Indonesian Journal of Pharmaceutical Education (e-Journal) 2023; 3 (2): 280 – 290
ISSN: 2775- 3670 (electronic)
Journal Homepage: http://ejurnal.ung.ac.id/index.php/ijpe/index
DOI: 10.37311/ijpe.v3i1.18063

Analisis Kualitatif Metabolit Sekunder dan Aktivitas Antioksidan Jamur Endofit Cangkang Bulu Babi *(Diadema setosum)*

Widy Susanti Abdulkadir[1], Mahdalena Sy. Pakaya[2], Fika Nuzul Ramadhani[3], Wiwit Zuriyati Uno[4], Arona Salama[5]

[1,2,3,4,5] *JurusanFarmasi, FakultasOlahraga Dan Kesehatan, Universitas Negeri Gorontalo, Kota Gorontalo, Indonesia.*
**E-mail: widi@ung.ac.id*

Article Info:
Received: 26 Januari 2023
in revised form: 18 Maret 2023
Accepted: 15 April 2023
Available Online: 20 Mei 2023

Keywords:
Diadema setosum;
Secondary Metabolites;
Endophytic Fungi;
Tomini Bay

Corresponding Author:
Widy Susanti Abdulkadir
JurusanFarmasi
FakultasOlahraga dan Kesehatan
Universitas Negeri Gorontalo
Kota Gorontalo
Indonesia
E-mail: widi@ung.ac.id

ABSTRACT

Endophytic fungi are fungi that live in plant tissues for a certain period and can form colonies in the host's tissues without endangering the host itself. In addition to plants, endophytic fungi are also found in marine biota. Endophytic fungi that live in the internal organs or tissues of marine biota, whether in the form of mold or yeast, can transform the nutrients they obtain from their host animals into metabolite compounds which will then be transferred back to the host organs so that they have the same metabolites as their hosts. This study aimed to analyze and test the antioxidant activity of the secondary metabolites of sea urchins in the Tomini Bay area. The method used from the beginning of the research was endophytic microbial fermentation, production of secondary metabolites, and partitioning of endophytic microbial isolates, namely liquid-liquid; the method used to test antioxidant activity was qualitative using TLC plates, DPPH UV-Vis spectrophotometer method, color reagent, and thin layer chromatography. Two isolates of endophytic fungi were obtained, namely (JBB1, JBB2). The isolate that was active as an antioxidant was JBB2 from sea urchins in the Tomini Bay area with an ICso 50-100 ppm, which was in the strong category. Meanwhile, JBB2 isolate was carried out at a wavelength of 517 nm with a value absorbance of 0,707 A. In accordance with the value of the linear equation, it obtained y = 0,092x+36,95 and an R2 value = 0,945 that the ethyl acetate extract in JBB2 had a moderate ICs of 87.43 µg/mL. Meanwhile, the qualitative test of secondary metabolites using thin layer chromatography with n-hexane eluent: ethyl acetate (8:2) ethyl acetate extract contained alkaloid and terpenoid compounds.

Copyright © 2023 IJPE-UNG
This open access article is distributed under a Creative Commons Attribution (CC-BY-NC-SA) 4.0 International license.

How to cite (APA 6th Style):

Abdulkadir, W.S., Pakaya, M.Sy.,Ramadhani,F.N.,Uno,W.Z., Salama, A. (2023). Analisis Kualitatif Metabolit Sekunder dan Aktivitas Antioksidan Jamur Endofit Cangkang Bulu Babi *(Diadema setosum). Indonesian Journal of Pharmaceutical (e-Journal), 3*(2), 280-290.

ABSTRAK

Fungi endofit adalah fungi yang hidup dalam jaringan tanaman pada periode tertentu dan mampu membentuk koloni dalam jaringan tanpa membahayakan inang itu sendiri, selain pada tamanan fungi endofit juga terdapat di biota laut. Fungi endofit yang hidup di dalam organ atau jaringan internal biota laut baik itu berbentuk kapang maupun khamir dapat mentransformasikan nutrisi yang diperolehnya dari hewan inangnya menjadi senyawa-senyawa metabolit yang kemudian akan ditransfer kembali ke organ inang, sehingga memiiki metabolit yang sama dengan inangnya. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis dan menguji aktivitas antioksidan pada metabolit sekunder Bulu babi di kawasan Teluk Tomini. Metode yang digunakan dari awal mulai penelitian yaitu fermentasi mikroba endofit, produksi metabolit sekunder, partisi isolat mikroba endofit yaitu partisi cair – cair, metode uji aktivitas antioksidan secara kualitatif menggunakan plat KLT, metode DPPH spekrofotometer Uv-Vis, pereaksi warna, dan kromatografi lapis tipis. Terdapat 2 isolat jamur endofit yang di dapatkan yaitu (JBB1, JBB2) isolat yang aktif sebagai antioksidan adalah JBB2 dari Bulu Babi di kawasan teluk tomini dengan niai Ic50 50-100 ppm yang masuk kategori kuat dimana isolat JBB2 yang diakukan pada panjang geombang 517 nm dengan nilai absorbansi 0,707 A. dapat dilihat dari nilai persamaan linear yang di dapat yaitu y = 0,092x + 36,95 dan nilai R2 = 0,945 dimana ekstrak Etil asetat pada BBJ1 memiliki IC50 yang sedang yaitu 87,43 µg/mL dan pada uji kualitatif metabolit sekunder menggunakan kromatografi lapis tipis dengan eluen n-heksan : etil asetat (8:2) ekstrak Etil asetat mengandung senyawa alkaloid dan terpenoid.

