



Prosiding

SEMINAR NASIONAL *BASIC SCIENCE VI*

*Sains Membangun Karakter dan Berpikir Kritis
Untuk Kesejahteraan Masyarakat*

Ambon, 07 Mei 2014

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PATTIMURA
AMBON**

Hak cipta dilindungi Undang-Undang

Cetakan I, Agustus 2014

Diterbitkan oleh: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pattimura

ISBN: 978-602-97552-1-2

Deskripsi halaman sampul : Gambar yang ada pada cover adalah kumpulan benda-benda langit dengan berbagai fenomena

ISOLASI KAPANG ENDOFIT DARI TANAMAN MENGKUDU (*Morinda citrifolia* L) DAN POTENSINYA SEBAGAI ANTIDIABETES DAN ANTIOKSIDAN

Edward J. Dompeipen

Balai Riset dan Standardisasi Industri Ambon, Jl. Kebun Cengkeh Ambon, Maluku. 97128
e-mail : dompeipenedward@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian isolasi kapang endofit dari ranting tanaman Mengkudu (*Morinda citrifolia* L) dan potensinya sebagai antidiabetes dan antioksidan telah dilakukan. Aktivitas antidiabetes dilakukan dengan menggunakan metode inhibisi α -glukosidase dan aktivitas antioksidan menggunakan metode peredaman radikal bebas dengan pereaksi 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Isolasi dilakukan pada media tanam *Cornmeal Malt Agar* (CMMA) dan *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan diperoleh 5 isolat kapang, yaitu A.Mc.1F, A.Mc.2F, B.Mc.1F, B.Mc.2F dan B.Mc.3 F. Aktivitas inhibisi α -glukosidase untuk ekstrak filtrat dan biomassa untuk isolat A.Mc.1F (53,51 dan 30,94%), A.Mc.2F(89,77 dan 30,94%), B.Mc.1F (74,56 dan 11,50%) dan B.Mc.2F(49,45 dan 65,17%) sehingga tidak berpotensi sebagai antidiabetes, hanya isolat kapang B.Mc.3F (89,77 dan 72,88%) yang memiliki aktivitas antidiabetes. Aktivitas antioksidanisolat A.Mc.1F (IC₅₀ 156,52), A.Mc.2F(IC₅₀ 279,84), B.Mc.1F (IC₅₀ 123,53), B.Mc.2F(IC₅₀ 188,53) dan B.Mc.3F(IC₅₀ 602,25) sehingga tidak ada isolat yang berpotensi sebagai antioksidan.

Kata kunci : *Morinda citrifolia* L, α -glucosidase, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, Cornmeal Malt Agar, Potato Dextrose Agar.

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara *mega diversitas* dengan segala kekayaan alamnya, termasuk kekayaan tanaman obat yang sebelumnya belum dieksploitasi. Begitu juga dengan hutan-hutan tropika Indonesia yang mengandung lebih dari 30.000 jenis tanaman yang sangat potensial untuk diteliti dan dikembangkan oleh para peneliti Indonesia. Berbagai tanaman yang lebih kurang 1.000 spesies tanaman telah menjadi tanaman obat atau bahan baku obat. Tanaman tersebut dapat mengobati berbagai macam penyakit degeneratif, seperti kardiovaskuler, kanker, diabetes dan anemia (Supriadi, *et al*, 2001).

Setiap tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa mikroba endofit yang mampu menghasilkan metabolit sekunder yang diduga sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik (*genetic recombination*) dari tanaman inangnya ke dalam mikroba endofit (Tan, *et al*. 2001). Setiap tanaman dapat mengandung satu atau lebih mikroba endofit yang terdiri dari bakteri dan jamur (Strobel, *et al*. 2003).

Kapang endofit merupakan mikroba endofit yang seluruh atau sebagian hidupnya berada dalam jaringan hidup tanaman inang, tanpa memberikan gejala-gejala merugikan (Petrini, *et al*. 1992). Interaksi antara mikroba endofit dengan tanaman diperkirakan saling menguntungkan (mutualisma), yaitu tanaman memberikan nutrisi untuk mikroba, kemudian mikroba mentransformasikan dan menghasilkan senyawa bioaktif yang mampu melindungi tanaman dari predator (Bacon, 2000).

