

ISOLASI FUNGI ENDOFIT DAUN Srikaya (*Annona muricata* L.) SEBAGAI ANTIOKSIDAN SECARA KLT-AUTOGRAFI

Muhammad Ikhwan Asri¹, Sabaruddin*² & Fitriana¹

¹Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Universitas Muslim Indonesia, Makassar, South Sulawesi, 90231, Indonesia

²Faculty of Pharmacy, Universitas Halu Oleo, Kendari, Southeast Sulawesi, 90232, Indonesia

*Corresponding Author, email: sabarudinombe@gmail.com

ABSTRACT

Antioxidants are compounds that can neutralize free radicals that produced by endophyte microbes. This study aims to isolate endophyte fungi and antioxidant activity of isolate endophyte fungi of Annona muricata L. leave used TLC-Autograph Method. The result of isolation endophyte fungi Annona muricata L. leaves obtained 7 isolates namely FES₁, FES₂, FES₃, FES₄, FES₅, FES₆, dan FES₇ colonies. Isolates of endophytic fungi were purified by quadran steak method to obtain pure isolates. The pure isolates obtained were fermented in Maltosa Yeast Broth (MYB) medium using shaker at 200 rpm for 7 x 24 hours to obtain secondary metabolites namely mycelia and supernatant. The results of testing the antioxidant activity of the supernatant extract of endophytic fungi isolates by TLC-Autograph using 0.04% DPPH spray reagent showed that the endophytic fungi isolate FES₂ had free radical activity at Rf values of 0.94 and 0.87.

Keywords : Endophyte Fungi, *Annona muricata* L. leave, Antioxidants, TLC-Autograph

PENDAHULUAN

Fungi Endofit merupakan mikroorganisme yang berasosiasi dengan jaringan tanaman sehat yang bersifat netral atau menguntungkan yang mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder seperti senyawa flavonoid, alkaloid, tanin. Kemampuan suatu endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inang sebagai akibat transfer genetik dari tanaman inangnya ke dalam fungi endofit (1). Mikroba endofit menghasilkan senyawa bioaktif yang berpotensi di bidang farmasi meliputi senyawa antibiotika, antivirus, antikanker,

antioksidan, biosektisida, immunosupresif, serta antidiuretik (2).

Fungi endofit dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya. Kemampuan suatu endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inang sebagai akibat transfer genetik dari tanaman inangnya ke dalam fungi endofit (Radji, 2008). Mikroba endofit menghasilkan bioaktif yang berpotensi di bidang farmasi. Potensi meliputi antibiotika, antivirus, antikanker, antioksidan, biosektisida, immunosupresif, serta antidiuretik (3). Fungi endofit yang memproduksi antioksidan

contohnya seperti, Pestacin dan isopestacin merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh endofit *p. microspora*. Baik pestacin ataupun isopestacin berkhasiat sebagai antioksidan, dimana aktivitas ini diduga karena struktur molekulnya mirip dengan flavonoid (4).

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menetralsisir radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak dengan cara melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas sehingga senyawa radikal bebas tersebut stabil dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas. Tanaman obat semakin banyak digunakan sebagai obat, salah satu tanaman obat tersebut adalah daun srikaya (*Annona squamosa* L.). Hasil penelitian sebelumnya tentang daun Srikaya (*Annona squamosa* L.) memiliki kemampuan sebagai antioksidan (5), maka pada daun srikaya (*Annona squamosa* L.) dapat dimanfaatkan untuk menghambat aktivitas radikal bebas.

Penggunaan daun Sirsak (*Annona squamosa* L.) sebagai tanaman obat, secara empiris tanaman ini dimanfaatkan sebagai obat batuk, disentri, rematik, menurunkan kadar asam urat dan diare oleh masyarakat. Disamping itu, tanaman ini juga diketahui memiliki aktivitas sebagai antioksidan, antikanker, dan antibakteri. Tanaman srikaya (*Annona squamosa* L.) mengandung

senyawa aktif antara lain flavanoid, alkaloid, terpen, saponin, tannin, polifenol dan senyawa poliketida (6).