Kata Kunci: *Diadema setosum;* Metabolit sekunder; Jamur endofit; Teluk tomini

1. Pendahuluan

Teluk Tomini merupakan salah satu kawasan perairan yang ada di Indonesia. Secara geografis, Teluk Tomini terletak pada 120°- 123°30' BT dan 0030' LU - 1°30' LS. Perairannya merupakan wilayah dari delapan Kabupaten dan tiga kota di tiga wilayah propinsi, yaitu Propinsi Sulawesi Utara, Propinsi Gorontalo, dan Propinsi Sulawesi Tengah. Perairan teluk ini diketahui mempunyai potensi sumber daya alam yang cukup tinggi dengan adanya ekosistem pesisir maupun laut. Salah satu sumber daya alam laut yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan obat-obatan adalah bulu babi. Bulu babi merupakan salah satu biota laut yang memiliki cangkang keras dilapisi duri-duri yang sangat rapuh dan untuk jenis-jenis tertentu mengandung racun. Duri yang dimiliki bulu babi ini digunakan untuk bergerak, melindungi diri, maupun untuk mencapit makanan.

Spesies bulu babi yang banyak ditemukan adalah *E. mathaei, astenosoma,* dan *Diadema setosum*. Penelitian Zakaria [1], menyatakan *Diadema setosum* merupakan salah satu jenis bulu babi yang penyebarannya di seluruh zona terumbu karang. *Diadema setosum* ini dapat dimanfaatkan sebagai sumber pangan bergizi. Bulu babi (*Diadema setosum)* diketahui memiliki kandungan bioaktif berupa flavonoid, fenol, dan alkaloid. Filum Echinodermata salah satunya Bulu babi (*Diadema setosum)* memiliki potensi sebagai antimikroba alami. Sabuah studi melaporkan 43% aktivitas antimikroba berasal dari 83 spesies dari filum Echinodermata yang tidak diidentifikasi yang diperoleh dari pantai barat daya california.

Manfaat yang terdapat pada Bulu babi (*Diadema setosum)* sangat beragam sehingga itu mendorong keinginan masyarakat untuk dapat memanfaatkannya. Maka untuk dapat memanfaatkannya Masyarakat akan berbondong-bondong mengambil biota laut tersebut sehingga akan terjadi penurunan pada ketersediaan hayati bulu babi (*Diadema*

setosum) yang dapat menimbulkan rusaknya ekosistem pesisir. Untuk itu agar dapat mengatasi hal tersebut maka pemanfaatannya dapat memanfaatkan mikroba endofit yang bersimbiosis di dalam Bulu babi (*Diadema setosum)*.

Berdasarkan uraian diatas, Untuk pemanfaatan bulu babi di Teluk Tomini agar lebih optimal dilakukannya penelitian mengenai jamur endofit yang bertujuan untuk menganalisis metabolit sekunder jamur endofit pada bulu babi (*Diadema setosum)* dan menguji aktivitas antioksidannya.

2. Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Autoklaf (Hirayama), Bunsen, Cawan petri, Enkas, Erlenmeyer, Gelas kimia, Gelas ukur, *incubator shaker,* Jarum ose, Gunting steril, Mikropipet (eppendorf), Oven (memmert), pinset, Tabung reaksi, Timbangan analitik (neraca), Tabung sentrifugasi dan Sentrifugasi(*centrifuge), Laminar Air Flow* (LAF).

Alkohol 70%, Aalumunium foil, Aqua pro injeksi, Larutan natrium klorida (NaCl) fisiologis 0.9%, Logam magnesium, Marine Agar (media MA), Medium *Potato Dextrosa agar Cloramfenicol* (PDAC), Medium *Potato dextrose Broth* (PDB), Pereaksi semprot DPPH, Spritus, Tisu, Sampel Bulu babi (*Diadema setosum*), pelarut metanol, pelarut etil asetat, pelarut N-heksan, pereaksi dragendorff, pereaksi Lieberman-buchard, Pereaksi mayer, Pereaksi Hcl pekat.

