

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Obat *Nan Fei Shu*

Tanaman obat *Nan Fei Shu* merupakan tanaman semak dengan daun tunggal berwarna hijau, berbentuk ovate, sisi daun rata, permukaan daun halus (tidak berbulu), akar tunggang, batang silindris, tunas terminal, bunga berwarna putih, biseksual, majemuk (inflorescentia), malai rata (corymbose) (Kunzhang, 2013). Berikut dokumentasi daun tanaman obat *Nan Fei Shu* pada Gambar 1.



Gambar 1. Daun tanaman obat *Nan Fei Shu* di Taiwan (Sumber: Kunzhang, 2013)

Tanaman tersebut berasal dari Afrika tropis dan diintroduksi di Taiwan kemudian dikultivasi oleh masyarakat Taiwan. Masyarakat Taiwan menggunakan daun tanaman *Nan Fei Shu* untuk detoksifikasi, antiinflamasi, menutup luka, pengobatan liver, diabetes, hipertensi, dan gastroenteritis. *Nan Fei Shu* atau *nánfēi yè* merupakan penamaan lokal spesies *Vernonia amygdalina* oleh masyarakat Taiwan (Kunzhang, 2013).

Spesies *Vernonia* dalam buku *Plant Resources of South East Asia* No 12 Jilid 1 disebutkan sebagai spesies yang tersebar di wilayah tropis, subtropis di Amerika, Afrika, dan Asia. Sebanyak 35 spesies *Vernonia* tersebar di area *Malaysian* sebagai semak-semak, tumbuhan merambat, dan rerumputan. Spesies *Vernonia* yang dapat ditemukan di Indonesia diantaranya: *Vernonia anthelmintica* dengan biji yang disebut kursani di Pulau Jawa untuk penggunaan aborsi, *Vernonia arborea* atau sembung dedek atau merambung di Sumatera Selatan digunakan untuk mengobati sakit perut, *Vernonia cinerea* atau buyung-buyung/sawi langit/maryuna dan *Vernonia patula* atau yawun/sarap di Pulau Jawa dikonsumsi sebagai sayuran (dePapua dkk., 1999).

Spesies *Vernonia* memiliki komponen seskuiterpenoid yang khas yakni vernolide; vernodalinol; vernodalol; 11,13-dihydrovernodalol; vernodalin; vernomygdiol; dan hydrocyvernolide. Senyawa seskuiterpenoid tersebut menunjukkan aktivitas antioksidan, antimikrobia, antiparasit, dan antikanker (Luo dkk., 2011).

B. Ekstraksi Tanaman Obat

Tanaman obat atau *herbal drugs* merupakan seluruh bagian atau sebagian dari tumbuhan yang diperoleh dari tanaman kultivasi atau liar (European Pharmacopoeia, 2005). Panen tanaman obat khususnya bagian daun dilakukan secara manual dengan pemetikan. Kuantitas kandungan senyawa pada bagian tumbuhan tidak konstan namun akan berubah sepanjang siklus kehidupan tumbuhan (*life cycle of a plant*). Waktu pemanenan yang optimal adalah pada

saat bagian tumbuhan tersebut mencapai tingkat perkembangan yang optimal (dePapua dkk., 1999).

Pemilihan tingkat umur daun memengaruhi kandungan senyawa di dalam sitoplasma sel. Senyawa terpenoid meningkat selama tahapan awal pembentukan daun kemudian konstan selama daun berfungsi hingga mengalami penurunan seiring daun menua. Perolehan senyawa terpenoid yang optimal terdapat pada daun yang berkembang penuh (*fully developed*) berumur 20-30 hari dengan ukuran 10-15 cm (Gershenzon dkk., 2000).

Analisis fitokimia, termasuk ekstraksi, secara ideal dilakukan terhadap jaringan tumbuhan segar, namun acap kali bahan yang ditelaah tidak tersedia karena ketersediaan tumbuhan yang sulit. Hal demikian dapat diatasi dengan menyimpan kering jaringan yang diambil segar dalam kantong plastik sebelum diekstraksi. Pengeringan tersebut perlu dilakukan dalam waktu singkat tanpa menggunakan suhu tinggi dengan aliran udara yang baik untuk mencegah terjadinya perubahan kimia yang terlalu banyak (Harbourne, 1987).

