

ISOLASI, SKRINING FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FUNGI ENDOFIT TANGKAI DAUN MURBEI (*Morus alba* L.)

Irwandi¹, Ratih Arum Astuti^{1*}, Herlina Rante², Sukriani Kursia³

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Pendidikan Muhammadiyah Sorong

²Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin

³Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makasar

ABSTRAK

Fungi endofit merupakan fungi yang hidup di bagian dalam tanaman yang berpotensi penghasil metabolit sekunder yang mirip atau sama dengan tanaman inangnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi isolat fungi dari tangkai daun murbei (*Morus alba* L.) memiliki aktivitas antioksidan dan menentukan golongan senyawa metabolit sekunder dari tangkai daun murbei (*Morus alba* L.) yang aktif sebagai antioksidan. Isolasi fungi endofit dilakukan dengan teknik isolasi langsung pada medium PDAC (Potato Dekstrosa Agar) ditambahkan kloramfenikol 0,2 g/L, selanjutnya dilakukan pemurnian isolat dan didapatkan 2 isolat yaitu isolat MAIRP dan MAIRH. Kemudian dilakukan fermentasi menggunakan medium PDY, setelah itu diekstraksi menggunakan etil asetat. Ekstrak etil asetat selanjutnya dilakukan uji kualitatif menggunakan lempeng KLT setelah itu disemprotkan DPPH 0,04 mM. Hasil yang didapatkan yang mempunyai aktivitas Antioksidan yaitu isolat MAIRP. Hasil uji kuantitatif pengujian aktivitas Antioksidan IC_{50} 298,044 $\mu\text{g/mL}$ yang termasuk kategori sedang. Hasil dari skrining fitokimia ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi yang diisolasi dari tangkai daun murbei (*Morus alba* L.) Diduga kuat mengandung golongan senyawa alkaloid, flavonoid, dan polifenol.

Kata Kunci : (isolasi MAIRP, Antioksidan, *Morus alba* L.)

Korespondensi

Nama Penulis Koresponden	Ratih Arum Astuti
Email Penulis Koresponden	rtharum17@gmail.com
Alamat Penulis Koresponden	

PENDAHULUAN

Mikroba endofit dapat berupa bakteri, jamur atau bahkan mikroba lain, tetapi saat ini lebih dikembangkan jamur endofit. Jamur endofit merupakan jamur yang terdapat di jaringan tumbuhan namun tidak memberikan efek negatif bagi tumbuhan inangnya. Fungi endofit merupakan mikroorganisme yang terdapat di dalam suatu sistem jaringan tumbuhan seperti biji, daun, bunga, ranting, batang dan akar. Jamur endofit menghasilkan berbagai senyawa yang memiliki aktivitas biologi diantaranya alkaloid, terpenoid, fenolik, dan sebagainya⁽¹⁰⁾. Jamur endofit yang tumbuh pada jaringan tumbuhan obat, juga dapat menghasilkan senyawa yang memiliki khasiat sama dengan tumbuhan inangnya, walaupun jenis senyawanya berbeda. Bahkan, senyawa yang dihasilkan jamur endofit seringkali memiliki aktivitas yang lebih besar dibandingkan aktivitas senyawa dari tumbuhan inangnya⁽⁸⁾.

Murbei (*Morus alba* L.) merupakan salah satu jenis tanaman obat yang mengandung flavonoid, fenol, kumarin, tanin, steroid, terpenoid, alkaloid, dan minyak atsiri⁽³⁾. Senyawa tersebut memiliki kegunaan sebagai antioksidan, antibakteri, antivirus, antidiabetes, antihipertensi, hipolipidemic, demam, flu, batuk, antiemetic dan gangguan saluran pencernaan^(1,2,3). Penelitian yang telah dilakukan oleh⁽⁵⁾ menyatakan bahwa cara mengetahui senyawa yang dihasilkan oleh metabolit sekunder isolat fungi endofit sama dengan tanaman inangnya maka dilakukan ekstraksi daun murbei (*Morus alba* L.) dengan etil asetat dan ditotolkan pula pada lempeng KLT, pada ekstrak daun tanaman diperoleh noda dengan nilai Rf 0,91 sedangkan pada metabolit sekunder isolat fungi endofit P1 diperoleh noda dengan nilai Rf 0,9 yang bersifat antioksidan, sehingga kemungkinan noda yang muncul diduga menghasilkan senyawa yang sama dengan tanaman inangnya. Dari hasil yang diperoleh juga terdapat noda yang berbeda sehingga dapat diketahui bahwa fungi endofit tidak hanya menghasilkan senyawa yang sama tetapi juga menghasilkan senyawa yang berbeda.