Salah satu tanaman yang berkhasiat sebagai antidiabetes dan antioksidan adalah daun sirsak. Berdasarkan penelitian sebelumnya, membuktikan bahwa fraksi air ekstrak etanol daun sirsak dosis 400mg/Kg BB memiliki efek penurunan kadar glukosa tertinggi diantara fraksi n-heksan dan etil asetat dengan % penurunan kadar glukosa sebesar 66,45% tikus putih diabetes yang diinduksi aloksan (7). Hasil pengujian aktivitas antioksidan dengan metode penangkapan radikal bebas DPPH menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak memiliki IC₅₀ sebesar 60,74 (8).

Berdasarkan hal sehingga dilakukan penelitian isolasi fungi endofit daun Sirsak (*Annona muricata* L.) sebagai antioksidan secara KLT-Autografi.

METODE

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah autoklaf, enkas, gelas erlenmayer 250 ml, inkubator, lampu spiritus, ose bulat, oven, shaker, tabung reaksi, timbangan analitik dan vial. Dan bahan yang digunakan adalah daun Srikaya (*Annona muricata* L.) yang diperoleh dari kota Maros Sulawesi Selatan, aquadest, alkohol 70%, medium maltosa yeast broth (MYB), lempeng Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Silika Gel F₂₅₄, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH) 0,004%.

Isolasi Fungi Endofit Daun Srikaya

(*Annona muricata* L.)

Daun srikaya (*Annona muricata* L.) yang telah disortasi basah disterilisasi permukaan menggunakan etanol 70% selama 2-5 menit, selanjutnya dibilas dengan aquadest steril + 1 menit diulang 2-3 kali lalu dikeringkan. Pengerjaan dilakukan secara aseptis di dalam Laminar Air Flow (LAF). Potongan kecil Daun sirsak diletakkan diatas medium PDAC (PDA+Cloramphenicol) di dalam cawan petri steril yang kemudian diinkubasi di dalam inkubator pada suhu kamar (25⁰C-30⁰C) selama 3 hari. Diisolasi dan dimurnikan pada media PDAC baru untuk mendapatkan biakan murni (9).

Fermentasi Dan Pemurnian Isolat Fungi Endofit Daun Srikaya (*Annona muricata* L.)

Biakan murni fungi endofit difermentasi menggunakan shaker pada kecepatan 200 rpm selama 7x24 jam. Isolat bakteri yang diperoleh dari proses sebelumnya ditumbuhkan pada media padat yaitu Nutrien Agar (NA) yang baru dengan menggunakan metode gores kuadran. Bakteri diambil dengan menggunakan ose, kemudian digoreskan pada kuadran pertama. Jarum ose disterilkan, ujung dari penggoresan pertama kemudian diteruskan dengan menariknya pada kuadran kedua dan digores kembali hingga kuadran ke empat. Bakteri yang tumbuh terpisah pada empat kuadran tersebut diremajakan pada media NA sebagai isolat murni untuk digunakan pada penelitian

selanjutnya (10).

Pengujian Aktivitas Isolat Fungi Endofit Daun Srikaya Secara KLT-Autografi

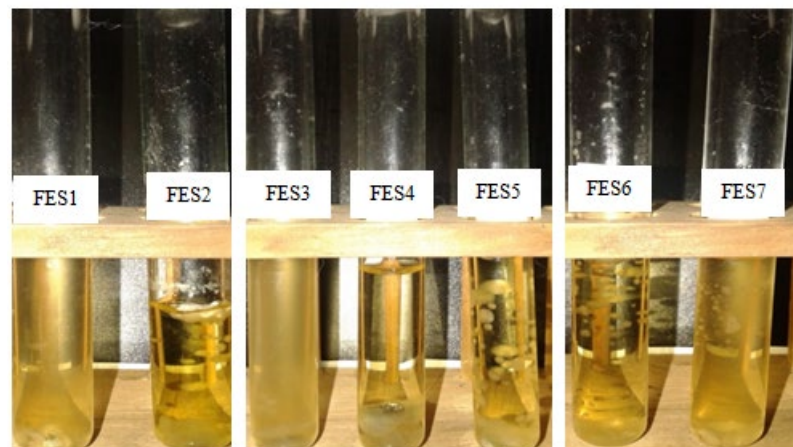
Isolat fungi endofit daun srikaya dilakukan penotolan pada lempeng kromatografi dan kromatogram hasil elusi disemprotkan pereaksi *1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazil* (DPPH) 0,004%. Hasil penyemprotan dengan DPPH diamati bercak aktif yang positif sebagai antioksidan berdasarkan bercak berwarna kuning pada sinar tampak kemudian dihitung nilai Rf-nya (11).