Prosedur Penelitian

Sterilisasi Alat dan Bahan

Untuk sterilisasi alat dan bahan dapat dilakukan dengan beberapa cara diantaranya, untuk alat gelas seperti tabung reaksi dan cawan petri disterilkan secara panas kering dalam oven selama 1 jam pada suhu 170˚C, alat berupa jarum ose dan pinset disterilkan dengan cara pemijaran langsung pada api bunsen, dan media disterilkan menggunakan autoklaf dengan tekanan uap air selama 15 menit pada suhu 121^{o}C [2].

Pembuatan Media

Marine Agar (Media MA)

Pembuatan media dilakukan dengan cara menimbang 5.525 gram MA, kemudian dimasukan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan 100 mL aquades. Setelah itu, ditutup menggunakan kapas dan alumunium foil selanjutnya disterilkan pada autoclave selama 15 menit pada suhu 121˚C [3].

Potato Dextrosa Agar (Media PDA)

Media PDAC dibuat dengan cara menimbang sebanyak 2,8 gram dilarutkan ke dalam 100 mL aquades dan ditambahkan 0,01 ml kloramfenikol, kemudian diaduk dan dipanaskan di atas hot plate setelah itu dimasukkan ke dalam erlenmeyer ditutup menggunakan kapas dan alumunium foil kemudian disterilkan pada autoclav dengan suhu 121^{o}C selama 15 menit [3].

Potato Dextrosa Broth (Media PDB)

Media PDB dibuat dengan cara menimbang sebanyak 6 gram, kemudian dimasukan ke dalam Erlenmeyer dan dilarutkan dengan 200 mL aquades. Setelah itu, ditutup menggunakan kapas dan alumunium foil kemudian disterilkan pada autoclave selama 15 menit pada suhu 121˚C [3].

Isolasi Jamur Endofit

Jamur endofit dilakukan isolasi dengan menggunakan metode tanam lansung, yaitu sampel yang telah dicuci dengan aquades direndam dengan etanol 70% selama 30 detik. Selanjutnya, potongan sampel tersebut dikeringkan diatas kaca steril selama beberapa menit. Masing masing sampel dipotong kecil kemudian diletakan diatas media

Potato dextrosa agar cloramfenicol. Selanjutnya inokulasi sampel dilakukan diatas cawan petri dan dilakukan duplo. Dan kemudian inkubasi selama 2-14 hari pada suhu 37^{o}C [4].

Pemurnian Jamur Endofit

Setelah jamur endofit tumbuh pada media isolasi *Potato dextrosa agar cloramfenicol.* Secara bertahap dimurnikan satu persatu, dari masing-masing isolat murni jamur endofit yang diperoleh dipindahkan ke dalam media *Potato dextrosa agar cloramfenicol* cawan petri. Pengamatan morfologi dilakukan kembali setelah 5-7 hari pada suhu kamar. Dan apabila masih ditemukan pertumbuhan koloni yang berbeda secara makroskopik maka harus dipisahkan kembali sampai ditemukan isolat murni. Setiap isolat murni dibuat duplo masing masing sebagai kultur stok dan kultur untuk penelitian [5].

Pembuatan Suspensi Mikroba Endofit

Koloni jamur endofit pada cawan petri PDA yang telah diinkubasi selama 5-7 hari, kemudian diinokulasi menggunakan ose bulat kemudian diambil potongan biakan jamur. Potongan jamur tersebut diinokulasikan ke dalam media cair PDB sebanyak 50 mL dan diinkubasi 3-5 hari pada suhu 37^{0}C, [5].

Fermentasi Isolat Mikroba Endofit

Setelah didapatkan suspensi jamur endofit kemudian diambil 20 mL dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi medium PDB 250 mL. Selanjutnya dilakukan fermentasi menggunakan inkubator shaker 150 rpm (putaran/menit) pada suhu kamar selama 14 hari [5].

Produksi Metabolit Sekunder

Dari masing-masing kultur yang telah difermentasi dimasukan kedalam tabung sentrifus ukuran 15 mL yang sebelumnya telah disterilisasi terlebih dahulu, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 90 menit [5].

Ekstraksi Metabolit Sekunder Jamur Endofit

Hasil metabolit sekunder (supernatan) di partisi cair-cair dengan menggunakan pelarut N-heksan dengan perbandian 1 : 1,kemudian di sentrifugasi hingga terbentuk dua lapisan dari partisi N – Heksan dengan air lalu diambil ekstrak N-Heksan dan di evaporasi hingga menjadi ekstrak kental, kemudian lapisan air di ekstrak kembali menggunakan etil asetat dan methanol dengan cara kerja yang sama [6]. Hasil ekstraksi dilakukan uji bebas metanol, etil asetat, dan n-heksan.

Analisis Kualitatif Metabolit Sekunder Jamur Endofit

Identifikasi Kromatografi Lapis Tipis

Plat KLT diaktifkan terlebih dahulu dengan pemanasan dalam oven selama 30 menit pada suhu 100˚C sebelum digunakan. Masing-masing ekstrak fermentasi dilarutkan dengan methanol, etil asetat, dan N-heksan kemudian ditotolkan pada plat KLT ukuran 6x3 cm menggunakan pipa kapiler dan diberi batas bawah 0.5 cm dan bats 0.3 cm kemudian dimasukkan ke dalam chamber. Plat KLT yang telah ditotol kemudian dielusi dengan eluen.selanjutnya diamati di bawah lampu UV 254 dan 366 nm setelah itu dihitung nilai Rf (*Retardation factor*) nya.

