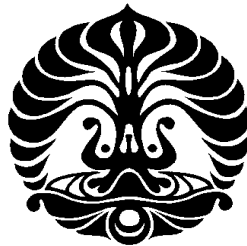


**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT HASIL FERMENTASI
KAPANG ENDOFIT DARI *Garcinia forbesii* King
DAN *Garcinia porrecta* Wall**

**YUYUN FARIDA
0305250735**



**PROGRAM SARJANA EKSTENSI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS INDONESIA
DEPOK
2008**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT HASIL FERMENTASI
KAPANG ENDOFIT DARI *Garcinia forbesii* King
DAN *Garcinia porrecta* Wall**

**Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi**

**Oleh:
YUYUN FARIDA
0305250735**



**DEPOK
2008**

SKRIPSI : UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT HASIL
FERMENTASI KAPANG ENDOFIT DARI *Garcinia
forbesii* King DAN *Garcinia porrecta* Wall

NAMA : YUYUN FARIDA

NPM : 0305250735

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JULI 2008




Dr. ATIEK SOEMIATI, MS

PEMBIMBING I


Dr. ABDUL MUN'IM, MS

PEMBIMBING II

Tanggal lulus Ujian Sidang Sarjana : 14 Juli 2008

Penguji I : 
Prof. Dr. Endang Hanani

Penguji II : 
Dra. Farida Ibrahim

Penguji III : 
Santi Purna Sari, MSi

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'alamin, segala puji dan syukur kepada Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan anugerah-Nya yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Skripsi ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Ibu Dr. Atiek Soemiati, MS, selaku pembimbing I, yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian ini, dan yang telah banyak memberikan bimbingan, pengarahan, saran, ilmu, dan bantuan yang sangat bermanfaat selama penelitian dan penyusunan skripsi.
2. Bapak Dr. Abdul Mun'im, MS, selaku Ketua Program Ekstensi Farmasi FMIPA-UI dan pembimbing II, yang telah memberikan bimbingan, ilmu, saran dan bantuan selama penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS, selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA -UI.
4. Bapak Sutriyo, SSi, Apt., selaku pembimbing akademis yang telah memberikan bimbingan dan bantuan selama penulis menempuh pendidikan di Program Ekstensi Farmasi FMIPA-UI.

5. Seluruh staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA-UI atas ilmu pengetahuan yang diberikan selama ini.
6. Karyawan serta laboran Departemen Farmasi FMIPA-UI yang telah membantu penulis selama menempuh pendidikan khususnya selama penelitian ini berlangsung.
7. Bapak dan Ibu tercinta, Maryono dan Hj. Tentrem Rahayu yang senantiasa memberikan kasih sayang, semangat, dorongan, bantuan, dan do'a yang tak putus kepada penulis serta kakak dan adikku, Yuli Haryadi dan Yanti Herniyati atas kasih sayang dan dukungannya.
8. Teman-teman seangkatan di Ekstensi Farmasi 2005, terutama Amat, Witri, Yunita, Eka, Yulie, Lifa, Sari, Ratih, Henrita, Indriani, Qq, Renita, Widia, Lili, Femy, Novi, Lucia, Mahardika, Ajit, Arum, dan Anglia atas kebersamaannya di Lab. Penelitian Mikrobiologi.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah membantu dalam proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, sehingga saran dan kritik yang membangun sangat penulis perlukan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan dan semua pihak yang memerlukan.

Penulis

2008

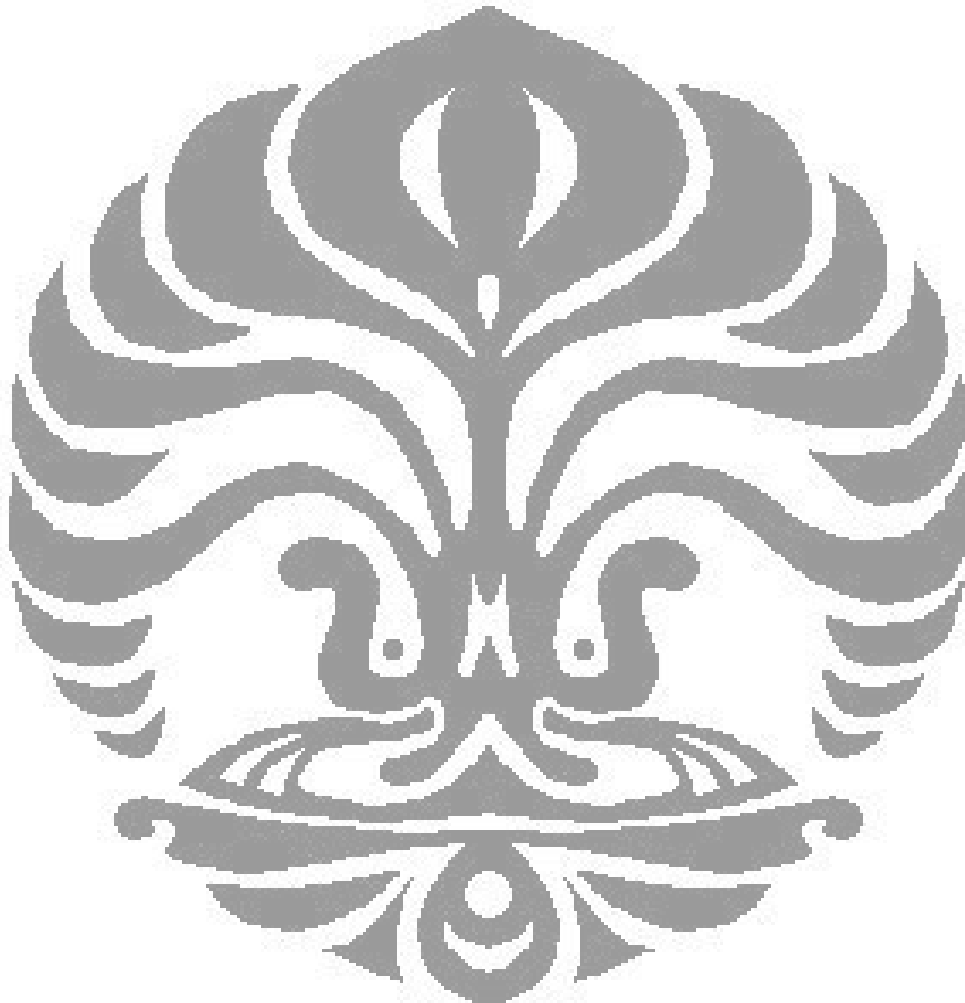
ABSTRAK

Telah dilakukan uji aktivitas antioksidan terhadap isolat kapang endofit dari *Garcinia forbesii* King dan *Garcinia porrecta* Wall. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan isolat hasil fermentasinya serta mendapatkan pola kromatogram KLT isolat yang memiliki aktivitas antioksidan. Uji aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Dari uji pendahuluan, didapat 3 isolat yang menunjukkan aktivitas antioksidan. Hasil pengujian dengan spektrofotometri UV-Vis menunjukkan isolat DP 1 memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dengan nilai IC_{50} sebesar 123,97 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan IC_{50} vitamin C adalah 4,8 $\mu\text{g/mL}$. Penentuan pola kromatogram KLT dilakukan terhadap dua isolat yang memiliki nilai IC_{50} terkuat yaitu isolat DP 1 dihasilkan dengan fase gerak terpilih n-heksana-aseton (3:2) dan isolat DF 1 dihasilkan dengan fase gerak terpilih aseton-etil asetat (3:2). Setelah elusi, terlihat delapan bercak pada isolat DP 1 dan satu bercak pada isolat DF 1. Setelah disemprot DPPH 0,2% dalam metanol, pada isolat DF 1 terlihat bercak kuning pucat berlatar belakang ungu, sedangkan pada isolat DP 1 tidak terlihat jelas. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa kapang endofit dari daun, akar *Garcinia forbesii* King dan daun *Garcinia porrecta* Wall memiliki aktivitas antioksidan.

Kata kunci : aktivitas antioksidan, DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), *Garcinia forbesii*, *Garcinia porrecta*, kapang endofit, kromatogram KLT.

xiv + 68 hlm.; gbr.; tab.; lamp.

Bibliografi : 44 (1984-2007)



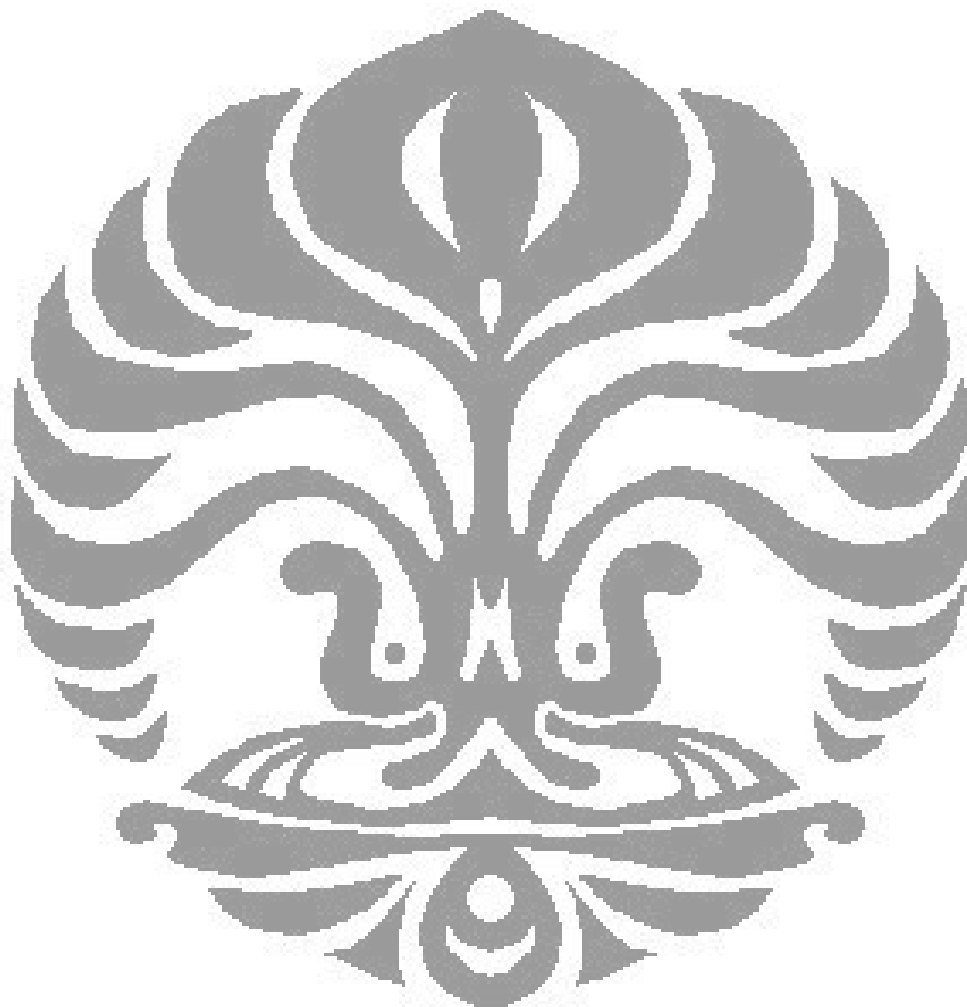
ABSTRACT

A study has been done to test an antioxidant activity of endophytic fungi isolates from *Garcinia forbesii* King and *Garcinia porrecta* Wall. This study was aimed to investigate the antioxidant activity of extracts produced by fermentation of isolates and to obtain those TLC chromatogram isolates which possessed antioxidant activity. The assay for antioxidant activity was based on the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) method. Initial analysis showed that 3 isolates had significant antioxidant activities. An observation used spectrophotometry UV-Vis showed that DP 1 isolate had the highest antioxidant activity with an IC_{50} value of 123.97 $\mu\text{g/mL}$, while IC_{50} vitamin C was 4.8 $\mu\text{g/mL}$. The chromatogram profile determination was done towards two isolates that had the strongest IC_{50} value, DP 1 isolate which was developed using n-hexane-acetone (3:2) as the selected mobile phase and DF 1 isolate which was developed using the selected mobile phase of acetone-ethyl acetate (3:2). After elution, there were seen eight spots on DP 1 isolate and one spot on DF 1 isolate. DF 1 isolate displayed the presence of antioxidant activity after spraying with methanolic solution of 0.2% DPPH which was a pale yellow spot with purple background, while it wasn't seen clearly on DP 1 isolate. This study has shown that endophytic fungi from the root, the leaf of *Garcinia forbesii* King and the leaf *Garcinia porrecta* Wall have antioxidant activities.

Keywords : antioxidant activity, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil), *Garcinia forbesii*, *Garcinia porrecta*, endophytic fungi, TLC chromatogram.

xiv + 68 pages; figs.; tabs.; apps.

Bibliography : 44 (1984-2007)

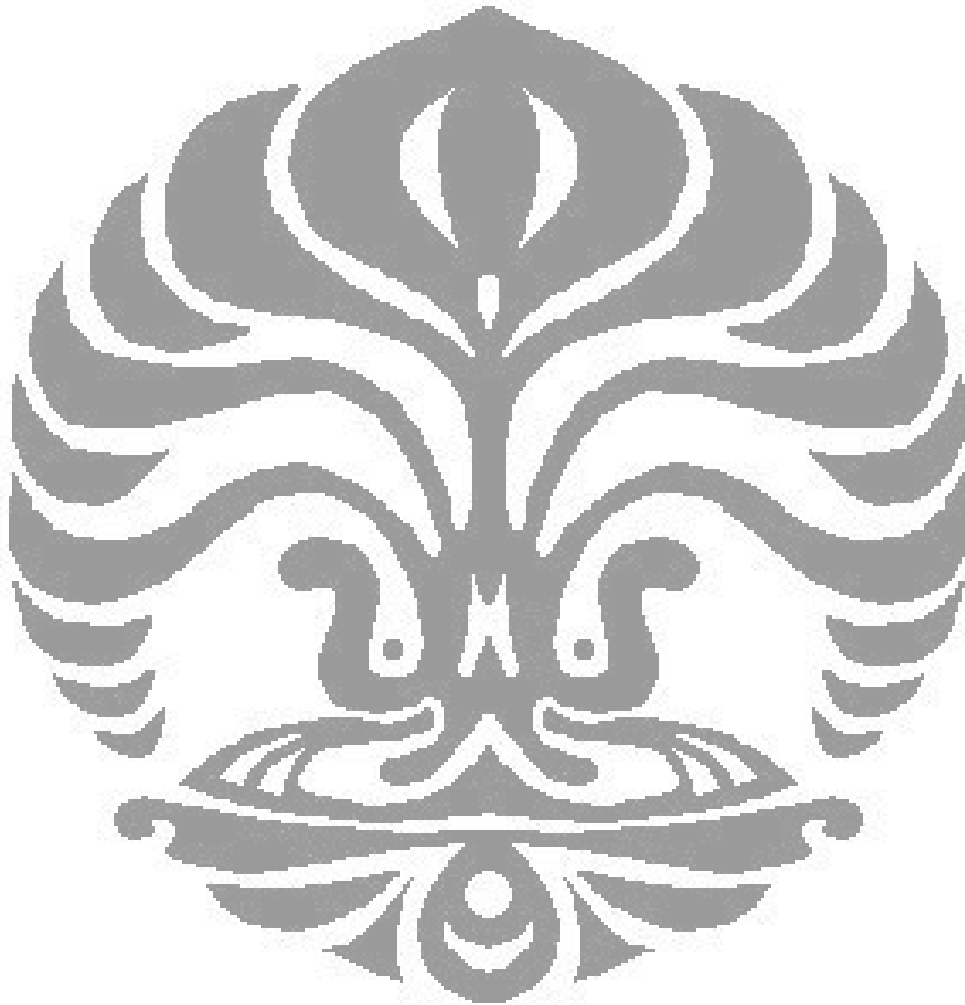


DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iii
ABSTRACT.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang.....	1
B. Tujuan Penelitian.....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Mikroba Endofit.....	5
1. Kapang Endofit.....	6
2. Hubungan Simbiosis Kapang Endofit.....	7
B. Uraian Umum Tanaman <i>Garcinia forbesii</i> King dan <i>Garcinia porrecta</i> Wall.....	8
1. Tanaman <i>Garcinia forbesii</i> King.....	8
a. Klasifikasi Tanaman.....	8
b. Senyawa Kimia yang Terdapat pada Tanaman.....	8

