

BAB II Tinjauan Pustaka

II.1 Cabai Rawit

Klasifikasi tanaman cabai rawit menurut Rukmana (2002) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliopyta
Kelas	: Magnoliopsida
Bangsa	: Solanales
Suku	: Solanaceae
Marga	: Capsicum
Jenis	: <i>Capsicum annuum</i> L.



Gambar II.1 Tanaman Cabai Rawit

Cabai merupakan salah satu komoditas penting tergolong kedalam famili Solanacea (terung-terungan) yang memiliki nilai ekonomi tinggi (Cahyono, 2003) Tanaman cabai memiliki nama populer tersendiri di berbagai negara, seperti di Indonesia (Cabai), Inggris (*chili*), Portugis (*pimento*) dan Spanyol (*chile*). Tanaman cabai di

Indonesia juga memiliki sebutan yang berbeda-beda disetiap daerahnya, seperti: Sumatra memiliki sebutan lada mutia (Melayu) dan lada limu di Kepulauan Nias. Daerah Jawa memiliki sebutan cengek (Sunda), lombok cempling (Jawa), cebhi letak (Madura). Daerah Sulawesi yaitu malita diti (Gorontalo), lasomeyang (Makasar), rica halus, rica padi (Manado), Bali yaitu tabiya krinyi. Papua yaitu metrek waktoh. Indonesia cabai rawit (Laoli belum terpublikasi, 2016).

Menurut Cahyono, (2003) tanaman cabai rawit tergolong tanaman semusim atau tanaman berumur pendek yang tumbuh sebagai tanaman perdu atau semak, dengan tinggi tanaman dapat mencapai 1,5 m. Secara umum cabai memiliki banyak kandungan gizi dan vitamin, seperti: lemak, protein, karbohidrat, kalsium, fosfor, besi, vitamin A, B1, B2, C dan senyawa alkaloid seperti *capsaicin*, *oleoresin*, flavanoid dan minyak esensial (Rukmana, 2002). Banyaknya kandungan gizi yang dimiliki oleh tanaman cabai rawit sehingga banyak penelitian yang membuktikan khasiatnya efek farmakologis didalam tubuh.

Menurut penelitian Laoli belum terpublikasi, (2016) buah cabai memiliki efek antimikroba. Beberapa mikroba endofit yang ditemukan pada tanaman cabai rawit adalah *Erwinia* sp., *Planococcus* sp., *Exiguobacterium* sp., *Propionibacterium* sp. Uji aktifitas bakteri endofit *Erwinia* sp. dan *Planococcus* sp. terhadap bakteri *E.coli* menggunakan konsentrasi hambat minimum 500 ppm mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan membentuk zona

bening disekitar cakram kertas. Sedangkan bakteri *Propionibacterium* sp. terhadap *S.aureus* mampu menghambat mikroba patogen dengan konsentrasi 500 ppm.

Buah cabai rawit banyak digunakan sebagai bumbu penyedap kebutuhan rumah tangga. Beberapa penelitian mengenai manfaat dari tanaman cabai adalah sebagai berikut:

1. Antihiperkolesterolemia, Rahmi (2017) penelitian ini mengungkapkan bahwa dengan dosis 200 mg/kg ekstrak etanol buah cabai merah (*Capsicum annuum*) terbukti dapat menurunkan kadar kolestrol darah pada mencit putih jantan hiperkolesterolemia.
2. Antidiabetes, Earnest *et.al.*, (2013) melakukan pengujian terhadap enam tikus percobaan yang sudah terdiagnosis menderita diabetes. Sebelum dilakukan percobaan, kadar gula darah pada tikus adalah 6,40 mmol / dL. Setelah tikus dilakukan uji coba hasil yang didapatkan 4,91 mmol / dL dan tercatat penurunan kadar gula darah sebesar 23%.
3. Antimikroba, Rahmafianda (2016 belum terpublikasi) bakteri endofit yang berhasil diidentifikasi dari bagian batang cabai rawit adalah *Ancylobacter* sp., *Propionibacterium* sp., *Erwinia* sp., *Planococcus* sp., *Exiguobacterium* sp., *Cyclobacterium* sp. Metode penelitian ini menggunakan cakram kertas. Aktivitas antimikroba bakteri endofit terhadap baskteri *S.aureus* dan *E.Coli* terbukti dengan adanya zona bening dibawah 10mm untuk *E.coli* dan dibawah 14mm untuk *S.aureus*

