

Isolasi, Karakterisasi, dan Uji Antioksidan Fungi Endofit dari Tanaman Batang Kunyit (*Curcuma domestica Val.*)

Mahdalena Sy. Pakaya¹, Nur Ain Thomas², Hamsidar Hasan³, Ariani H. Hutuba⁴,
Grasela Mbae⁵

^{1,2,3,4,5} Jurusan Farmasi, Fakultas Olahraga dan Kesehatan, Universitas Negeri Gorontalo,
Jl. Jenderal Sudirman No. 06 Kota Gorontalo 96128, Indonesia

* Penulis Korespondensi.. Email: mahdalena@ung.ac.id

ABSTRAK

Fungi endofit merupakan fungi yang hidup bersimbiosis mutualisme serta dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang sama dengan inangnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, karakterisasi, dan menguji aktivitas antioksidan pada metabolit sekunder batang kunyit. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dimana metode yang digunakan pada tahap isolasi fungi endofit adalah metode tanam langsung dan uji aktivitas antioksidan menggunakan metode kualitatif dan kuantitatif dengan menggunakan DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Fungi yang diperoleh 1 isolat; dengan kode isolat fungi (BK). Berdasarkan hasil karakterisasi secara makroskopis dan mikroskopis, isolat fungi BK tersebut menunjukkan karakteristik dari kelas *deuteromycota*. Hasil uji antioksidan secara kualitatif menunjukkan bahwa fraksi isolat fungi endofit BK memiliki aktivitas antioksidan ditandai dengan adanya warna kuning pada latar ungu pada plat KLT dilihat pada sinar tampak, serta aktivitas antioksidan masing-masing menunjukkan nilai IC_{50} dari fraksi etil asetat, n- heksan sebesar 52,989 $\mu\text{g/ml}$; 89,725 $\mu\text{g/ml}$; yang masuk kategori kuat sedangkan fraksi metanol sebesar 119,02 $\mu\text{g/ml}$ termasuk kategori sedang, dan untuk fraksi supernatan murni dengan nilai sebesar 156,86 $\mu\text{g/ml}$, termasuk kategori lemah.

Kata Kunci:

Curcuma domestica Val., Fungi endofit, Isolat Fungi, Antioksidan

Diterima:

17-01-2023

Disetujui:

22-03-2023

Online:

01-05-2023

ABSTRACT

Endophytic fungi live in mutualistic symbiosis and can produce secondary metabolites similar to their host. This research aims to isolate, characterize, and test the antioxidant activity of secondary metabolites from turmeric stems. This research is experimental research where the method used for endophytic fungi isolation is the direct planting method, and antioxidant activity is tested using qualitative and quantitative methods with DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). One fungal isolate was obtained with the fungal isolate code (BK). Based on macroscopic and microscopic characterization, the BK fungal isolate indicates the Deuteromycota class's characteristics. The qualitative antioxidant test results indicate that the fraction of BK endophytic fungal isolate indicates antioxidant activity, indicated by the yellow color against a purple background on the TLC plate observed under visible light. The respective IC_{50} values for the ethyl acetate and n-hexane fractions were 52.989 $\mu\text{g/ml}$ and 89.725 $\mu\text{g/ml}$, categorized as strong antioxidants. The methanol fraction had an IC_{50} value of 119.02 $\mu\text{g/ml}$, categorized as moderate, while the pure supernatant fraction had an IC_{50} value of 156.86 $\mu\text{g/ml}$, categorized as weak antioxidant activity.

Copyright © 2023 Jsscr. All rights reserved.

Keywords:

Curcuma domestica Val.; Endophytic Fungi; Fungal Isolate; Antioxidant

Received:
2023-01-17

Accepted:
2023-03-22

Online:
2023-05-01

1. Pendahuluan

Hampir semua tumbuhan diduduki oleh beragam macam mikroorganisme yang salah satunya dikenal sebagai fungi endofit. Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman diyakini dipengaruhi oleh mikroba yang terdapat dalam tanaman. Pemanfaatan yang dapat menguntungkan dari mikroba terkait tanaman sangat penting pada tingkat yang diterapkan, untuk meningkatkan produksi hasil dari tanaman pertanian, serta berguna untuk pengendalian hama tanaman, sejak abad ke-19 sampai saat ini para generasi ahli kimia dan bahan alam sudah menerapkan kemampuan serta ilmunya terhadap jutaan molekul yang berasal dari alam dan juga masyarakat meyakini bahwa alam berpotensi besar bagi kehidupan. Interaksi antara jamur endofit dengan tumbuhan inangnya bersifat simbiosis mutualisme atau dengan kata lain sifat saling menguntungkan, dimana jamur endofit mendapatkan nutrisi dari tanaman inang dan tumbuhan inang terlindungi dari mikroba penyebab penyakit pada tumbuhan serta meningkatkan pertahanan tanaman dari kekeringan [2].

Antioksidan adalah senyawa yang mampu menangkap atau meredam dampak negatif oksidan dalam tubuh. Antioksidan didefinisikan sebagai inhibitor yang bekerja menghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif yang membentuk radikal bebas tidak reaktif yang tidak stabil [18].