2	Tanaman <i>Garcinia porrecta</i> Wall.....	9
a.	Klasifikasi Tanaman.....	9
b.	Senyawa Kimia yang Terdapat pada Tanaman.....	9
C.	Teknik Fermentasi.....	9
1.	Jenis Fermentasi.....	10
2.	Faktor-faktor yang Mempengaruhi Proses Fermentasi.....	11
D.	Ekstraksi.....	13
E.	Kromatografi.....	13
	Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	14
F.	Antioksidan.....	14
	Antioksidan Sintesis dan Alami.....	15
G.	Uji Aktivitas Antiradikal DPPH.....	16
BAB III.	BAHAN DAN CARA KERJA	
A.	Bahan.....	18
B.	Alat.....	19
C.	Cara Kerja.....	20
BAB IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	
A.	Hasil.....	25
B.	Pembahasan.....	29
BAB V.	KESIMPULAN DAN SARAN	
A.	Kesimpulan.....	38

B. Saran.....	39
DAFTAR ACUAN.....	40



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Mekanisme reaksi aktivitas peredaman radikal DPPH oleh antioksidan.....	17
2. Contoh peremajaan isolat kapang endofit di media PDA <i>slant</i>	45
3. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit akar <i>Garcinia forbesii</i> ke-1 (AF 1).....	46
4. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit akar <i>Garcinia forbesii</i> ke-3 (AF 3).....	46
5. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit akar <i>Garcinia forbesii</i> ke-5 (AF 5).....	47
6. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit batang <i>Garcinia forbesii</i> ke-1 (BF 1).....	47
8. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit batang <i>Garcinia forbesii</i> ke-3 (BF 3).....	48
9. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit batang <i>Garcinia forbesii</i> ke-3 isolasi sebanyak x kali (BF 3 lx).....	48
10. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit batang <i>Garcinia forbesii</i> ke-5 (BF 5).....	49
11. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit batang	

	<i>Garcinia forbesii</i> ke-12 (BF 12).....	49
11.	Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit daun <i>Garcinia forbesii</i> ke-1 (DF 1).....	50
12.	Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit daun <i>Garcinia porrecta</i> ke-1 (DP 1).....	50
13.	Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit batang <i>Garcinia porrecta</i> ke-1 isolasi pertama kali (BP 1A).....	51
14.	Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit batang <i>Garcinia porrecta</i> ke-1 isolasi ketiga kali (BP 1C).....	51
15.	Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit batang <i>Garcinia porrecta</i> ke-1 isolasi sebanyak x kali (BP 1x).....	52
16.	Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit batang <i>Garcinia porrecta</i> ke-2 (I2 BP).....	52
17.	Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit batang <i>Garcinia porrecta</i> ke-3 (BP 3).....	53
18.	Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit batang <i>Garcinia porrecta</i> ke-x (BP X).....	53
19.	Uji pendahuluan aktivitas antioksidan I ekstrak etil asetat menggunakan <i>96 wells plate</i>	54
20.	Uji pendahuluan aktivitas antioksidan II ekstrak etil asetat menggunakan <i>96 wells plate</i>	55

21. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit DP 1 yang memiliki aktivitas antioksidan.....	56
22. Hasil pengamatan mikroskopik isolat kapang endofit DP 1.....	56
23. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit DF 1 yang memiliki aktivitas antioksidan.....	57
24. Hasil pengamatan mikroskopik isolat kapang endofit DF 1.....	57
25. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit AF 1 yang memiliki aktivitas antioksidan.....	58
26. Hasil pengamatan mikroskopik isolat kapang endofit AF 1.....	58
30. Kromatografi lapis tipis isolat DP 1 dengan fase gerak n-heksana-aseton (3 : 2) pada UV 254 nm dan 366 nm.....	59
31. Hasil kromatografi lapis tipis isolat DP 1 dengan fase gerak n-heksana-aseton (3 : 2) setelah disemprot dengan penampak bercak : A. anisaldehyda-asam sulfat pada UV 366 nm; B. DPPH 0,2% dalam metanol.....	60
32. Kromatografi lapis tipis isolat DF 1 dengan fase gerak aseton-etil asetat (3 : 2) pada UV 254 nm dan 366 nm.....	61
33. Hasil kromatografi lapis tipis isolat DF 1 dengan fase gerak aseton-etil asetat (3 : 2) setelah disemprot dengan penampak bercak : A. anisaldehyda-asam sulfat pada sinar tampak; B. DPPH 0,2% dalam metanol.....	62

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Peremajaan isolat kapang endofit dari tanaman <i>Garcinia forbesii</i> King dan <i>Garcinia porrecta</i> Wall.....	63
2. Hasil uji isolat kapang endofit yang memiliki aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil).....	64
3. Keterangan KLT isolat kapang endofit yang memiliki aktivitas antioksidan.....	65

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kerangka operasional penelitian.....	66
2. Cara perhitungan aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH secara spektrofotometri.....	67
3. Kode isolat kapang endofit yang telah diremajakan dari tanaman <i>Garcinia forbesii</i> King dan <i>Garcinia porrecta</i> Wall.....	68



BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Indonesia merupakan negara yang terdiri dari beribu-ribu pulau, terletak di daerah tropis, dan memiliki kekayaan alam yang sangat beraneka ragam. Salah satu diantaranya adalah keanekaragaman tumbuhan. Dari berbagai tumbuhan yang terdapat di Indonesia, banyak yang berpotensi mengandung senyawa yang berkhasiat sebagai obat (1). Oleh karena itu, kekayaan alam yang berada di Indonesia sangat mungkin untuk dijadikan sebagai obyek penelitian dalam menemukan senyawa obat baru dan substansi bioaktif lainnya.

Pada umumnya senyawa obat yang dihasilkan oleh tanaman merupakan metabolit sekunder aktif. Namun, pada beberapa spesies tanaman, senyawa obat yang dihasilkan berasal dari mikroorganisme yang hidup di dalam jaringan tanaman tersebut. Mikroorganisme itu pada umumnya disebut mikroorganisme endofitik (2). Endofit adalah mikroorganisme yang hidup di dalam ruang interselular dari organ tanaman, dimana hubungan antara endofit dan inangnya bisa bersifat simbiotik hingga parasitik, dan biasanya asimtomatis (3). Mikroba endofit adalah sumber

hayati yang potensial dan mempunyai nilai ekonomi yang penting di masa mendatang. Hal ini diperkuat oleh bukti yang menunjukkan bahwa metabolit sekunder dari jamur dan bakteri endofit mempunyai prospek yang bagus sebagai sumber bahan baku obat (4). Mikroorganisme endofit dapat berupa kapang atau bakteri dan di alam keduanya dapat ditemukan. Namun, antara kapang dan bakteri endofit yang paling banyak ditemukan adalah kapang sebanyak dua per tiga dari jumlah mikroorganisme (5).

Tanaman *Garcinia sp.* merupakan inang dari kapang endofit. *Garcinia* telah dikenal baik oleh masyarakat luas. Genus ini mempunyai lebih dari 180 spesies dan terdapat di seluruh wilayah Indonesia terutama di dataran rendah. Beberapa spesies dari genus *Garcinia* telah diketahui mempunyai aktivitas biologis dan farmakologis, misalnya sebagai anti-amuba, antifungi, antiinflamasi, sitotoksik, antitumor, dan antioksidan (6). *Garcinia mangostana* telah diketahui memiliki efek antiproliferasi, antioksidan, serta mampu menginduksi apoptosis dari sel kanker payudara (7). Minami dkk. melaporkan hasil isolasi dari kayu *Garcinia subelliptica* mengandung senyawa-senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan (8).

Akhir-akhir ini penggunaan senyawa antioksidan berkembang dengan pesat baik untuk makanan maupun pengobatan. Penggunaan sebagai obat makin berkembang seiring dengan makin bertambahnya pengetahuan tentang aktivitas radikal bebas dan membaiknya pengertian terhadap peranan antioksidan dalam beberapa penyakit degeneratif seperti penyakit jantung, aterosklerosis, dan kanker (6).

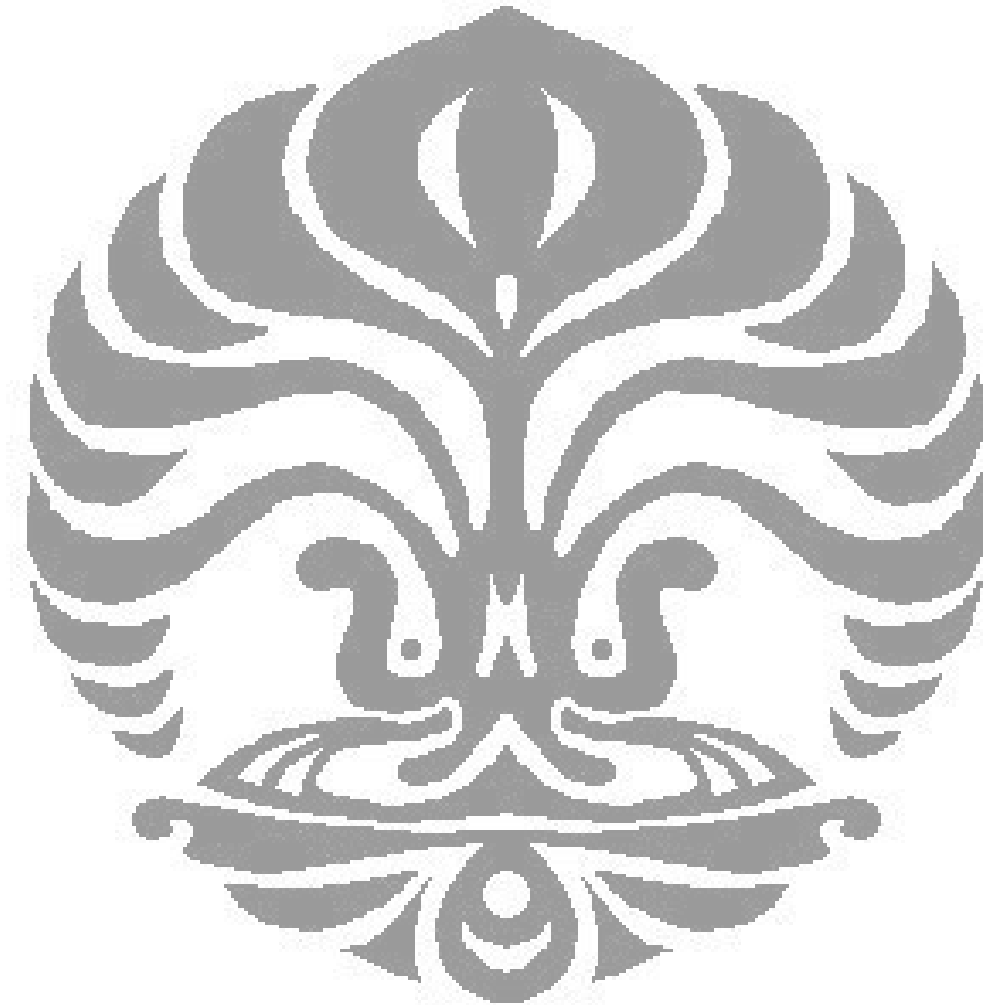
Penelitian tentang mikroba endofit saat ini sedang intensif dilakukan karena banyaknya manfaat yang dapat diperoleh terutama dalam hal aktivitas biologis dan farmakologisnya. Perkembangan lebih jauh menunjukkan bahwa perhatian para ahli terhadap mikroorganisme endofit lebih banyak tertuju pada jenis kapang dibandingkan dengan bakteri endofit (5). Hasil penelitian terdahulu melaporkan bahwa telah berhasil diisolasi 32 isolat kapang endofit dari *Garcinia forbesii* King dan *Garcinia porrecta* Wall dengan 10 isolat mempunyai efek antibakteri (9).

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diduga dalam isolat kapang endofit dari *Garcinia forbesii* King dan *Garcinia porrecta* Wall juga terdapat senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan. Senyawa tersebut akan diuji aktivitas antioksidannya dengan menggunakan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH).

B. TUJUAN PENELITIAN

1. Mengetahui aktivitas antioksidan senyawa yang terdapat dalam isolat kapang endofit dari *Garcinia forbesii* King dan *Garcinia porrecta* Wall menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH (1,1 - difenil - 2 - pikrilhidrazil).

2. Mendapatkan pola kromatogram Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dalam isolat kapang endofit dari *Garcinia forbesii* King dan *Garcinia porrecta* Wall yang memiliki aktivitas antioksidan.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. MIKROBA ENDOFIT

Mikroba endofit dapat berupa bakteri, kapang, dan khamir. Orland Petrini (1986) mendefinisikan endofit sebagai mikroorganisme yang mempunyai habitat hidup di dalam organ tanaman dalam kurun waktu tertentu, dapat berkolonisasi dalam jaringan tanaman tanpa merugikan tanaman inangnya. Endofit yang berada dalam rumput-rumputan dapat berbeda dengan yang ada dalam tanaman (3).

Penelitian terhadap mikroba endofit telah dimulai lama, akan tetapi potensi dari mikroorganisme sebagai penghasil senyawa bioaktif baru akhir-akhir ini diteliti. Mikroba endofit dapat diisolasi dari semua jaringan tanaman, namun memerlukan seleksi dan skrining penapisan untuk dapat mengetahui endofit secara lebih spesifik. Bagian organ atau jaringan tanaman tertentu ternyata mengandung endofit tertentu pula yang berbeda satu dengan lainnya. Hal ini merupakan mekanisme adaptasi dari endofit terhadap mikroekologi dan kondisi fisiologis yang spesifik dari masing-masing tanaman inang (10).

Petrini *et. al.* (1986) menyatakan bahwa dalam satu jaringan tanaman kemungkinan ditemukan beberapa jenis mikroba endofit. Jumlah isolat yang diperoleh dari satu bagian tanaman inang biasanya amat banyak, akan tetapi hanya beberapa saja yang dominan pada satu inang. Selain itu, beberapa hasil penelitian menunjukkan pula bahwa bagian tanaman yang berbeda dari satu tanaman inang memperlihatkan isolat endofit yang berbeda pula (10).

1. Kapang Endofit

Kapang endofit adalah kapang yang hidup dalam satu siklus kehidupan di dalam ranting atau daun dari tanaman inangnya. Kapang ini menyebabkan infeksi sistemik secara intraselular terhadap inangnya, akan tetapi tidak menyebabkan kerugian pada inangnya. Hidup secara simbiosis mutualisme. Keberadaannya pada tanaman dapat dilihat secara mikroskopik pada jaringan tanaman atau dapat juga melalui isolasi biakan murni. Untuk mendapatkan isolat kapang endofit dari tanaman, bagian tanaman dilakukan sterilisasi permukaan dan potongan dari bagian tanaman tersebut diletakkan pada medium biakan standar dan diinkubasi. Setelah beberapa hari, fungi endofit dapat tumbuh pada medium dan ada kemungkinan dapat bersporulasi (11).

Penelitian yang dilakukan Petrini menyatakan bahwa endofit dapat berada pada tanaman yang hidup. Beberapa fungi dapat diisolasi dari keluarga tanaman yang beragam, yang tumbuh dalam ekologi dan geografi

yang berbeda. Hanya sedikit kapang yang spesifik untuk spesies tanaman inang tertentu (11).