Kemampuan mikroba endofit menghasilkan senyawa bioaktif yang sama dengan tanaman inangnya merupakan peluang untuk mendapatkan sumber bahan obat yang alami, murah dan ramah lingkungan. Beberapa kajian tentang mikroba endofit terbukti memiliki potensi ekonomi yang tinggi sebagai bahan baku obat atau obat. Pada bidang industri farmasi mikroba endofit dapat menghasilkan enzim, vitamin, antioksidan, antimikroba, antikanker, antiinflamasi dan agen farmakologi (Onifade, 2007).

Umumnya, mikroba endofit dapat diisolasi dari semua jaringan tanaman dan memerlukan seleksi dan skrining (penapisan) yang ketat untuk mengetahui senyawa bioaktif yang dihasilkan. Banyak hasil penelitian menunjukkan bahwa bagian tanaman yang berbeda dari suatu tanaman inang dan habitat yang berbeda dapat menunjukkan jenis-jenis mikroba endofit dan senyawa kimia yang berbeda.

Diabetes mellitus (DM) merupakan suatu kelompok penyakit metabolik dengan karakteristik hiperglikemia yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin atau kedua-duanya. Hiperglikemia kronik pada diabetes berhubungan dengan kerusakan jangka panjang, disfungsi atau kegagalan beberapa organ tubuh, terutama mata, ginjal, saraf, jantung dan pembuluh darah (Arif,A.S., 2008).

Di Indonesia, jumlah penderita diabetes tercatat lebih dari 13 juta pada tahun 2003 dan diperkirakan terus meningkat menjadi lebih dari 20 juta pada tahun 2030. Data Badan Kesehatan Dunia (WHO) memprediksi jumlah penderita diabetes di dunia terus melonjak hingga mencapai 330 juta jiwa pada 2025. Peningkatan di negara berkembang sekitar 170%, sementara di negara maju 41% (Arif Adi, 2008).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kapang endofit dari tanaman mengkudu yang berpotensi menghasilkan senyawa kimia sebagai antidiabetes dan antioksidan.

METODE PENELITIAN

Koleksi dan Penyiapan

Materi penelitian adalah ranting tumbuhan Mengkudu, yang dikoleksi dari daerah di sekitar Bogor. Tumbuhan tersebut diidentifikasi di Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Penelitian Indonesia.

1. Steriliasi Permukaan

Ranting tanaman panjang 2 cm dan Φ 1 cm di cuci dengan aliran air selama 10 menit. Setiap ranting dipotong empat potongan masing-masing sepanjang 1 cm. Potongan ranting ini disterilisasi permukaannya dengan mencuci (merendam) dalam etanol 75% selama 1 menit,

kemudian selama 5 menit dalam larutan NaOCl 5,3%, dan terakhir selama 0,5 menit dalam etanol 75% (Croizer, *et al.*, 2006).

Isolasi Kapang Endofit

1. Penyiapan Media Isolasi

Media CMMA terdiri dari *cornmeal agar* 17,0 g, *malt extract* 2,0 g, air demineral 1000 mL. Atur pH sampai 6,0 dengan NaOH. Kloramfenikol (50 mg/L) ditambahkan setelah sterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit pada 121⁰C. Media PDA terdiri dari 4,0 g *potato starch*, 20 g *dextrose* dan agar 15,0 g. Masukkan 39 gram PDA dalam 1000 mL air demineral kemudian dihomogenkan. Panaskan sambil diaduk hingga larutan mendidih. Ditutup dengan aluminium foil. Disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit kemudian ditambahkan Kloramfenikol (50 mg/L). Masukkan 24 gram PDB dalam 1000 ml air suling. Panaskan sampai media larut sepenuhnya. Sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Aduk rata sebelum pengeluaran. Dalam pekerjaan tertentu, ketika pH 3,5 diperlukan, mengasamkan media dengan asam tartarat steril 10%.