Pengeringan merupakan metode sederhana untuk mengawetkan herbal dengan mengeluarkan air sehingga kadar air dalam simplisia berkurang (Utomo dkk., 2009). Pengeringan dapat dilakukan dalam empat metode umum yakni: pengeringan udara (*air drying*), pengeringan pasir silika (*silica sand drying*), pengeringan dingin (*freeze drying*) dan pengeringan panas (*heat drying*) (Schmidt dan Noland, 1997; Abascal dkk., 2005). Terpenoid merupakan senyawa yang volatil sehingga pengeringan dilakukan dengan pengeringan udara (*air drying*) karena dapat mengawetkan senyawa volatil lebih banyak

dibandingkan pengeringan oven atau pengeringan dingin (Abascal dkk., 2005). Pengeringan dihentikan hingga bobot simplisia mencapai konstan (Utomo dkk., 2009).

Simplisia yang telah dikeringkan perlu dipersiapkan dalam bentuk serbuk untuk dapat meningkatkan difusi ketika proses ekstraksi komponen aktif yang terkandung (Sastrohamidjojo, 2004; Allen dkk., 2011). Ukuran partikel simplisia dapat memengaruhi laju penetrasi dan distribusi melalui perluasan bidang kontak simplisia dengan pelarut (Sasidharan dkk., 2011; Allen dkk., 2011). Pengayakan (*sieving*) merupakan metode untuk menentukan ukuran partikel secara homogen menggunakan ayakan, yaitu lembaran (*screen*) dengan lubang-lubang (*sieve*) ukuran tertentu sehingga dapat dilalui partikel (Allen dkk., 2011).

Simplisia daun menggunakan ayakan dengan ukuran 20 mesh (*sieve opening* atau diameter lubang yakni $\leq 0,850$ mm), sehingga dapat diperoleh partikel yang relatif berpotongan besar / kasar (*coarse*) seperti pasir dan garam (Allen dkk., 2011; Hornby, 2010). Ukuran partikel secara umum untuk proses ekstraksi berkisar 0,05-1,0 mm. Ukuran yang kurang dari 0,05 mm akan menurunkan perolehan ekstraksi karena partikel kecil cenderung untuk menggumpal sehingga laju penetrasi pelarut semakin menurun (Stamatopoulos dkk., 2014).

Ekstraksi merupakan separasi senyawa metabolit dengan jaringan tumbuhan menggunakan pelarut selektif (Megha dan Minal, 2013). Pada proses ekstraksi perlu diperhatikan dua hal yakni sifat komponen zat aktif yang akan

diperoleh dan pelarut yang akan digunakan (Sasidharan dkk., 2011). Seskuiterpenoid merupakan senyawa larut lemak (lipofilik) sehingga untuk mengekstraksi senyawa tersebut diperlukan pelarut dengan kepolaran rendah atau non-polar diantaranya diklorometan, petroleum eter, aseton, dan kloroform (Sasidharan dkk., 2011; Harbourne, 1987; Houghton dan Raman, 1998; Cowan, 1999).

Diklorometana, CH_2Cl_2 (DCM) merupakan komponen hidrokarbon alifatik yang terhalogenisasi dengan berat molekul 84,93, dan titik didih $39,8^\circ\text{C}$. DCM larut dalam pelarut organik seperti etanol, eter, fenol, aldehid, dan keton, namun hanya sedikit larut dalam air (2 g DCM/100 ml air pada 20°C) (World Health Organization, 2000; Pittsburgh Plate Glass, 2003). Komponen senyawa yang terekstrak oleh pelarut DCM yakni lemak, asam lemak, dan pigmen (klorofil) (Konig dan Wright, 1997; Sanchez dkk., 2008).