2. Hubungan Simbiosis Kapang Endofit

Hubungan simbiosis kapang endofit merupakan hubungan yang obligat bagi kapang. Menjadi agak sulit menentukan apakah tanaman inang yang lebih banyak mendapat keuntungan atau endofit yang lebih banyak mendapat keuntungan. Akan tetapi bagi tanaman inang, ada kerugian yang disebabkan oleh adanya kapang endofit yaitu endofit dapat merugikan tanaman inang dengan mengganggu alat reproduksi tanaman inang. Gejala sakit dapat tampak pada beberapa rumput-rumputan yang diinfeksi oleh *Balansia sp.* Pada bagian daun menjadi kuning dan nekrosis. Namun di samping itu juga ada keuntungan yang diperoleh bagi tanaman inangnya yaitu : pertumbuhan vegetatif dari rumput yang terinfeksi oleh kapang endofit meningkat, rumput menjadi lebih toleran terhadap kekeringan dan toksin yang dihasilkan oleh endofit membuat rumput menjadi tidak disukai oleh hewan pemakan rumput. Seperti pada tanaman yang diinfeksi oleh kapang *Acremonium* menyebabkan pertumbuhan yang meningkat, tahan terhadap kekeringan, dan tahan terhadap gangguan dari hewan herbivora (11).

B. URAIAN UMUM TANAMAN *Garcinia forbesii* KING DAN *Garcinia porrecta* WALL

1. Tanaman *Garcinia forbesii* King

a. Klasifikasi Tanaman (12)

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Subdivisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledonae
Ordo : Guttiferales
Famili : Guttiferae
Genus : *Garcinia*
Spesies : *Garcinia forbesii* King

b. Senyawa Kimia yang Terdapat pada Tanaman

Terdapat tiga senyawa xanton terprenilasi yang telah diisolasi dari tanaman *Garcinia forbesii* yaitu 1,3,7-trihidroksi-2-(3-metilbut-2-enil)-xanton, forbexanton, dan pyranojacareubin. Senyawa lainnya yaitu garcinixanton C; 1,2,5-trihidroksi xanton; 2,6-dihidroksi,1,5-dimetoksixanton; 1,2-dihidroksi,5,6-dimetoksixanton; 1,6-dihidroksi-5-metoksixanton; dan 1,5-dihidroksixanton. Senyawa tersebut diperoleh dari bagian cabang dan ranting tanaman (13).

2. Tanaman *Garcinia porrecta* Wall

a. Klasifikasi Tanaman (12)

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Subdivisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledonae
Ordo : Guttiferales
Famili : Guttiferae
Genus : *Garcinia*
Spesies : *Garcinia porrecta* Wall

b. Senyawa Kimia yang Terdapat pada Tanaman

Dalam *Garcinia porrecta* terdapat senyawa xanton, diantaranya porxanton A, dulxanton E, dulxanton F, dan dulxanton G. Selain itu, terdapat pula senyawa porlanosterol (14). Tanaman ini secara tradisional digunakan untuk mengobati demam.

C. TEKNIK FERMENTASI

Fermentasi adalah penguraian metabolik senyawa organik oleh mikroorganisme yang menghasilkan energi yang pada umumnya berlangsung dalam kondisi anaerob dengan pembebasan gas.

1. Jenis Fermentasi

Berdasarkan jenis media, fermentasi dibagi dua yaitu fermentasi media padat dan fermentasi media cair.

Fermentasi media padat adalah proses fermentasi dengan substrat tidak larut dan tidak mengandung air bebas, tetapi cukup mengandung air untuk keperluan mikroba. Fermentasi media padat disebut fermentasi permukaan karena mikroorganisme ditumbuhkan pada permukaan bahan. Fermentasi media padat digunakan untuk produksi enzim dan asam organik dengan menggunakan kapang (15). Fermentasi media padat mempunyai beberapa kelebihan, antara lain cara operasinya sederhana, kontaminasi bukan merupakan masalah penting, bahan untuk media atau substrat mudah diperoleh dan relatif murah harganya. Sedangkan kelemahannya antara lain memerlukan ruang yang luas, membutuhkan banyak tenaga kerja, sulit mengatur komposisi komponen-komponen media dan meniadakan komponen yang berpengaruh negatif terhadap proses fermentasi, dan sulit mengatur kondisi lingkungan fermentasi (16).

Fermentasi media cair adalah proses fermentasi dengan substrat yang larut atau tersuspensi dalam fase cair. Fermentasi media cair disebut fermentasi kultur terendam yang umumnya memerlukan aerasi dan agitasi. Sebagai inokulum pada fermentasi ini digunakan bakteri, kapang, dan khamir. Medium cair mempunyai beberapa kelebihan, yaitu antara lain jenis dan konsentrasi komponen-komponen medium dapat diatur sesuai dengan

yang diinginkan, dapat memberikan kondisi yang optimum untuk pertumbuhan, dan pemakaian medium lebih efisien (16).

Untuk keberhasilan suatu proses fermentasi, medium yang sesuai sangat dibutuhkan. Pada umumnya mikroba membutuhkan air, energi, sumber karbon, nitrogen, dan mineral. Selain itu media harus steril sehingga tidak ditumbuhi oleh mikroorganisme lain yang tidak dikehendaki (16).

Berdasarkan metode fermentasi, fermentasi dibagi dua yaitu fermentasi metode goyang dan metode diam :

Fermentasi Media Goyang

Metode ini menggunakan alat pengocok *rotary* atau *orbital* dan *reciprocating*. Alat pengocok *rotary* yang lebih sering digunakan. Pada mesin pengocok *rotary*, kultur berputar perlahan di dalam labu pada kecepatan 200-250 rpm. Sedangkan pada mesin pengocok *reciprocating*, kultur bergerak ke depan dan ke belakang, hal ini dapat menyebabkan percikan medium. Sebagai wadah fermentasi digunakan labu Erlenmeyer atau menggunakan tabung reaksi besar.

Fermentasi Metode Diam

Menggunakan labu Erlenmeyer dan dibiarkan selama masa inkubasi tanpa ada guncangan (15).

2. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Proses Fermentasi

Pembentukan produk hasil fermentasi mikroba dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti substrat dan nutrisi, suhu, pH, aerasi dan agitasi.

Substrat dan Nutrien

Medium fermentasi menyediakan semua nutrien yang dibutuhkan oleh mikroba untuk pertumbuhan dan memperoleh energi. Dalam fermentasi dibutuhkan substrat yang murah, mudah didapat, dan efisien penggunaannya. Beberapa substrat, sumber karbon adalah molase, pati, garam amonium, urea, nitrat, dan tepung kedelai.

pH

Pengukuran pH dilakukan agar dapat mempertahankan pH optimum selama fermentasi. Bakteri mempunyai pH optimum 6,7-7,5. pH dibawah 5,5 dan di atas 8,5 bakteri tidak tumbuh dengan baik. Khamir tumbuh pada pH 2,5-8,5. Kapang mempunyai pH optimum antara 5 dan 7, dan dapat tumbuh pada kisaran pH 3-8,5.

Suhu

Fermentasi dilakukan pada suhu dimana pertumbuhan sel atau produksi metabolit tertinggi. Sebagian besar mikroorganisme hanya dapat tumbuh pada selang suhu 20-30°C. Berdasarkan suhu pertumbuhan optimum, mikroorganisme yang digunakan dalam fermentasi tergolong mesofil dengan suhu optimum 20-45°C dan termofilik dengan suhu optimum 45°C. Laju pertumbuhan di bawah suhu 20°C adalah tergolong psikrofilik.

Aerasi dan agitasi

Aerasi bertujuan agar pemasukan oksigen cukup memadai, mempertahankan kondisi aerobik serta membuang gas karbondioksida yang

dihasilkan selama fermentasi. Agitasi bertujuan meratakan penyebaran mikroorganisme, nutrisi, dan oksigen di dalam medium (15).

D. EKSTRAKSI

Ekstraksi adalah pemisahan komponen dari suatu bahan alam, berdasarkan perbedaan kelarutan bahan. Ekstraksi dapat dilakukan dengan menggunakan bermacam-macam pelarut, mulai dari pelarut non polar (heksana, eter), semi polar (kloroform, dietilmetan) sampai polar (butanol, metanol).

Teknik pemisahan komponen dapat berdasarkan sifat kepolaran suatu bahan uji. Pemisahan komponen dalam suatu bahan disebut fraksinasi. Jumlah serta jenis senyawa yang dapat dipisahkan menjadi fraksi yang berbeda bergantung pada jenis tumbuhannya atau bahan yang diuji (17).

E. KROMATOGRAFI

Prinsip kromatografi adalah prinsip pemisahan berdasarkan partisi cuplikan yang berada diantara fase bergerak dan fase diam. Fase diam berperan menahan secara selektif partisi cuplikan, sedangkan fase bergerak dapat berbentuk padat atau cair. Kromatografi dapat digolongkan berdasarkan jenis fase diam dan fase gerak : kromatografi cair-padat, gas-padat, cair-cair, gas-cair. Berdasarkan mekanisme pemisahan : kromatografi serapan, partisi, penukar ion, gel.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT merupakan bentuk kromatografi cair-padat. Fase diam dapat berupa lempeng kaca atau logam yang dilapisi silika gel, aluminium oksida, kieselgur, serbuk selulosa, pati poliamida atau sefadeks. Campuran yang akan dipisahkan ditotolkan berupa bercak atau pita pada fase diam. Pekerjaan kromatografi dilakukan di dalam suatu bejana yang tertutup rapat berisi larutan pengembang dalam keadaan jenuh. Setelah pengembangan selesai, lempeng kromatogram diambil dan dikeringkan, kemudian disemprot dengan penampak bercak. Posisi bercak pada lempeng dinyatakan dengan harga Rf atau hRf ($hRf = 100 \times \text{harga Rf}$). Rf adalah jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal dibagi dengan jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal (17).

F. ANTIOKSIDAN

Definisi antioksidan secara umum adalah senyawa yang dalam jumlah kecil dibanding substrat mampu menunda atau menjaga terjadinya oksidasi dari substrat yang mudah teroksidasi (18). Antioksidan dapat diartikan sebagai zat yang dapat menetralkan radikal bebas, sehingga atom dan elektron yang tidak berpasangan mendapat pasangan elektron dan menjadi tidak liar lagi atau stabil. Radikal bebas sendiri merupakan atom atau molekul yang sifatnya sangat tidak stabil. Fungsi antioksidan adalah menetralkan

radikal bebas sehingga tubuh terlindungi dari berbagai macam penyakit degeneratif dan kanker. Fungsi lain antioksidan adalah membantu menekan proses penuaan/*antiaging* (19).

Senyawa antioksidan dalam tubuh kita dapat dikelompokkan menjadi tiga yaitu antioksidan primer yang mencegah pembentukan radikal bebas baru, antioksidan sekunder atau penangkap radikal yang mencegah terjadinya reaksi berantai, dan antioksidan tersier yang memperbaiki kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas (20).

Antioksidan Sintetis dan Alami

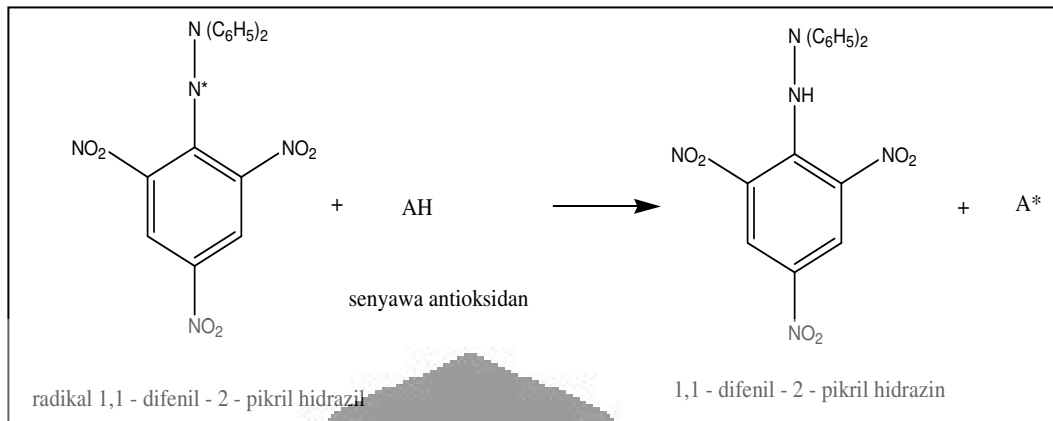
Antioksidan sintetis seperti *butylated hydroxy anisole* (BHA), *butylated hydroxy toluene* (BHT), dan *propyl gallate* (PG), banyak digunakan dalam industri makanan karena sangat efektif dalam menghambat oksidasi lemak dan murah dibandingkan antioksidan alami. Akan tetapi, hasil uji BHA pada bermacam-macam binatang percobaan oleh FAO/WHO (1989) didapatkan senyawa BHA ini dapat menyebabkan pembengkakan organ hati dan mempengaruhi aktivitas enzim di dalam hati. BHA juga bersifat karsinogenik pada hewan percobaan. BHT dapat menyebabkan perubahan dalam tiroid tikus, stimulasi sintetis DNA, dan induksi enzim. Akibat sampingan lainnya adalah gangguan fungsi hati, paru-paru, mukosa usus, dan keracunan.

Untuk mengatasi masalah tersebut, banyak dilakukan penelitian tentang antioksidan alami karena sifatnya yang aman. Namun demikian, antioksidan alami seperti tokoferol dan asam askorbat kurang efektif

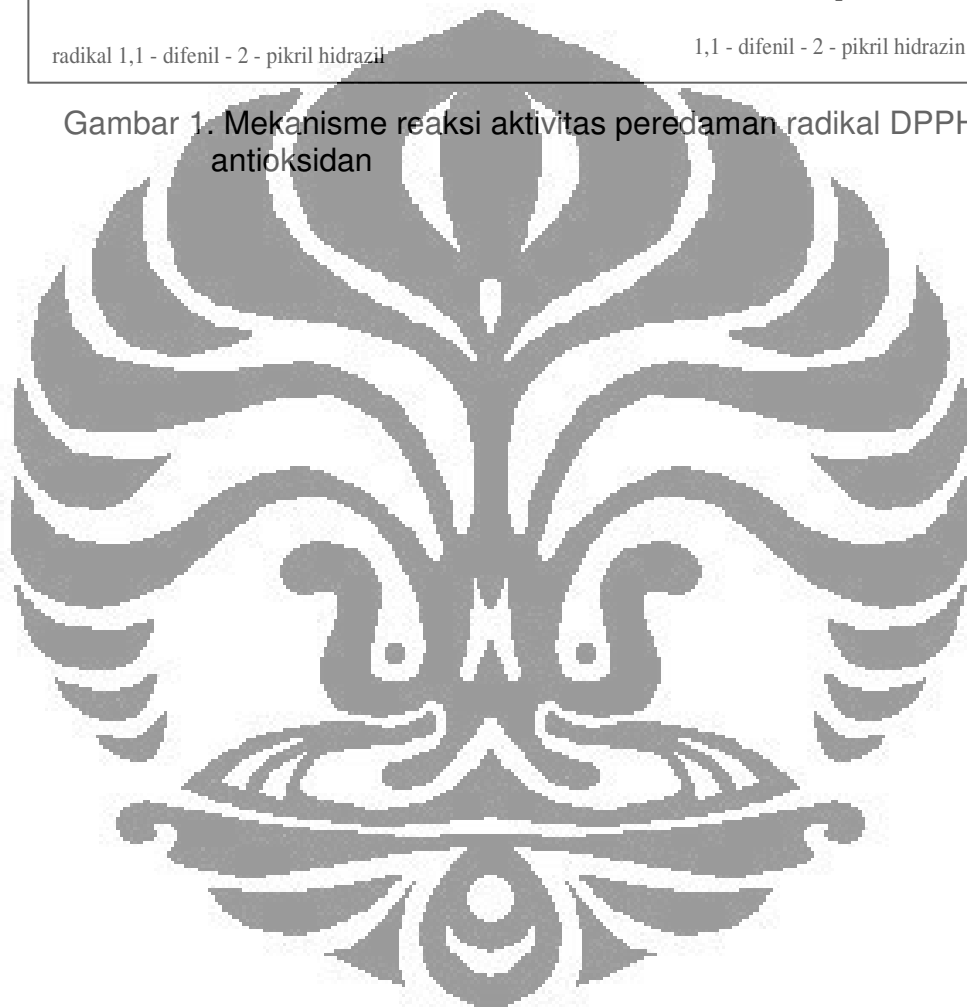
dibandingkan antioksidan sintetik dan memerlukan biaya yang tinggi dalam proses pengolahan. Oleh karena itu, perlu identifikasi komponen alami lain yang lebih efektif (21).