2. Isolasi dan Pemurnian Kapang Endofit

Ranting tanaman dibelah dua secara *longitudinal*, lalu diletakkan di atas cawan petri berisi *Corn Meal-Malt Agar* (CMMA) yang telah dicampur dengan kloramfenikol 0,05 mg/mL (Theantana *et al.*, 2007) dan *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang telah dicampur dengan kloramfenikol 0,05 mg/mL (Croizer, *et al.*, 2006). Keduanya diinkubasi selama 3 hari pada suhu 25⁰C, kemudian koloni dipindahkan ke PDA dalam cawan petri dan selanjutnya diinkubasi lagi pada suhu 25⁰C dan dilakukan pengecekan secara berkala untuk pemurnian lebih lanjut. Masing-masing endofit diisolasi melalui beberapa kali ditanam pada agar miring (PDA) dan diinkubasi dalam inkubator suhu 25⁰C.

Uji Aktivitas Antidiabetes terhadap Hasil Bioproduksi Senyawa Kimia oleh Kapang Endofit.

Uji aktivitas antidiabetes secara *in vitro* dilakukan dengan menggunakan metode α -glukosidase (Saijyo *et al.*, 2008). Sebanyak 1 mg α -glukosidase dilarutkan dalam 1000 μ L buffer fosfat (pH 7). Kemudian 12 μ L larutan enzim diencerkan dalam 30 μ L buffer fosfat sebelum digunakan untuk pengujian. Sebanyak 250 μ L 20 mM-paranitrofenil- α -D glukopiranosida, 475 μ L 100 mM buffer fosfat dan 25 μ L larutan sampel dilarutkan dalam DMSO. Setelah larutan homogen diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37⁰C, lalu ditambahkan 250 μ L larutan enzim α -glukosidase, inkubasi dilanjutkan selama 25 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL 0.2 M Na₂CO₃. Jumlah *p*-nitrofenol yang dilepaskan diukur pada panjang gelombang, λ = 400 nm. Selanjutnya, kemampuan inhibisi dihitung berdasarkan rumus:

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{OD_{test} - OD_{blanko}}{COD_{test} - COD_{blanko}} \times 100\%$$

OD test menunjukkan absorbansi sampel dengan penambahan enzim, OD blanko adalah absorbansi sampel tanpa penambahan enzim, COD test absorbansi kontrol dengan penambahan enzim dan COD blank adalah absorbansi kontrol tanpa penambahan enzim.

Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode peredaman radikal bebas dengan menggunakan pereaksi DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Sebanyak 19,75 mg DPPH (BM= 394,32 g/mol) ditimbang, kemudian dilarutkan dengan metanol p.a. hingga 50 mL, ditempatkan dalam botol gelap. Sebanyak 1 mL larutan DPPH 1mM dipipet ke dalam tabung reaksi yang telah ditera 5 mL, kemudian ditambahkan metanol p.a. hingga tanda dan dihomogenkan. Mulut tabung ditutup dengan aluminium foil. Sebanyak 5 mg sampel ditimbang kemudian dilarutkan ke dalam 10 mL metanol p.a., larutan ini adalah larutan induk. Sebanyak 50, 100, 250, 500 dan 1000 µL larutan induk dipipet ke dalam tabung reaksi yang telah ditera 5 mL untuk mendapatkan konsentrasi 5, 10, 25, 50, 100 µg/mL. Tambahkan 1 mL DPPH 1mM ke dalam masing-masing tabung dan tambahkan metanol p.a. sampai 5 mL kemudian dihomogenkan. Sebanyak 3 mg vitamin C ditimbang kemudian dilarutkan dengan metanol p.a. hingga 5 mL. Pipet 50, 100, 150, 200 dan 250 µL masukan kedalam labu terukur 5 mL dengan ditambahkan 1 mL larutan DPPH 1 mM kemudian tambahkan metanol p.a. hingga diperoleh konsentrasi larutan vitamin C sebagai kontrol positif sebesar 3, 6, 9, 12, 15 µg/mL. Larutan uji diinkubasi dalam penangas air dengan suhu 37 °C selama 30 menit. Serapan diukur pada panjang gelombang serapan maksimum 515 nm menggunakan spektrofotometer cahaya tampak. Persentase inhibisi dihitung dengan rumus :