Pendekatan secara ilmiah kunyit (*Curcuma domestica Val.*) berpotensi sebagai antioksidan dilihat dari kandungan beberapa senyawa yang ada pada ekstrak kunyit. Hal ini mendorong peneliti untuk menguji dan melihat pemanfaatan fungi endofit dari batang kunyit terhadap antioksidan. Pemilihan bagian batang juga dikarenakan masih sangat minimnya studi terkait uji antioksidan dengan menggunakan bagian batang kunyit. Berdasarkan beberapa uraian diatas, maka akan dilakukan studi penelitian berkaitan dengan isolasi karakterisasi dan uji antioksidan fungi endofit dari tanaman batang kunyit (*Curcuma domestica Val.*).

2. Metode

Desain Penelitian

Desain penelitian yang dipakai pada penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium, alasan penelitian eksperimental dimana dilakukan isolasi, karakterisasi dan uji antioksidan fungi endofit dari tanaman batang kunyit (*Curcuma domestica Val.*) secara kualitatif dan kuantitatif.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah autoklaf (Hirayama®), batang pengaduk, bunsen, cawan petri (Normax®), corong, erlenmeyer, enkas, gelas kimia, gelas ukur, hot plate dan strirer (Kenko®), jarum ose, kuvet, lemari pendingin (Sanken, Indonesia), mikroskop (Yazumi), neraca analitik (Kern®), oven (Mettler®), pipet, pinset, pipa kapiler, pisau steril, rotary evaporator, sendok tanduk, shaker inkubator (Carbolite®), spektrofotometri UV-Vis (Thermo), tabung reaksi, tabung sentrifugasi (Onemed).

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Alkohol 70% (Onemed) Aquadest, Aluminium foil (Total wrap), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) (Himedia), imersi oil, Kertas HVS, Kertas saring (whatman), Kapas, Kloramfenikol (Sanbe), Korek

api, Metanol pro analisa, Natrium hipoklorit 0,5%, Pelarut etil asetat (Alkemi), Pelarut n-heksan (Alkemi), Pelarut methanol (Alkemi), *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Nitra Kimia), PDB (*Potato Dextrose Broth*) (Nitra Kimia), Plastik wrap, Sampel batang kunyit (*Curcuma domestica Val.*), Plat KLT (Nitra Kimia), Tissue steril.

Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat disterilisasi menggunakan oven selama 1 jam. Bahan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, jarum ose dan pinset dipijarkan dengan lampu bunsen[3].

Isolasi Fungi Endofit Dari Batang Kunyit

Batang Kunyit dicuci menggunakan air mengalir selama 5 menit, kemudian dipotong dengan ukuran 1 x 1 cm², dilakukan secara sterilisasi didalam enkas. Sampel dilakukan sterilisasi permukaan secara berurutan menggunakan alkohol 70% selama 1 menit, larutan natrium hipoklorit 5 % selama 5 menit, alkohol 70% selama 1 menit, dan dibilas dengan aquadest ±3 menit diulang dua kali.

Diambil sampel yang telah dikeringkan , menggunakan pinset dan ditanamkan 3 potong sampel dengan cara meletakkan pada posisi tertelungkup ke dalam cawan petri yang berisi media PDA (*Potato Dextrose Agar*) yang sudah ditambahkan Kloramfenikol. Diinkubasi pada suhu 25⁰-27⁰C selama 7 hari dan diamati pertumbuhan fungi setiap hari sampai tampak fungi yang hidup dalam media isolasi PDA, diinokulasikan dalam cawan petri yang isinya media PDA, disimpan pada suhu 25⁰C hingga 5 hari sampai didapatkan koloni murni [15].

Karakterisasi Fungi Endofit Batang Kunyit

Karakterisasi dari jamur endofit dilakukan dengan mengamati morfologinya baik secara makroskopik maupun mikroskopik. Pengamatan makroskopik dilakukan dengan mengamati warna koloni, warna sebalik, permukaan koloni (granular, seperti tepung, menggunung, licin, ada atau tidak tetes-tetes eksudat), diameter pertumbuhan koloni jamur, dan lingkaran-lingkaran konsentris. Pengamatan mikroskopik dilakukan dengan menggunakan mikroskop, dengan cara pada kaca objek diletakkan sedikit hifa lalu ditetaskan dengan aquadest setelah itu di keringkan sedikit di atas api bunsen lalu tetaskan *Imertion Oil* setelah itu dilakukan pengamatan identifikasi isolat jamur endofit [11].

Pembuatan Fermentasi Stater Fungi Endofit

Isolat fungi selanjutnya diinokulasi ke dalam ke dalam labu erlenmeyer ukuran 50 mL yang berisi 20 mL media yang berisi media fermentasi PDB steril dan diletakkan di suhu ruangan 3-5 hari [4].

Produksi Supernatan Fungi Endofit Batang Kunyit

Isolat fungi selanjutnya diinokulasi ke dalam ke dalam labu Erlenmeyer ukuran 500 mL yang berisi 250 mL media yang berisi media fermentasi PDB steril di fermentasi menggunakan *incubator shaker* kemudian, diinkubasi kultur fungi endofit pada suhu 27⁰ C dalam shaker inkubator 170 rpm selama 18 hari.

