

Uji Antioksidan Fungi Endofitik BS-1 yang Berasosiasi dengan Bunga Sambiloto (*Andrographis paniculata*) dengan Beras Hitam sebagai Media Pertumbuhan

Srihayuni¹, Riga*², Edi Nasra³

^{1,2,3}Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang

Jln. Prof. Dr. Hamka, Air Tawar Padang, Indonesia

*rigakimia@fmipa.unp.ac.id

Abstract — Sambiloto (*Andrographis paniculata*) is a well known restorative plant from the Acanthaceae family and andrographolide was the super optional metabolite with different organic activities including cell reinforcement. *A. paniculata* is one of the restorative plants revealed as likely host for endophytic growths. The purpose of this research is to determine whether endophytic fungi associated with *A. paniculata* flower tissue can be used as a source of antioxidants. An isolate from the flowers of *A. paniculata* was coded as BS-1. Macroscopic observation of BS-1 fungi showed a white mushroom colony with a round shape in the middle and a slightly rough surface. The crude extract of endophytic fungus BS-1 reveals the presence of steroids, alkaloids, terpenoids, and phenolic compounds. The BS-1 fungus exhibits moderate antioxidant activity, expressed as an IC₅₀ value ranging from 101 to 250 ppm.

Keywords — *Andrographis paniculata*, antioxidant, endophytic fungi, BS-1

I. PENDAHULUAN

Antioksidan memiliki kemampuan untuk menetralkan radikal bebas dengan mengakomodasi atau menyumbangkan elektron untuk menghilangkan kelebihan elektron yang tidak berpasangan dari radikal tersebut. Pada saat molekul antioksidan bereaksi langsung dengan radikal reaktif, mereka menghancurkannya sementara waktu. Molekul antioksidan berubah menjadi radikal bebas baru yang kurang aktif, tetapi memiliki daya tahan lebih lama dan tingkat reaktivitas yang lebih rendah daripada radikal awal yang telah dinetralkan. Radikal bebas yang dihasilkan oleh antioksidan akan dinetralkan kembali oleh antioksidan lain atau mekanisme lain untuk menghilangkan sifat radikalnya [1].

Sambiloto (*Andrographis paniculata*) adalah tanaman obat populer yang berasal dari famili Acanthaceae dimana andrographolide adalah metabolit sekunder utamanya yang memiliki aplikasi obat yang sangat besar [2]. Sambiloto secara tradisional digunakan untuk mengobati sejumlah penyakit menular, termasuk pilek, demam, sakit tenggorokan, malaria, disentri, dan diare di Cina, India, dan negara – negara Asia Tenggara lainnya [3].

Sambiloto memiliki fenolik, flavonoid, dan tanin, di antara senyawa bioaktif lainnya. Menurut studi farmakologis, sambiloto memiliki sifat antiinflamasi, antimalaria, antipiretik, antidiabetes, imunomodulator, antioksidan, dan antivirus [4]. Salah satu tumbuhan obat yang teridentifikasi sebagai inang jamur endofit adalah sambiloto [5].

Jamur endofit merupakan mikroorganisme yang mengkolonisasi hampir semua jaringan tanaman seperti akar, bunga, daun, buah dan cabang [6]. Jamur endofit menghasilkan berbagai metabolit sekunder dengan tubuh dan struktur yang berbeda untuk membantu tanaman inangnya bertahan secara eksternal [7]. Jamur endofit menghasilkan mikotoksin beserta senyawa lain yang akan memberikan efek positif bagi fisiologis dan biokimia untuk kelancaran pertumbuhan sel inang [8].

Dalam penelitian ini, jamur endofit dengan kode BS (Bunga Sambiloto) dikultivasi pada media beras hitam. Beras hitam adalah beras berbiji dengan corak ungu tua dengan rasa sedikit manis [9, 10]. Belum pernah dilakukan penelitian tentang kemampuan aktivitas antioksidan jamur BS-1 dengan inang dari bunga *A. paniculata* dan ditumbuhkan pada media tanam beras hitam. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah fungi endofit yang berasosiasi dengan jaringan bunga *A. paniculata* dapat menjadi sumber senyawa antioksidan berdasarkan hal tersebut.

II. METODE PENELITIAN

A. Alat

Penelitian ini menggunakan neraca analitik, laminar airflow, spektrofotometri UV-Vis, aluminium foil, sarung tangan, jarum ose, cawan petri, corong, *waterbath*, inkubator, kuvet, alat - alat gelas, dan *autoclave*.