$$\text{Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ adalah konsentrasi antioksidan (µg/mL) yang mampu menghambat 50% radikal bebas. Nilai IC₅₀ diperoleh dari perpotongan garis antara 50% daya hambatan dengan sumbu konsentrasi, kemudian dimasukkan ke dalam persamaan $y = a + bx$, di mana $y = 50$ dan nilai x menunjukkan IC₅₀. Ekstrak dikatakan aktif bila nilai IC₅₀ lebih kecil dari 100 µg/ML.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kapang endofit dari ranting tumbuhan mengkudu (*Morinda citrifolia* L)

Hasil isolasi kapang-kapang endofit dari ranting tumbuhan mengkudu diperoleh lima isolat, dua isolat dari media tumbuh CMMA dan tiga dari media PDA. Pada penelitian yang dilakukan di Malaysia dengan sampel dari batang daun tumbuhan mahoni dan ditumbuhkan dalam media PDA diperoleh empat isolat kapang (Son., *et al.*, 2002). Pada penelitian yang dilakukan di Indonesia, isolasi kapang endofit dari batang tanaman mengkudu dengan menggunakan media PDA diperoleh sebelas isolat kapang (Shirly., *et al.*, 2007). Perbedaan jumlah isolat disebabkan karena adanya perbedaan kondisi pada saat isolasi dan asal sampel tumbuhan.

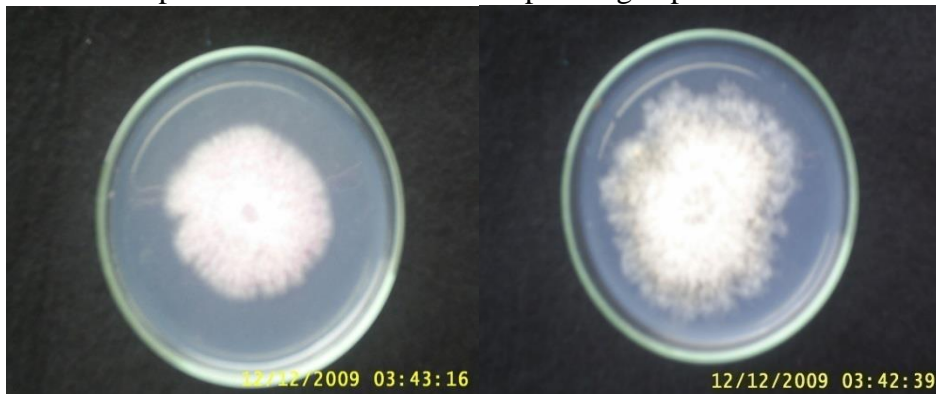
Berat ekstrak filtrat dan biomassa dari isolat-isolat ini tidak ada perbedaan yang signifikan, hal ini disebabkan isolat-isolat ini memiliki metabolit sekunder yang disekresikan pada bagian intraseluler maupun ekstraseluler yang sama. Isolat kapang endofit dari ranting tumbuhan mengkudu dan pengkodean serta berat filtrat dan biomassa dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Isolat-isolat kapang endofit dari ranting tumbuhan mengkudu

No	Tanaman	Isolat Kapang	Berat Ekstrak Etil asetat	
			Filtrat (g)	Biomassa (g)
1.	Mengkudu	A.Mc.1F	0,0697	0,0557
2.	Mengkudu	A.Mc.2F	0,0558	0,1326
3.	Mengkudu	B.Mc.1F	0,0619	0,0603
4.	Mengkudu	B.Mc.2F	0,0584	0,0646
5.	Mengkudu	B.Mc.3F	0,0688	0,0538

Gambar isolat kapang endofit dari ranting tumbuhan mengkudu

Isolat-isolat kapang endofit dari ranting tumbuhan mengkudu ini dapat dilihat pada Gambar 1 – 5, setelah dilakukan pemotretan secara makroskopis dengan perbesaran 4000 kali.