Maserasi merupakan suatu proses ekstraksi dengan serbuk simplisia diletakkan di dalam wadah tertutup bersama pelarut dalam suhu ruang selama ± 3 hari disertai pengadukan (agitasi) sesekali hingga sepenuhnya terlarutkan (International Centre for Science and High Technology-United Nations Industrial Development Organizations (ICS-UNIDO), 2008; Bucar dkk., 2013). Keuntungan dari metode tersebut yakni, tidak memerlukan perubahan suhu (dapat dilakukan pada suhu ruang ($\pm 27^\circ\text{C}$), tidak memerlukan modifikasi tekanan, dan tepat untuk ekstraksi senyawa termolabil, seperti terpenoid yang kestabilannya dapat menurun seiring meningkatnya suhu pada saat ekstraksi (Sasidharan dkk., 2011; Pandey dan Tripathi, 2014; Zwenger dan Basu, 2008).

Sementara kekurangan metode maserasi yakni waktu proses ekstraksi yang lama (dapat mencapai 24-96 jam) dan membutuhkan pelarut dalam jumlah banyak (Sasidharan dkk., 2011; Bucar dkk., 2013).

Pengeringan ekstrak atau *extracta sicca* merupakan preparasi *solid* yang diperoleh dari mengevaporasi pelarut yang digunakan pada ekstraksi (European Pharmacopoeia, 2005). Ekstrak yang telah dikeringkan akan disimpan pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$ sebelum analisis berikutnya (Obistioiu dkk., 2014). Penyimpanan pada suhu dingin ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) akan memberikan kestabilan senyawa lebih baik daripada suhu kamar ($\pm 27^{\circ}\text{C}$) (Suhartatik dkk., 2013).

C. Identifikasi Komponen Senyawa dalam Ekstrak Tanaman Obat

Kromatografi Gas – Spektroskopi Massa (KG-SM) merupakan metode gabungan kromatografi gas dan spektroskopi massa untuk menskrining atau mengidentifikasi atau mengkuantifikasi senyawa non-polar dan/atau semi-polar atau organik yang volatil (Hajslova dan Cajka, 2007; Philips, 2013). Prinsip penggunaan metode ini yakni kromatografi gas akan memisahkan komponen volatil kemudian komponen yang terpisah tersebut diidentifikasi dan dikuantifikasi berdasarkan massanya oleh spektroskopi massa (Philips, 2013). Metode KG-SM merupakan salah satu metode untuk penentuan komponen senyawa volatil (Inamdar dan Chatterjee, 2000; Obistioiu dkk., 2014).

Kromatografi gas dilakukan dengan separasi pada kolom kapiler yang berlapis cairan (Carbowax 20 M) atau padatan (gelas) sebagai fase diam dan gas *inert* yang mengalir di sepanjang kolom sebagai fase gerak (Philips, 2013).

Injeksi sampel pada GC kolom kapiler terdapat dua tipe yakni *split* dan *splitless*. Tipe injeksi *split*, hanya sebagian sampel yang terinjeksi sehingga senyawa mayoritas yang dideteksi, sementara senyawa *trace* tidak dideteksi. Berbeda dengan tipe injeksi *splitless*, yakni hampir seluruh sampel ditransfer dari injektor sehingga senyawa *trace* juga dapat dianalisis (Grob, 2000). Komponen senyawa akan bergerak pada kecepatan yang berbeda di sepanjang kolom dan terpisah berdasarkan titik didih dan polaritas yang terdeteksi dalam waktu retensi berbeda (Philips, 2013). Pemanas pada kolom meningkatkan suhu kolom untuk mendukung pemisahan komponen dengan *range* suhu tertentu (Harbourne, 1987).

Hasil kromatografi gas dinyatakan dengan volume retensi R_v , yakni volume gas pembawa yang diperlukan untuk melulusi suatu komponen dari kolom. Hasil dapat pula dinyatakan dengan waktu retensi R_t , yaitu waktu yang diperlukan untuk melulusi komponen dari kolom. Kromatografi gas memberikan data kuantitatif maupun kualitatif komponen senyawa dan komponen yang terpisah dapat dianalisis dengan cara spektrometri (Harbourne, 1987).