B. Bahan

Air suling, metanol p.a., alkohol 70%, Potato Dextrose Agar (PDA), beras hitam, etil asetat, HCl p.a., H_2SO_4 2 N, $FeCl_3$ 1%, asam asetat glasial, asam asetat anhidrat, DPPH, $NaOCl_3$ 3,5%, logam Mg, amoniakloform, reagen dragendorf, mayer, dan wagner adalah bahan yang digunakan.

C. Prosedur Penelitian

1. Inokulasi Jamur Endofit

Inokulasi dimulai dengan pengambilan tanaman *A. paniculata* yang dikumpulkan dari Kota Tabing, Banda Gadang, Kampung Nanggalo, Padang. Bunga *A. paniculata* diatur dengan luas 2 x 2 cm dan dibilas dengan air bersih bagian luar. Dua tahap perlakuan dilakukan untuk menjamin sterilisasi permukaan bunga *A. paniculata* yang telah dibersihkan. Bunga pertama kali direndam selama 45 detik dalam larutan etanol 70%. Langkah kedua melibatkan merendam bunga dalam larutan yang mengandung 3,5% $NaOCl_3$ selama tiga puluh detik. Tujuan dari prosedur sterilisasi ini adalah untuk menghilangkan mikroorganisme epifit pada permukaan bunga *A. paniculata* [11].

Sebagai kontrol negatif, bunga yang telah steril tersebut diletakkan dalam wadah yang berisi Potato Dextrose Agar (PDA) padat. Selanjutnya bunga dipotong berukuran 1 x 1 cm dan divaksinasi pada media PDA padat. Kemudian, media diteteskan pada suhu 28°C. Setelah beberapa minggu, organisme endofit yang berkembang pada media tersebut disubkultur untuk melepaskan satu jenis parasit endofit. Satu jamur endofit dipilih dari berbagai isolat untuk penelitian fitokimia lebih lanjut berdasarkan beberapa kriteria morfologi.

2. Pengamatan Jamur Endofit Secara Makroskopis Dan Mikroskopis

Pengamatan Makroskopis

Pada tahap ini, setelah isolat murni jamur endofit dipisahkan dilanjutkan dengan pengamatan secara visual menggunakan indera penglihatan manusia. Beberapa karakteristik yang diperhatikan meliputi warna, bentuk, tepi (margin), dan tinggi dari koloni jamur endofit yang tumbuh dalam media pertumbuhan khusus.

Indera penglihatan manusia hanya digunakan untuk mengamati jamur endofit yang diisolasi yang telah dipisahkan dan diproduksi pada tahap ini. Warna, bentuk, tepian, dan tinggi koloni jamur endofit yang tumbuh subur pada media tertentu merupakan ciri-ciri yang diamati.

Pengamatan Mikroskopis

Setelah tahap pengamatan makroskopis, dilanjutkan dengan identifikasi secara lebih mendetail menggunakan mikroskop. Metode yang digunakan adalah slide culture (Riddel). Dalam metode ini, jamur endofit dipanen dari media pertumbuhannya dan ditempatkan dalam bentuk slide yang khusus untuk mempermudah pengamatan di bawah mikroskop. Melalui pengamatan mikroskopis, para

peneliti dapat melihat struktur mikroskopis seperti spora jamur endofit. Spora adalah sel reproduksi pada jamur yang penting untuk identifikasi dan klasifikasi [12].

3. Optimasi Waktu Kultivasi Optimum

Penentuan waktu optimasi kultivasi jamur endofit merupakan langkah yang cermat dan teliti, di mana proses ini dianalisa secara komprehensif dengan mempertimbangkan kuantitas massa ekstrak yang dihasilkan selama periode budidaya. Melalui tahapan isolasi tunggal jamur endofit, waktu yang optimal untuk mengkultivasi mikroorganisme ini ditentukan dengan seksama, sehingga menghasilkan produksi metabolit sekunder yang lebih unggul dan berpotensi untuk aplikasi di berbagai bidang farmasi dan industri.

Dalam media Erlenmeyer 250 mL, jamur endofit yang tumbuh pada media padat dipotong-potong berukuran 1 x 1 cm dan dipindahkan ke media beras. Akan ada dua panen Erlenmeyer setiap minggu selama empat minggu. Menggunakan pelarut etil asetat, ekstrak EtOAc akan diekstraksi dari hasil panen setelah dipanen.

4. Uji Fitokimia dan Reaksi

Steroid/Terpenoid

Ekstrak EtOAc dicampurkan dengan amonia-kloroform dan H_2SO_4 2 N menggunakan tabung reaksi, dikocok, dan ditunggu sampai terbentuk dua fasa. Diambil lapisan bawah untuk pengujian selanjutnya dengan cara diteteskan keatas plat tetes. Setelah terjadi penguapan, ditambahkan asam asetat anhidrat dan H_2SO_4 p.a. ke dalamnya.