II.2 Mikroba Endofit

Mikroba endofit dapat ditemukan pada hampir 300.000 spesies tumbuhan yang ada di muka bumi. Masing-masing individu tumbuhan memiliki satu atau lebih jenis mikroba endofit (Strobel and Daisy, 2003). Mikroba endofit dapat digunakan sebagai sumber senyawa bioaktif yang relatif mudah untuk ditumbuhkan dan memiliki siklus hidup yang pendek. Hal ini menyebabkan mikroba endofit dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder dalam jumlah besar dengan metode fermentasi. Mikroba endofit ini dapat diisolasi dari jaringan akar, batang, daun, biji, dan buah dan dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang sama dengan tanaman inangnya. Senyawa bioaktif tersebut dapat digunakan sebagai bahan obat. Dengan demikian, maka perusakan lingkungan akibat penebangan pohon sebagai sumber bahan obat dengan cara mengikis tanamannya untuk diambil eksudat dapat dikurangi (Tan and Zou, 2001).

Beberapa metabolit sekunder dari mikroba endofit diketahui memiliki aktivitas, diantaranya sebagai antimalaria (*Colletotrichum* sp. dari tanaman *Artemisia annua*), antivirus (Asam sitonat A dan B dari jamur *Cytospora* sp), antijamur (cryptocandin dihasilkan dari *Cryptosporiopsis quercina* hasil isolasi tanaman *Tripterigeum wilfordii*), antikanker (*T. andreanae*, *T. brevifolia*, dan *T. wallichiana* dari genus *Taxus*), antibakteri (*Phomopsisichalasin* merupakan metabolit sekunder dari mikroba endofit *Phomopsis* sp), antidiabetes (*Pseudomassaria* sp. dari hutan lindung) dan antioksidan (metabolit sekunder pestasin dan

isopestasin dari *P. microspore*, diisolasi dari tanaman *Terminalia morobensis*) (Strobel, G.A *et.al.*, 2004).

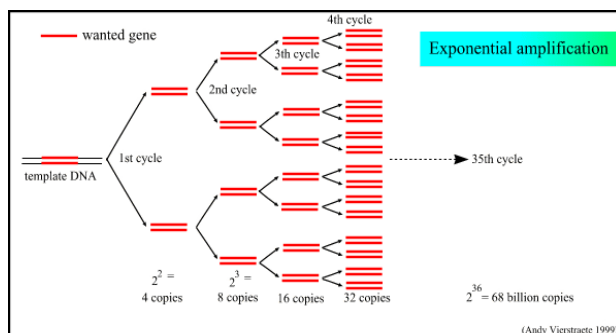
II.3 Tanaman Beserta Mikroba Endofit yang Dihasilkan

Pada daun dan batang tanaman Johar diperoleh isolat sebanyak 7 dengan kode DC1, DC2, DC3, DC4, BC1, BC2, BC3 (Nursanty and Suhartono, 2012). Pada rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) jumlah isolat yang didapatkan berjumlah 4 dengan kode BT1 (*Actinomyces viscosus*), BT2 (*Pseudomonas stutzeri*), PD1 (*Actinomyces viscosus*) dan PD2 (*Bacillus brevis*). Isolat ini diketahui memiliki aktifitas sebagai antibakteri (Imawati, 2015). Pada kulit batang Tanaman Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) jumlah isolat yang didapatkan berjumlah 29 isolat dan 9 isolat diketahui memiliki aktifitas antibakteri (Sepriana *et.al.*, 2009). Pada Tanaman Salam jumlah isolat yang didapatkan berjumlah 4 dengan kode isolat WL-SB, WL-SK, WL-SM1 dan WL-SM2 (Hidayati *et.al.*, 2017). Pada ranting Tanaman Biduri jumlah isolat yang didapatkan berjumlah 4 dengan kode CG.r I b1 8,7, CG.r I c1 9,0 ,CG.r III d1 dan CG.r III e1 7,2 (Kumal and Ainun, 2014). Pada Tanaman Pisang jumlah isolat yang didapatkan berjumlah 4 dengan kode V1, V2, V3 dan V4. Kode isolat ini menunjukkan kemiripan yang dekat dengan *Klebsiella* spp. dan *Erwinia* spp.(Sharma *et.al.*, 2017) dan pada Tanaman Rambutan jumlah isolat yang didapatkan berjumlah 9 isolat dengan lima genus yang terdiri dari *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Staphylococcus*, dan *Curtobacterium* (Suhandono *et.al.*, 2016).