Spektroskopi massa digunakan untuk menetapkan bobot molekul dengan cara mengkonversi molekul menjadi ion, memilahnya berdasarkan nisbah massa terhadap muatan (m/z), dan menetapkan jumlah relatif dari setiap ion yang ada (Hart, 2007). Uap cuplikan berdifusi ke dalam sistem spektrometer massa yang bertekanan rendah, lalu diionkan dengan energi yang cukup untuk memutus ikatan kimia yaitu sekitar 70 eV (Harbourne, 1987; Sastrohamidjojo,

2004). Ion positif yang terbentuk dipercepat dalam medan magnet untuk mendispersikan ion sehingga memungkinkan pengukuran kelimpahan nisbi ion yang mempunyai nisbah massa terhadap muatan tertentu. Rekaman kelompahan ion terhadap massa merupakan grafik spektrum massa yang terdiri atas sederetan garis yang intensitasnya berbeda-beda pada satuan massa yang berlainan (Harbourne, 1987).

D. Pengujian Aktivitas Antifungi dari Ekstrak Tanaman Obat

Antifungi merupakan senyawa kimia yang membunuh (fungisida) atau menghambat (fungistatik) pertumbuhan fungi. Senyawa antifungi digunakan sebagai pengobatan atau pencegahan terhadap infeksi fungi pada manusia yang disebabkan mikosis sistemik dan lokal (Singleton dan Sainsbury, 2006). Pengobatan antifungi *Candida* umumnya melalui memiliki mekanisme hambat sintesis sterol pada membran, penurunan permeabilitas membran fungi, dan hambat pembentukan mitotik *spindle* serta divisi sel (Prescott dkk., 2002).

Senyawa dalam golongan terpenoid memiliki mekanisme antifungi yaitu menurunkan konsentrasi ergosterol. Senyawa ergosterol merupakan komponen sterol utama dalam membran sel fungi sehingga berfungsi menjaga integritas membran sel fungi. Oleh karenanya secara tidak langsung terpenoid mencegah terbentuknya membran sel fungi. Senyawa terpenoid juga mengakibatkan membran mitokondria mengalami hiperpolarisasi sehingga *reactive oxygen species* (ROS) meningkat sehingga menurunkan viabilitas sel (Chen dkk., 2013).

Penentuan efektivitas antimikrobia terhadap patogen, penting untuk mengetahui kecenderungan antimikrobia untuk menghambat atau menghentikan pertumbuhan patogen secara *invivo* (Morello dkk., 2003). Penentuan efektivitas tersebut terbagi menjadi dua pengujian yakni: uji minimum dilusi atau *dilution susceptibility tests* (konsentrasi hambat minimum dan konsentrasi letal minimum) dan uji difusi keping (metode Kirby-Bauer) (Prescott dkk., 2002).

The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) menetapkan dalam dokumen M44-A mengenai metode pengujian antifungi menggunakan difusi keping pada spesies *Candida*. Dokumen tersebut mencantumkan tahapan preparasi inokulum sebelum melakukan pengujian menggunakan difusi keping, dimana dalam tahap ini inokulum dipreparasi untuk memperoleh suspensi inokulan 10^6 hingga 5.10^6 sel per mL (The National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004).

Inokulasi *Candida albicans* yang telah didilusi akan diinokulasikan pada medium Sabouraud Dekstrose Agar (SDA). Medium tersebut merupakan medium standar untuk kultivasi fungi dengan pH 5,6 dan dapat mensupresi kontaminan bakteri oleh pH asam tersebut (Larone, 1995). Komposisi medium SDA yakni dekstrosa sebagai Sumber karbon, pepton sebagai Sumber nitrogen, dan agar sebagai *solidfying* (HiMedia, 2011)

Kultur *Candida albicans* perlu dipastikan kemurniannya terutama apabila kultur diperoleh dari kultur tua. Pengujian *Germ Tube* merupakan prosedur tercepat untuk mengidentifikasi *Candida albicans* karena hanya *C. albicans*

yang dapat memproduksi *germ tubes* dalam waktu kurang dari 3 jam dalam medium *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YEPD) (Kim dkk., 2002; Larone, 1995). *Germ tubes* merupakan awal dari hifa sejati dan tampak sebagai filamen yang tidak terkonstruksikan pada sel *parent* (Larone, 1995), ditunjukkan dalam Gambar 2 berikut.