Kemudian supernatan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 60 menit. Hasil dari sentrifugasi diambil supernatannya kemudian diekstraksi menggunakan metode partisi cair-cair dengan menggunakan pelarut organik n-heksan, pelarut organik etil asetat, dan pelarut organik metanol secara bertingkat [5].

Kemudian dilakukan metode partisi perbandingan 1:1 pertama menggunakan pelarut n-heksan sebagai pelarut non polar, lalu didiamkan selama 20 menit, setelah terpisah menjadi dua lapisan kemudian dilanjutkan pada tahap partisi menggunakan

pelarut etil asetat sebagai pelarut semi polar dan lakukan perlakuan yang sama dengan menggunakan pelarut metanol sebagai pelarut polar.

Selanjutnya, hasil partisi dari masing-masing pelarut di evaporasi pada suhu 40°C agar mendapatkan ekstrak kental. Fraksi dari masing-masing hasil ekstraksi yang diperoleh dan supernatan murni yang tidak diekstraksi kemudian diuji antioksidannya dengan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) secara kualitatif dan kuantitatif [9].

Uji Bebas Metanol

Sebelum diuji antioksidan, dilakukan uji bebas pelarut salah satunya uji bebas metanol untuk membuktikan bahwa ekstrak tersebut telah bebas dari metanol. Uji bebas pelarut metanol dilakukan dengan cara satu tetes ekstrak ditambahkan 1 tetes larutan asam sulfat pekat kemudian tambahkan 1 tetes larutan KMnO_4 pekat diamkan 10 menit, tambahkan tetes demi tetes larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ pekat. Dikatakan bebas metanol apabila tidak ada perubahan warna permangot (coklat) pada sampel [16].

Uji Bebas Etil Asetat

Uji bebas pelarut etil asetat dilakukan dengan menggunakan pereaksi NaOH, asam asetat dan H_2SO_4 dengan cara 2 tetes ekstrak supernatan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 NaOH, 2 ml asam asetat dan 2 ml H_2SO_4 . Lalu mengamati perubahan bau yaitu jika tidak berbau etil asetat maka ekstrak sudah terbebas dari etil asetat dan jika masih berbau etil asetat maka perlu di uapkan kembali [16].

Uji Bebas N-heksan

Uji bebas pelarut n-heksan dilakukan dengan cara 2 tetes ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu dibakar. Dikatakan bebas n-heksan apabila tidak ada api dan asap yang terbentuk, tetapi jika ada api dan asap maka ekstrak perlu di uapkan [16].

Uji Aktivitas Antioksidan

Uji Kualitatif

Dilakukan dengan pembuatan pereaksi semprot DPPH, dengan menimbang DPPH sebanyak 2 mg dimasukkan dalam botol coklat kemudian dilarutkan dalam 50 ml metanol p.a. Setelah DPPH larut kemudian dibungkus dengan aluminium foil dan disimpan ditempat gelap yang terhindar dari cahaya matahari lalu plat KLT diberikan tanda terlebih dahulu pada batas atas dan bawah, pada batas bawah diberikan jarak antar sampel 0,5 cm dan pada jarak atas 0,5 cm. Kemudian fraksi fungi endofit batang kunyit (*Curcuma domestica Val.,*) ditotolkan pada plat KLT menggunakan pipa kapiler.

Proses elusi dilakukan dengan cara plat KLT dimasukkan dalam erlenmeyer yang telah berisi eluen yakni n-heksan : etil asetat (6:4 ; 7:3 ; 8:2, 10:2) 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 nm. Setelah itu, plat KLT disemprotkan dengan larutan DPPH 0.2mM. Noda pada plat KLT yang memiliki aktivitas antioksidan berubah menjadi warna putih kekuningan dilihat pada sinar tampak [20].

Uji Kuantitatif

Pembuatan Larutan DPPH

Serbuk DPPH 2 mg dilarutkan dengan methanol kemudian dimasukan kedalam metanol kemudian dimasukan kedalam labu ukur 50 ml, volumenya di cukupkan dengan metanol p.a sampai pada tanda batas [9].

Pembuatan Larutan Blanko

Larutan DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) 0,2 mM sejumlah 2 mL dituangkan ke dalam vial, kemudian dituangkan pelarut metanol pro analisis sampai tanda batas 5 mL, dishaker menggunakan vortex sampai tercampur rata, kemudian diinkubasi selama 30 dalam ruangan gelap.

Hasil fraksi (n-heksan, etil asetat dan metanol) dan supernatan hasil metabolit sekunder fungi endofit dari batang kunyit (*Curcuma domestica Val.*) ditimbang masing-masing ekstrak 2 mg, dan 2 mg (DPPH) (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) ditambahkan pelarut metanol pro analisis lalu dituang ke dalam gelas kimia 50 ml, cukupkan dengan metanol pro analisis hingga tanda batas yang ditentukan [9]. Sebanyak 2 mL larutan DPPH ditambahkan dengan dengan 2 mL ekstrak fungi endofit batang kunyit dalam berbagai konsentrasi 5, 10, 25, 50 dan 100 ppm, kemudian didiamkan selama 30 menit dalam tempat gelap. Larutan induk hasil dari fraksi (n-heksan, etil asetat, metanol dan supernatan murni) metabolit sekunder fungi endofit dari batang kunyit (*Curcuma domestica Val.*) masing-masing dipipet 50, 100, 250, 500, 1000 (μL), dimasukkan ke dalam vial 10 mL, volume dicukupkan dengan metanol sampai tanda batas[9].