G. UJI AKTIVITAS ANTIRADIKAL DPPH

Terdapat beberapa metode pengujian aktivitas antioksidan secara kuantitatif, salah satunya dengan cara peredaman aktivitas radikal DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) secara spektrofotometri (20). Metode peredaman radikal bebas DPPH bisa digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan dalam waktu relatif singkat bila dibandingkan dengan metode lain, dan telah digunakan secara ekstensif untuk memprediksi aktivitas antioksidan berbagai macam senyawa kimia (22). Pada prinsipnya, reaksi peredaman radikal DPPH adalah penangkapan atom hidrogen dari senyawa antioksidan oleh radikal DPPH menjadi senyawa DPP hidrazin (1,1-difenil-2-pikrilhidrazin) yang relatif stabil dan diukur serapannya secara spektrofotometri pada panjang gelombang 517 nm. Hal ini dapat dicirikan dengan adanya perubahan warna ungu (radikal DPPH) menjadi warna kuning (DPP hidrazin). Reaksi antara DPPH dengan senyawa antioksidan dapat digambarkan sebagai berikut : (23)



Gambar 1. Mekanisme reaksi aktivitas peredaman radikal DPPH oleh antioksidan



BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

A. BAHAN

1. Sampel yang Digunakan

Enam belas isolat kapang endofit dari tanaman *Garcinia forbesii* King dan *Garcinia porrecta* Wall yang diperoleh dari penelitian terdahulu di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Farmasi, FMIPA-UI (9).

2. Bahan Kimia

Pelarut dan bahan kimia yang digunakan antara lain etil asetat (Merck), aquadest, n-heksana teknis yang telah didestilasi, aseton (Mallinckrodt), asam sulfat (Merck), etanol (Merck), anisaldehida, asam asetat glasial (Merck), DPPH (Sigma), metanol (Merck), kalsium karbonat (Merck), vitamin C (Brataco), dan DMSO (dimetil sulfoksida) (Merck), *Lactofenol* *Cotton Blue*.

3. Medium

Medium yang digunakan untuk peremajaan kapang endofit adalah *Potato Dextrose Agar* (PDA; Difco). Medium yang digunakan untuk

fermentasi kapang endofit adalah *Potato Dextrose Broth* (PDB; Difco) dan *Yeast Extract* (Oxoid).

B. ALAT

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *Laminar Air Flow* (LAF; ESCO), inkubator (Mettler), oven (WTB Binder), autoklaf (Hirayama), *orbital shaker* (Lab Line), timbangan analitik (Acculab), *vortex mixer* (Digisystem), sentrifuge (Kubota-6800), *hotplate* (Corning), spektrofotometer UV-Vis model UV-1601 (Shimadzu), mikropipet (Socorex), mikroskop cahaya, *96 Wells Plate* (Nunc), lempeng silika gel GF₂₅₄, bejana kromatografi, lampu UV (Camag), kamera *digital* (Fujifilm tipe FinePix A 800).

Peralatan gelas dan peralatan lain yang mendukung, antara lain : Erlenmeyer, cawan Petri, pipa kapiler, tabung reaksi, gelas ukur, *syringe* 5 cc, vial, ose lurus, pinset, labu bulat, alat penyemprot pereaksi.

C. CARA KERJA

1. Pembuatan Medium Peremajaan Isolat Kapang Endofit

Pembuatan medium PDA *plate*

PDA (*Potato Dextrose Agar*) ditimbang sebanyak 39 g, dimasukkan dalam labu bulat, dilarutkan dalam aquadest hingga 1 liter. Campur bahan, aduk hingga larut kemudian dipanaskan hingga mendidih lalu disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Tuang ke dalam cawan Petri, masing-masing 15 mL, biarkan media memadat.

Pembuatan medium PDA *slant*

PDA (*Potato Dextrose Agar*) ditimbang sebanyak 39 g, dimasukkan dalam labu bulat, dilarutkan dalam aquadest hingga 1 liter. Campur bahan, aduk hingga larut kemudian dipanaskan hingga mendidih lalu disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Masukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 10 mL. Letakkan tabung dalam posisi miring ± 45° dan biarkan media memadat.

2. Pembuatan Medium Fermentasi Kapang Endofit

Untuk membuat PDY (*Potato Dextrose Yeast*) disiapkan : *Potato Dextrose Broth* 24 g; *Yeast Extract* 4 g; dan kalsium karbonat (CaCO₃) 5 g, dimasukkan dalam labu bulat, dilarutkan dalam aquadest hingga 1 liter. Aduk hingga larut kemudian dipanaskan hingga mendidih lalu disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C.

3. Peremajaan Isolat Kapang Endofit

Isolat kapang endofit diremajakan dalam medium PDA dengan cara : hifa dari tiap koloni kapang diambil menggunakan ose steril dan dipindahkan ke dalam masing-masing satu PDA *plate* dikerjakan duplo, satu untuk *working culture* dan satu lagi untuk *stock culture* kemudian diinkubasi selama 5-7 hari pada suhu kamar. Tiap-tiap koloni kapang yang tumbuh pada medium PDA *plate* dipindahkan ke PDA *slant*, inkubasi pada suhu kamar selama tiga sampai lima hari sesuai pertumbuhan kapang. Setiap isolat kapang endofit dibuat duplo pada PDA *slant*, masing-masing sebagai *stock culture* (kultur stok) dan *working culture* (kultur kerja).

4. Fermentasi dan Ekstraksi Kultur Hasil Fermentasi

Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kapang endofit dapat diperoleh melalui suatu proses fermentasi. Koloni kapang endofit yang telah murni diambil kira-kira 2 x 2 cm² (hifa dan agar) lalu diinokulasikan masing-masing ke dalam Erlenmeyer yang berisi 50 mL medium PDY. Kultur tersebut selanjutnya *dishaker* pada kecepatan 150 rpm selama 14 hari pada suhu kamar (24).

Kultur hasil fermentasi diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat setengah dari volume kultur dengan *divortex* selama 5 menit, selanjutnya disentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit (25, 26). Ekstrak etil asetat diambil menggunakan *syringe* 5 cc, selanjutnya dimasukkan ke dalam vial kering yang telah ditimbang sebelumnya lalu diuapkan pada suhu kamar dengan

cara diangin-anginkan hingga diperoleh ekstrak kering. Ekstrak kering yang diperoleh, ditimbang, dan dilarutkan dalam metanol *p.a* dengan bantuan sedikit DMSO (dimetil sulfoksida) hingga diperoleh konsentrasi larutan 1 mg/mL untuk dijadikan larutan induk.

5. Uji Aktivitas Antioksidan

a. Uji Pendahuluan Aktivitas Antioksidan Menggunakan *96 wells plate*

Larutan induk dipipet masing-masing sebanyak 30 μ L ke dalam tiap sumur lalu ditambahkan 30 μ L metanol dan 20 μ L DPPH 0,4 mM dalam metanol kemudian ditunggu beberapa saat hingga terjadi perubahan warna ungu menjadi warna kuning bila larutan uji memiliki aktivitas antioksidan. Kontrol positif yang digunakan adalah vitamin C 1 mg/mL sebanyak 30 μ L yang diperlakukan sama seperti larutan uji. Kontrol pelarut dilakukan dengan memipet 60 μ L metanol dan 20 μ L DPPH 0,4 mM pada salah satu sumur dan tiap pengujian dilakukan secara duplo (1).

b. Uji Peredaman Radikal DPPH Secara Spektrofotometri

Apabila pada uji pendahuluan menunjukkan aktivitas antioksidan maka selanjutnya dilakukan pengukuran aktivitas antioksidan terhadap radikal DPPH secara spektrofotometri (27). Larutan uji yang akan diukur aktivitasnya dilarutkan dalam berbagai konsentrasi (25, 50, 75, dan 100 ppm) dengan cara membagi larutan induk menjadi 4 bagian dan dimasukkan dalam tabung

reaksi. Masing-masing larutan dalam tabung reaksi ditambahkan 400 μL DPPH 0,4 mM dalam metanol *p.a* yang harus selalu dalam keadaan baru dan volumenya dibuat hingga 2 mL dengan metanol *p.a* (28).

Larutan dalam tabung reaksi lalu divortex hingga homogen dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Serapannya diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 517 nm (29). Pengukuran serapan blanko dilakukan terhadap 400 μL DPPH 0,4 mM dan volumenya dibuat hingga 2 mL dengan metanol *p.a*. Sebagai pembanding digunakan vitamin C dengan konsentrasi 2, 4, 6, dan 8 ppm yang dibuat dengan perlakuan yang sama seperti larutan uji.

Ekstrak dinyatakan aktif sebagai antioksidan apabila nilai $\text{IC}_{50} < 200$ $\mu\text{g/mL}$ (30). Nilai IC_{50} adalah konsentrasi efektif antioksidan yang mampu menghambat 50% radikal bebas yang dapat dihitung menggunakan persamaan regresi linier (29).

6. Identifikasi Dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi dilakukan terhadap isolat yang memiliki aktivitas antioksidan yaitu isolat DP 1 dan isolat DF 1. Larutan induk dari dua isolat tersebut ditotolkan pada lempeng KLT silika gel GF₂₅₄ kemudian dielusi dengan berbagai fase gerak hingga diperoleh pemisahan yang baik (fase gerak terpilih). Hasil elusi diamati fluoresensinya dengan sinar ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm kemudian lempeng disemprot

dengan penampak bercak yaitu asam sulfat 10% dalam etanol, anisaldehid-
asam sulfat, dan DPPH 0,2% dalam metanol.

7. Identifikasi Isolat Kapang Endofit yang Memiliki Aktivitas Antioksidan

Identifikasi kapang endofit yang memiliki aktivitas antioksidan dilakukan secara makroskopik dan mikroskopik. Identifikasi makroskopik dilakukan dengan mengamati morfologi dan pertumbuhan koloni, sedangkan pengamatan mikroskopik dilakukan dengan cara bagian hifa kapang endofit dipindahkan pada kaca objek lalu ditetaskan 1-2 tetes *lactofenol cotton blue*, tutup dengan gelas penutup. Preparat tersebut diamati secara mikroskopik menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Peremajaan Kapang Endofit

Peremajaan kapang endofit dilakukan terhadap 16 isolat kapang endofit yang didasarkan atas perbedaan makroskopik dengan perincian 3 isolat berasal dari akar *Garcinia forbesii* King, 5 isolat berasal dari batang *Garcinia forbesii* King, 1 isolat berasal dari daun *Garcinia forbesii* King, 6 isolat berasal dari batang *Garcinia porrecta* Wall, dan 1 isolat berasal dari daun *Garcinia porrecta* Wall. Peremajaan isolat kapang endofit dari tanaman *Garcinia forbesii* King dan *Garcinia porrecta* Wall serta contoh peremajaan isolat kapang endofit di media PDA *slant* (agar miring) dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 2.

2. Fermentasi dan Ekstraksi Kapang Endofit

Fermentasi dilakukan terhadap 16 isolat yang telah diremajakan. Keenam belas isolat tersebut difermentasi menggunakan medium PDY (*Potato Dextrose Yeast*). Ekstraksi dari kultur hasil fermentasi didapat sebanyak 16 ekstrak etil asetat. Isolat yang difermentasi dapat dilihat pada Gambar 3-18.

3. Uji Aktivitas Antioksidan

Pada uji pendahuluan aktivitas antioksidan menggunakan *96 wells plate* diperoleh 3 isolat yang menunjukkan aktivitas antioksidan yaitu berasal dari isolat DP 1, DF 1, AF 1. Hasil uji pendahuluan aktivitas antioksidan menggunakan *96 wells plate* dapat dilihat pada Gambar 19-20.

Pada uji aktivitas antioksidan dengan metode peredaman terhadap radikal DPPH secara spektrofotometri menunjukkan bahwa isolat DP 1 memiliki IC_{50} sebesar 123,97 $\mu\text{g/mL}$, isolat DF 1 sebesar 164,18 $\mu\text{g/mL}$, dan isolat AF 1 sebesar 195,56 $\mu\text{g/mL}$. Hasil ini menunjukkan bahwa isolat DP 1, DF 1, dan AF 1 memiliki aktivitas antioksidan karena nilai IC_{50} yang diperoleh kurang dari 200 $\mu\text{g/mL}$ dengan isolat DP 1 memiliki aktivitas antioksidan terbesar. Vitamin C yang digunakan sebagai pembanding memiliki IC_{50} sebesar 4,8 $\mu\text{g/mL}$. Hasil uji aktivitas antioksidan terhadap radikal DPPH secara spektrofotometri dapat dilihat pada Tabel 2.

4. Identifikasi dengan Menggunakan KLT

Setelah dilakukan percobaan dengan beberapa fase gerak, ternyata yang memberikan pemisahan terbaik untuk isolat DP 1 adalah dengan fase gerak n-heksana-aseton (3:2) dan untuk isolat DF 1 adalah dengan fase gerak aseton-etil asetat (3:2).

Pola kromatogram diamati sebelum dan sesudah lempeng disemprot dengan penampak bercak asam sulfat 10% dalam etanol, anisaldehyda-asam

sulfat, DPPH 0,2% dalam metanol pada sinar tampak serta sinar ultraviolet panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.

Sebelum lempeng disemprot, pada pengamatan hasil elusi kandungan isolat DP 1 di bawah sinar UV 366 nm terlihat delapan bercak dengan variasi warna, antara lain kuning, hijau, biru kehijauan, ungu, dan biru dengan Rf 0,12; 0,22; 0,28; 0,37; 0,46; 0,52; 0,61; dan 0,71. Pada pengamatan hasil elusi kandungan isolat DF 1 di bawah sinar UV 366 nm terlihat bercak berwarna kuning pucat dengan Rf 0,57. Pada UV 254 nm, hanya isolat DF 1 yang memperlihatkan bercak kehitaman.

Tahap berikutnya lempeng disemprot dengan penampak bercak asam sulfat 10% dalam etanol dan anisaldehida-asam sulfat kemudian dipanaskan 100°-105°C selama beberapa menit. Hasil elusi kandungan isolat DP 1 disemprot dengan penampak bercak asam sulfat 10% dalam etanol, pada pengamatan sinar tampak, bercak tidak terlihat, hanya terlihat samar-samar garis elusinya. Pengamatan dengan menggunakan penampak bercak anisaldehida-asam sulfat karena bercak tidak terlihat pada sinar tampak maka diamati pada sinar UV 366 nm terlihat adanya beberapa bercak dengan variasi warna hijau, kuning kehijauan, dan kuning dengan Rf 0,13-0,81. Hasil elusi kandungan isolat DF 1 disemprot dengan penampak bercak asam sulfat 10% dalam etanol, pada sinar tampak bercak tidak terlihat jelas selama pemanasan beberapa menit. Pengamatan dengan menggunakan penampak bercak anisaldehida-asam sulfat, pada sinar tampak terlihat adanya bercak berwarna kecoklatan.

Setelah disemprot dengan penampak bercak DPPH 0,2% dalam metanol, pada isolat DF 1 terlihat adanya bercak berwarna kuning pucat dengan latar belakang ungu, sedangkan pada isolat DP 1 tidak terlihat jelas. Pola kromatogram metabolit sekunder isolat DP 1 dan DF 1 dapat dilihat pada Gambar 27-30 dan keterangan KLT isolat kapang endofit yang memiliki aktivitas antioksidan dapat dilihat pada Tabel 3.

