dan USDA memperoleh hasil bahwa kelompok tumbuhan genus *Taxus* mengandung bahan aktif antikanker. Tumbuhan genus *Taxus* ini mengandung senyawa *Taxane* dari golongan diterpenoid yang terdapat pada seluruh bagian pohon dari Genus *Taxus*. Penelitian tentang senyawa *Taxane* dari pohon *Taxus* terus dilakukan hingga *Taxane* dinyatakan mampu membunuh sel kanker secara efektif dan efisien. Hal ini menjadikan senyawa *Taxane* populer dan dicari didunia. Hingga akhirnya senyawa *Taxane* ini dipatenkan oleh USDA dan terkenal sebagai Taxol.

Tingginya permintaan kebutuhan produksi bahan aktif Taxol tidak berbanding lurus dengan kelimpahan *Taxus*, penanaman pohon yang sangat lama menjadi salah satu kendala. Dari data yang diperoleh untuk mendapatkan 1 kg *Taxus* dibutuhkan sekitar 2000 pohon *Taxus* (Nicolaou, dkk. 1994). Penggunaan senyawa Taxol yang efektif dalam mengobati sel kanker menjadikan obat jenis ini sangat populer dalam dunia medis. Kondisi seperti ini memicu eksploitasi yang berlebihan terhadap genus *Taxus*. Untuk mengontrol status kelestarian jenis dari genus *Taxus*, jenis ini telah dimasukkan ke dalam Appendiks II CITES Ann. #10 (CITES, 2005).

Perkembangan penelitian genus *Taxus* sebagai salah satu sumber alternatif pengobatan kanker telah tercatat dengan baik. Perkembangan penelitian *Taxus* diawali dari penemuan genus *Taxus* sebagai sumber Taxol, distribusi dan status kelangkaan, proses isolasi dan ekstraksi, pengembangan teknik budi daya dan kultur sel, sampai dengan pemanfaatan kalus dan jamur endofitik sebagai sumber alternatif Taxol. Hal ini pertama kali ditemukan oleh Strobel dkk. (1933) yang telah berhasil mengisolasi kapang endofit dari *Taxus brevifolia* dan menemukan *Taxomyces andreane* yang dapat memproduksi Taxol. Penelitian *Taxus* dibelahan bumi lain berbeda dengan *T. sumatrana* yang hidup dan yang masih belum populer.

Dari puluhan spesies *Taxus* yang ada di dunia, Indonesia juga memiliki salah satu jenis *Taxus* yaitu *Taxus sumatrana* yang dilaporkan juga mampu menghasilkan Taxol (Hidayat, 2014).

Kapang endofit adalah mikroorganisme yang hidup di dalam jaringan internal tumbuhan namun tidak menyebabkan kerugian bagi inang. Kapang endofit banyak dibuktikan mampu mensintesis metabolit tertentu yang dihasilkan oleh tumbuhan inang (Kuncoro dan Sugijanto, 2011). Banyak penelitian terbaru mempublikasikan produk bioaktif yang terkandung dalam makhluk hidup memiliki metabolit yang sama dengan mikroorganisme simbiotiknya (endofit) (Prokesh, dkk. 2007). Kemampuan kapang endofit dalam menghasilkan produk bioaktif merupakan potensi yang dapat dikembangkan. Penelitian mengenai mikroorganisme endofit dari *Taxus sumatrana* seperti potensi antifungal bakteri endofit *Taxus sumatrana*, uji senyawa antikanker dari ekstrak kapang endofit, uji aktifitas antioksidan dari kapang endofit hingga produksi Taxol pada kapang endofit dengan metode HPLC telah dilakukan namun belum dilaporkan bahwa ekstrak kapang endofit mengandung Taxol (Udin, 2009; Widowati, 2014). Maka penelitian terkait produksi Taxol dari kapang endofit *Taxus sumatrana* memiliki potensi besar sebagai penemuan baru produksi Taxol pada mikroorganisme dengan metode dan penelitian dari sisi yang berbeda dari penelitian yang telah dilakukan pada kapang endofit *Taxus sumatrana* sebelumnya.

Potensi produksi bahan aktif Taxol melalui proses fermentasi dan penapisan banyak dikembangkan untuk mempermudah manusia dalam menemukan senyawa bioaktif yang bermanfaat, terutama zat antikanker. Metode penapisan metabolit sekunder dari kapang endofit belum banyak dikembangkan secara genomik. Metode penapisan secara genomik lebih efisien dibanding metode penapisan konvensional. Metode genomik umumnya meliputi isolasi DNA, Amplifikasi sekuen DNA, elektroforesis hingga analisis filogenetik molekuler (Garyali, dkk. 2013; Roppa, dkk. 2014; Zhang, dkk. 2008).