Pengukuran Serapan Dengan Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

Larutan uji ekstrak metabolit sekunder fungi endofit batang kunyit (*Curcuma domestica Val.*) masing-masing fraksi dan supernatan murni, diambil dari masing-masing konsentrasi diambil sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam vial, ditambahkan larutan DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) 0,2 mM sampai tanda batas 5 mL, dishaker dengan vortex hingga tercampur rata, semua materi analisis di inkubasi dalam ruang gelap selama 30 menit [9]. Selanjutnya, serapan diukur pada panjang gelombang 517 nm.

Analisis Data

Data hasil absorbansi sampel digunakan untuk mencari % inhibisinya. Rumus untuk mencari % inhibisi adalah sebagai berikut [20]:

$$\% \text{inhibisi} = \frac{\text{absorban blanko} - \text{absorban sampel}}{\text{absorban blanko}} \times 100\%$$

Keterangan:

Ablanko= Absorbansi pada DPPH tanpa sampel

Asampel= Absorbansi pada DPPH setelah ditambah sampel

Persamaan linier yang diperoleh digunakan untuk menentukan nilai IC50. Nilai IC50 adalah konsentrasi yang didapatkan pada saat nilai % inhibisi sebesar 50 dari persamaan $Y = aX + b$, pada saat % Inhibisi = 50, maka rumus untuk menentukan nilai IC50 persamaannya menjadi [20].

$$50 = aX + b = \frac{50 - b}{a} X$$

3. Hasil Pembahasan

Isolasi Fungi Endofit

Pada metode isolasi fungi endofit ini, didapatkan hanya 1 isolat fungi endofit batang kunyit dengan diberi kode (BK), dimana tumbuh pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA). Proses isolasi terlebih dahulu yang harus diperhatikan adalah sterilisasi permukaan sampel. Hal ini bertujuan supaya menghilangkan bakteri kontaminan yang terdapat pada sampel bagian tanaman kunyit (daun, batang dan rimpang) yang telah diambil dilakukan sterilisasi permukaan secara berurutan menggunakan alkohol 70% selama 30 detik, larutan natrium hipoklorit 5% selama lima menit, alkohol 70% selama 30 detik, lalu dibilas dengan aquades steril selama tiga menit, desinfeksi dilakukan pada sampel bertujuan agar menghilangkan kotoran, beserta mikroorganisme patogen yang terdapat pada sampel supaya saat menanamkan sampel tidak akan ditumbuhi mikroorganisme lain pada media tetapi hanya menumbuhkan isolat jamur endofit yang berasal dari jaringan tanaman sampel [12].

Tabel 1. Hasil Isolasi Fungi Endofit Dari Tanaman Batang Kunyit

Sampel Tanaman	Media Pertumbuhan Mikroba	
	NA	PDA
Daun	-	-
Batang	-	+
Rimpang	-	-

Ket: (+) = Adanya pertumbuhan fungi endofit (-) = Tidak adanya pertumbuhan fungi endofit

Kemudian dilakukan pembilasan sampel menggunakan aquadest setelah disterilisasi di ulangi sebanyak dua kali, setelah itu dikeringkan pada tisu steril. setelah itu bagian kunyit yang telah diambil dipotong menjadi bagian kecil dengan ukuran 1 cm pada kondisi aseptis menggunakan pisau steril.

Potongan, daun, batang, rimpang yang telah disterilisasi ditanam langsung PDA secara aseptis menggunakan Enkas. Sebelumnya sampel dipotong 1 cm menggunakan pisau steril secara vertikal, posisi bekas potongan yang menampakkan jaringan ditanam pada permukaan media sehingga mikroba yang hidup dalam jaringan tanaman mendapatkan nutrisi dari media PDA. Sebelum digunakan, media PDA ditambahkan kloramfenikol 0.01%. Kemudian diinkubasi selama dan 3-5 hari pada suhu 28°C untuk pertumbuhan jamur. Setelah masa inkubasi, hasil isolasi fungi endofit diperoleh sebanyak 1 isolat yaitu isolat dari bagian batang.

Pemurnian Fungi Endofit

Selanjutnya isolat fungi yang telah muncul di permukaan media PDA selanjutnya akan dimurnikan secara aseptis dengan cara memindahkan tiap satu koloni pada media yang baru sehingga mendapatkan isolat tunggal. Isolat yang diperoleh, diambil sebanyak 1 ose kemudian akan dipindahkan ke media baru pada tabung reaksi steril dan dibiarkan padat dengan posisi yang dimiringkan sebagai *stock kultur* dan kultur kerja. *Stock kultur* fungi endofit batang kunyit disimpan di dalam lemari pendingin dengan suhu 4° C yang akan di uji aktivitas antioksidan [19].