Gambar 1. Isolat kapang A.Mc.1F

Gambar 2. Isolat kapang A.Mc.2F



Gambar 3. Isolat kapang B.Mc.1F

Gambar 4. Isolat Kapang B.Mc.2F



Gambar 5. Isolat kapang B.Mc.3F

Aktivitas antidiabetes kapang endofit dari ranting tumbuhan mengkudu

Uji Aktivitas inhibisi terhadap enzim α -glucosidase isolat kapang endofit dari ranting tumbuhan mengkudu disajikan pada Tabel 2.

Tabel.2. Aktivitas inhibisi terhadap enzim α -glucosidase isolat-isolat kapang endofit dari ranting tumbuhan mengkudu

No	Nama Tumbuhan	Isolasi Kapang	Absorbansi		α -Glucosidase (100%)	
			Filtrat	Biomassa	Filtrat	Biomassa
1.	Mengkudu	A.Mc.1F	0,0550	0,0817	53,51	30,94
2.	Mengkudu	A.Mc.2F	0,0121	0,0817	89,77	30,94
3.	Mengkudu	B.Mc.1F	0,0301	0,1047	74,56	11,50
4.	Mengkudu	B.Mc.2F	0,0598	0,0412	49,45	65,17
5.	Mengkudu	B.Mc.3F	0,0121	0,0322	89,77	72,78

Isolat-isolat kapang endofit ini tidak berpotensi untuk dikembangkan sebagai isolat untuk bioproduksi senyawa-senyawa antidiabetes, hanya isolat B.Mc.3F yang berpotensi. Penelitian yang dilakukan Son Radu dan kawan-kawan juga diperoleh isolat-isolat kapang dari tumbuhan ini yang tidak memiliki aktivitas sebagai antimikroba dan antitumor (Son., *et al*, 2002).

Penelitian untuk melihat potensi antidiabetes dari tanaman obat Indonesia telah dilakukan juga oleh Maria D.P.T dan kawan-kawan dengan menggunakan metode uji penghambatan enzim α -glucosidase dan α -amilase. Skrining dilakukan terhadap ekstrak metanol empat puluh dua spesies yang terdiri dari dua puluh tujuh suku tanaman obat, termasuk tanaman mengkudu. Hasil skrining diperoleh nilai penghambatan enzim α -glucosidase ekstrak metanol tanaman mengkudu sebesar sebesar 86% (Maria, et al, 2009).

Aktivitas antioksidan kapang endofit isolat-isolat kapang endofit dari ranting tumbuhan mengkudu

Hasil uji aktivitas antioksidan isolat-isolat kapang endofit dari ranting tumbuhan mengkudu dengan metode DPPH dengan menggunakan vitamin C sebagai kontrol positif, disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Aktivitas antioksidan isolat kapang endofit dari ranting tumbuhan mengkudu

No	Nama Tumbuhan	Isolat Kapang	IC ₅₀	Keterangan
1.	Mengkudu	A.Mc.1F	156,52	Tidak aktif
2.	Mengkudu	A.Mc.2F	279,84	Tidak aktif
3.	Mengkudu	B.Mc.1F	123,53	Tidak aktif
4.	Mengkudu	B.Mc.2F	188,03	Tidak aktif
5.	Mengkudu	B.Mc.3F	602,25	Tidak aktif

Isolat-isolat kapang endofit dari ranting tumbuhan ini juga tidak aktif sebagai antioksidan. Nilai IC₅₀ isolat-isolat ini di atas 100 ppm sangat jauh dibandingkan dengan nilai inhibisi dari vitamin C sebagai kontrol positif sebesar 3,44 ppm. Dengan demikian isolat-isolat ini tidak berarti tidak dapat dikembangkan untuk bioproduksi senyawa antioksidan.