Steroid ditampilkan sebagai positif apabila terdapat warna hijau kebiruan, sedangkan terpenoid ditampilkan sebagai positif apabila terdapat warna merah.

Alkaloid

Tes alkaloid memanfaatkan lapisan atas pada pengujian steroid/ terpenoid. Lapisan atas diuji secara berurutan dengan tiga reagen dalam tabung reaksi diantaranya, pereaksi Dragendorf, pereaksi Mayer, dan pereaksi Wagner. Hasil positif alkaloid untuk masing - masing reagen akan ditandai dengan endapan coklat pada pereaksi Dragendorf, endapan putih pada pereaksi Mayer, dan endapan jingga untuk pereaksi Wagner.

Fenolik

Bahan uji untuk uji fenolik adalah ekstrak jamur BS-1. Setelah ekstrak ditempatkan pada plat tetes, larutan $FeCl_3$ 1% ditambahkan. Sebagai tanda adanya senyawa fenolik, warna pink akan memberikan hasil positif.

Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan mengambil konsentrat dari organisme endofit yang kemudian ditambahkan etanol 70% dalam tabung reaksi dan dihangatkan. Selain itu, satu tetes HCl pekat dan logam magnesium ditambahkan dengan tujuan mencapai hasil yang menguntungkan untuk

flavonoid. Warna merah muda akan berkembang jika hasilnya positif, menunjukkan adanya flavonoid.

5. Uji Antioksidan

Uji antioksidan dilakukan dengan menggunakan lima sampel bunga sambiloto yang sudah diekstrak hingga kering. Langkah selanjutnya adalah melarutkan 10 mg ekstrak sambiloto dalam 100 mL metanol pa untuk pembuatan larutan induk sampel dengan konsentrasi 100 ppm. Masing - masing sampel dilarutkan dengan pelarut methanol pa dalam konsentrasi yang berbeda yaitu 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm, dan 90 ppm.

Pembuatan larutan stok DPPH konsentrasi 50 ppm dilakukan dengan melarutkan 2,5 mg DPPH dan ditambahkan methanol pa hingga 50 mL. Kelima sampel dengan konsentrasi berbeda tersebut diambil masing - masing 2 mL dan ditambahkan 2 mL larutan DPPH. Pembuatan larutan kontrol untuk keperluan perbandingan dilakukan dengan mencampurkan 2 mL methanol pa dan 1 mL larutan DPPH 50 ppm.

Tahapan selanjutnya adalah inkubasi semua sampel pada suhu 27°C dengan waktu 30 menit dengan tujuan mengamati perubahan warna akibat aktivitas DPPH. Semua sampel yang telah diinkubasi diuji nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Inokulasi Jamur Endofit

Interaksi inokulasi dimulai dengan tahap pembersihan bunga sambiloto. Bunga sambiloto dicuci menggunakan air bersih untuk menghilangkan tanah dari lapisan luar bunga. Pembersihan dilakukan dengan memanfaatkan larutan natrium hipoklorit dan cairan keras yang memiliki intensitas tinggi sebagai pembersih untuk membuang mikroorganisme.

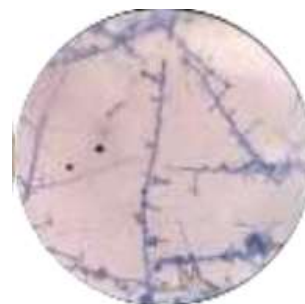
Bunga steril tersebut diinokulasi selama 7 hari pada media agar PDA yang sudah diberi antibiotik. Penggunaan media PDA ini adalah pilihan yang tepat karena kandungan ekstrak umbi kentang yang baik untuk jamur. Kandungan tersebut akan mendorong pemecahan pati pada jamur. Selain itu, jamur endofitk dapat memanfaatkan media tersebut sebagai sumber energi [13].

B. Pengamatan Makroskopis dan Mikroskopis Jamur Endofit

Isolat hasil dari sub-kultur pada media PDA diberi kode BS-1. Pengamatan makroskopis jamur BS-1 (Gambar 1) memperlihatkan koloni jamur yang berwarna putih berbentuk bulat pada bagian tengah dan permukaan agak kasar. Pemeriksaan mikroskopis jamur BS-1 (Gambar 2) ditemukan adanya spora dan hifa yang tidak terdeteksi.