Gambar 2. Germ Tubes *Candida albicans*, kiri: sketsa *germ tubes* dan kanan: penampakan mikroskop perbesaran x400 (Sumber: Larone, 1995, Kim dkk., 2002)

Inokulasi mikrobial pada medium dilakukan dengan volume suspensi inokulan tidak melebihi 0,1 ml (100 μ l) (Hafidh dkk., 2011). Volume yang berlebihan dapat mengakibatkan koloni mikroba bertumpuk. Selama inokulasi, sel akan disebar merata pada permukaan medium agar secara aseptis dengan menggunakan *lazy-Susan* atau *L-shaped bent glass* maupun *trigalski* (Madigan dkk., 2009). Metode ini digambarkan pada Gambar 3 sebagai berikut.



Gambar 3. *Spread plate method* (Sumber: Madigan dkk., 2009)

Pengujian dengan metode agar difusi keping secara umum menggunakan metode *Kirby-Bauer*. Pengujian dengan metode *Kirby Bauer* diperuntukkan menguji daya hambat antimikrobia terhadap mikrobia yang tersebar pada agar.

Senyawa antimikrobia diinfusikan ke keping *filter paper* dan selama inkubasi akan berdifusi ke permukaan agar (Morello dkk., 2003; Madigan dkk., 2009).

Aktivitas antimikrobia akan nampak dengan kehadiran zona hambat pertumbuhan mikrobial yang berwarna jernih di sekitar keping *filter paper* pada permukaan agar dan dikategorikan sebagai Sensitif atau *Susceptible* (S). Apabila aktivitas antimikrobia tidak ada maka dikategorikan sebagai Resistan (R), yakni mikrobial resisten terhadap antimikrobia. Namun ketika sensitivitas mikrobial terhadap antimikrobia sedang (*intermediate*) yakni antimikrobia yang tidak menghambat seluruh koloni namun cukup mengurangi pertumbuhan koloni mikrobial, dikategorikan sebagai Cukup Sensitif atau *Intermediate* (I) (Rodloff dkk., 2008).

Ukuran zona hambat bergantung pada beberapa faktor diantaranya: laju difusi senyawa antimikrobia, konsentrasi senyawa antimikrobia, tipe medium, tingkat kepekaan mikrobial uji, jumlah mikrobial yang terinokulasi pada *plate*, laju pertumbuhan mikrobial (Morello dkk., 2003; Madigan dkk., 2009; Benaducci, 2007). Ketoconazole digunakan sebagai kontrol positif pada uji zona hambat terhadap *Candida albicans* (Arundhina, 2014)

Komponen senyawa antimikrobia, Azole, menghambat demetilasi C14 α lanosterol sehingga mengganggu sintesis ergosterol pada sel membran fungi (Kanafani dan Perfect, 2008). Meski demikian azole tidak memberikan hasil uji antimikrobia yang pasti (*persistent*) karena terjadi pertumbuhan koloni di zona yang semula sensitif terhadap antimikrobia seiring periode inkubasi diperpanjang yang disebut sebagai *Trailing growth* (Arikan, 2007). Kostiala

dan Kostiala (1984) mengungkapkan *Candida albicans* sensitif (*susceptible*) terhadap ketoconazole pada 24 jam inkubasi namun 48 jam inkubasi nampak sebagai resisten, sehingga hasil difusi keping harus dicatat untuk 24 jam inkubasi.

DMSO sangat polar dan umum digunakan sebagai pelarut untuk antifungi yang tidak larut dalam air pada uji sensitifitas (*susceptibility assay*) (Randhawa, 2006; Hazen, 2013). Senyawa antifungi akan terdispersi dalam laju yang lebih tinggi dengan pelarut DMSO dibandingkan dengan pelarut air karena DMSO memiliki dielektrik konstan yang lebih rendah dari air (Izquierdo dkk., 2012). DMSO berikatan dengan plasma membran sel dan meningkatkan permeabilitas membran sehingga membantu penetrasi antimikrobia (Hazen, 2013).