II.4 Polymerase Chain Reaction

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan suatu metode molekular yang digunakan untuk amplifikasi DNA hingga berjuta kali lipat secara *in vitro* pada daerah spesifik yang dibatasi oleh dua buah primer oligonukleotida dengan bantuan enzim polymerase (Zyskind and Bernstein, 1992). Oligonukleotida digunakan sebagai primer untuk memungkinkan DNA template di *copy* oleh DNA polymerase. Metode PCR ditemukan oleh Kary B. Mullis pada tahun 1983, akan tetapi DNA yang digunakan masih belum thermostable dan harus dilakukan proses penambahan untuk setiap siklus yang dijalankan. Pada tahun 1988 dikembangkan Taq DNA polymerase yang diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus* (*Taq*). Enzim hasil pengembangan ini tahan hingga temperatur mendidih 100°C dan aktifitas maksimal pada temperatur 92-95°C (Fatchiyah *et.al.*, 2005).

Proses amplifikasi DNA dapat dilihat pada **Gambar II.2**



Gambar II.2 Proses Amplifikasi DNA

Dalam mengamplifikasi DNA, dilalui dengan beberapa tahap, diantaranya, terdiri dari :

1. Denaturasi

Proses ini terjadi pada suhu 95°C selama 30 detik. Pada umumnya sampel yang digunakan bisa berupa DNA atau pun RNA (mRNA). Jika sampel DNA, proses denaturasi ini membantu terjadinya pelepasan untai DNA dari untai ganda menjadi untai tunggal. Jika sampel yang di PCR adalah mRNA, maka diperlukan teknik RT (*Reverse Transkriptase*) untuk mengubah mRNA menjadi cDNA (Fatchiyah *et.al.*, 2005).

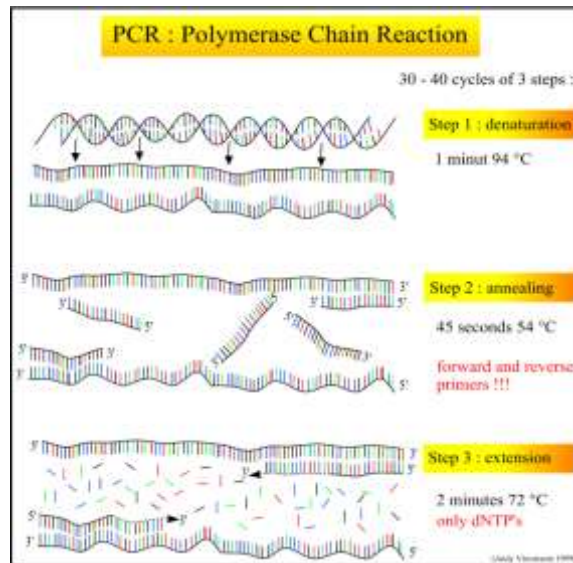
2. Annealing

Proses ini terjadi pada suhu 55–60°C selama 30 detik. Pada tahapan ini terjadi penempelan pada DNA template untuk memulai proses amplifikasi DNA. Primer ini berfungsi seperti enzim primase pada proses replikasi DNA yaitu tempat untuk memulainya proses replikasi (Fatchiyah *et.al.*, 2005).

3. Extension (Pemanjangan).

Proses ini terjadi pada suhu 72°C selama 2 menit. Pada tahapan ini menunjukkan proses pemanjangan yang dilakukan enzim DNA Polymerase. Pada proses PCR, enzim DNA Polymerase yang digunakan adalah *Taq DNA polymerase* yang diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus*. Enzim ini ditemukan pada tahun 1988 dan bersifat tahan panas hingga suhu 100°C. Waktu

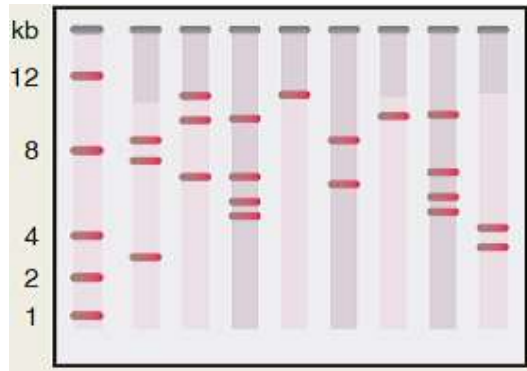
pemanjangan ini dipengaruhi oleh panjang untai DNA yang akan diamplifikasi (Fatchiyah *et.al.*, 2005).