Identifikasi pereaksi warna

Uji alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan menggunakan reagen Mayer dan Dragendorff. Uji reagen Mayer : menambahkan 1 mL ekstrak ke dalam tabung ditambah 1 mL HCl 2 N dan 1mL reagen Mayer. Uji reagen Dragendorff : sejumlah ekstrak ditambah dengan 1 mL reagen Dragendorf. Hasil ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih pada ekstrak dengan penambahan reagen Mayer dan endapan jingga pada reagen Dragendorff.

Uji terpenoid atau steroid

Sebanyak 1 ml larutan ekstrak aktif metabolit sekunder jamur endofit dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ekstrak kental diuapkan sampai kering, kemudian ditambah dengan pereaksi Lieberman-Burchad. Jika warna berubah menjadi biru atau ungu, menandakan adanya senyawa steroid. Jika warna berubah menjadi merah, menunjukkan adanya senyawa terpenoid.

Uji flavonoid

Ekstrak aktif metabolit sekunder jamur endofit dimasukan kedalam tabung reaksi, ditambahkan logam magnesium dan setetes asam klorida (HCl) pekat. Hasil positif mengandung flavonoid bila terjadi perubahan warna larutan menjadi kuning atau merah muda.

Uji saponin

Saponin dapat dideteksi dengan uji busa dalam air panas dan dikocok kuat. Busa yang stabil akan terus terlihat selama 5 menit dan tidak hilang pada penambahan 1 tetes HCl 2 N menunjukkan adanya saponin.

Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH

Uji kualitatif menggunakan Metode Kromatograpi Lapis Tipis (KLT)

Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM

Serbuk DPPH (BM 394,32) 2 mg dilarutkan dengan methanol p.a kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml, volumenya dicukupkan dengan methanol p.a sampai tanda batas (DPPH 0,1 mM). Larutan DPPH 0,1 mM dipipet 50 µL, dimasukkan ke dalam labu ukur 200 mL dicukupkan dengan methanol p.a hingga tanda batas (DPPH 0,5 mM) [7].

Uji Aktivitas Antioksidan

Pada plat KLT diberikan tanda terlebih dahulu pada batas atas dan bawah, Pada batas bawah diberikan jarak antar sampel 1 cm dan pada jarak atas 0.5 cm. Sampel ekstrak jamur endofit bulu babi (*Diadema setosum)* ditotolkan pada plat KLT menggunakan pipa kapiler. Proses elusi dilakukan dengan cara plat KLT dimasukkan dalam erlen meyer yang telah berisi eluen yakni kloroform:etanol (9:1) dan telah dijenuhkan lalu Eluen dibiarkan terelusi hingga mencapai batas plat yang telah ditandai. Setelah selesai, plat KLT dikeluarkan dari erlen meyer dan diamati dibawah lampu UV 366 dan 254 nm. Setelah itu, plat KLT disemprotkan dengan larutan DPPH 0.1mM. Noda pada plat KLT yang memiliki aktivitas antioksidan berubah menjadi warna putih kekuningan [7].

Uji Kuantitatif Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Aktivitas antioksidan ditentukan berdasarkan metode DPPH. Larutan induk dibuat dengan cara melarutkan 2 mg senyawa 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) dalam metanol 50 mL. Sebanyak 4 mL larutan DPPH ditambahkan dengan dengan 1 mL ekstak metabolit dalam berbagai konsentrasi (10, 20, 40, 60, dan 80 ppm.), kemudian didiamkan selama 30 menit dalam tempat gelap. Analisis dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dilakukan pada panjang gelombang maksimum (517,0 nm). Kemampuan merendam radikal DPPH (inhibisi) ditentukan dari nilai serapan yang dihasilkan. Nilai IC50 merupakan harga yang diperoleh dengan cara memasukkan 50% untuk nilai y pada masing-masing persamaan yang diperoleh untuk masing-masing sampel uji.

Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM

Serbuk DPPH (BM 394,32) 2 mg dilarutkan dengan methanol p.a kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml, volumenya dicukupkan dengan methanol p.a sampai tanda batas (DPPH 0,1 mM). Larutan DPPH 0,1 mM dipipet 50 µL, dimasukkan

ke dalam labu ukur 200 mL dicukupkan dengan methanol p.a hingga tanda batas (DPPH 0,1 mM) [7].

Pembuatan panjang gelombang

Larutan DPPH 0,1 mM sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu di tambahkan methanol p.a sebanyak 2,5 ml, dikocok dengan vortex hingga homogen lalu dituang ke dalam kuvet dan diukur pada panjang gelombang 400-800 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis [7].