Metode penapisan penanda molekuler lebih efisien untuk menemukan kapang penghasil Taxol. Enzim-enzim biosintesis Taxol dikode oleh gen. Salah satu gen kunci dari biosintesis Taxol dapat digunakan sebagai primer pendeteksian prekursor penghasil Taxol yaitu gen 10-deacetylbaaccatin III (DBAT) (Xiong, dkk. 2013). Gen 10- deacetylbaaccatin III merupakan salah satu gen yang ada dalam urutan tahap biosintesis Taxol yang akan mengekspresikan pembentukan enzim 10-deacetylbaaccatin III-10-O-acetyl transferase. Enzim 10-deacetylbaaccatin III-10-O-acetyl transferase merupakan enzim kunci dalam pembentukan Taxol (Ondari dan Walker, 2008). Tanpa adanya gen DBAT maka enzim 10-deacetylbaaccatin III-10-O-acetyl transferase tidak akan dapat terbentuk dan taxol tidak akan dapat diproduksi. Keberadaan gen DBAT merupakan kunci terbentuknya Taxol.

Hingga saat ini telah dilaporkan lebih dari 30 mikroorganisme endofit dari tanaman *Taxus* dapat menghasilkan Taxol dengan kisaran 10 ng/L, sampai 800 µg/L melalui penapisan tradisional (Flores, dkk. 2010). Mayoritas Taxol dihasilkan dari kelompok jamur *Ascomycetes* dan sedikit ditemukan juga pada bakteri *Kitasatospora* dan *Streptomyces* (Liu, dkk. 2009). Penapisan gen kunci penghasil Taxol sudah banyak dilakukan pada kapang-kapang endofit dari berbagai *Taxus* seperti *Taxus cuspidata*, *Taxus x media* (Xiong, dkk. 2013), *Taxus chinensis*, dan *Taxus baccata* (Rakotoririana, dkk. 2008; Rubini, dkk. 2005), namun belum dilakukan penapisan genomik gen kunci penghasil Taxol terhadap *Taxus sumatrana*. Dari latar belakang tersebut, penelitian penapisan potensi bioaktif antikanker Taxol pada kapang endofit dari kulit batang Sumatrana yew (*Taxus sumatrana* (mequel) de loub: *Taxaceae*) dengan pendekatan genomik melalui penapisan gen DBAT perlu untuk dilakukan.

1.2 Rumusan Masalah Penelitian

Berdasarkan latar belakang di atas maka rumusan masalah penelitian adalah “Adakah gen DBAT (10-deacetylbaaccatin III) pada kapang-kapang endofit kulit batang *Taxus sumatrana*?”

1.3 Pertanyaan Penelitian

Dari rumusan masalah diatas dikemukakan beberapa pertanyaan penelitian sebagai berikut :

- 1) Bagaimana karakteristik kapang endofit yang dihasilkan dari kulit batang *Taxus sumatrana* ?
- 2) Bagaimana hasil isolasi DNA kapang endofit dari kulit batang *Taxus sumatrana* ?
- 3) Bagaimana hasil penapisan kapang endofit kulit batang *Taxus sumatrana* yang memiliki gen DBAT (10-deacetylbaaccatin III)?
- 4) Bagaimana analisis hasil sikuensing dan analisis kekerabatan antarspesies kapang dan kapang lain yang terdektesi memiliki gen DBAT (10-deacetylbaaccatin III)?

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah untuk membatasi penelitian ini adalah sebagai berikut:

- 1) Kapang yang diteliti merupakan kapang yang berhasil tumbuh dan terseleksi pada medium MID, PDA, dan S7 dari sampel *Taxus sumatrana* yang diambil dari Kebun Raya Cibodas, Bogor, Jawa Barat
- 2) Penapisan gen dilakukan dengan analisis DNA meliputi proses isolasi DNA, Amplifikasi sequen DNA, elektroforesis dan analisis bioinformatika.

1.5 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakterisasi dan mengeksplorasi kapang endofit kulit batang *Taxus sumatrana* yang berpotensi menghasilkan senyawa bioaktif antikanker Taxol melalui identifikasi keberadaan gen DBAT (10-deacetyl bacatin III).