Gambar II.3 Siklus PCR

Proses PCR (Gambar 3) akan terjadi secara terus menerus selama 25 – 30 siklus, sehingga akan diperoleh molekul-molekul DNA rantai ganda baru yang merupakan hasil 6 polimerasi dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA cetakan yang digunakan. Banyaknya siklus amplifikasi tergantung pada konsentrasi DNA target dalam campuran reaksi. Produk PCR dapat diidentifikasi melalui ukurannya dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa (Gambar 4). Metode ini memisahkan molekul DNA berdasarkan ukuran fragmennya. DNA yang bermuatan negatif akan bergerak menuju kutub positif pada alat elektroforesis. Molekul yang

berukuran kecil akan bergerak lebih cepat dari pada yang berukuran besar.



Gambar II.4 Hasil elektroforesis DNA dibawah lampu UV

Komponen-komponen yang dibutuhkan pada PCR yaitu:

a. DNA Template

Fungsi *DNA template* pada proses PCR adalah sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru yang persis dengan bentuk aslinya. *DNA template* dapat berupa DNA kromosom, DNA plasmid ataupun fragmen DNA apapun asalkan di dalam *DNA template* tersebut mengandung fragmen DNA target yang dituju. DNA terdiri dari basa purin dan pirimidin. Basa purin terdiri atas Adenin (A) dan Guanin (G) yang memiliki struktur cincin ganda, sedangkan basa pirimidin terdiri atas Sitosin (C) dan Timin (T) yang memiliki cincin tunggal. Ketika guanin berikatan dengan sitosin, maka akan terbentuk tiga ikatan hidrogen, sedangkan ketika adenin berikatan dengan timin

maka hanya akan terbentuk dua ikatan hydrogen (Handoyo and Ari, 2001).

b. Primer

Primer merupakan suatu polimer asam nukleat pendek (*oligonukleotida*) yang mempunyai urutan nukleotida. Fungsi dari Primer sendiri adalah sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses ekstensi DNA. Pemilihan primer yang tidak sesuai dapat menyebabkan tidak terjadinya reaksi polimerasi antara gen target dengan primer. Terdapat dua jenis primer dalam suatu reaksi PCR yaitu primer *reverse* dan *forward* yang bekerja pada dua untai berbeda (*sense* dan *antisense*) dalam satu DNA (Handoyo and Ari, 2001).

c. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTPs)

dNTPs merupakan suatu campuran yang terdiri atas dATP (*deoksiadenosin trifosfat*), dTTP (*deoksitimidin trifosfat*), dCTP (*deoksisitosin trifosfat*) dan dGTP (*deoksiguanosin trifosfat*). dNTPs bertindak sebagai *building block* DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA. dNTP akan menempel pada gugus -OH pada ujung 3' dari primer membentuk untai baru yang komplementer dengan untai DNA template (Handoyo and Ari, 2001).

d. Buffer PCR dan MgCl₂

Buffer PCR berfungsi untuk menjaga keseimbangan pH. Umumnya larutan penyangga PCR mengandung senyawa MgCl₂ yang berperan sebagai kofaktor enzim DNA polimerase. MgCl₂ tersebut juga akan meningkatkan interaksi primer dengan template yang membentuk kompleks larut dengan dNTP (senyawa antara) (Handoyo and Ari, 2001).

e. *Taq* Polimerase

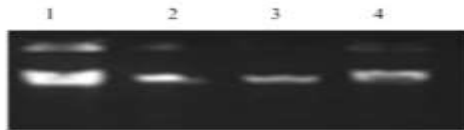
Enzim polimerase DNA merupakan enzim yang stabil dalam pemanasan. Umumnya digunakan enzim *Taq* DNA polymerase. Enzim ini tetap stabil mengamplifikasi DNA walaupun amplifikasi berjalan pada suhu mendekati titik didih air. Polimerase DNA berfungsi sebagai katalis untuk reaksi polimerisasi DNA. Pada proses PCR enzim ini juga diperlukan untuk tahap ekstensi DNA (Handoyo and Ari, 2001).

Beberapa penelitian telah berhasil mengidentifikasi bakteri endofit menggunakan teknik PCR. Suhandono, Kusumawardhani, and Aditiawati (2016) mengidentifikasi mikroba endofit menggunakan gen 16S rDNA dari endofit tanaman rambutan menghasilkan sembilan isolat yang terdiri dari lima genus, yakni *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Staphylococcus*, dan *Curtobacterium*.