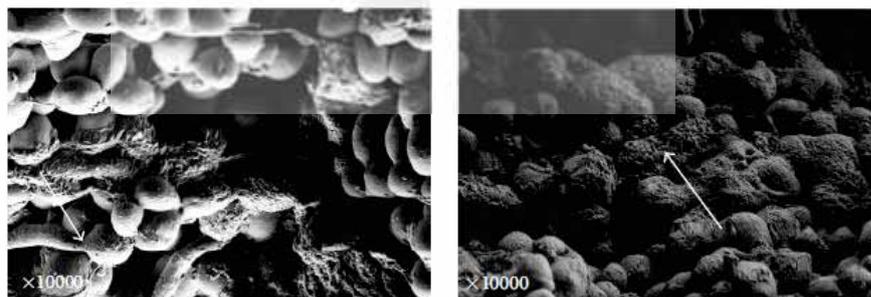
E. *Candida albicans*

Infeksi fungi pada kulit, rambut, dan kuku adalah penyebab sebagian besar penyakit kulit. Namun demikian, penyakit kulit yang berkaitan dengan fungi tidak mempenetrasi lebih dari lapisan epidermis kulit. Keratin pada lapisan epidermis merupakan nutrien bagi fungi dan pada jumlah besar ditemukan di stratum corneum kulit(lapisan paling luar dari epidermis), rambut, dan kuku (Aly, 2001).

Candida albicans merupakan fungi aseksual, uniseluler, diploid, dimorfik yang patogenik (Mohandas dan Ballal, 2011; Harley dan Prescott, 2002). Karakteristik dimorfik, yakni *Candida albicans* dapat berbentuk sebagai *yeast* (kapang) dan berkembang menjadi miselium (kumpulan hifa) sebagai respon

terhadap pH, nutrisi, dan temperatur (Kim dkk., 2002). *Germ tube* terbentuk dari blastospora yang akan berkembang membentuk hifa (Molero dkk., 1998).

Candida albicans memiliki karakteristik membentuk *biofilm* yang merupakan kolonisasi blastokonidium yang terlapisi polimer ekstraseluler. Terbentuknya *biofilm* menjadikan fungi bersifat patogen karena resisten antifungi (Pasteur dkk., 2011; Mohandas dan Ballal, 2011). Infeksi *Candida* pada kutan secara berurutan dimulai dengan menempelnya *blastoconidia* pada permukaan sel epitel, berproliferasi, berkolonisasi, dan menginvasi jaringan epitel. Studi oleh Pasteur dkk. (2011) menunjukkan dalam jumlah besar *Candida albicans* mampu berproliferasi pada kulit dalam waktu 1 hari dengan konsentrasi koloni rendah (10^6 sel.mL⁻¹). Hari kelima kultur *Candida albicans* menunjukkan adanya *biofilm* (tanda panah pada Gambar 3 (kanan)) yang terbentuk antar blastokonidium dengan permukaan korneosit (ditunjukkan pada panah dalam Gambar 4).



Gambar 4. SEM dari *Candida albicans* dengan konsentrasi 10^6 mL⁻¹ pada hari ke-1 (kiri) blastokonidium belum terlapisi *biofilm* dan hari ke-5 (kanan) blastokonidium terlapisi *biofilm* (Sumber: Pasteur dkk., 2011)

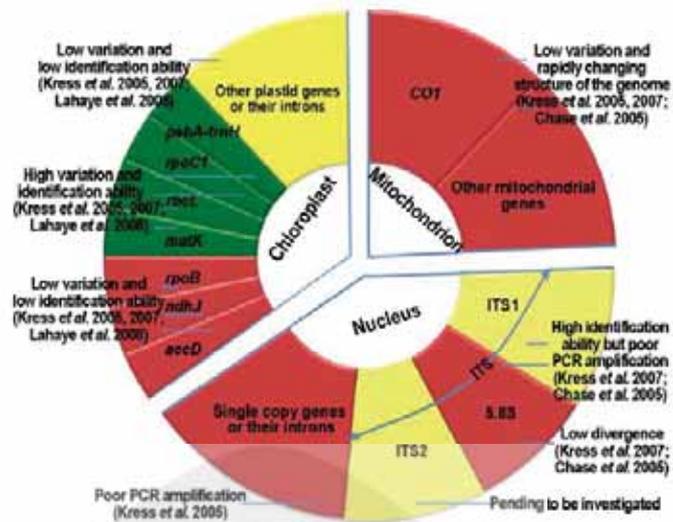
Candida albicans berproliferasi dengan sangat baik dalam kondisi aerobik dan dapat tumbuh dalam media yang hanya mengandung karbon, nitrogen, dan

fosfat. Suhu yang sesuai dengan pertumbuhannya berkisar antara 20-40°C dan pH yang sesuai berkisar pH 2-8. Laju pertumbuhan secara optimal diperoleh pada suhu 30°C, yaitu 0.3-0.4 /jam (Anand dan Prasad, 1991).