5. Identifikasi Isolat Kapang Endofit yang Memiliki Aktivitas Antioksidan

Hasil identifikasi isolat-isolat aktif adalah sebagai berikut :

a. Isolat DP 1

Kapang endofit yang berasal dari daun *Garcinia porrecta* ini memiliki hifa berwarna hijau tua. Tipe spora bulat dan spora kapang sangat mudah menyebar. Pengamatan di bawah mikroskop terlihat berupa rantai dari satu sel konidia (Gambar 22).

b. Isolat DF 1

Kapang endofit yang berasal dari daun *Garcinia forbesii* ini memiliki hifa berwarna hijau tua, tepi koloni bergelombang. Pengamatan secara mikroskopis menunjukkan konidia coklat yang berdinding tebal (Gambar 24).

c. Isolat AF 1

Koloni kapang endofit yang berasal dari akar *Garcinia forbesii* ini berbentuk bulat, memiliki hifa halus berwarna krem kecoklatan di bagian tengah, sedangkan bagian pusat dan tepinya berwarna putih. Pengamatan secara mikroskopis menunjukkan hifa tipis berwarna biru dengan konidia bulat berwarna biru atau coklat yang saling berlekatan (Gambar 26).

B. PEMBAHASAN

Penelitian dilakukan terhadap isolat kapang endofit dari tanaman *Garcinia forbesii* King dan *Garcinia porrecta* Wall yang diperoleh dari penelitian terdahulu di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Farmasi, FMIPA-UI bertujuan untuk mengetahui potensinya sebagai antioksidan dengan cara menguji ekstrak hasil fermentasinya terhadap radikal DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Selanjutnya, ekstrak hasil fermentasi tersebut juga digunakan untuk mendapatkan pola kromatogram dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya.

Dari 32 isolat kapang endofit dari tanaman *Garcinia forbesii* King dan *Garcinia porrecta* Wall digunakan 16 kapang endofit untuk diremajakan, difermentasi, dan ditentukan aktivitas antioksidannya yang didasarkan atas perbedaan secara makroskopik yaitu pengamatan bentuk koloni kapang dan

warna koloni (1). Peremajaan bertujuan membuat isolat menjadi kultur yang siap dikembangkan untuk produksi (31). Isolat kapang endofit dipindahkan ke dalam cawan Petri dan agar miring yang berisi medium PDA, tiap pengerjaan dibuat duplo berfungsi sebagai kultur stok dan kultur kerja. Media PDA adalah media yang umum digunakan untuk penelitian dan pemeliharaan kapang di laboratorium (32). Media ini cukup baik untuk pertumbuhan sebagian besar jamur. Pertumbuhan kapang endofit pada media ini umumnya lebih cepat karena PDA mengandung karbohidrat yang lebih mudah dicerna oleh kapang (33).

Produksi metabolit sekunder dari isolat endofit dilakukan dengan fermentasi cair. Proses fermentasi adalah proses yang memanfaatkan kemampuan mikroorganisme untuk menghasilkan metabolit (produk) yang diinginkan, kondisi proses harus dikendalikan sehingga mikroorganisme dapat hidup dan berproduksi pada kondisi yang optimum (34). Metabolit sekunder yang diinginkan mampu dihasilkan dalam jumlah besar dengan proses fermentasi (35). Media fermentasi yang digunakan adalah PDY. Medium PDY dipilih dengan pertimbangan terdapat sumber karbon yang berasal dari ekstrak kentang dan dekstrosa, serta ekstrak khamir sebagai sumber nitrogen karena merupakan komponen media yang paling penting yaitu sumber C dan N dimana sel mikroba dan produk fermentasi sebagian besar dari komponen ini (5). Pada medium fermentasi ditambahkan CaCO_3 (kalsium karbonat) sebagai buffer untuk mempertahankan pH medium agar tetap pH 6 karena pertumbuhan optimum kapang umumnya pada pH 5-7

(16). Fermentasi glukosa yang berlangsung cepat akan menurunkan pH, sehingga diperlukan buffer untuk mempertahankan pH sistem (36). Isolat yang telah berumur \pm 2 minggu dipindahkan ke dalam 50 mL medium cair PDY kemudian difermentasi selama 14 hari pada suhu kamar untuk mendapatkan hasil metabolit sekunder yang optimal (1, 37). Lamanya waktu inkubasi berdasarkan penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa pertumbuhan kapang akan mencapai fase stasioner, dalam waktu 14 sampai dengan 21 hari. Pada fase ini metabolit sekunder akan diproduksi. Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroorganisme tidak akan digunakan oleh kapang, tetapi dalam keadaan tertentu seperti keadaan kekurangan makanan, hasil metabolit sekunder itu akan digunakan kembali oleh kapang untuk metabolisme. Berdasarkan pertimbangan tersebut, maka pengambilan hasil metabolit sekunder dilakukan dalam waktu 14 hari disesuaikan dengan fase stasioner pertumbuhan kapang (1).

Fermentasi media cair disebut fermentasi kultur terendam yang umumnya memerlukan kondisi aerasi dan agitasi (16). Aerasi pada proses fermentasi yang dilakukan diberikan melalui proses pengadukan (agitasi) dengan bantuan *orbital shaker* pada 150 rpm selama 14 hari (24). Fermentasi memerlukan sistem aerasi untuk menyuplai kebutuhan oksigen mikroorganisme sedangkan agitasi bertujuan untuk meningkatkan suplai oksigen dalam medium karena oksigen mempunyai kelarutan rendah. Tujuan agitasi lainnya untuk meningkatkan berlangsungnya pertukaran panas

sehingga distribusi suhu menjadi homogen di seluruh bagian substrat, juga kontak nutrisi dan hifa menjadi efisien (5).

Setelah fermentasi berakhir, kultur hasil fermentasi diekstrak dengan pelarut organik etil asetat yang bersifat semi polar. Pelarut organik akan melarutkan metabolit sekunder yang terdapat pada membran sel (*membrane bound*) (1). Alasan digunakan pelarut etil asetat ini adalah didasarkan pada penelitian-penelitian yang telah dilakukan, pelarut etil asetat banyak digunakan dalam mengisolasi senyawa xanton pada beberapa genus *Garcinia* (8, 38, 39) Pemisahan supernatan dan biomassa dilakukan melalui sentrifugasi pada suhu rendah. Sentrifugasi pada suhu rendah bertujuan untuk mengurangi kemungkinan rusaknya senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada isolat endofit (1).

Hasil ekstraksi dikeringkan dengan bantuan kipas angin dan dibiarkan menguap pada suhu kamar selama ± 1 minggu. Ekstrak kering yang diperoleh dilarutkan dalam metanol pada konsentrasi ± 1 mg/mL dijadikan sebagai larutan induk, kelarutannya dapat ditingkatkan dengan bantuan DMSO. Larutan induk yang mengandung senyawa metabolit sekunder tersebut digunakan untuk uji aktivitas antioksidan terhadap radikal DPPH.

Sebelum dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal DPPH, dilakukan uji pendahuluan menggunakan *96 wells plate* untuk seleksi awal dari 16 ekstrak etil asetat yang diperoleh. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dipilih karena sederhana, mudah,

cepat, dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel. DPPH merupakan radikal sintetik yang larut dalam pelarut polar seperti metanol dan etanol (22). Aktivitas diukur dengan menghitung jumlah pengurangan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan pengurangan konsentrasi larutan DPPH. Peredaman tersebut dihasilkan oleh bereaksinya molekul difenil pikril hidrazil (DPPH) dengan atom hidrogen yang dilepaskan satu molekul komponen bahan uji sehingga terbentuk senyawa difenil pikril hidrazin yang berwarna kuning (17). Berdasarkan literatur, panjang gelombang maksimum (λ maks) DPPH adalah 517 nm (22, 40), namun pada percobaan ini diukur pada λ maks 516 nm. Hal ini mungkin disebabkan karena faktor perbedaan instrumen yang digunakan. Pengamatan dilakukan setelah inkubasi pada suhu 37°C dimaksudkan agar sesuai dengan suhu tubuh manusia karena reaksi pembentukan radikal bebas merupakan mekanisme biokimia tubuh yang alamiah dan diukur serapannya pada menit ke-30 karena tenggang waktu tersebut sudah dianggap cukup untuk mengukur besarnya penurunan serapan radikal DPPH (41). Pengerjaan antara sampel dan blanko DPPH harus dilakukan dalam periode waktu yang sama agar didapat perbandingan serapan yang signifikan (36).

Hasil uji aktivitas dengan metode peredaman radikal DPPH yang telah dilakukan, didapat 3 ekstrak yang menunjukkan aktivitas antioksidan dengan ekstrak etil asetat yang berasal dari isolat DP 1 merupakan ekstrak yang paling tinggi aktivitas antioksidannya dengan IC_{50} sebesar 123,97 $\mu\text{g/mL}$ dibandingkan 2 ekstrak lainnya. Suatu senyawa dinyatakan aktif sebagai

antioksidan bila nilai IC_{50} kurang dari 200 $\mu\text{g/mL}$ (32). Semakin kecil nilai IC_{50} berarti semakin kuat daya antioksidannya (21). Dalam penelitian ini yang diuji aktivitas antioksidannya masih berupa ekstrak kasar, sehingga masih ada kemungkinan senyawa murni yang dikandung memiliki aktivitas peredaman radikal bebas lebih kuat dibandingkan ekstraknya (40).

Terhadap isolat yang memiliki potensi sebagai antioksidan yaitu isolat DP 1, DF 1, dan AF 1 dilakukan pengamatan secara makroskopik dan mikroskopik. Isolat DP 1 diduga termasuk genus *Penicillium sp.*, sedangkan isolat DF 1 dan AF 1 belum dapat diketahui kemungkinan taksonominya karena hifa yang dimiliki tidak menunjukkan ciri yang spesifik. Oleh karena itu diperlukan identifikasi secara molekuler agar dapat diketahui dengan tepat taksonomi kapang endofit tersebut.

Uji kandungan kimia dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis. Identifikasi kualitatif dilakukan dengan melihat adanya bercak pada lempeng kromatografi lapis tipis dan harga R_f . Untuk mendapatkan pemisahan yang baik, maka digunakan beberapa kombinasi fase gerak terhadap larutan uji yang berasal dari isolat yang memiliki aktivitas antioksidan, yaitu isolat DP 1 dan DF 1. KLT sering digunakan untuk mencari pelarut kromatografi kolom, menganalisis fraksi hasil kromatografi kolom, identifikasi dan isolasi senyawa murni skala kecil, serta memudahkan penentuan larutan pengembang dalam analisis KCKT (16, 42). Langkah awal yaitu pencarian berbagai macam fase gerak dengan variasi perbandingan sehingga dihasilkan bercak yang benar-benar terpisah pada lempeng KLT

(bercak dapat terlihat di bawah UV) (31). Didapat fase gerak yang baik (fase gerak terpilih) untuk isolat DP 1 adalah n-heksana-aseton (3:2) dan untuk isolat DF 1 adalah aseton-etil asetat (3:2).

Pendeteksian senyawa yang paling sederhana adalah jika senyawa menunjukkan penyerapan di daerah UV gelombang pendek (radiasi utama pada kira-kira 254 nm) atau jika senyawa itu dapat dieksitasi ke fluoresensi radiasi UV gelombang pendek dan/atau gelombang panjang (365 nm) (43). Pada isolat DP 1, pengamatan menggunakan sinar UV 366 nm dihasilkan delapan bercak dengan bercak yang lebih dominan yaitu bercak berwarna kuning dengan Rf 0,71. Diduga metabolit sekunder yang terdapat dalam isolat DP 1 merupakan senyawa campuran. Pada isolat DF 1, pengamatan menggunakan sinar UV 366 nm dihasilkan satu bercak berwarna kuning dengan Rf 0,57 sedangkan pada UV 254 nm terlihat adanya bercak kehitaman dengan Rf yang sama. Perbedaan jumlah bercak ini dapat disebabkan oleh jumlah komponen kimia yang terkandung di dalam isolat DF 1 lebih sedikit dibandingkan isolat DP 1.

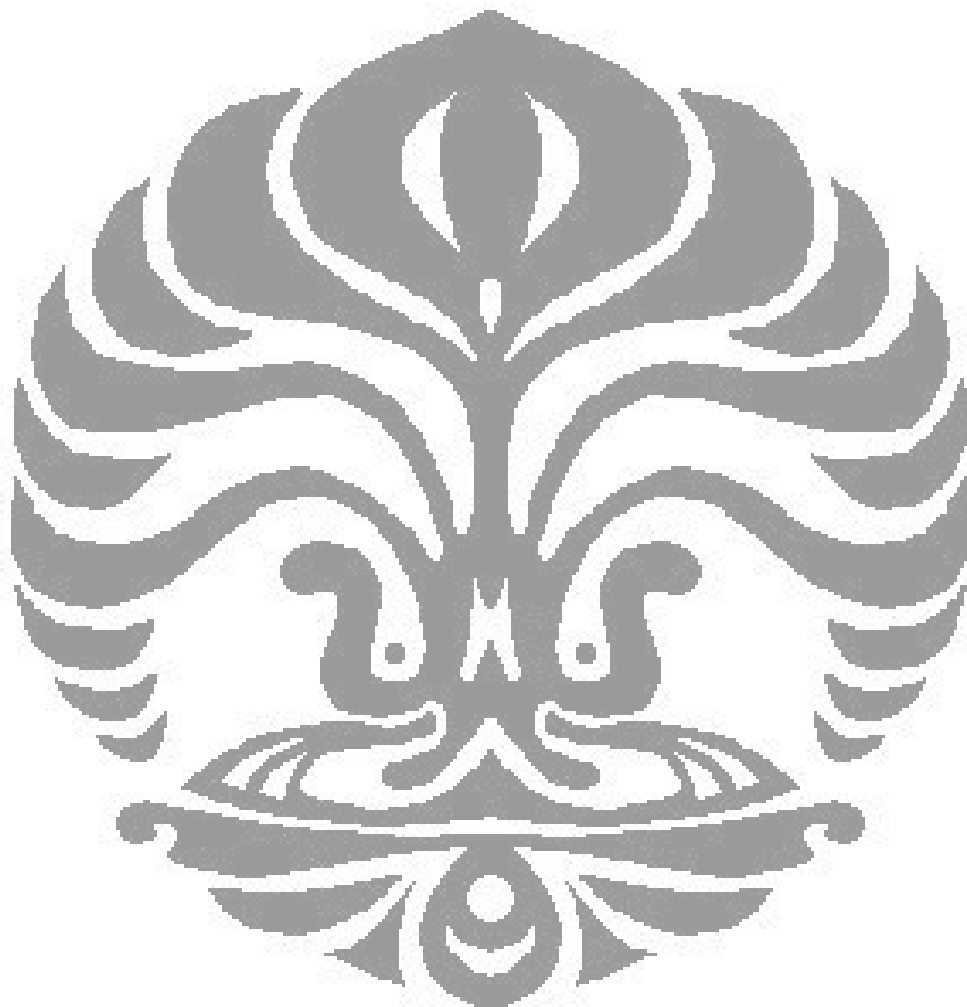
Pengamatan terhadap isolat DP 1 setelah disemprot penampak bercak asam sulfat 10% dalam etanol dan anisaldehida-asam sulfat dengan pemanasan, pada sinar tampak bercak tidak terlihat jelas mungkin dikarenakan senyawa yang terkandung masing-masing berada dalam kadar yang kecil sehingga setelah pemanasan selama beberapa menit, bercak sulit terlihat. Bila bercak tidak terlihat pada pengamatan sinar tampak dengan penampak bercak anisaldehida-asam sulfat, maka berdasarkan literatur

dapat dievaluasi pada UV 365 nm (44). Pengamatan terhadap isolat DF 1 setelah disemprot dengan penampak bercak asam sulfat 10% dalam etanol, pada sinar tampak bercak tidak terlihat jelas dan penampak bercak anisaldehyda-asam sulfat, pada sinar tampak timbul bercak berwarna kecoklatan.