Gambar 1. Morfologi Jamur BS-1 (makroskopis)



Gambar 2. Morfologi Jamur BS-1 (mikroskopis)

C. Optimasi Waktu Kultivasi Optimum

TABEL I
MASSA EKSTRAK ETOAC (mg)

Jamur	Minggu			
	1	2	3	4
BS-1	15,3 mg	25,3 mg	24,6 mg	24,0 mg

Tabel I. memperlihatkan hasil optimum yang menunjukkan fase stasioner terdapat pada minggu ketiga dengan massa ekstrak 24,6 mg. Fase stasioner adalah fase keadaan seimbang laju pertumbuhan dan kematian sel. Fase stasioner ini dapat menjadi sangat penting dalam konteks pengembangan obat atau terapi, karena fase ini menunjukkan bahwa ekstrak pada konsentrasi tersebut memiliki potensi untuk mengendalikan pertumbuhan sel tanpa menyebabkan kematian sel yang berlebihan [14].

D. Uji Fitokimia

TABEL II
HASIL UJI FITOKIMIA

Uji Fitokimia	Hasil Uji
Terpenoid	+
Steroid	+
Flavonoid	-
Fenolik	+
Alkaloid Mayer	+
Dragendorf	+
Wagner	+

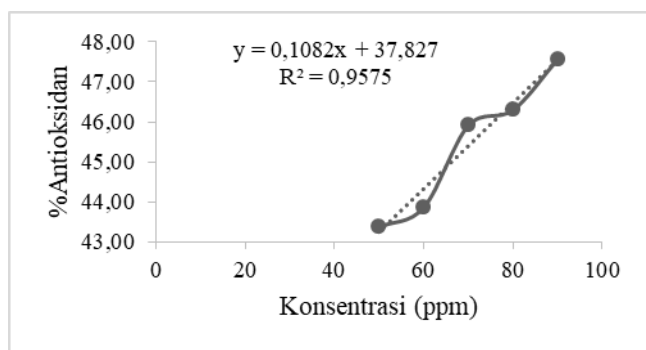
Tabel II. menunjukkan hasil positif kecuali untuk senyawa flavonoid. Kemampuan jamur endofit menghasilkan metabolit sekunder seperti kemampuan inangnya didorong oleh faktor koevolusi antara jamur endofit dan tanaman inangnya.

E. Uji Antioksidan

Strategi DPPH digunakan dalam menguji antioksidan dari EtOAc pekat yang dipisahkan dari pertumbuhan endofit BS-1. Metode DPPH merupakan metode sederhana dan tidak memerlukan sampel dalam jumlah yang banyak. Hasil uji aktivitas antioksidan dapat kita lihat pada Tabel III.

TABEL III.
UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK JAMUR BS-1

Absorban Kontrol	Konsentrasi	Absorbansi	% Antioksidan
0,432	50	0,194	43,37
0,432	60	0,192	43,86
0,432	70	0,185	45,91
0,432	80	0,184	46,30
0,432	90	0,179	47,56



Gambar 3. Kurva Antioksidan Ekstrak EtOAc Jamur Endofit BS-1

Setelah diperoleh hasil absorbansi pada Tabel III. dilanjutkan dengan perhitungan IC₅₀ menggunakan persamaan regresi pada kurva antioksidan yaitu $y = 0,1082x + 37,827$. Dengan memasukkan nilai $y = 50$, maka diperoleh nilai IC₅₀

(nilai $x = 112,5046$) ppm. Sifat antioksidan menurut IC₅₀ adalah sedang. Suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat jika nilai IC₅₀ < 50 ppm, kuat untuk nilai IC₅₀ berkisar 50 - 100 ppm, sedang jika IC₅₀ bernilai 101-250 ppm, dan lemah untuk nilai IC₅₀ berkisar 251 - 500 ppm [15].

Hasil IC₅₀ berdasarkan kriteria nilai aktivitas antioksidan, maka ekstrak jamur BS-1 hanya mengandung 50% mengandung antioksidan. Hal ini kemungkinan terjadi karena senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan pada ekstrak jamur BS-1 tidak sepenuhnya bernilai positif sehingga kandungan aktivitas antioksidan bernilai sedang [16].

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah didapatkan, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

- 1) Jamur endofit yang diambil dari bunga sambiloto berhasil diisolasi dengan kode isolat jamur BS-1. Pengamatan morfologi jamur secara makroskopis menunjukkan bentuk koloni jamur yang berwarna putih berbentuk bulat pada bagian tengah dan permukaan agak kasar. Untuk pengamatan mikroskopis jamur memperlihatkan jamur memiliki spora dan hifa tidak bersekat.
- 2) Hasil uji fitokimia jamur endofit menunjukkan positif steroid, terpenoid, fenolik dan alkaloid.
- 3) Uji antioksidan jamur endofit berdasarkan kriteria nilai IC₅₀ yaitu 112,5046 ppm, maka sifat antioksidan jamur endofit adalah sedang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada analis Laboratorium Kimia, FMIPA, Universitas Negeri Padang, Kota Padang yang turut membantu dan memberikan dukungan sepanjang penelitian dilakukan.