F. Identifikasi Tanaman Obat *Nan Fei Shu* Secara Molekuler

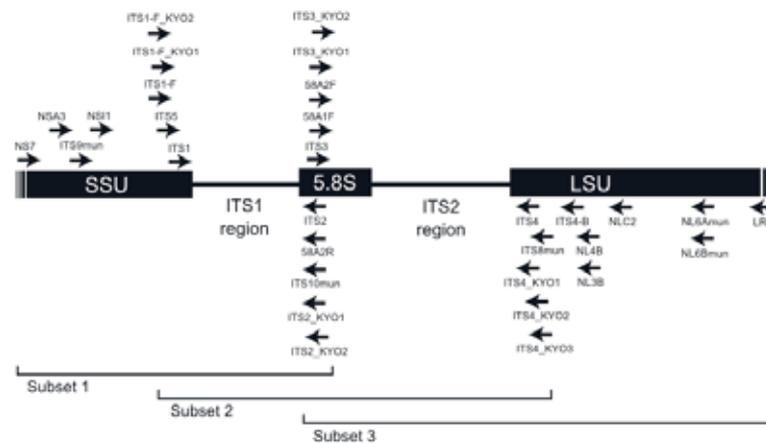
Perdagangan tanaman obat yang tidak termonitor membutuhkan metode identifikasi untuk autentikasi tanaman obat secara akurat dan cepat sehingga dapat menjamin keamanan pengobatan (Chen dkk., 2010; dePapua dkk., 1999). Identifikasi tanaman menggunakan pendekatan morfologi menemui banyak kendala diantaranya memerlukan sampel tanaman yang utuh sehingga ketika karakter morfologi tidak representatif maka identifikasi tidak dapat dilakukan (Wallinger dkk., 2012). Pendekatan identifikasi tanaman kemudian mengarah pada molekuler, karena dapat dilakukan identifikasi berdasarkan perbedaan *genomic* antar spesies tanaman (Wallinger dkk., 2012).

DNA *barcode* merupakan metode identifikasi spesimen dan menentukan takson spesimen baru atau kriptik secara efektif (Shokralla dkk., 2014). Pemetaan DNA *barcoding* pada genom tanaman dalam Gambar 5 berikut.



Gambar 5. Primer pada tiga genom tanaman (kloroplas, mitokondria, dan nukleus) sebagai kandidat DNA *barcode* (Sumber: Chen dkk., 2010)

Region gen *rbcl* dan *matK* pada genom kloroplas digunakan sebagai DNA *barcode* untuk tanaman karena variasi gen yang tinggi dan kemampuan identifikasi yang tinggi (Hollingsworth dkk., 2009; Shokralla dkk., 2014; Chen dkk., 2010). *Internal transcribed spacer* (ITS) pada genom nukleus dapat menjadi DNA *barcode* yang potensial untuk tanaman karena mampu mengidentifikasi takson secara luas meski kemampuan untuk diamplifikasi PCR rendah (Chen dkk., 2010). Regional ITS untuk DNA *barcoding* ditunjukkan dalam Gambar 6 berikut.



Gambar 6. Regional ITS pada ribosom nukleus (Sumber: Toju dkk., 2012)
 Keterangan: SSU (*Short Sub Unit*), LSU (*Long Sub Unit*), 5,8S (konservatif sekuens dari 5,8S ribosomal), ITS (*Internal Transcribed Spacer*), NSA3/NLC2 (*outer nested primer*), NS11/NLB4 (*inner nested primer*), NS7/LR3 (*high coverage ITS primer*).