Isolat DF 1 setelah disemprot dengan penampak bercak DPPH 0,2% dalam metanol memperlihatkan adanya bercak berwarna kuning pucat dengan latar belakang berwarna ungu yang menunjukkan bahwa isolat ini memberikan aktivitas peredaman radikal bebas, sedangkan pada isolat DP 1 tidak terlihat jelas. Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan spektrofotometri menunjukkan hasil yang berlawanan, yaitu isolat DP 1 memiliki nilai IC_{50} yang lebih kuat daripada isolat DF 1. Hal ini disebabkan senyawa yang terkandung dalam isolat DP 1 terdiri dari beberapa komponen kimia, terlihat dengan munculnya 8 bercak setelah elusi, yang masing-masing berada dalam kadar kecil atau tiap senyawa kimia tersebut aktivitas antioksidannya lemah. Sedangkan, pada isolat DF 1 terdiri dari senyawa tunggal yang mempunyai kadar cukup besar sehingga bercak terlihat cukup jelas tetapi aktivitas antioksidannya juga lemah sehingga nilai IC_{50} nya rendah.

Dari hasil KLT menunjukkan masih banyak senyawa yang terkandung dalam ekstrak etil asetat, terutama ekstrak yang berasal dari isolat DP 1 sehingga perlu difraksinasi lebih lanjut untuk mendapatkan senyawa murni,

kemudian diisolasi dan ditentukan struktur kimia maupun rumus bangun senyawa, serta aktivitas antioksidan yang sebenarnya.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Tiga ekstrak etil asetat dari tiga isolat kapang endofit memiliki aktivitas antioksidan, dan isolat DP 1 memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dengan nilai IC_{50} sebesar 123,97 $\mu\text{g/mL}$.
2. Pola kromatogram terbaik kandungan metabolit sekunder dari isolat DP 1 dapat diperoleh dengan menggunakan fase gerak terpilih n-heksana-aseton (3:2).
3. Pola kromatogram terbaik kandungan metabolit sekunder dari isolat DF 1 dapat diperoleh dengan menggunakan fase gerak terpilih aseton-etil asetat (3:2).

B. SARAN

1. Penelitian lebih lanjut untuk produksi dalam skala besar, purifikasi, dan identifikasi perlu dilakukan untuk mendapatkan informasi lebih lanjut

tentang antioksidan yang dihasilkan oleh kapang endofit yang memiliki aktivitas antioksidan.

2. Diperlukan optimalisasi media fermentasi, waktu fermentasi, dan kondisi pertumbuhan terhadap kapang endofit yang memiliki aktivitas antioksidan agar dapat dihasilkan metabolit sekunder dalam jumlah yang lebih banyak.
3. Perlu dilakukan identifikasi secara molekuler terhadap isolat kapang endofit yang memiliki aktivitas antioksidan sehingga dapat diketahui spesiesnya.



DAFTAR ACUAN

1. Kumala, S. *Isolasi dan penapisan mikroba endofit tanaman Brucea javanica (L.) Merr serta uji sitotoksik metabolit sekunder terhadap beberapa sel kanker secara in vitro*. Disertasi Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta, 2005 : 2, 43-47, 107-119.
2. Strobel, G., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R.S. and Hess, W.M. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiol.*, 1996; 142 : 435-440.
3. Song, Y. *Isolation and cultivation of endophytic fungi*. Proceeding of International Conference on Asian Network on Microbial Researches. Gadjah Mada University (GMU). Yogyakarta, 1998 : 255-258.
4. Colwell, R.R. Microbial diversity : the importance of exploration and conservation. *J. Industrial. Microbiol. Biotechnol.*, 1997; 18 : 302-307.
5. Kumala, S., Wibowo M., Peny B. Fermentasi diam dan goyang isolat kapang endofit dari *Brucea javanica* L. Merr dan uji aktivitas antimikroba. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 2005; 3 (2) : 60-63.
6. Boer, Y. Uji aktivitas antioksidan ekstrak kulit buah Kandis (*Garcinia parvifolia* Miq). *Jurnal Matematika dan IPA 1*, 2000; 1 : 26-33.
7. Mongkarndi, P., *et. al.* Antiproliferation, antioxidant, and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) dalam SKBR3 Human Breast Cancer Cell Line. *J. Et. Pharm.* 90, 2004 : 161-166.
8. Minami, H., Kinoshita, M., Fukuyama, Y., Kodama, M., Yashizawa, T., Sugiura, M., Nakagawa, K. And Tago, H. Antioxidant xanthenes from *Garcinia subelliptica*. *Phytochemistry*, 1994; 36 : 501.
9. Taqwim, S.F. *Uji toksisitas dan uji antibakteri metabolit sekunder kapang endofit Garcinia forbesii King dan Garcinia porrecta Wall*. Skripsi Sarjana Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Depok, 2007 : 25-40.

10. Petrini, O., Sieber T.N., Toti L. and Viret, O. Ecology metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*, 1992; 1 : 185-196.
11. Elizabeth, M.L. *Fundamentals of the fungi*. Fourth Edition. Prentice Hall Inc., New Jersey, 1990 : 501-504.
12. Rukmana, R. *Seri penangkaran : bibit manggis*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta, 2003 : 17.
13. Harrison, L.J., Leong L.S., Sia G.L., Sim K.Y. and Tant H.T.W. Xanthenes from *Garcinia forbesii*. *Phytochemistry*, 1993; 33 (3) : 727-728.
14. Kardono, L. B. S., Hanafi M., Sherley G., Kosela S. and Harrison L. J. Bioactive constituents of *Garcinia porrecta* and *Garcinia parvifolia* grown in Indonesia. *Pak. J. Biol. Sci.*, 2006; 9 (3) : 483-486.
15. Judoamidjojo, M., Darwis A.A., Said E.G. *Teknologi fermentasi*. PAU. Bogor. Bioteknologi IPB, 1992 : 45-55, 79-147.
16. Rahman, A. *Teknologi fermentasi*. Arcan. Jakarta, 1992 : 149-150, 162.
17. Harborne, B.J. *Metode fitokimia, penuntun cara modern menganalisis tumbuhan*. Terj. dari *Phytochemical methods*, oleh Kosasih Padmawinata, Iwang Sudiro. Penerbit ITB. Bandung, 1996 : 1-40.
18. Hafid, A. F. Aktivitas anti-radikal bebas DPPH fraksi metanol *Fagraea auriculata* dan *Fagraea ceilanica*. *Majalah Farmasi Airlangga*. 2003; 3 (1) : 34-36.
19. Tapan, E. *Kanker, antioksidan, dan terapi komplementer*. PT. Elex Media Komputindo. Jakarta, 2005 : 103-104.
20. Hertiani, T. *Isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid antioksidan dari daun Plantago major L.* Tesis Program Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta, 2000; 2 : 16-18.
21. Wiyani, L. *Kandungan flavonoid dan aktivitas antioksidan berbagai bagian buah cabe (Capsicum annum)*. Tesis Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta, 1999 : 12-16.

22. Rohman, A. dan Sugeng R. Daya antioksidan ekstrak etanol daun Kemuning (*Murraya paniculata* (L) Jack) secara in vitro. *Majalah Farmasi Indonesia*, 2005; **16** (3) : 136-140.
23. Fidiyasi, E.R. *Isolasi, identifikasi gugus fungsi dan inti senyawa kimia, serta uji antioksidan ekstrak kulit batang Sesoot (Garcinia picrorrhiza Miq.)*. Skripsi Sarjana Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Depok, 2003 : 23.
24. Rahmawaty, D. *Penapisan dan pemurnian fraksi bioaktif yang dihasilkan dari isolat bakteri dan kapang endofitik berdasarkan aktivitas antioksidan*. Skripsi Sarjana Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Pancasila. Jakarta, 2006 : 15-17.
25. Yulia, P.R. *Isolasi dan seleksi kapang endofit penghasil anti mikroba pada beberapa tanaman obat tradisional Indonesia*. Skripsi Sarjana Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia. Depok, 2005 : 23.
26. Nugroho, B.N. dan Bambang S. *Isolasi dan seleksi mikroba endofit tanaman hutan Sumatera Barat sebagai mikroorganisme penghasil senyawa anti-jamur*. Diajukan pada Pertemuan Ilmiah Tahunan Mikrobiologi Indonesia. Padang, 1999 : 2.
27. Aqil, F., Ahmad I. and Mehmood Z. Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used Indian medicinal plants. *Turk. J. Biol.*, 2006; 30 : 177-183.
28. Lacikova, L., Muselik J., Masterova I. and Grancai D. Antioxidant activity and total phenols in different extracts of four *Staphylea* L. species. *Molecules*, 2007; 12 : 98-102.
29. Rohman, A., Sugeng R. dan Diah U. Aktivitas antioksidan, kandungan fenolik total, dan kandungan flavonoid total ekstrak etil asetat buah mengkudu serta fraksi-fraksinya. *Majalah Farmasi Indonesia*, 2006; **17** (3) : 138-139.
30. Praptiwi, Dewi P. dan Harapini M. Nilai peroksida dan aktivitas anti radikal bebas Diphenyl Picrilhydrazyl (DPPH) ekstrak metanol *Knema Laurina*. *Majalah Farmasi Indonesia*, 2006; **17** (1) : 32-36.
31. Wahyudi, P. *Teknik skrining mikroba endofit penghasil antibiotik*. Sub Direktorat Bioteknologi. Direktorat Pengkajian Ilmu Kehidupan

Deputi Bidang Pengkajian Ilmu Dasar dan Terapan Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi. Jakarta, 1997 : 1-9.

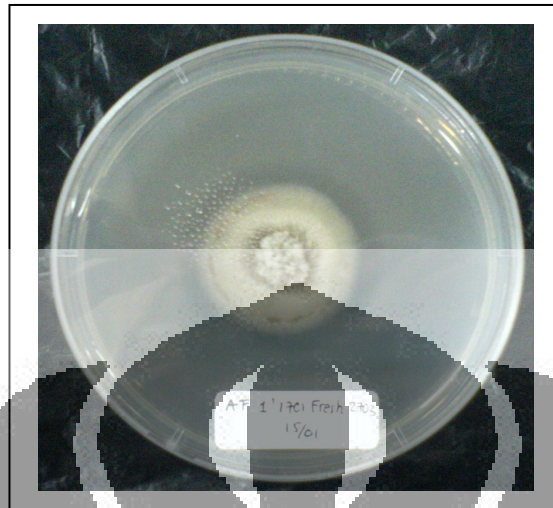
32. Adriantim, A.T.H. *Pertumbuhan Cladosporium resinae pada medium PDA dan MEA dengan sembilan variasi pH*. Skripsi Sarjana Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Depok, 1987 : 10-13.
33. Kesumawardani, I. W. *Skrining kapang endofit penghasil antimikroba dari ranting Garcinia cowa Roxb. terhadap Escherichia coli, Salmonella typhosa, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Candida albicans, dan Aspergillus niger*. Skripsi Sarjana Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Depok, 2007 : 38-39.
34. Marwoto, B. *Uji proses produksi dan pengembangan teknologi fermentasi beberapa jenis antibiotika*. Prosiding Seminar Sehari Perkembangan Mutakhir Pengkajian Metabolit Sekunder Untuk Farmasi dan Pertanian. Direktorat Pengkajian Ilmu Kehidupan Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi. Jakarta, 1995 : 93.
35. Prihaningtias, W., Widyastuti S.M. dan Subagus W. *Senyawa antibakteri dari Thievalia polygonoperda, fungi endofit tumbuhan akar kuning (Fibraurea chloroleuca Miers.)*. PHARMACON, 2005; 6 (1) : 19-22.
36. Inesia, I. *Uji aktivitas antioksidan metabolit sekunder kapang endofit yang diisolasi dari akar, daun Garcinia nigrolineata Planch. dan batang Garcinia celebica L.* Skripsi Sarjana Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia. Depok, 2007 : 21-23; 32-33.
37. Abraham, S. *Aktivitas antibakteri empat isolat kapang Penicillium spp. yang diperoleh dari spons*. Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia, 2003; 5 (2) : 95-98.
38. Sukamat dan Ersam T. *Dua senyawa santon dari kayu batang mundu Garcinia dulcis (Roxb.) Kurz. sebagai antioksidan*. Diajukan pada Seminar Nasional Kimia VIII. Surabaya, 2006 : 1-5.
39. Chanmahasathien, W., Yushan L., Masayuki S., Yasukatsu O., Nijsiri R., Yasushi O. *Prenylated xanthenes with NGF-potentiating*

activity from *Garcinia xanthochymus*. *Phytochemistry*, 2003; 64 : 981-986.

40. Hanani, E., Abdul M., Ryany S. Identifikasi senyawa antioksidan dalam spons *Callyspongia sp.* dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 2005; 2 (3) : 127-133.
41. Jasprica, I., Mirza B., Ana M., Erim B., Kajo B. and Marica MS. Evaluation of antioxidative activity of *Croatian propolis* samples using DPPH[•] And ABTS^{•+} stable free radical assays. *Molecules*. 2007; 12 : 1011.
42. Simanjuntak, P., Titi P. dan Titik K.P. Studi mikroba endofit *Cinchona spp.* (4) : produksi senyawa kuinin oleh khamir endofit dengan berbagai konsentrasi maltosa. *Jurnal Biosains dan Bioteknologi Indonesia*. 2002; 2 (1) : 24.
43. Stahl, E. *Analisis obat secara kromatografi dan mikroskopi*. Terj. dari Drug analysis by chromatography and microscopy : a practical supplement to pharmacopoeias, oleh Kosasih Padmawinata, Iwang Sudiro. Penerbit ITB, Bandung, 1985 : 13.
44. Wagner, H., S. Bladt and E.M. Zgainski. *Plant drug analysis*. Translated by Th. A. Scott. Springer-Verlag, Berlin, 1984 : 299.



Gambar 2. Contoh peremajaan isolat kapang endofit di media PDA *slant*



Gambar 3. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit akar *Garcinia forbesii* ke-1 (AF 1)

Keterangan :

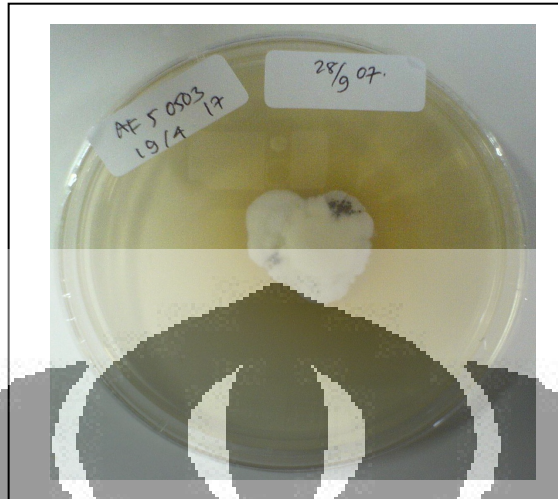
AF 1 = isolat kapang endofit akar *Garcinia forbesii* ke-1
1701, Fresh 2703, 15/01 = tanggal peremajaan kembali isolat kapang endofit AF 1



Gambar 4. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit akar *Garcinia forbesii* ke-3 (AF 3)

Keterangan :

26/04, 28/09/07 = tanggal peremajaan kembali isolat kapang endofit AF 3



Gambar 5. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit akar *Garcinia forbesii* ke-5 (AF 5)

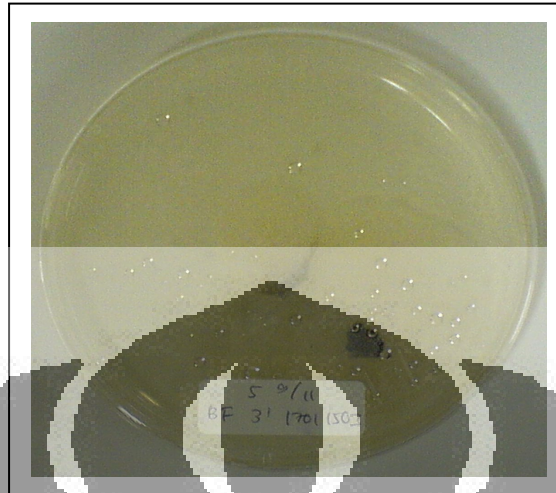
Keterangan :

AF 5 = isolat kapang endofit akar *Garcinia forbesii* ke-5

19/4, 17, 28/9/07 = tanggal peremajaan kembali isolat kapang endofit AF 5



Gambar 6. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit batang *Garcinia forbesii* ke-1 (BF 1)