Secara kimia senyawa antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (*elektron donor*). Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat di hambat⁽¹²⁾. Antioksidan dibutuhkan tubuh untuk melindungi tubuh dari serangan radikal bebas. Antioksidan adalah suatu senyawa atau komponen kimia yang dalam kadar atau jumlah tertentu mampu menghambat atau memperlambat kerusakan akibat proses oksidasi. Penggunaan senyawa antioksidan semakin berkembang baik untuk makanan maupun untuk pengobatan seiring dengan bertambahnya pengetahuan tentang aktivitas radikal bebas⁽⁹⁾. Stres oksidatif merupakan keadaan yang tidak seimbang antara jumlah molekul radikal bebas dan antioksidan di dalam tubuh (Trilaksani, 20antioksidan senyawa fenolik dikarenakan sifat oksidasi yang berperan dalam menetralisasi radikal bebas⁽⁷⁾). Senyawa antioksidan merupakan suatu inhibitor yang digunakan untuk menghambat autooksidasi.

METODE PENELITIAN

Pembuatan Medium Potato Dextrose Agar (PDA)

Ditimbang serbuk PDA 3,9 gram lalu dilarutkan dalam 100 ml air suling dan dipanaskan, kemudian ditambahkan kloramfenikol 0,02 gram/L dan dilarutkan. Selanjutnya medium yang sudah jadi disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan diukur pH (pH 6).

Pembuatan Medium Potato Dextrose Yeast (PDY)

Ditimbang serbuk PDB sebanyak 24 gram dan ekstrak yeast sebanyak 10 gram kemudian dilarutkan dalam 1000 ml air suling dan dipanaskan. Selanjutnya medium yang sudah jadi disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan diukur pH (pH 6).

Pengolahan Sampel Penelitian

Sampel tangkai daun murbei (*Morus alba* L.) dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel dan dipotong kecil kurang lebih 1 cm lalu dilakukan sterilisasi permukaan dengan cara direndam dalam etanol 70% selama 30 detik kemudian direndam dalam larutan natrium hipoklorit (NaOCl) 5,25% selama 30 detik. Bilas dengan aquadest steril sebanyak 3 kali. Sampel dikeringkan diatas tissue steril.

Isolasi Fungi Endofit

Ditimbang medium PDAC ke dalam cawan petri steril, ditunggu hingga memadat. Kemudian potongan sampel ditempelkan diatas medium secara aseptis lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 4-5 hari atau sampai ada pertumbuhan koloni fungi endofit. Setelah terjadi pertumbuhan koloni, segera diisolasi guna didapatkan biakan murni.

Pemurnain Koloni Fungi

Medium yang digunakan untuk pemurnian fungi endofit adalah medium yang sama yaitu PDAC. Fungi endofit yang telah tumbuh dipindahkan ke cawan petri lain, berisi medium PDAC yang telah padat kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 3-5 hari.

Pengamatan Makroskopik Fungi Endofit

Fungi endofit yang telah diinkubasi selama 3-5 hari pada suhu kamar diamati berdasarkan ciri-ciri makroskopik dengan cara langsung melihat bentuk dan warna koloni fungi endofit.

Fermentasi Jamur Endofit

Hasil isolasi fungi endofit tangkai daun murbei (*Morus alba* L.) dimasukkan kedalam Erlenmeyer 250 ml yang mengandung 100 ml medium PDY lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 11-15 hari sambil sesekali dikocok tiap hari.

Ekstraksi Senyawa Endofit

Setelah melakukan fermentasi selama 11-15 hari, media fermentasi dipisahkan miselinya dengan menggunakan kertas saring. Ekstrak cair, diperoleh selanjutnya dilakukan pemisahan dengan metode ekstraksi cair-cair dengan corong pisah menggunakan etil-asetat. Ekstrak yang diperoleh diuapkan lalu disimpan didesikator untuk dapat digunakan pada uji selanjutnya.