Tabel 2. Hasil Karakterisasi Makroskopis Fungi Endofit

Karakteristik	Kode Isolat
	BK
Warna Miselium	Miselium muda berwarna putih yang semakin tua berubah warna
Elevasi Koloni	Datar
Garis Radial	Ada
Warna Sebalik	Berwarna putih, Kecoklatan, dan Kekuningan

Pada hasil karakterisasi secara makroskopis pada isolat fungi endofit diperoleh warna miselium muda berwarna putih yang semakin tua berubah warna, elevasinya datar, garis radial ada, warna sebalik ada.

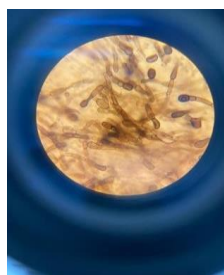
Tabel 3. Hasil Karakterisasi Mikroskopis Fungi Endofit

Karakteristik	Kode Isolat
	BK
Hifa Konidia	Panjang, bercabang dan bersepta Berbentuk lonjong, dan ada yang bulat serta transparan
Bentuk Spora	Silindris

Pada hasil karakterisasi secara mikroskopis pada isolat fungi endofit diperoleh hifa panjang bercabang dan bersepta, konidia berbentuk lonjong dan ada yang bulat serta transparan, bentuk spora silindris.



a.)



b.)

Gambar 1. Hasil uji karakterisasi fungi endofit isolat (BK) dari batang kunyit secara a.) mikroskopis, (b) secara mikroskopis (Perbesaran 100x)

Karakterisasi Secara Makroskopis dan Mikroskopis

Fungi endofit yang telah diperoleh dikarakterisasi secara mikroskopis dengan cara mengambil kaca objek tetesi dulu dengan aquadest lalu keringkan diatas api bunsen dengan gerakan *zig zag*, selanjutnya diambil sebanyak 1 ose kemudian diletakkan diatas kaca objek lalu tetesi *imersi oil*. Alasan kenapa ditetesi *imersi oil* adalah untuk memperjelas objek dan melindungi preparat dari gesekan lensa. Selain itu jika tidak menggunakan minyak imersi maka hasil pengamatan akan terlihat kabur atau tidak jelas [14].

Produksi Supernatan Untuk Uji Aktivitas Antioksidan

Tahap yang dilakukan setelah karakterisasi yaitu untuk memproduksi metabolit sekunder yaitu proses fermentasi. Tetapi sebelum itu dilakukan dulu pembuatan fermentasi starter terlebih dahulu dengan dengan cara membuat media fermentasi cair *Potato Dextrose Broth* (PDB) disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian inokulasikan fungi endofit sebanyak 3 kali kemudian disimpan disuhu ruangan selama 3-5 hari[1].

Setelah mencapai 5 hari, media yang telah ditumbuhi fungi endofit dipindahkan ke media PDB yang baru untuk difermentasi selama 18 hari. Setelah mencapai 18 hari proses fermentasi dihentikan, selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi, lalu disentrifugasi pada kecepatan 3000rpm selama 60 menit dengan tujuan untuk memisahkan biomassa dan supernatan.

Dalam proses fermentasi isolat yang digunakan merupakan biakan fungi endofit yang telah berumur 7 hari setelah dilakukan peremajaan isolat, dengan tujuan agar pada saat proses fermentasi isolat fungi endofit berada dalam fase pertumbuhan log atau biasa disebut dengan fase eksponensial, dimana fase ketika mikroba aktif membelah kecepatan maksimum, sehingga jumlah sel metabolit sekunder terbentuk dalam jumlah banyak, proses fermentasi dilakukan secara aseptik agar tidak terjadi kontaminasi[6].

Goyangan berfungsi untuk meningkatkan aerasi dan kultur fermentasi. Aerasi bertujuan untuk memberikan pasokan oksigen yang memadai agar dapat mempertahankan kondisi aerobik serta membuang gas karbon dioksida yang dihasilkan selama fermentasi berlangsung, serta meratakan penyebaran mikroorganisme, nutrisi, dan oksigen dalam medium fermentasi [20].

Pemilihan metode partisi cair-cair karena pelarut yang digunakan secara bertingkat dari mulai non polar, semi polar, dan polar tujuannya agar senyawa metabolit sekunder yang tertarik sesuai dengan tingkat kepolaran [7].

Tahap selanjutnya yang dilakukan yaitu pengujian bebas pelarut pada ekstrak supernatan murni yang bertujuan untuk mengetahui apakah ekstrak masih mengandung pelarut atau tidak serta ekstrak supernatan murni yang diperoleh merupakan ekstrak yang murni tanpa ada kontaminasi.