Gambar 7. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit batang *Garcinia forbesii* ke-3 (BF 3)

Keterangan :

BF 3 = isolat kapang endofit batang *Garcinia forbesii* ke-3

5, 9/11, 1701, 1503 = tanggal peremajaan kembali isolat kapang endofit
BF 3



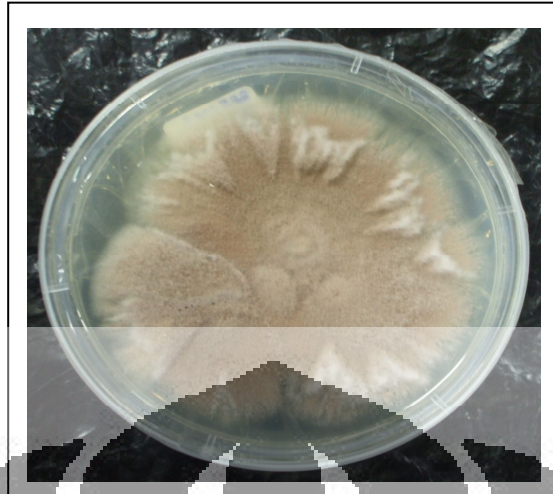
Gambar 8. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit batang *Garcinia forbesii* ke-3 isolasi sebanyak x kali (BF 3 lx)

Keterangan :

BF 3 = isolat kapang endofit batang *Garcinia forbesii* ke-3

lx? = isolasi sebanyak x kali

4, 23/10, 1701, 1603 = tanggal peremajaan kembali isolat kapang endofit
BF 3 lx



Gambar 9. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit batang *Garcinia forbesii* ke-5 (BF 5)

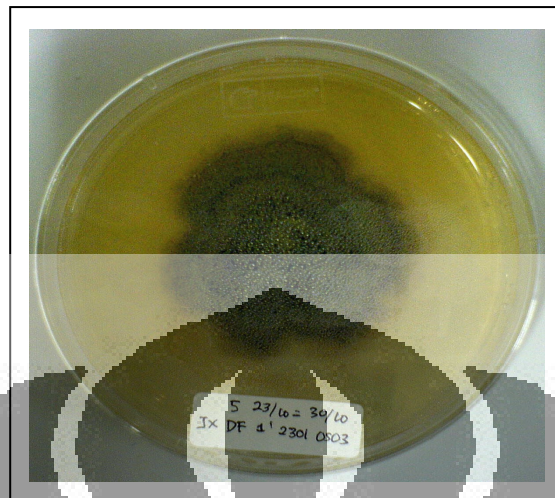


Gambar 10. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit batang *Garcinia forbesii* ke-12 (BF 12)

Keterangan :

BF 12 = isolat kapang endofit batang *Garcinia forbesii* ke-12

13/04, 22, 28/9/07 = tanggal peremajaan kembali isolat kapang endofit
BF 12



Gambar 11. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit daun *Garcinia forbesii* ke-1 (DF 1)

Keterangan :

Ix = isolasi sebanyak x kali

DF 1 = isolat kapang endofit daun *Garcinia forbesii* ke-1

5, 23/10 = 30/10; 2301, 0503 = tanggal peremajaan kembali isolat kapang endofit DF 1



Gambar 12. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit daun *Garcinia porrecta* ke-1 (DP 1)

Keterangan :

DP 1 = isolat kapang endofit daun *Garcinia porrecta* ke-1

2301 (2), 28/9/07 = tanggal peremajaan kembali isolat kapang endofit DP 1



Gambar 13. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit batang *Garcinia porrecta* ke-1 isolasi pertama kali (BP 1A)

Keterangan :

BP 1 = isolat kapang endofit batang *Garcinia porrecta* ke-1

A = isolasi pertama kali

8, 29/10, 17/01, 09/02 = tanggal peremajaan kembali isolat kapang endofit BP 1A



Gambar 14. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit batang *Garcinia porrecta* ke-1 isolasi ketiga kali (BP 1C)

Keterangan :

BP 1 = isolat kapang endofit batang *Garcinia porrecta* ke-1

C = isolasi ketiga kali

17/01, 09/02, 15/01 = tanggal peremajaan kembali isolat kapang endofit BP 1C



Gambar 15. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit batang *Garcinia porrecta* ke-1 isolasi sebanyak x kali (BP 1x)

Keterangan :

BP (1) = isolat kapang endofit batang *Garcinia porrecta* ke-1

BP x? bsr = isolasi kapang endofit batang *Garcinia porrecta* yang besar sebanyak x kali

3, 23/10, 26/04 = tanggal peremajaan kembali isolat kapang endofit - BP 1x

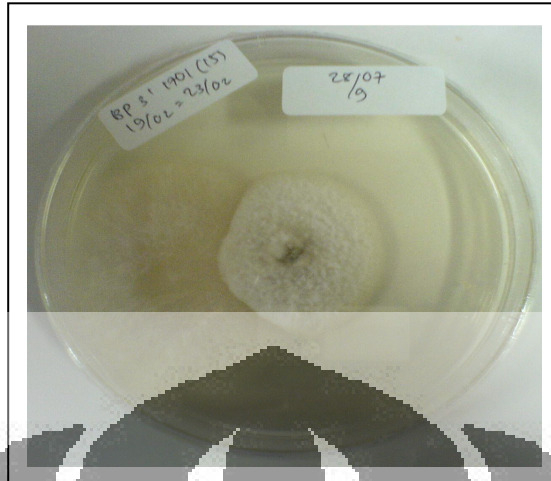


Gambar 16. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit batang *Garcinia porrecta* ke-2 (I2 BP)

Keterangan :

I2 BP = isolat kapang endofit batang *Garcinia porrecta* ke-2

0202, 1503, 28/9/07 = tanggal peremajaan kembali isolat kapang endofit I2 BP



Gambar 17. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit batang *Garcinia porrecta* ke-3 (BP 3)

Keterangan :

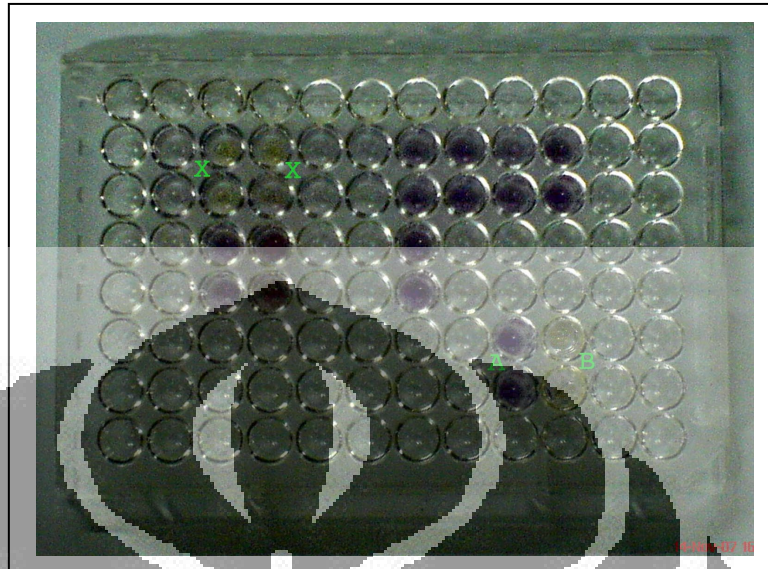
BP 3 = isolat kapang endofit batang *Garcinia porrecta* ke-3
 17/01 (15), 19/02 = 23/02, 28/9/07 = tanggal peremajaan kembali isolat kapang endofit BP 3



Gambar 18. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit batang *Garcinia porrecta* ke-x (BP X)

Keterangan :

BP X? = isolat kapang endofit batang *Garcinia porrecta* ke-x
 bsr = batang yang besar dari *Garcinia porrecta* ke-x
 6, 9/11, 26/04 = tanggal peremajaan kembali isolat kapang endofit BP X

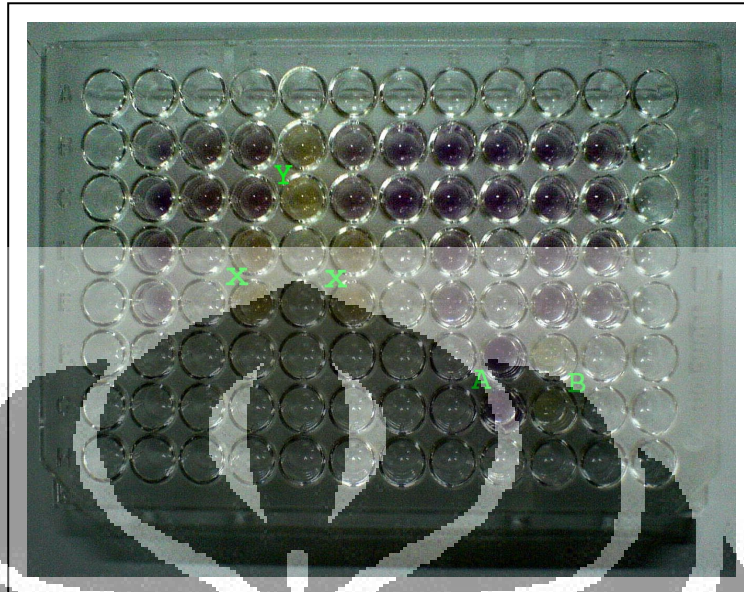


Gambar 19. Uji pendahuluan aktivitas antioksidan I ekstrak etil asetat menggunakan *96 wells plate*

Keterangan :

Hasil positif ditunjukkan oleh

- X = isolat DP 1
- A = DPPH 0,4 mM dalam metanol
- B = Vitamin C 1000 ppm



Gambar 20. Uji pendahuluan aktivitas antioksidan II ekstrak etil asetat menggunakan *96 wells plate*

Keterangan :

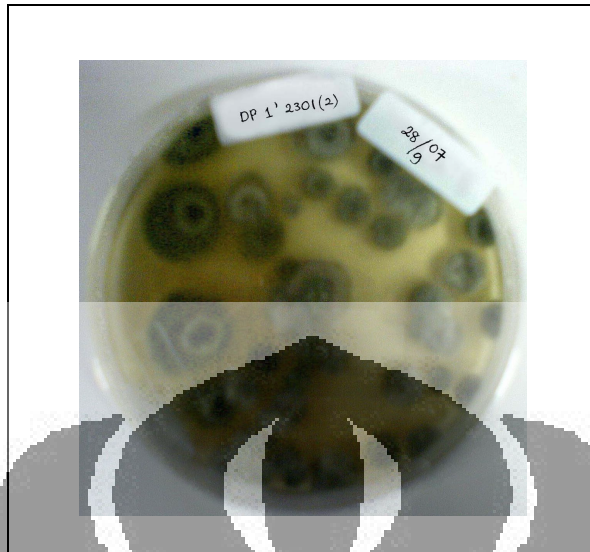
Hasil positif ditunjukkan oleh

X = isolat DF 1

Y = isolat AF 1

A = DPPH 0,4 mM dalam metanol

B = Vitamin C 1000 ppm



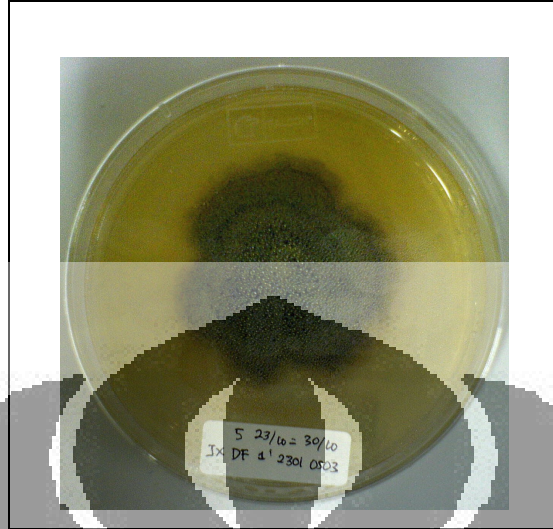
Gambar 21. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit DP 1 yang memiliki aktivitas antioksidan

Keterangan :

DP 1 = isolat kapang endofit daun *Garcinia porrecta* ke-1
2301 (2), 28/9/07 = tanggal peremajaan kembali isolat kapang endofit DP 1



Gambar 22. Hasil pengamatan mikroskopik isolat kapang endofit DP 1



Gambar 23. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit DF 1 yang memiliki aktivitas antioksidan

Keterangan :

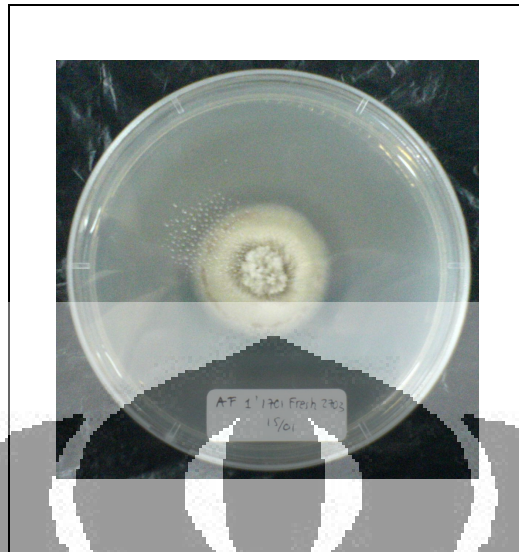
Ix = isolasi sebanyak x kali

DF 1 = isolat kapang endofit daun *Garcinia forbesii* ke-1

5, 23/10 = 30/10, 2301, 0503 = tanggal peremajaan kembali isolat kapang endofit DF 1



Gambar 24. Hasil pengamatan mikroskopik isolat kapang endofit DF1



Gambar 25. Pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit AF 1 yang memiliki aktivitas antioksidan

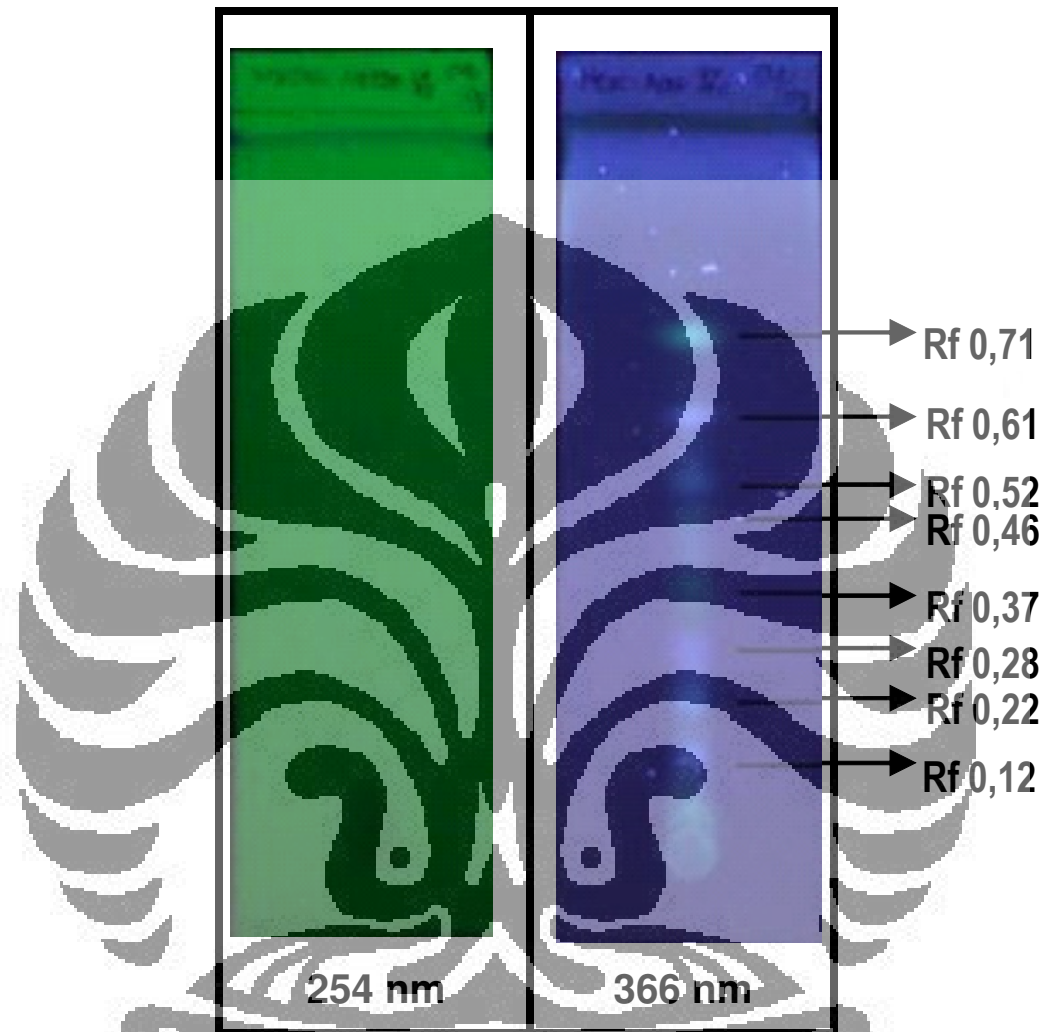
Keterangan :