Identifikasi Metabolit Sekunder

Ekstrak kental isolat fungi endofit tangkai daun murbei (*Morus alba* L.) diletakkan pada plat tetes secukupnya. Untuk identifikasi senyawa alkaloid ditambahkan pereaksi Dragendroff dan Wagner. Hasil positif yang menggunakan pereaksi Dragendroff berbentuk endapan

merah jingga dan pereaksi Wagner terbentuk endapan coklat. Identifikasi senyawa flavonoid, ekstrak kental isolat fungi endofit dilarutkan dengan metanol panas dan ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg serta 5 tetes HCl pekat. Hasil positif terbentuk warna jingga. Untuk identifikasi senyawa polifenol ditambahkan pereaksi FeCl₃ 1%. Hasil positif terbentuk warna hijau, merah, ungu, biru kehitaman, biru tua atau hijau kehitaman.

Penyiapan Uji Aktifitas Antioksidan

Pembuatan Larutan DPPH 0,04 mM

Larutan DPPH 0,4 mM dibuat dengan cara menimbang DPPH sebanyak 0,094 mg, kemudian dilarutkan dengan metanol hingga volume 10 ml.

Pengujian Kualitatif Antioksidan

Ekstrak dari hasil fermentasi dilakukan uji perendaman radikal bebas untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak fungi endofit *Morus alba* L. Uji ini menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dengan cara menotolkan cairan fermentasi dan miselia plat KLT kemudian dielusi dengan n-heksan : etil asetat (1:5). Plat KLT dikeringkan dan disemprotkan dengan larutan DPPH 0,04 mM. Setelah diamati plat KLT, uji positif sebagai antioksidan apabila terjadi perubahan warna pada plat KLT dari warna ungu menjadi warna putih kekuningan.

Pembuatan Larutan DPPH 0,4 mM

Larutan DPPH 0,4 mM dibuat dengan cara menimbang DPPH sebanyak 0,94 mg, kemudian dilarutkan dengan etanol absolut hingga volume 10 ml.

Pengujian Kuantitatif Antioksidan

Uji kuantitatif dilakukan dengan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH. Sampel dan pembanding dilarutkan dalam etanol absolut kemudian ditambahkan larutan stok DPPH dengan perbandingan volume 1:1 dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar menggunakan wadah gelap yang dilapisi aluminium foil dan tertutup. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer. Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan nilai IC₅₀.

Pembuatan Larutan Pembanding Kuarsetin

Larutan stok 50 ppm dibuat dengan cara menimbang kuarsetin setara 5 mg dan dilarutkan dengan etanol absolut sambil diaduk dan dihomogenkan lalu dicukupkan volumenya hingga 100 ml, kemudian dilakukan pengenceran :

1. Larutan stok dipipet sebanyak 0,2 ml, kemudian dicukupkan dengan etanol absolut sampai volume akhir 5 ml (2 ppm)
2. Larutan stok dipipet sebanyak 0,4 ml kemudian dicukupkan dengan etanol absolut sampai volume akhir 5 ml (4ppm)

Larutan stok dipipet sebanyak 0,6 ml kemudian dicukupkan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian yang telah dilakukan yaitu tentang penentuan golongan senyawa dari metabolit sekunder hasil isolasi fungi endofit tangkai daun murbei (*Morus alba* L.) yang berefek sebagai antioksidan. Hasil isolasi pada hari ke 5 diperoleh sebanyak dua jenis fungi endofit yaitu MAIRP dan MAIRH, hasil ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan Mey *et al*, 2016 pada daun murbei (*Morus alba* L.) yang mendapatkan tiga jenis fungi endofit yaitu (P1), (M2) dan (C3). Dapat dilihat dari gambar dibawah ini (gambar 1.)

Tahapan selanjutnya yaitu pemurnian koloni dan pengamatan secara makroskopik. Hasil pengamatan dapat dilihat pada tabel 1.

Isolat fungi difermentasi selama 14 hari menggunakan sistem batch. Fermentasi sistem batch adalah sistem tertutup, artinya semua nutrisi yang dibutuhkan mikroba selama pertumbuhan dan pembentukan produk berada didalam satu fermentor. Jadi tidak ada penambahan atau pengambilan hasil selama fermentasi berlangsung. Keuntungan sistem ini adalah mudah, sederhana, dan kecil kemungkinan adanya kontaminasi. Perubahan warna yang terjadi pada saat inkubasi menunjukkan adanya proses fermentasi yang dilakukan oleh isolat fungi endofit dimana perubahan ini menunjukkan metabolit sekunder telah diproduksi (McNeil and Harvey, 2008). Fermentat kemudian diekstraksi cair-cair (ECC) dengan pelarut etil asetat. alasan pemilihan ekstraksi cair-cair karena selain sampel yang digunakan berupa cairan, ekstraksi cair-cair juga lebih sederhana dan mudah dilakukan dan etil asetat digunakan sebagai pereaksi karena merupakan pelarut organik yang sangat baik menarik senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan. jumlah ekstrak yang diperoleh sebanyak 450 mg.