1.6 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

- 1) Memberikan informasi mengenai karakteristik kapang endofit kulit batang *Taxus sumatrana*
- 2) Memberikan gambaran mengenai isolasi DNA kapang endofit
- 3) Memperkaya pengetahuan pada bidang mikrobiologi, khususnya mengenai kapang endofit beserta kemampuannya dalam memproduksi Taxol yang dilihat dari keberadaan gen DBAT
- 4) Memberikan gambaran mengenai hubungan kekerabatan kapang endofit yang mengandung gen DBAT dengan kapang lainnya

1.7 Struktur Organisasi Skripsi

Secara umum gambaran tentang skripsi ini dapat dilihat dalam struktur organisasi penulisan skripsi berikut:

- 1) Bab I Pendahuluan

Bab I berisi latar belakang, rumusan masalah, batasan penelitian, pertanyaan penelitian, tujuan dan manfaat dari penelitian ini. Penelitian ini dilakukan sebagai penelitian awal mengenai kapang endofit yang hidup pada kulit batang *Taxus sumatrana* yang memiliki gen 10-deacetylbaconin-III (DBAT). Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui dan mengeksplorasi kapang endofit kulit batang *Taxus sumatrana* yang memiliki gen DBAT. Pada penelitian ini terdapat beberapa batasan masalah agar penelitian lebih fokus dan mengerucut sehingga rumusan masalah dalam penelitian ini dapat terjawab. Kapang yang diteliti merupakan kapang yang berhasil tumbuh pada medium MID, PDA, dan S7 dari sampel *Taxus sumatrana* yang berasal dari Kebun Raya Cibodas, Bogor, Jawa Barat. Hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi mengenai kapang endofit yang memiliki gen DBAT dan dapat memproduksi Taxol.

2) Bab II Kajian Pustaka

Bab II berisi tentang kajian pustaka yang telah dilakukan penulis sebagai literatur tambahan yang dikutip dan diambil dari berbagai sumber yang berkaitan dengan penelitian ini. Kajian pustaka ini berisi tentang teori-teori dan hasil penelitian-penelitian sebelumnya yang dituliskan untuk membuka wawasan mengenai cakupan penelitian. Pada bab ini dikaji beberapa materi tentang *Taxus sumatrana* (Mequel), kapang endofit, interaksi kapang endofit dengan tanaman inang, Taxol, gen 10-deacetylbaconin-III, sikuensing, bioinformatika dan filogenetika molekuler. Bab ini berfungsi untuk membantu penulis membandingkan dan mengaitkan teori yang telah ada dengan temuan dan pembahasan pada penelitian ini.

3) Bab III Metode Penelitian

Bab III berisi tentang pemaparan mengenai metode penelitian secara detail, disertai langkah-langkah yang telah dilakukan dalam penelitian. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif. Penelitian diawali dengan tahap persiapan, pelaksanaan penelitian dan analisis data. Terdapat 15 tahapan pelaksanaan mulai dari pembuatan media, isolasi kapang endofit, pemurnian kapang endofit, karakterisasi morfologi kapang endofit, subkultur kapang endofit untuk ekstraksi DNA, optimasi isolasi DNA, isolasi DNA kapang endofit, uji kualitas dan kuantitas DNA, optimasi suhu PCR, amplifikasi PCR untuk penapisan Taxol dari gen DBAT, elektroforesis gen DBAT, ligasi pada vektor pGEM-T easy, amplifikasi PCR menggunakan primer M13, elektroforesis hasil ligasi, hingga sequencing DNA untuk selanjutnya dianalisis. Seluruh tahapan dalam penelitian disusun dalam bentuk alur penelitian untuk memudahkan melihat gambaran umum dari setiap tahap penelitian dalam penelitian ini.

4) Bab IV Temuan dan Pembahasan

Bab IV berisi tentang temuan yang didapatkan dalam penelitian yang telah dilakukan kemudian dianalisis dan dibahas secara detail dan menyeluruh. Temuan yang didapat akan dibandingkan dengan teori yang ada dan hasil-hasil penelitian sebelumnya. Temuan yang akan dibahas dalam penelitian ini antara lain hasil isolasi dan karakterisasi kapang endofit, hasil isolasi DNA kapang endofit, hasil penapisan gen 10-deacetylbaconin-III pada kapang endofit, analisis hasil sikuensing gen 10-deacetylbaconin-III, dan analisis bioinformatika sikuen gen 10-deacetylbaconin-III isolat kapang endofit.

5) Bab V Simpulan, Implikasi dan Rekomendasi

Bab V berisi tentang kesimpulan dari penelitian ini. Kesimpulan mengenai keseluruhan pemaknaan penulis tentang penelitian yang dilakukan hingga dapat menjawab rumusan masalah dan pertanyaan penelitian. Bab ini berisi tentang perluasan dan pengembangan penelitian selanjutnya yang dituliskan dalam sub bab implikasi. Bab ini juga berisi rekomendasi yang ditulis sebagai upaya perbaikan dan saran untuk penelitian selanjutnya. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam penelitian mengenai *Taxus sumatrana* dan gen 10-deacetylbaconin-III.