Penelitian ini merupakan penelitian berdasarkan pengujian aktivitas antibiotika dari fungi endofit, untuk menentukan aktivitas antiradikal bebas secara KLT-Autografi.. Isolasi fungi endofit dilakukan menggunakan metode tanam pada medium Potato Dekstrosa Agar + Clora, fenikol (PDAC) diperoleh koloni fungi endofit. Hasil isolasi fungi endofit daun srikaya (*Annona muricata* L.) diperoleh 7 isolat dan isolat fungi endofit daun sirsak difermentasi pada medium maltosa yeast broth (MYB) menggunakan shaker pada kecepatan 200 RPM selama 7x24 jam untuk memperoleh metabolit sekunder berupa supernatan dan miselia dan dimurnikan dengan metode kuadran hingga diperoleh isolat fungi endofit daun srikaya yaitu isolat FES₁, FES₂, FES₃, FES₄, FES₅, FES₆, dan FES₇. Hasil fermentasi

fungi endofit terlihat pada gambar 1.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat murni yang diperoleh difermentasi dalam medium maltosa yeast broth (MYB) selama 1 x 24 jam, sambil



Gambar 1. Hasil fermentasi isolat fungi endofit (FES) daun srikaya : Isolat FES₁, FES₂, FES₃, FES₄, FES₅, FES₆, dan FES₇

disheaker dengan kecepatan 200 rpm selama 7 x 24 jam agar selama fermentasi fungi endofit akan mencapai fase stasioner dan menghasilkan metabolit sekunder, hal ini untuk mempertahankan hidup mikroorganisme lain sehingga mikroorganisme itu tidak dapat tumbuh dan berkembang biak. Untuk melihat potensi dari hasil metabolisme sekunder maka dilakukan pengujian aktivitas antiradikal bebas.

Media fermentasi yang digunakan adalah maltosa yeast broth (MYB), karena media ini merupakan media cair yang mengandung ekstrak yeast sebagai sumber protein, maltosa dan dekstrosa sebagai sumber karbon dan pepton sebagai sumber asam amino, yang dibutuhkan dalam

pertumbuhan, sintesis sel, keperluan energi dalam metabolisme mikroorganisme. Hasil fermentasi kemudian dilakukan pengujian skrining antiradikal bebas. Pengujian ini bertujuan untuk memorelah isolat yang paling memiliki potensi sebagai antiradikal

bebas.

Hasil pengujian skrining aktivitas antiradikal bebas isolat fungi endofit yaitu isolat FES₁, FES₂, FES₃, FES₄, FES₅, FES₆, dan FES₇ secara kualitatif menggunakan pereaksi DPPH 0,004% sebanyak 200 μ L diperoleh isolat FES₂ merupakan isolat aktif ditandai dengan adanya perubahan warna dari kuning dan pengujian aktivitas antiradikal bebas secara KLT-Autografi menggunakan eluen etil asetat : etanol : air (12:6:1) pada penyemprotan DPPH 0,004% diperoleh nilai Rf 0.94 dan 0.87 bercak kuning berlatar ungu hingga disimpan selama 30 menit menunjukkan isolat FES₂ aktif sebagai antioksidan sebagaimana terlihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil pengujian aktivitas antiradikal bebas isolat fungi endofit daun srikaya (*Annona muricata* L.) secara KLT-Autografi dengan pereaksi DPPH 0,004%

No.	Isolat	Warna Bercak	Uji KLT-Autografi	
			Nilai Rf	Warna Bercak
1.	FES ₁	Ungu	-	-
2.	FES ₂	Kuning (+)	0.94	Kuning (+)
			0.87	Kuning (+)
3.	FES ₃	Ungu	-	-
4.	FES ₄	Ungu	-	-
5.	FES ₅	Ungu	-	-
6.	FES ₆	Ungu	-	-
7.	FES ₇	Ungu	-	-

Ket : FES = Isolat Fungi Endofit Srikaya, + = Aktif sebagai antioksidan, - = Tidak terdapat nilai Rf dan Warna bercak

Pengujian aktivitas Antiradikal bebas dengan metode KLT-Autografi menggunakan pereaksi semprot DPPH 0.004% yang ditandai dengan adanya bercak noda berwarna kuning pada kromatogram [11]. Metode ini digunakan karena merupakan salah satu metode yang sederhana dengan jumlah sampel yang relatif sedikit sudah mampu memperlihatkan aktivitasnya, serta dapat langsung melokalisir senyawa yang memberikan aktivitas antiradikal bebas sehingga memudahkan dalam proses isolasi atau pemisahan senyawa aktif dari senyawa-senyawa lainnya .