Penentuan golongan senyawa metabolit sekunder ekstrak etil asetat diduga mengandung alkaloid, flavonoid dan polifenol (Tabel 2).

Hasil yang di peroleh tersebut sejalan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Nanrang dkk 2017 pada daun murbei (*Morus alba* L.)

Pengujian secara kualitatif aktivitas antioksidan dengan menggunakan uji kualitatif. Pada uji kualitatif, ekstrak etil asetat tangkai daun murbei (*Morus alba* L.) ditotolkan pada lempeng KLT kemudian dielusi dengan etil asetat. (gambar 2).

Rf 0,47 diduga memiliki aktivitas antioksidan ditandai dengan imbulnya perubahan warna dari warna ungu ke kuning. Selanjutnya dilakukan uji kuantitatif Metode DPPH. Hasil pengujian menunjukkan bahwa IC₅₀ dari isolat fungi adalah 298,044 mg/ml (table 4).

Aktivitas antioksidan merupakan suatu senyawa atau ekstrak untuk menghambat reaksi oksidasi yang dapat dinyatakan oleh % peredaman atau penghambatan (Wijaya 2012). Aktivitas antioksidan dari isolat MAIRP fungi endofit tangkai daun murbei (*Morus alba* L.) pada tabel IV menunjukkan nilai IC₅₀ sebesar 298,044 mikrogram/mL yang tergolong sedang sedangkan pembanding kuarsetin sebesar 4,755 mikrogram/mL tergolong sangat kuat (Sinaga 2009), hasil tersebut menunjukkan penelitian yang dilakukan oleh Nanrang dkk 2017 terhadap daun murbei mempunyai aktivitas antioksidan lebih bagus yaitu 54,57 mikrogram/ML yang tergolong kuat.

KESIMPULAN

Adapun kesimpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Ekstrak etil asetat isolat fungi endofit tangkai daun murbei memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ 298,044 mikrogram/mL dan kuarsetin sebesar 4,755 mikrogram/mL
2. Senyawa yang terkandung dalam ekstrak etil asetat isolat MAIRP fungi endofit tangkai daun murbei diduga adalah alkaloid, flavonoid, dan polivenol.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima Kasih kepada Ibu Herlina Rante, Ibu Sukriani Kursia dan Ratih Arum Astuti atas bantuannya dalam menyelesaikan penelitian dan jurnal saya. Motivasi serta bimbingannya sangat membantu saya dalam menyelesaikan penelitian dan jurnal ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. El-Beshbishy, H.A., Singab, A.N.B., Sinkkonen, J., & Pihlaja, K. 2006. Hypolipidemic and antioxidant effects of *Morus alba* L.(Egyptian mulberry) root bark fractions supplementation in cholesterol-fed rats. *Life sciences* 78, 2724-2733.
2. Haryanto, Susgeng. 2009. *Ensiklopedia Tanaman Obat Indonesia*. Palmall: Yogyakarta.
3. Iqbal, S., Younas, U., Chan, K.W., Safraz, R.A., & Uddin, M. K. 2012. Proximate composition and antioxidant potential of leaves from three varieties of Mulberry (*Morus sp.*): a comparative study. *International journal of molecular sciences* 13, 6651-6664.
4. McNeil, B. and Harvey, L.M., 2008. *Practical Fermentation Technology*, John Wiley & Son Ltd, England : 42, 70-90, 100-101.
5. Mey, A.W., Rante, H., dan Kursia, S., 2016. "Isolasi Fungi Endofit dari Daun Murbei (*Morus alba* L.) sebagai Penghasil Antioksidan". Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi : Makassar.
6. Nanrang A, N., Rante, H., dan Kursia, S., 2017. "Penentuan Golongan Metabolit Sekunder Isolat Fungi Endofit F1 Dari Daun Murbei (*Morus alba* L.) Yang Berefek Sebagai Antioksidan". Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi : Makassar
7. Panovska, T.K., Kulevanova, S., Stefova., 2005, In Vitro Antioxidant Activity of Some Teucrium Spesies (Lamiaceae), *Acta Pharm*, 55 hal 207-214
8. Prihatiningtias, W., 2005. Senyawa bioaktif Fungi Endofit Akar kuning (*Fibraurea chloroleuca* Miers) sebagai senyawa antimikroba. Tesis. Sekolah Pascasarjana UGM.
9. Sinaga, I.L.H., 2009, Skrining Fitokimia dan Uji aktivitas Antioksidan Dari Ekstrak Etanol Buah Terong Belanda (*Solanum betaceum Cav.*) Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Sumatra Utara, Medan.
10. Tan, R.X. & Zou, W.X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod. Rep* 18: 448-459.
11. Trilaksani, W., 2003, Antioksidan: Jenis, Sumber, Mekanisme Kerja dan Peran Terhadap Kesehatan, Institute Pertanian Bogor, Bogor, hal 1-12
12. Winarti, Sri. 2010. Makanan Fungsional. Yogyakarta.