Tabel 4. Hasil Uji bebas Pelarut Pada Supernatan Batang Kunyit

Identifikasi	Pereaksi	Hasil
Bebas Metanol	1 tetes larutan asam sulfat pekat, 1 tetes larutan KMnO ₄ diamkan 10 menit, Tetes demi tetes larutan Na ₂ S ₂ O ₃	(-) Negatif, Tidak ada warnapermangat (coklat)
Bebas Etil Asetat	2 mL NaOH, 2 mL Asam asetat, 2 mL H ₂ SO ₄	(-) Negatif, Tidak ada bau ester
Bebas N-Heksan	Dibakar ekstraknya	(-) Negatif, Tidak menghasilkan api dan asap

Pada uji bebas pelarut diperoleh hasilnya yaitu hasil uji bebas pelarut metanol tidak terdapat warna permangat (Coklat). Hal ini sesuai dengan penelitian [16], menyatakan bahwa hasil dari bebas pelarut metanol yaitu tidak ada warna permangat (Coklat), hasil uji bebas pelarut etil asetat yang diperoleh yaitu tidak adanya tercium bau ester, hal ini menandakan bahwa ekstrak sampel benar-benar bebas dari pelarut etil asetat. Sedangkan hasil uji bebas pelarut n-heksan yang diperoleh yaitu tidak menghasilkan api dan asap setelah dibakar di atas api bunsen, hal ini menandakan bahwa ekstrak sampel benar-benar bebas dari pelarut etil asetat. Ekstrak dikatakan bebas dari pelarut n-heksan apabila tidak tidak menghasilkan api dan asap [20].

Uji Aktivitas Antioksidan

Uji Kualitatif Menggunakan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji kualitatif antioksidan dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan menyempatkan DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*). Sebelum disempatkan dengan DPPH pertama-tama sampel ekstrak isolat fungi endofit batang kunyit (*Curcuma domestica Val.*) ditotol pada lempeng kromatogram lalu dielus dengan

eluen N-heksan : Etil asetat (6:4, 7:3, 8:2, 10:2). Hasil positif ditandai dengan pemudaran warna dari warna ungu menjadi putih kekuningan kemudian dihitung nilai RF pada noda yang menunjukkan positif antioksidan (noda kuning).

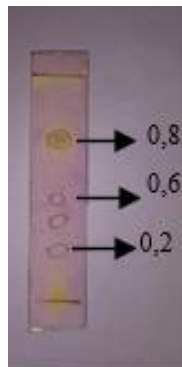
Tabel 5. Hasil uji aktivitas antioksidan secara kualitatif

Ekstrak	BK
Supernatan	+
Metanol	+
Etil Asetat	+
N-heksan	+

Keterangan :

(+) = Positif beraktivitas sebagai antioksidan

Pada pengujian secara kualitatif diperoleh hasil positif pada ekstrak supernatan, metanol, etil asetat, n-heksan ditandai dengan latar ungu dengan noda kuning yang memudar. Uji kualitatif antioksidan dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan menggunakan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*). Karena merupakan metode sederhana, cepat, mudah dan menggunakan sampel dalam jumlah yang sedikit dengan waktu yang singkat. DPPH pada uji ditangkap oleh antioksidan yang melepaskan hidrogen, sehingga membentuk DPPH tereduksi. Warna berubah dari ungu gelap menjadi memudar.



Gambar 2. Hasil analisis kualitatif antioksidan metabolit sekunder isolat fungi endofit batang kunyit (*Curcuma domestica Val.*)

Penampakan noda diamati di bawah lampu UV 366 nm. Pada lampu UV 366 noda akan berfluoresensi dan lempeng akan berwarna. Setelah itu disemprotkan dengan larutan DPPH 0,2 mM. Hasil positif ditandai dengan pemudaran warna dari warna ungu menjadi putih kekuningan kemudian dihitung nilai RF pada noda yang menunjukkan positif antioksidan (noda kuning), 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[13]. Yang menunjukkan 8 nilai RF isolat BK, pada sampel ekstrak supernatan 0,2, sampel ekstrak n-heksan 0,6;0,2, sampel ekstrak etil asetat 0,8;0,6;0,2 kemudian pada sampel metanol 0,4;0,2.

Analisis Kuantitatif Antioksidan Metode DPPH

Pada hasil pengukuran absorbansi larutan blanko, didapatkan rata-rata hasil dari absorbansi blanko yaitu 0,463A. Diperoleh hasil dari pengukuran nilai absorbansi dari masing-masing sampel. Kemudian dihitung nilai %inhibisi dari masing-masing sampel,

diperoleh yaitu sampel n-heksan dengan konsentrasi 5, 10, 25, 50 dan 100ppm mempunyai nilai %inhibisi berturut-turut sebesar 19,87%; 25,26 %; 29,58%; 41,03% dan 51,40%. Sampel etil asetat dengan konsentrasi 5, 10, 25, 50 dan 100 ppm mempunyai nilai %inhibisi berturut-turut sebesar 21,81%; 34,77%; 42,98%; 54,42% dan 65,44%. Sampel metanol dengan konsentrasi 5, 10, 25, 50 dan 100 ppm mempunyai nilai %inhibisi berturut-turut sebesar 1,70%; 9,07%; 17,06%; 24,83% dan 41,25%. Sedangkan sampel supernatan murni dengan konsentrasi 5,10, 25, 50 dan 100 ppm mempunyai nilai %inhibisi berturut-turut sebesar 16,84%; 19,00%;22,46%; 26,99% dan 37,79%.