Penentuan larutan blanko

Larutan blanko yang digunakan adalah 2,5 mL etanol dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL larutan DPPH kocok hingga homogen, kemudian didiamkan di ruang gelap selama 30 menit, setelah itu diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517.0 nm [7].

3. Hasil dan Pembahasan

Supernatan yang diperoleh dari hasil sentrifugasi yang telah mengandung metabolit sekunder bakteri endofit Bulu Babi *(Diadema setosum)* di partisi cair cair menggunakan tiga pelarut yaitu N-heksan, etil asetat dan metanol. Hasil partisi suprnatan 240 mL memperoleh berat ekstrak yang berbeda-beda dalam tiap pelarut.

Tabel 1. Hasil partisi cair-cair jamur endofit bulu babi *(Diadema setosum)*

Isolat	Pelarut	Berat ekstrak (g)
JBB1	N-heksan	1,3
	Etil asetat	1,2
	Metanol	1,9
JBB2	N-heksan	1,4
	Etil asetat	1,9
	Metanol	1,7

Keterangan :
JBB1 = Isolat jamur endofit 1
JBB2 = Isolat jamur endofit 2

Ekstraksi dengan menggunakan partisi cair-cair bertingkat dilakukan dengan menggunakan corong pisah. Tujuan partisi cair-cair yaitu untuk memisahkan komponen senyawa yang terkandung dalam sampel berdasarkan kepolaran. Hal ini sesuai dengan penelitian Kumala [8] yang menyatakan bahwa partisi cair-cair dilakukan untuk memisahkan komponen kimia dalam dua fase pelarut berdasarkan tingkat kepolaran dengan perbandingan konsentrasi yang tetap. Dengan dimulai menggunakan pelarut nonpolar (N-heksan), semipolar (etil asetat) dan polar (metanol). kemudian dikocok hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan pelarut dan filtrat. kemudian hasil Filtrat tersebut di partisi menggunakan pelarut etil asetat dan metanol secara berturut-turut kemudian dievaporasi hingga diperoleh ekstrak kental.

Tabel 1 menunjukan bahwa jamur endofit bulu babi *(Diadema setosum)* pada isolat 1 menghasilkan sebanyak 240 mL supernatan yang di ekstraksi dengan metode partisi cair-cair dengan 3 pelarut yang berbeda yaitu n-heksan, etil asetat, metanol. Isolat 1 sebanyak 240 mL menghasilkan berat ekstrak masing-masing pelarut, n-heksan 1,3 gram, etil aseta 1,2 gram, dan metanol 1,9 gram. Pada isolat 2 menghasilkan 220 mL supernatan yang di partisi dengan menggunakan 3 pelarut yang sama yaitu n-heksan,

etil asetat, dan metanol, sebanyak 220 mL menghasilkan berat ekstrak n-heksan 1,4 gram, etil asetat 1,9 gram, dan metanol 1,7 gram.

Hasil dari partisi metabolit sekunder bakteri endofit bulu babi (*Diadema setosum*) dinyatakan bebas pelarut apabila telah memenuhi beberapa syarat.

Tabel 2. Hasil uji bebas pelarut

Identifikasi	Isolat	Hasil	Keterangan
Bebas Metanol	JBB1 JBB2	(-) Negatif	Tidak ada warna permangat (coklat)
Bebas Etil asetat	JBB1 JBB2	(-) Negatif	Tidak berbau ester
Bebas N-heksan	JBB1 JBB2	(-) Negatif	Tidak menghasilkan api dan asap

Tujuan dari pengujian bebas pelarut menggunakan N-heksan, etil asetat, dan metanol untuk mengetahui apakah ekstrak tersebut masih mengandung pelarut atau tidak. Hasil yang diperoleh pada pengujian bebas pelarut yaitu ekstrak N-heksan tidak menghasilkan api dan asap setelah dibakar pada api bunsen, ekstrak dikatakan bebas dari etil asetat apabila tidak berbau ester dan tidak menghasilkan api dan asap. Esktrak dikatakan bebas metanol yaitu tidak terdapat warna permangat (coklat) [9].

Uji aktivitas antioksidan metabolit sekunder dari Bulu babi *(Diadema setosum)* dilakukan dengan cara kualitatif menggunakan metode DPPH secara semprot. Hasil dari supernatan postif dari ke tiga ekstrak yang berbeda yang ditandai dengan adanya warna kuning pada noda yang disemprot pada plat KLT.