AF 1 = isolat kapang endofit akar *Garcinia forbesii* ke-1

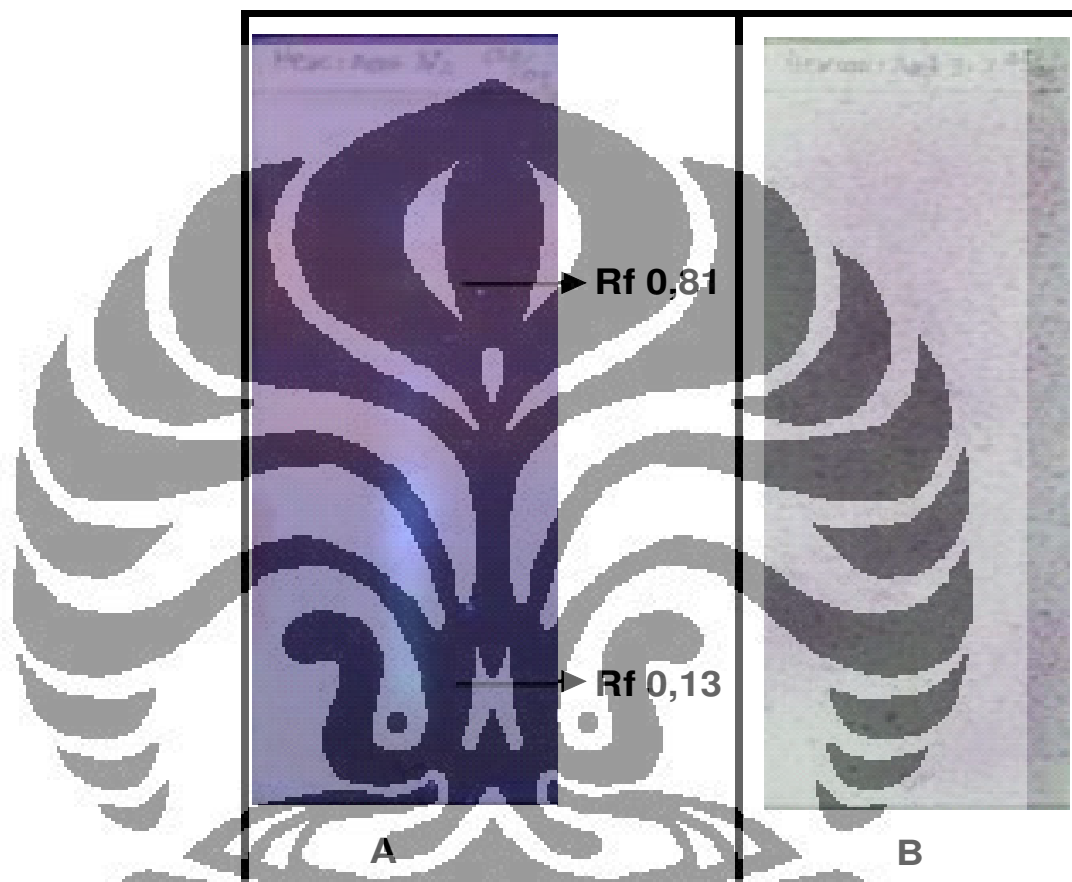
1701, Fresh 2703, 15/01 = tanggal peremajaan kembali isolat kapang endofit AF 1



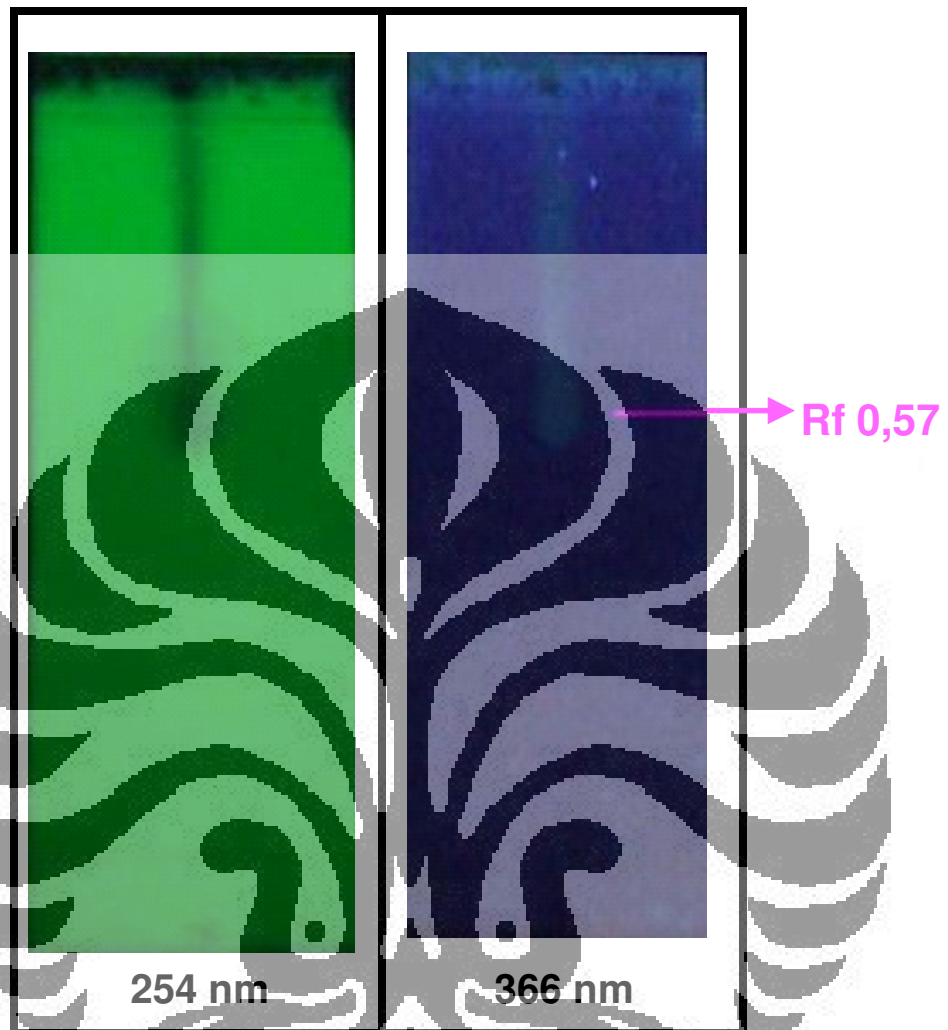
Gambar 26. Hasil pengamatan mikroskopik isolat kapang endofit AF1



Gambar 27. Kromatografi lapis tipis isolat DP 1 dengan fase gerak n-heksana-aseton (3 : 2) pada UV 254 nm dan 366 nm



Gambar 28. Hasil kromatografi lapis tipis isolat DP 1 dengan fase gerak n-heksana-aseton (3 : 2) setelah disemprot dengan penampak bercak : A. anisaldehyda-asam sulfat pada UV 366 nm; B. DPPH 0,2% dalam metanol



Gambar 29. Kromatografi lapis tipis isolat DF 1 dengan fase gerak aseton-etil asetat (3 : 2) pada UV 254 nm dan 366 nm



Gambar 30. Hasil kromatografi lapis tipis isolat DF-1 dengan fase gerak aseton-etil asetat (3 : 2) setelah disemprot dengan penampak bercak : A. anisaldehyde-asam sulfat pada sinar tampak; B. DPPH 0,2% dalam metanol

Tabel 1

Peremajaan isolat kapang endofit dari tanaman *Garcinia forbesii* King dan *Garcinia porrecta* Wall

Tanaman	Bagian	Jumlah isolat
<i>Garcinia forbesii</i> King	Akar	3
	Batang	5
	Daun	1
<i>Garcinia porrecta</i> Wall	Batang	6
	Daun	1

Tabel 2

Hasil uji isolat kapang endofit yang memiliki aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)

Larutan uji	Konsentrasi (ppm)	Serapan	Serapan blanko	Aktivitas peredaman (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
Vit. C	2	0,594	0,820	27,56	4,8
	4	0,559		31,83	
	6	0,350		57,32	
	8	0,067		91,83	
DP 1	25	0,931	1,029	9,52	123,97
	50	0,845		17,88	
	75	0,743		27,79	
	100	0,604		41,30	
DF 1	25	0,600	0,692	13,29	164,18
	50	0,563		18,64	
	75	0,491		29,05	
	100	0,472		31,79	
AF 1	25	0,644	0,716	10,06	195,56
	50	0,590		17,60	
	75	0,561		21,65	
	100	0,516		27,93	

Keterangan :

DP : kapang endofit dari daun *Garcinia porrecta* Wall

DF : kapang endofit dari daun *Garcinia forbesii* King

AF : kapang endofit dari akar *Garcinia forbesii* King

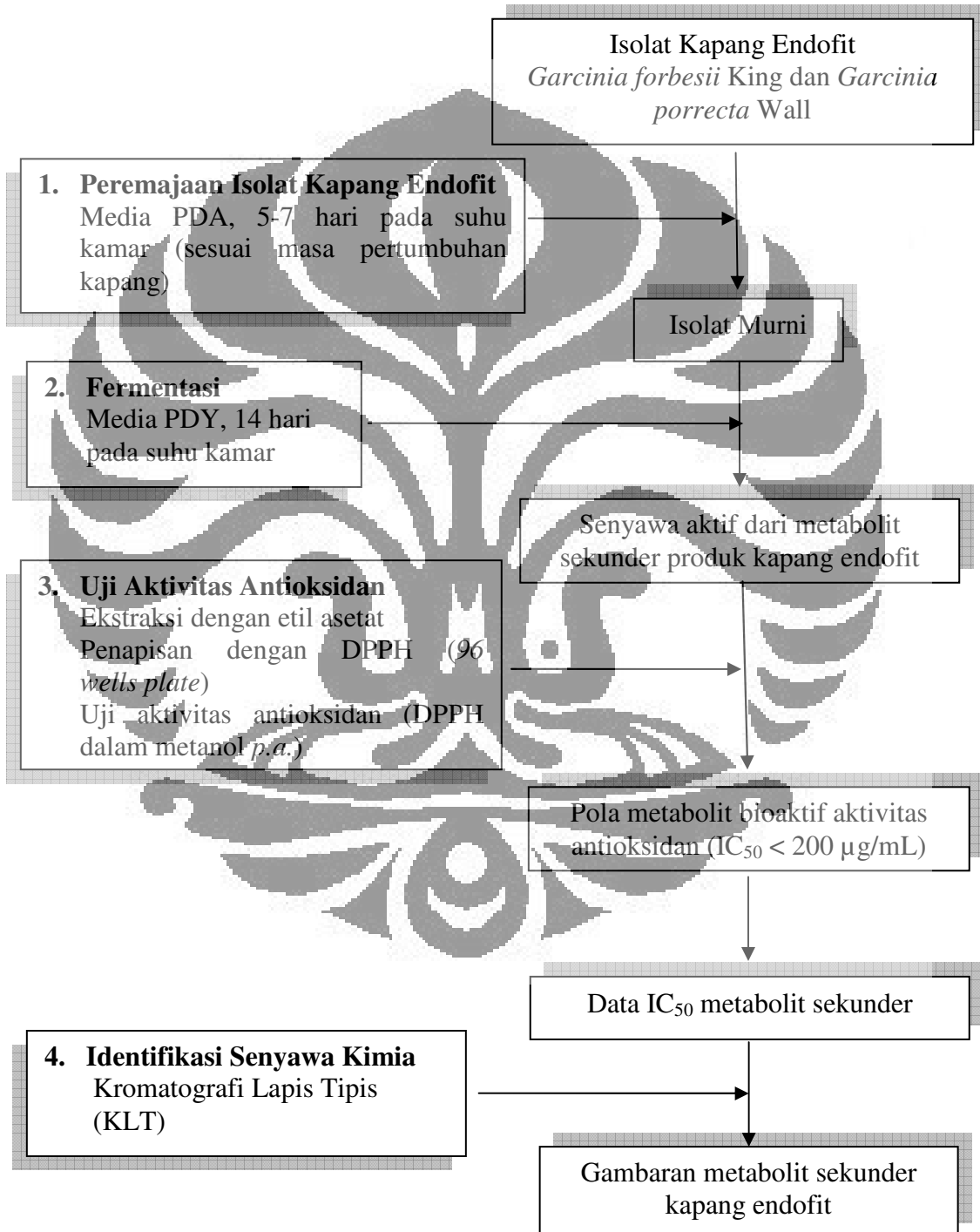
Tabel 3

Keterangan KLT isolat kapang endofit yang memiliki aktivitas antioksidan

Kode Isolat	Fase diam	Fase gerak	Volume penotolan	Deteksi
DP 1	Silika gel GF ₂₅₄	n-heksana-aseton (3:2)	10 µL	A. Sinar UV 254 nm B. Sinar UV 366 nm C. Sinar tampak D. Asam sulfat 10% dalam etanol E. Anisaldehyda-asam sulfat F. DPPH 0,2% dalam metanol
DF 1	Silika gel GF ₂₅₄	Aseton-etilasetat (3:2)	5 µL	A. Sinar UV 254 nm B. Sinar UV 366 nm C. Sinar tampak D. Asam sulfat 10% dalam etanol E. Anisaldehyda-asam sulfat F. DPPH 0,2% dalam metanol

Lampiran 1

Kerangka operasional penelitian



Lampiran 2

Cara perhitungan aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH secara spektrofotometri

Aktivitas antioksidan dari sampel dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Persentase (\%) aktivitas antioksidan} = \frac{(\text{Serapan blanko} - \text{Serapan sampel})}{\text{Serapan blanko}} \times 100\%$$

Persentase aktivitas antioksidan diplot terhadap konsentrasi sampel ($\mu\text{g/mL}$) untuk memperoleh IC_{50} . Nilai IC_{50} (x) diperoleh dari persamaan regresi linier dengan mengganti faktor y dengan nilai 50. Persamaan regresi linier yang dimaksud :

$$y = a + bx$$

Lampiran 3

Kode isolat kapang endofit yang telah diremajakan dari tanaman *Garcinia forbesii* King dan *Garcinia porrecta* Wall

No.	Kode isolat kapang endofit koleksi Laboratorium Mikrobiologi, FMIPA-UI
1.	AF 1' 1701 Fresh 2703
2.	AF 3' 1701 19/02 (26/04 13)
3.	AF 5 0503 19/4
4.	BF 1(16) 5' 1601 12/02 = 26/02
5.	BF 3' 1701 1503
6.	BF 3' 1701 lx?1603
7.	BF 5'1202 1603
8.	BF 12 13/04 22
9.	lx DF 1' 2301 0503
10.	DP 1' 2301 (2)
11.	BP 1' 17/01 09/02 A
12.	BP 1' 17/01 09/02 C
13.	BP (1) → BP x? bsr 26/04
14.	I2 BP 0202 1503
15.	BP_3' 1701 19/02 = 23/02 (15)
16.	BP x? bsr 26/04