Tabel 4. Hasil pengukuran nilai absorbansi metode DPPH

Bahan	Panjang Gelombang Maksimum	Absorbansi (A)			Rata-rata absorbansi blanko (A)
		1	2	3	
Blanko (DPPH)	517 nm	0,463	0,463	0,463	0,463

Dari hasil perhitungan nilai % inhibisi, hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak n-heksan dan etil asetat memiliki nilai %inhibisi yang baik dibandingkan dengan ekstrak metanol dan supernatan murni. Hal ini berhubungan dengan diduga adanya kandungan senyawa metabolit yang dapat mampu menghasilkan aktivitas antioksidan. Ekstrak fraksi etilasetat pada isolat fungi endofit BK memiliki nilai aktivitas antioksidan lebih tinggidi dari pada ekstrak n-heksan, metanol dan supernatan murni [17].

Tabel 5. Hasil Pengukuran Absorbansi Sampel Dan %Inhibisi

Sampel	(ppm)	Rata-rata (A)	% Inhibisi	Persamaan Linear	IC50 (µg/ml)
Ekstrak N-heksan	100	0,225	51,403	$Y = 0,3203x + 21,261$ $R^2 = 0,9576$	89,72 µg/ml
	50	0,273	41,036		
	25	0,326	29,589		
	10	0,346	25,269		
	5	0,371	19,870		
Ekstrak Etil Asetat	100	0,160	65,442	$Y = 0,4077x + 28,396$ $R^2 = 0,8739$	52,98 µg/ml
	50	0,211	54,427		
	25	0,264	42,980		
	10	0,302	34,773		
	5	0,362	21,814		
Ekstrak Metanol	100	0,272	41,252	$Y = 0,3852x + 4,1515$ $R^2 = 0,9625$	119,02 µg/ml
	50	0,348	24,838		
	25	0,384	17,062		
	10	0,421	9,071		
	5	0,455	1,727		
Ekstrak Super natan	100	0,288	37,796	$Y = 0,2135x + 16,51$ $R^2 = 0,9961$	156,86 µg/ml
	50	0,338	26,997		
	25	0,359	22,462		
	10	0,375	19,006		
	5	0,385	16,846		

Setelah itu di hitung nilai IC₅₀ dengan diperoleh bahwa sampel fraksi etilasetat merupakan fraksi unggul yang mempunyai kemampuan untuk menangkap radikal bebas yang diselaraskan dengan nilai IC₅₀. Hasil analisis menunjukkan bahwa sampel fraksi n-heksan mampu menangkap radikal bebas sebesar 89,72 µg/mL fraksi etilasetat sebesar 52,98 µg/mL ini termasuk kategori kuat, sedangkan metanol sebesar 119,02 µg/mL dan supernatan murni yaitu sebesar 156,86 µg/mL. Nilai IC₅₀ menggambarkan kekuatan aktivitas antioksidan yang dihasilkan oleh jamur endofit dalam menghasilkan senyawa bioaktif yang mampu menangkap radikal bebas sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka senyawa uji tersebut mempunyai keefektifan sebagai penangkap radikal bebas yang lebih baik [13]. Secara spesifik, suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat bila IC₅₀ bernilai 50-100 ppm, sedang bila IC₅₀ 101-250 ppm, dan lemah bila IC₅₀ 251-500 ppm.

4. Kesimpulan

Berdasarkan Hasil Penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan pada Batang Kunyit (*Curcuma domestica Val.*) terdapat 1 isolat fungi endofit yaitu isolat (BK). Isolat fungi endofit yang berhasil diisolasi menunjukkan karakteristik yaitu termasuk kategori *deuteromycetes* dengan bentuk batang memiliki konidia (spora), konidiofor, serta memiliki hifa bersepta. Pada uji kualitatif fraksi metabolit sekunder fungi endofit Batang Kunyit (*Curcuma domestica Val.*) positif memiliki aktivitas antioksidan pada sinar tampak, serta uji secara kuantitatif ekstrak memiliki aktivitas antioksidan yaitu n-heksan, etilasetat, metanol dan supernatan murni masing-masing sebesar 89,725 µg/mL, 52,989 µg/mL; 119,02 µg/mL dan 156,86 µg/mL. Nilai ini menunjukkan bahwa ekstrak n-heksan dan ekstrak etilasetat termasuk kategori antioksidan kuat, lalu metanol termasuk kategori sedang dan supernatan lemah.