Tabel 3. Hasil uji aktivitas antioksidan secara kualitatif

Ekstrak sampel	JBB1	JBB2
Supernatan	+	+
N-heksan	+	+
Etil aseta	+	+
Metanol	+	+

Keterangan :
JBB1 = Isolat jamur endofit 1
JBB2 = Isolat jamur endofit 2
(+) = Positif beraktivitas sebagai antioksidan
(-) = Negatif beraktivitas sebagai antioksidan

Uji kualitatif antioksidan menggunakan Kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan dengan menyemprotkan DPPH *(1,1-difenil-2-pikrihidrazil)*. Sampel ekstrak isolat Bulu babi *(Diadema setosum)* pertama-tama sebelum ditotol pada lempeng kromatogram disemprot terlebih dahulu dengan DPPH, lalu kemudian dielusi dengan eluen N-heksan : etil asetat dengan perbandingan 8:2, 9:1, dan 7:3. Hasil positif ditandai dengan pemudaran warna dari warna ungu menjadi putih kekuningan, kemudian dihitung nilai Rf pada noda yang menunjukan positif antioksidan (noda warna kuning).

Pada pengujian isolat JBB1, dan JBB2 secara kualitatif ini sampel bulu babi (*Diadema setosum*) berpotensi sebagai antioksidan alami yang berasal dari biota laut. Hasil positif ditandai dengan pemudaran warna dari warna ungu menjadi putih kekuningan kemudian dihitung nilai RF pada noda yang menunjukan positif antioksidan (noda kuning), menurut Prakash [10], terbentuknya bercak kuning setelah

penyemprotan DPPH 0,2 mM disebabkan oleh adanya senyawa yang dapat mendonorkan atom hidrogen di dalam ekstrak, sehingga dapat mengakibatkan molekul DPPH tereduksi yang diikuti dengan perubahan warna ungu dari larutan DPPH menjadi kuning bening.

Uji aktivitas antioksidan hasil ekstrak supenatan jamur bulu babi *(Diadema setosum)* dilakukan dengan menggunakan metode penangkapan radikal bebas DPPH *(1,1-difenil-2-pikrihidrazil).* Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode DPPH memiliki beberapa kelebihan yaitu sederhana, cepat dan tidak memerlukan ruangan kimia yang cukup banyak [11].

Tabel 4. Hasil pengukuran nilai absorbansi DPPH dengan panjang gelombang 517 nm

Bahan	Panjang Gelombang Maksimum	Absorbansi (A)			Rata-rata Absorbansi Blanko (A)
		1	2	3	
Blanko (DPPH)	517 nm	**0,707**	**0,707**	**0,706**	0,707

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dengan bertambahnya konsentrasi ekstrak maka absorbansi sampel akan menurun dan tingkat inhibisi akan naik. Absorbansi sampel turun karena elektron pada DPPH menjadi berpasangan dengan electron sampel yang mengakibatkan warna larutan berubah dari ungu pekat menjadi kuning bening. Kondisi ini sesuai dengan pernyataan Suhaling [11] bahwa nilai tingkat inhibisi meningkat seiring meningkatnya konsentrasi sampel dikarenakan semakin banyak senyawa antioksidan pada sampel yang dapat menangkal radikal bebas.

Kemudian dihitung nilai % inhibisi dari masing-masing sampel, diperoleh yaitu sampel methanol dengan konsentrasi 10, 20, 40, 60 dan 80 ppm mempunyai nilai % inhibisi berturut-turut sebesar 24,45 %; 27,01 %; 28,57 %; 29,98 %; dan 32,21 %. Sampel etil asetat dengan konsentrasi 10, 20, 40, 60 dan 80 ppm mempunyai nilai % inhibisi berturut-turut sebesar 38,04 %; 39,03 %; 39,98 %; 42,56 %; dan 44,55 %. Sampel n-heksan dengan konsentrasi 10, 20, 40, 60 dan 80 ppm mempunyai nilai % inhibisi berturut-turut sebesar 17,39 %; 23,62 %; 25,31 %; 28,14 %; dan 31,40 %. Sedangkan sampel supernatant murni dengan konsentrasi 10, 20, 40, 60 dan 80 ppm mempunyai nilai % inhibisi berturut-turut sebesar 34,93 %; 35,51 %; 37,90 %; 39,32 %; dan 43,98 %.

Hasil perhitungan nilai % inhibisi uji aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat memiliki nilai % inhibisi yang baik dibandingkan dengan ekstrak, n-heksan, metanol dan supernatant murni. Hal ini berhubungan dengan diduga adanya kandungan senyawa metabolit yang dapat mampu menghasilkan aktivitas antioksidan.

Hasil analisis menunjukkan bahwa sampel fraksi etil asetat mampu menangkap radikal bebas sebesar 87,43 µg/mL dalam kategori aktif dari pada fraksi, n-heksan methanol dan supernatant murni yaitu sebesar 129,94 µg/mL; 138,47µg/mL dan 136,991 µg/mL. Nilai IC50 menggambarkan kekuatan aktivitas antioksidan yang dihasilkan oleh jamur endofit dalam menghasilkan senyawa bioaktif yang mampu menangkap radikal bebas sebesar 50%..