REFERENSI

- [1] Burhamin, Y., Syarifuddin K.A., & Riska. 2023. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Heksan Daun Matoa (Pometea Pinnta) Dengan Menggunakan Metode DPPH (1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl). Jurnal Kesehatan Yamasi Makassar, 7(1), 49-57.
- [2] Jiang, M., Sheng, F., Zhang, Z., Ma, X., Gao, T., Fu, C., Li, P., 2021. *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees and its major constituent andrographolide as potential antiviral agents. J. Ethnopharmacol. 272, 113954.
- [3] Arify et al., 2019. T. Arify, S.E. Valavan, A. Varun, A. Sundaresan, K. Manimaran Effect of garlic (*Allium sativum*) and nilavembu (*A. aniculate*) on growth performance and cost effectiveness of broiler chicken Indian J. Anim. Sci., 89 (2019), pp. 347-352.
- [4] Yunita, E. (2021). Mekanisme Kerja Andrografolida dari Sambiloto Sebagai Senyawa Antioksidan. Herb-Medicine Journal, 4(1), 43-56.
- [5] Al Khairi, V. A., Etika, S. B., Ulfah, M., Riga, R., Info, A., Sciences, N., & Padang, U. N. (2021). Study of The Antibacterial Activity of Endophytic Fungus That Colonize With The Twig of *Andrographis paniculata*. Eksakta, 21(02), 137-144.
- [6] Riga R, Happyana N, Quentmeier A, Zammarelli C, Kayser O, Hakim EH. Secondary metabolites from *Diaporthe lithocarpus* isolated from *Artocarpus heterophyllus*. Nat Prod Res. 2019;
- [7] R. Riga and E. H. Hakim, "Aktivitas Sitotoksik dan Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Jamur Endofitik *Colletotrichum gloeosporioides* yang Diisolasi dari Daun *Artocarpus heterophyllus*," vol. 10, no. 2, 2021.

- [8] Sari N. 2020. Review of endophytic fungi as biocontrol agents against plant pathogen. *Gontor agrotech Sci. J.* 6: 55.
- [9] Zulman, H.U. 2019. *Budi Daya Padi Hitam Dan Merah Pada Lahan Marginal Dengan Sistem SBSU*. Yogyakarta: CV Andi Offset.
- [10] Agus, K. A. (2016). Identification of Anthocyanin Compounds and Secondary Metabolites from Ethanol Extract of Black Glutinous Rice (*Oryza Sativa. L*) in Its Use as an Alternative Treatment of Dengue Hemorrhagic Fever. *Medicamento Scientific Journal*. Vol. 2, No.1.
- [11] V. A. Al Khairi et al., 2021. "Study of The Antibacterial Activity of Endophytic Fungus That Colonize with The Twig of *Andrographis paniculata*," vol. 22, no. 02, pp. 137–144.
- [12] Sulistiono, F. Dewi dan Mahyuni S. (2019) Isolasi dan Identifikasi Jamur Endofit Pada Umbi Talas (*Colocasia esculenta (L.) Schoot*), *Jurnal Sains Natural* 9 (22) hal 66-70.
- [13] Yastanto, A. J. (2020). Karakteristik Pertumbuhan Jamur pada Media PDA dengan Metode Pour Plate. *Indonesian Journal of Laboratory*, 2(1), 33.
- [14] Wahyuningsih, N., & Zulaika, E. (2019). Perbandingan Pertumbuhan bakteri Selulolitik Pada media nutrient broth dan carboxy methyl cellulose. *Jurnal Sains Dan Seni ITS*, 7(2).
- [15] Susilowati, Suharyanto., Potensi Antioksidan dan Kadar Fenolik Total Fraksi Air dan Fraksi Etil Asetat Daun Kelor (*Moringa oleifera Lam.*), *Jurnal Permata Indonesia*, 2017:8(2):26- 38.
- [16] Musa, N. S, Nadia Madiha RamLi, Jaznizat Saidin, Yosie Andriani, Antioxidant And Cytotoxicity Propertise of Ethyl Acetate Fractions Of *Pandanus tectorius* Fruit Against HELA Cell Line, *Alotrop*, 2017: 1(2):106-112.