Primer ITS 1 dengan sekuens primer 5`-3` yakni TCC GTA GGT GAA CCT GCG G (19 bp) merupakan primer *forward* dalam kategori SSU. Primer ITS 4, sebaliknya, merupakan primer *reverse* dalam kategori LSU, dengan sekuens primer 5`-3` yakni TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC (20 bp). Kedua primer tersebut didesain untuk mengamplifikasi regional ITS 1, 5.8S, dan ITS 2 (Toju dkk., 2012).

Perolehan data DNA sekuens dimulai dengan tahap isolasi genomik DNA (Shokralla dkk., 2014). Isolasi DNA dari sampel tanaman memiliki beberapa kendala diantaranya: degradasi DNA oleh endonuklease, ko-isolasi dengan polisakarida, ko-isolasi inhibitor komponen seperti polifenol (Azmat dkk., 2012). Isolasi DNA secara optimal diperoleh dari sampel daun dalam tingkat usia muda (± 7 hari) dengan kualitas dan kuantitas DNA yang tinggi. Sampel daun dalam tingkat usia tua (± 3 minggu) akan mengakibatkan perolehan DNA berwarna kecoklatan yang mengindikasikan kontaminasi komponen fenol yang

berpotensi menghambat kerja *Taq polymerase* dalam proses amplifikasi (Moreira dan Oliverira, 2011).

Isolasi DNA merupakan suatu teknik yang digunakan untuk memperoleh DNA murni, yaitu tanpa protein dan RNA dari suatu sel dalam jaringan (Campbell dkk, 2002). Tahapan isolasi DNA secara berurutan yakni *lysis* sel dan menghilangkan protein, purifikasi DNA serta *recovery* DNA (Fatchiah dkk, 2011). Metode PCE (*Phenol Chloroform Extraction*) merupakan metode isolasi konvensional yang digunakan untuk sampel tumbuhan (Amani dkk., 2011; Azmat dkk., 2012).

Genomic DNA yang diperoleh selanjutnya dilakukan amplifikasi PCR (Shokralla dkk., 2014; Kim dkk., 1998). Komponen-komponen utama yang diperlukan dalam proses PCR diantaranya: enzim polimerase DNA, *deoxynucleotide triphosphates* atau dNTP, ion magnesium ($MgCl_2$), dan primer. Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu: (1) pra-denaturasi DNA templat; (2) denaturasi DNA templat; (3) penempelan primer pada templat (*annealing*); (4) pemanjangan primer (*extensio-n*) dan (5) pemantapan (*postextension*). Tahap (2),(3), dan (4) merupakan tahapan berulang (siklus), di mana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA (Innis dan Gelfand, 1990).

DNA yang telah teramplifikasi kemudian dipurifikasi dengan elektroforesis menggunakan agarose gel (Kim dkk., 1998). DNA yang terpurifikasi tersebut selanjutnya disekuensi menggunakan metode sekuensing oleh Sanger (Shokralla dkk., 2014). Metode tersebut merupakan metode mensekuens

oligonukleotida secara enzimatik menggunakan enzim polimerase (Franca dkk., 2002). Proses sekuens tersebut berdasarkan terminasi rantai pada empat basa spesifik (A,G,C,T) dalam empat reaksi berbeda menggunakan 2',3'-dideoksinukleotida trifosfat (ddNTP) yang spesifik terhadap basa tertentu, yakni ddATP, ddGTP, ddCTP, dan ddTTP (Men dkk., 2008).

DNA sekuens yang diperoleh selanjutnya di *blast* untuk mendapatkan database sekuens DNA dengan kesesuaian sekuens tertinggi. DNA sekuens dari *database* di *align* dengan sekuens dari *sequencing* menggunakan Clustal W (Kim dkk., 1998). Analisis tersebut akan menghasilkan informasi mengenai identitas tanaman obat *Nan Fei Shu*.

G. Hipotesis

1. Aktivitas antifungi melalui uji Zona Hambat dengan hasil luas zona hambat terbesar diperoleh ekstrak tanaman obat *Nan Fei Shu* pada konsentrasi 200 mg/ml.
2. Tanaman obat *Nan Fei Shu* melalui identifikasi molekuler diketahui memiliki nama ilmiah yakni *Vernonia amygdalina*.