Referensi

- [1]. Adefira, E., (2021). „Produk Ekstraseluler Isolat Kapang Endofit C.1.1 dan C.3.3 dari Ranting Cempaka Kuning (*Michelia champaca L.*) sebagai Antimikroba” Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia, April 2021, hlm. 131-138 Vol. 19, No. 1 ISSN:1693-1831, E-ISSN: 2614-6495.
- [2]. Akmalasari, I., Purwati, E. S., & Dewi, R. S. (2013). „Isolasi dan identifikasi jamur endofit tanaman manggis (*Garcinia mangostana L.*)”. *Biosfera*, 30(2), 82-89. *Antimikroba Ekstrak Etil Asetat Jamur Endofit dari Daun Matoa (Pometia pinnata)*. Jurnal Farmasi Higea, 12(1).
- [3]. Ariyono, R. Q., Djauhari., (2014). „Keanekaragaman Jamur Endofit Kangkung Darat (*Ipomea reptans Poir*) pada Lahan Pertanian Organik Konvensional” Jurnal Hama dan Penyakit Tanaman 2 (1) :1-10 ISSN : 2338- 4366.
- [4]. Deya Apriliana, Wahyu Widayat, Rolan Rusli., (2016) „Isolasi Jamur Endofit Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata*) Dan Uji Aktivitas Antioksidan”. Penelitian dan Pengembangan Farmaka Tropi Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman, Samarinda, Kalimantan Timur., Hal: 72-77.
- [5]. El-Mansi, T, E.M., El-Mansi, E.M.T., Bryce, C.F.A., Demain, A.L., dan Allman, A.R., 2012. „*Fermentation Microbiology and Biotechnology*”, Third Edition, 3 edition. ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- [6]. Fajrina, A., Bakhtra, D. D. A., Mawarni, A. E., & . 2020. *Isolasi dan Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etil Asetat Jamur Endofit dari Daun Matoa (Pometia pinnata)*. Jurnal Farmasi Higea, 12(1)

- [7]. Kanifah, U., M. Lutfi dan B. Susilo. 2015. *Karakterisasi Ekstrak Daun Sirih Merah (Piper Crocatum) Dengan Metode Ekstraksi Non-Thermal Berbantuan Ultrasonik (Kajian Perbandingan Jenis Pelarut Dan Lama Ekstraksi)*. Jurnal Bioproses Komoditas Tropis. Volume 3 (1) : 73-79.
- [8]. Khomsan.,2014. *Pangan dan Gizi untuk Kesehatan*. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.
- [9]. Komala, Oom. 2015. *Uji Efektivitas Esktrak Etanol Daun Lidah Mertua (Sansevieria trifasciata Prain) Terhadap Khamir Candida albican*. Universitas Pakuan: Bogor.
- [10]. Munawaroh, S. 2012. "Ekstraksi Minyak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*D.C.) Dengan Pelarut Etanol dan N-Heksana".Jurnal Teknik Kimia. Universitas Negeri Semarang:Semarang, Vol. 2, No.1.
- [11]. Pakaya, M. S., Uno, W. Z., Papeo, D. R. P., & Moo, D. R. 2022. *Isolasi dan Karakterisasi Jamur Endofit Lamun (Thalassia hemprichii) Dari Kawasan Teluk Tomini*. Journal Syifa Sciences and Clinical Research, 4(3).
- [12]. Priharto. (2018). "Isolasi, Karakterisasi dan Uji Aktifitas Antibiotik Bakteri Endofit dari Tumbuhan Eceng Gondok (*Eichornia crassipes*) di Danau Maninjau, Sumatera Barat". Jurnal Farmasi. 4(2): 41-50.
- [13]. Prakash, A., (2014), *Antioxidant Activity, Medallion Laboratories Analytical Progress, vol. 19, No.2*.
- [14]. Reihani dan Oddershede. 2016. *Screening Minyak Nabati Untuk Minyak Imerisi Mikroskop Optik*. Institut Teknologi Sepuluh Nopember: Surabaya
- [15]. Rianto, A., Isrul, M., Anggarini, S., & Saleh, A. (2018). *Isolasi Dan Identifikasi Fungi Endofit Daun Jambu Mete (Anacardium occidentale L.) Sebagai Antibakteri Terhadap Salmonella typhimurium*. Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia, 4(02), 109-121
- [16]. Ristiyani, E. (2015). *Perbandingan Efektifitas Antibakteri Ekstrak Maserasi Dan Soxhletasi Daun Pandan Wangi (Pandanus amaryllifolius Roxb.) Terhadap Bakteri Bacillus subtilis*. Politeknik Harapan Bersama, Tegal.
- [17]. Rizka Dwi Widya Putri, Nuniek Herdyastuti.(2021),*Potensi Senyawa Antioksidan Yang Dihasilkan Bakteri Endofit Pada Daun Jambu Biji (Psidium guajava L.)*, Departement of Chemistry, Faculty of Matematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Surabaya
- [18]. Salmia, S. (2016). *Analisis Kadar Flavonoid Total Ekstrak Kulit Batang Kedondong Bangkok (Spondias Dulcis) dengan Metode Spektrofotometri Uv-Vis*. Thesis. [Skripsi]. Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar. Hal 48.
- [19]. Siburian., Elfrida,T.,(2012).*Pengaruh Suhu dan Waktu Penyimpanan Terhadap Pertumbuhan Bakteri dan Fungi Ikan Bandeng.*, Biologi Unnes Journal Of Life Science.ISSN 2252-6277 Hal: 101:105.
- [20]. Wahdaningsih, S., Wahyuono, S., & Styowati, E.P., (2013) : *Isolation And Identification Of Antioxidant Compounds In Fern Stems (Alsophila Glauca J.Sm) Using Dpph Method (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl)*. Department Of Biology, Faculty Of Pharmacy , Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia ; ISSN : 1410-5918.