Penelitian yang dilakukan oleh Sarika R.Desmukh dan kawan-kawan di India juga melakukan uji aktivitas antioksidan dari ekstrak tanaman mengkudu dengan metode penghambatan radikal bebas DPPH. Kesimpulan dari penelitian mereka adalah bahwa ekstrak metanol dari akar tanaman ini memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 92,5% (Sarika, et al, 2010).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Isolasi kapang endofit dari ranting tanaman Mengkudu (*Morinda citrifolia* L) pada media CMMA dan PDA, diperoleh 5 isolat kapang, yaitu A.Mc.1F, A.Mc.2F, B.Mc.1F, B.Mc.2F dan B.Mc.3F. Aktivitas inhibisi α -glukosidase ekstrak filtrat dan biomassa untuk isolat A.Mc.1F (53,51 dan 30,94%), A.Mc.2F (89,77 dan 30,94%), B.Mc.1F (74,56 dan 11,50%) dan

B.Mc.2F(49,45 dan 65,17%) sehingga tidak berpotensi sebagai antidiabetes, hanya isolat kapang B.Mc.3F (89,77 dan 72,88%) yang memiliki aktivitas antidiabetes. Aktivitas antioksidan isolat A.Mc.1F (IC₅₀ 156,52), A.Mc.2F(IC₅₀ 279,84), B.Mc.1F (IC₅₀ 123,53), B.Mc.2F(IC₅₀ 188,53) dan B.Mc.3F(IC₅₀ 602,25) sehingga tidak ada isolat yang berpotensi sebagai antioksidan.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan terhadap isolat kapang endofit B.Mc.3F yang aktif sebagai antidiabetes untuk dapat memproduksi senyawa antidiabetes. Perlu juga dilakukan penelitian aktivitas antidiabetes secara *invivo* terhadap senyawa hasil bioproduksi isolat kapang dari ranting tanaman mahoni ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Arif, A. S.. "Mengenal obat antidiabetes" 26 Desember. 2
<http://diarif.adi.com/2008/12/literasi-informasi-obat-diabetes-oral.html>
- Bacon, C.W., Microbial Endophytes. 2000 Marcell Dekker, New York, 3 - 20.
- Croizer J., S.E. Thomas., M.C. Awie., H.C. Evan., A.A. Holmes. 2006. Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies isolated from stem and pods of *Theobroma cacao*. Plant Pathology 55: 783-791.
- Maria, D.P.T, Gunawan Puteri, Meg Raj Bandari and Jun Kawabata, 2009. Fungsional Foods For Chronic Diseases, Volume 4. Indonesian Medicinal Plant and Their Antidiabetic Potencies, Laboratory of Food Biochemistry, Division of Applied Bioscience, Graduate School of Agriculture, Hokaido University Sapporo- Japan. p. 110-119, ISSN 0-9767535-5-1.
- Onifade, AK. 2007, Research trends : Bioactive metabolites of fungal origin. Res. J. of Biol. Scie. 2 (1): 81-84.
- Saijyo J., Suzuki Y., Okuno Y., Yamaki H., 2008., a-glukosidase Inhibitor from *Bergenia Ligulata.*, J.Oleo Sci. 57 (8). 431-435
- Sarika R. D, Solomon, H, Prasad A. W. 2010. Antioxidant and Antiproliferative Activity of Root Suspension Culture of *Morinda citrifolia* L. Research Journal o Pharmacies and Technology. 03(04), ISSN 0974-3618.
- Shirly, K ,Endro, B. S. 2007. Isolation and Screening of Endophytic Microbes from *Morindacitrifolia* and their Ability to Produce Anti-Microbial Substances, Microbiology Indonesia, 1(3) , p. 145-148. ISSN 1978-3477
- Son, R, Chea ,Y.K, 2002. Preliminary Screening of Endophytic Fungi from Medicinal Plants in Malaysia for Antimicrobial and Antitumor Activity. Malays.J.Med Sci. July; 9(2): 23-33.
- Strobel, G.A, Bryn D. 2003., Bioprospecting for microbial endophytes and their natural product. Microbiol. and Molecular Biol. Review 67 (4): 491-502
- Supriadi. 2001. Tumbuhan Obat Indonesia Penggunaan dan Khasiatnya. Edisi Pertama. Pustaka Populer Obor. 145.
- Tan, RX, Zou, WX., 2001. Endophytes : a Rich Source of Functional Metabolites. J. Nat Prod, Rep. 18 : 448-459.
- Theantana T., Hyde K.O, Lumyong A. 2007., *Asparaginase* production by endophytic fungi isolated from some thai medical plants. KMITL, Scie.Tech. J. 7 (1): 13-18.