Berdasarkan data diatas Pemanfaatan jamur endofit bulu babi pada aktivitas antioksidan sangatlah baik dibandingkan dengan komponen bulu babi yang hanya memiliki aktivitas antioksidan sangat rendah. Sehingga itu pemanfaatan jamur endofit lebih baik daripada pemanfaatan komponen bulu babi (*Diadema setosum*) itu sendiri, selain bisa mencegah eksploitasi bulu babi (*Diadema setosum*) yang berlebihan dapat juga bermanfaat sebagai antioksidan yang sangat kuat.

Semakin kecil nilai IC50 maka senyawa uji tersebut mempunyai keefektifan sebagai penangkap radikal bebas yang lebih baik [12]. Menurut Ika, et al., [13] menyatakan bahwa suatu senyawa dinyatakan sangat aktif apabila memiliki nilai IC50 < 10 bpj dan aktif jika memiliki nilai IC50 < 100 bpj serta tidak aktif bila nilai IC50 > 100 bpj.

Analisis senyawa metabolit sekunder Jamur endofit Bulu babi *(Diadema setosum)* menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan plat KLT dengan ukuran 5 x 1 cm dan uji perubahan warna.

Tabel 5. Hasil uji perubahan warna jamur endofit bulu babi *(Diadema setosum)*

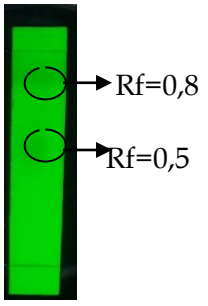
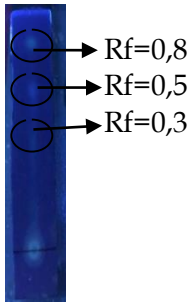
Komponen Bioaktif	**Ekstrak Aktif**				
	Alkaloid	Flavonoid	Steroid	Terpenoid	Saponin
SJBB2	+	+	-	+	-
HJBB2	+	-	-	+	-
EJBB2	+	-	-	+	-
MJBB2	+	+	-	-	-

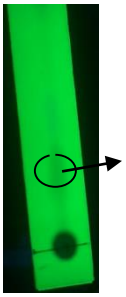
Keterangan :
SJBB2= Superntan murni
HJBB2 = Ekstrak Heksan
EJBB2 = Ekstrak Etil Asetat
MJBB2= Ekstrak Metanol
(+) = Positif
(-) = Negatif

Tabel 5 menunjukan bahwa isolat 2 jamur endofit bulu babi *(Diadema setosum)* positif mengandung senyawa alkaloid pada pereaksi Dragendroff, flavonoid dan terpenoid pada pelarut supernatan, sedangkan untuk komponen senyawa bioaktif lain seperti tanin, saponin dan steroid diperoleh hasil negatif. Pada ekstrak N-heksan positif mengandung senyawa alkaloid pada pereaksi Dragendroff dan terpenoid, etil asetat positif mengandung senyawa alkaloid pada pereaksi Dragendroff dan terpenoid, dan pada methanol mengandung senyawa alkaloid, flavonoid dan terpenoid.

Uji terpenoid menunjukan hasil positif dengan adanya perubahan warna merah, sedangkan uji alkaloid dengan menggunakan pereaksi meyer dikatakan positif dengan adanya endapan putih hingga kekuningan, pada pereaksi dragendorff adanya merah bata, jingga atau cokelat oranye. Pada uji flavonoid Jika maisng-masing larutan terbentuk warna kuning jingga sampai merah, maka positif mengandung flavonoid [14].

Tabel 6. Hasil Analisis Kromatografi Lapis Tipis Senyawa Metabolit Sekunder Jamur Endofit Bulu Babi *(Diadema setosum)*

Ekstrak	**Fase Gerak N-heksan : Etil asetat**	**Nilai Rf**		**254 nm**	**366 nm**
		254 mm	**366 mm**		
SJBB2	7:3	0,8	0,8		
		0,5	0,5		
		-	0,3		

HJBB2	9:1	-	0,8		 Rf=0,8 Rf=0,4
		0,4	0,4		
EJBB2	8:2	0,8	0,8	 Rf=0,8	 Rf=o,8 Rf=0,3
		-	0,3		
MJBB2	5:5	-	0,6		 Rf=0,6 Rf=0,4
		-	0,4		

Metode kromatografi lapis tipis dilakukan dengan prinsip trial and error dimana prinsip ini digunakan untuk mencari eluen dengan perbandingan yang sesuai agar memberikan pemisahan yang baik. Identifikasi kromatografi lapis tipis dilakukan menggunakan fase diam plat KLT kiesel G 60 F 254 dengan fase gerak menggunakan beberapa perbandingan eluen.