Menurut Rininta (2008), bahwa setelah lempeng disemprotkan dengan DPPH 0,04% akan diperoleh bercak pita berwarna kekuningan dengan dasar plat berwarna ungu, hal ini dibuktikan oleh hasil penelitian dilakukan dimana isolat JES I₂ menunjukkan 2 bercak berwarna kuning sedangkan

latarnya berwarna ungu, masing-masing dengan nilai Rf 0,94 dan 0,87 yang menandakan bahwa isolat tersebut mammallike aktivitas antiradikal bebas (12).

KESIMPULAN

Hasil isolasi fungi endofit daun srikaya (*Annona squamosa* Linn.) diperoleh 7 isolat dengan isolat fungi endofit JES I₂ secara KLT-Autografi memiliki aktivitas antiradikal bebas pada nilai Rf 0,94 dan 0,87.

DAFTAR PUSTAKA

1. Radji M. Peranan Bioteknologi Dan Mikroba Endofit Dalam Pengembangan Obat Herbal. *Maj Ilmu Kefarmasian*. 2005;2(3):113–26.
2. Strobel G, Daisy B, Castillo U, Harper J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. Vol. 67, *Journal of Natural Products*. 2004. p. 257–68.
3. Strobel, G.A., and Daisy, B., 2003. *Natural Products from Endophytic Microorganism*. *J.Nat.Prod.* 67: 257-268.

4. Strobel, G.A., 2002. *Microbial Gifts From Rainforests*. Can. J. Plant Pathology. 24:14-20.
5. Mulyani, M., Arifin, B., dan Nurdin, H., 2013. *Uji Antioksidan dan Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Daun Serikaya (Annona squamosa Linn)*. (Diakses 27 Nofember 2013)
6. Djajanegara, I., dan Wahyudi, P., 2009. *Pemakaian Sel Hela Dalam Uji Sitotoksi Fraksi Kloroform dan Etanol Daun Annona squamosa*. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indoneisa. Vol 7: 7-11.
7. Adiyati A. *Aktivitas Antidiabetes Fraksi N-Heksana, Etil Asetat Dan Air Ekstrak Etanol Daun Sirsak (Annona muricata L.) Pada Tikus Putih Jantan Diabetes Aloksan [Skripsi]*. Bandung: Universitas Padjajaran; 2011.
8. Rianes R. *Karakteristik Simplisia dan Skrining Fitokimia serta Uji Aktivitas Antioksidan Jus Buah Sirsak dan Ekstrak Etanol Daun Sirsak (Annona muricata L) [Skripsi]*. Medan: Universitas Sumatera Utara; 2012.
9. Herwin. *Isolasi Fungi Endofit Penghasil Antibiotika Pada Alga Merah Jenis Gracilaria verrucosa Secara KLT-Bioautografi*. As-Syifaa. 2010;10(1):83–91.
10. Maulidiyah Z, Dali S, Rusli R, Naid T. *Isolasi Bakteri Rhizosfer Tanaman Nilam (Pogostemon cablin Benth.) yang Berpotensi sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri terhadap Bakteri Penyebab Infeksi Saluran Pencernaan*. Wind Heal J Kesehat. 2020;
11. Herwin, Baits M, Ririn. *Aktivitas Antibakteri Dan Antioksidan Fraksi Daun Colocacia esculenta L. dengan Metode KLT-Bioautografi Dan Difenilpikril Hidrazil*. As-Syifaa. 2015;7(2):174–81.3. Wiyono P. *Peranan hiperglikemia terhadap terjadinya komplikasi kronik diabetes melitus*. Medicine (Baltimore). 2003;35(1):55–60.
12. Rininta, N. 2008. *KLT Autografi CUPRAC sebagai Teknik Cepat Pendeteksian Senyawa Antioksidan*. [Skripsi]. FMIPA IPB, Bogor.