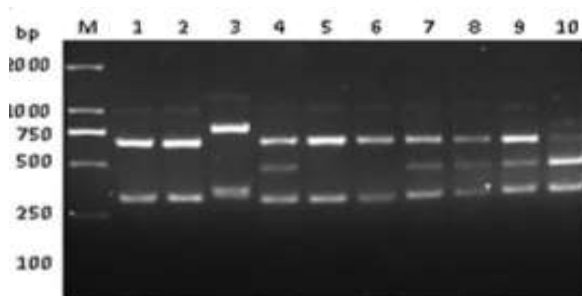
Gambar II.5 Hasil PCR Bakteri Endofit Tanaman Rambutan

Penelitian lain telah dilakukan oleh Sharma *et.al.*, (2017) yang berhasil mendapatkan 4 isolat endofit dari tanaman pisang (*Musa rhizomes*) yang berkerabat dengan *Klebsiella* spp. dan *Erwinia* spp. Primer yang digunakan adalah primer forward 8-27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan primer reverse 1492R (5'-TAGGGYTACCTTGTTACGACTT3'),



Gambar II.6 Hasil PCR Bakteri Endofit Tanaman Pisang

Menurut Liu, Liu et al., (2017) menggunakan primer forward 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan reverse 1510R (5'-GGCTACCTTGTTACGTA3') dalam menganalisis sekuens gen 16S rRNA dari biji-bijian dan menghasilkan tujuh isolat bakteri endofit. Homologi ditemukan di antara strain yang terisolasi dan beberapa spesies yang didapatkan, yaitu *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, dan *Paenibacillus*.



Gambar II.7 Hasil PCR Bakteri Endofit dari Biji-Bijian

II.5 Elektroforesis Gel Agarosa

Elektroforesis merupakan suatu cara untuk memisahkan fraksi dari suatu campuran berdasarkan pergerakan partikel koloid yang bermuatan dibawah pengaruh medan listrik. Cara elektroforesis sudah digunakan untuk analisa virus, asam nukleat, enzim, protein, serta molekul-molekul organik dengan berat molekul rendah seperti asam amino (Westermeyer, 2004). Gel agarosa merupakan salah satu gel yang dapat digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, memurnikan fragmen-fragmen DNA untuk ukuran molekul lebih besar dari 100 bp dan dijalankan secara horizontal. Molekul DNA termasuk senyawa bermuatan negatif. Sifat ini menjadikan molekul DNA yang ditempatkan pada medan listrik akan bermigrasi menuju kutub positif. Menurut (Sambrook *et.al.*, 1989) mobilitas fragmen DNA pada gel elektroforesis sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya yaitu:

1. Ukuran Molekul DNA

Perpindahan DNA ditentukan oleh ukuran panjang DNA. Fragmen DNA yang berukuran kecil akan bermigrasi lebih cepat dibandingkan dengan fragmen DNA yang berukuran lebih besar. Sehingga elektroforesis mampu memisahkan fragmen berdasarkan ukuran panjangnya.

2. Konsentrasi Agarosa

Perpindahan molekul DNA pada gel berkonsentrasi rendah lebih cepat dari pada perpindahan molekul DNA yang sama pada gel berkonsentrasi tinggi.

Tabel II.1
Kisaran Konsentrasi Agarosa yang digunakan dalam
Elektroforesis DNA

Konsentrasi Agarosa (%)	Efisiensi Pemisahan DNA (kb)
0,3	5 – 60
0,6	1 – 20
0,7	0,8 – 10
0,9	0,5 – 7
1,2	0,4 – 6
1,5	0,2 – 3
2,0	0,1 – 2

(Muladno, 2010)

3. Voltase

Kecepatan berpindah DNA sebanding dengan tingginya voltase yang digunakan. Akan tetapi, apabila penggunaan voltase terlalu tinggi. Mobilitas molekul DNA meningkat secara tajam. Hal ini mengakibatkan efektifitas pemisahan molekul DNA menurun dengan meningkatnya voltase yang digunakan. Penggunaan voltase yang ideal untuk mendapatkan separasi molekul DNA berukuran lebih besar 2 kb adalah tidak lebih dari 5 volt per cm.

4. Etidium Bromida

Keberadaan EtBr di dalam gel dapat mengakibatkan pengurangan tingkat kecepatan migrasi molekul DNA linier sebesar 15%. Larutan etium bromida sangat berbahaya dan bersifat karsinogen, oleh karena itu semua larutan yang mengandung etium bromida harus didekontaminasi sebelum dibuang. Oleh karena itu, etium bromida dapat diganti menggunakan larutan *sybr safe* yang bersifat tidak karsinogenik.

5. Komposisi *Buffer*

Larutan *buffer* berkekuatan ion tinggi akan meningkatkan panas. Apabila didalam larutan tidak terdapat kekuatan ion maka aliran listrik akan sangat minimal dan perpindahan DNA akan menjadi lambat.