Tabel 6 menunjukkan bahwa perbandingan eluen yang baik untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder pada jamur endofit Bulu babi *(Diadema setosum)* yaitu dengan perbandingan eluen n-heksan : eti asetat (7 : 3) pada supernatan dengan nilai Rf yang diperoleh yaitu 0,5 ; 0,3 dan 0,8 dan ekstrak methanol mendapatkan nilai Rf 0,6 ; dan 0,4, sedangkan pada perbandingan n-heksan : etil asetat (8 : 2) pada ekstrak etil asetat memperoleh nilai Rf 0,8, 0,4 untuk ekstrak n-heksan pada perbandingan n-heksan : etil asetat (9 : 1) memperoleh nilai Rf 0,8 dan 0,4. Menurut Harborne [15] nilai Rf masuk dalam kisaran 12 alkaloid yang paling umum yaitu 0,07-0,62 dengan warna noda merah atau ungu. Menurut Gandjar & Rohman [16], nilai Rf senyawa flavonoid yang baik memiliki range 0,2-0,8 dengan warna tampak lampu UV ungu tua, biru dan jingga.

4. Kesimpulan

Analisis kualitatif metabolit sekunder isolat jamur endofit Bulu Babi *(Diadema setosum)* positif mengandung alkaloid, terpenoid, dan flavonoid dengan nilai Rf yang diperoleh secara berurutan 0,8, 0,6, 0,8, 0,4 dan 0,3 ; 0,3, 0,4 dan 0,5, 0,3.

Potensi antioksidan pada jamur endofit Bulu babi tergolong dalam kategori kuat ditunjukan pada hasil IC50 < 100 pada isolat JBB1, pada SJ1 (136,991 µg/mL), pada HJ1 (129,94 µg/mL), pada EJ2 (87,43 µg/mL) pada MJ1 (138,47µg/mL) dan dapat dilihat dari nilai IC50 ekstrak Etil asetat pada BB1 menghasilkan antioksidan tinggi.

Referensi

[1]. Zakaria, I. J. (2013). *Komunitas Bulu Babi (Echonoidea) di Pulau Cingkuak, Pulau Sikuai dan Pulau Setan.* Sumatera Barat. Prosiding SEMIRATA 2013, 1(1).

[2]. Indrawati, A., Nur, A.H. & Muyassara. (2019). *Isolasi dan Uji Potensi Fungi Endofit Kulit Batang Langsat (Lansium domesticum corr.) Penghasil Antibakteri terhadap Staphylococcus aureus dan Escherichia coli.* Media Farmasi, 15(1).

[3]. Siregar T. 2018. *Pembuatan Media Pertumbuhan Jmur.* Yogyakarta : UGM Press

[4]. Febrina O, Nurhayati T. 2015. *Isolasi Dan Karakterisasi Antibakteri Dari Bulu Babi.* Bogor : Ilmu Kelautan Institut pertanian Bogor

[5]. Laode R, Ahmad I. 2015. *Isolasi Jamur Endofit Dan Produjsi Metabolit Sekunder Antioksidan dari Daun Pacar (Laosonia inermis).* Samarinda : Universitas Mulawarman

[6]. Abubakar L, Wangi C, Uku J, Ndirangu S. 2012. *Antimicrobial activity of various extracts of the sea urchin Tripneustes gratilla (Echinoidea).* African Journal of Pharmacology and Therapeutics 1(1), pp19- 23.

[7]. Rahmi W. 2019. Uji *Aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit buah mundar (Garcinia forbeesi king) menggunakan metode DPPH.* Banjarbaru : Sekolah tinggi ilmu kesehatan borneo lestari.

[8]. Kumala, S. (2014). *Mikroba Endofit*. Jakarta: PT. ISFI Penerbitan.

[9]. Wulandari, E. 2017. *Isolasi dan penentuan Struktur Senyawa Metabolit Sekunder dari fraksi n-heksana Daun Aglaia minahassae Koord.* Kalimantan Timur : Fakultas Farmasi

[10]. Prakash, A., 2001, *Antioxidant Activity, Medallion Laboratories Analytical* Progress, vol. 19, No.2.

[11]. Suhaling, S., 2010, Uji *Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Kacang Merah (Phaseolus vulgaris L) dengan Metode DPPH*, Skripsi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan,Universitas Islam Negeri Alauddin, Makassar.

[12]. Cholisoh, Z dan Dedi, H., 2006, *Aktivitas Antiradikal Ekstrak Etanol Daun, Bunga, dan Biji Selasih (Ocimim sanctum) serta Hubungannya dengan Karakteristik Kandungan Polifenol,* PHARMACON, 7(1), Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.

[13]. Ikka. 2013. *Oxidative Stress a Role Of Antioxidant in Normal and Abnormal Sperm Function. Frountiers in Bioscience. Omm*

[14]. Mustikasari, K dan Ariyani, D. (2010). *Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Biji Kalangkala (Litsea Angulata).* Jurnal Sains dan Terapan Kimia. Vol.4, No.2, Hal. 131-136.

[15]. Harborne, J. B., 1987, *Metode fitokimia, penuntun cara modern menganalisis tumbuhan, diterjemahkan oleh Kosasih Padwawinata, ed. V,* Penerbit ITB, Bandung.

[16]. Gandjar, I. G. dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogjakarta: Pustaka Pelajar.

.