Lampiran Tabel dan Gambar

Tabel 1. Hasil pengamatan makroskopik jenis isolat fungi endofit dari tangkai daun murbei (*Morus alba* L.)

Isolat	Gambar	Ciri Makroskopik
Isolat MAIRP 01		Warna koloni putih, pertumbuhan koloni agak tipis dan rata, permukaan halus dan terdapat bulu-bulu.
Isolat MAIRH 02		Warna koloni hijau terdapat warnah putih dibagian pinggirnya, pertumbuhan koloni agak tipis dan rata dan tidak terdapat bulu halus.

Tabel 2. Penentuan golongan senyawa metabolit sekunder

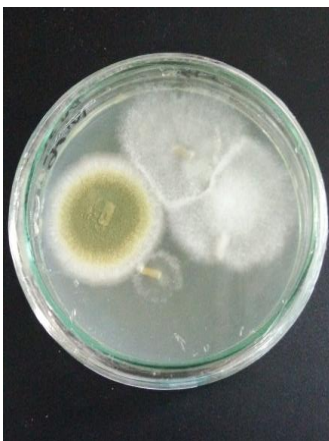
Uji	Reagen	Hasil
Alkaloid	Dregendrof	+
	Wegner	+
Flavonoid	Methanol, HCL pekat	+
Polifenol	FeCl ₃	+

Tabel 3. Nilai Rf yang teramati pada sinar uv 254 dan 365 serta penyemprotan H₂SO₄ 10%

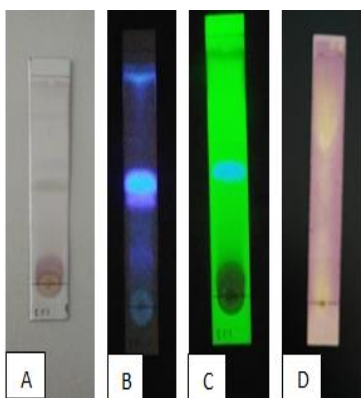
Sampel	Noda teramati	Nilai Rf			
		UV 254	UV 365	Semprot H ₂ SO ₄ 10 %	Penyemprotan DPPH 0,04 Mm
Isolat IR 01	Noda I	0,10	0,18	0,10	0,47
	Noda II	0,47	0,41	0,47	-
	Noda III	-	0,47	0,58	-
	Noda IV	-	-	0,81	-

Tabel 4. Pengujian aktivitas antioksidan

Sampel uji	konsentrasi	Replikasi			rata-rata	absorbansi blanko	%aktivitas antioksidan	IC50 mikrogram/mL
		1	2	3				
Isolat MAIRP	100	0,774	0,766	0,764	0,768		31,486	298,044
	200	0,66	0,654	0,684	0,666	1,121	40,588	
	300	0,551	0,528	0,514	0,531		52,631	
	400	0,485	0,466	0,45	0,467		58,340	
	500	0,368	0,374	0,351	0,364		67,498	
Kuarsetin	2	0,519	0,546	0,547	0,537		36,259	4,755
	4	0,487	0,504	0,511	0,500	0,843	40,608	
	6	0,385	0,377	0,378	0,38		54,922	
	8	0,229	0,199	0,198	0,208		75,246	
	10	0,112	0,139	0,142	0,131		84,460	



Gambar 1. Pertumbuhan koloni fungi Endofit dari daun Murbei



Gambar 2. Kromatogram hasil kualitatif deteksi senyawa antioksidan dari isolat MAIRP fungi endofit tangkai daun murbei (*Morus alba L.*)

Keterangan:

Gambar visualisasi dengan H₂SO₄ 10%

Gambar visualisasi dengan sinar UV 365

Gambar visualisasi dengan sinar UV 254

Gambar visualisasi dengan DPPH 0,04 Mm