



UNIVERSITAS INDONESIA

**SKRINING DAN UJI AKTIVITAS PENGHAMBATAN
 α -GLUKOSIDASE DARI KAPANG ENDOFIT DAUN JOHAR
(*Cassia siamea* Lamk.)**

SKRIPSI

M. GAMA RAMADHAN

0706163382

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI

DEPOK

JULI 2011



UNIVERSITAS INDONESIA

**SKRINING DAN UJI AKTIVITAS PENGHAMBATAN
 α -GLUKOSIDASE DARI KAPANG ENDOFIT DAUN JOHAR
(*Cassia siamea* Lamk.)**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

M. GAMA RAMADHAN

0706163382

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI

DEPOK

JULI 2011

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar

Nama : M. Gama Ramadhan

NPM : 0706163382

Tanda Tangan :

Tanggal : 7 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

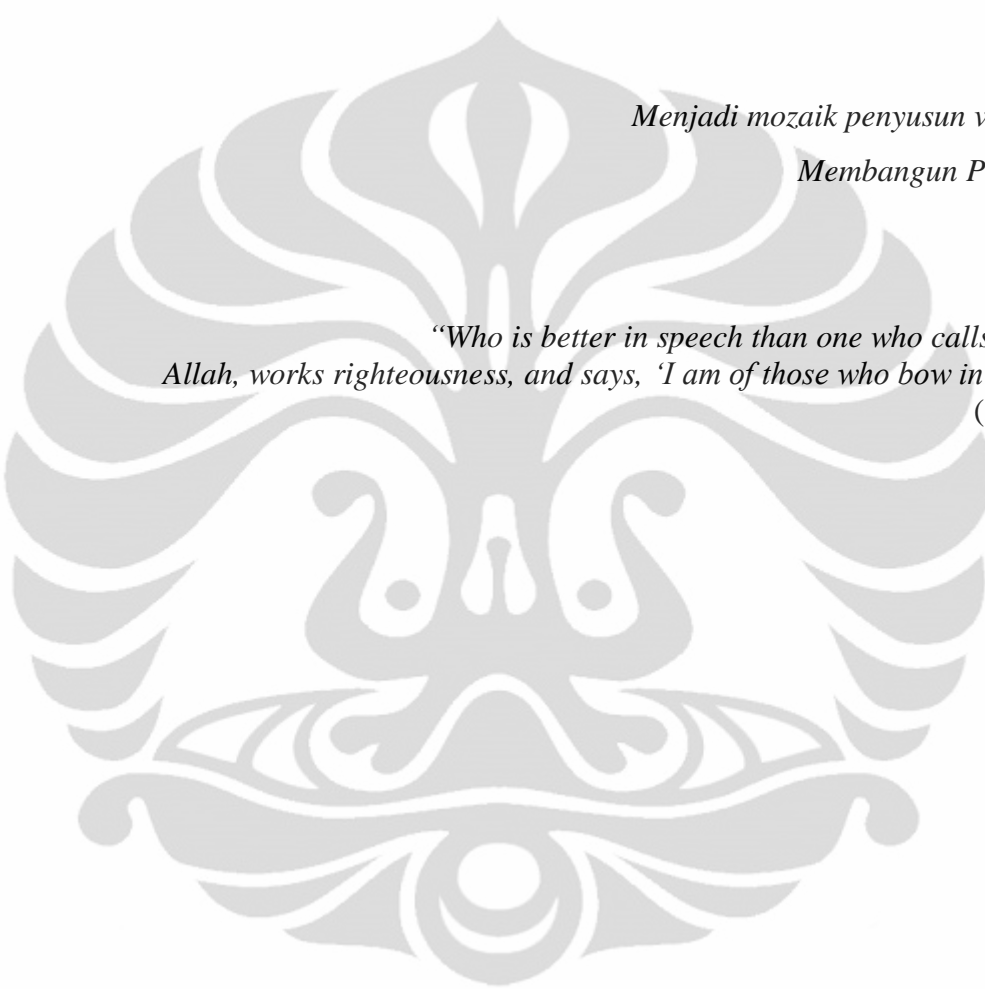
Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : M. Gama Ramadhan
NPM : 076163382
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Skirining dan Uji Aktivitas Penghambatan
 α -Glukosidase dari Kapang Endofit Daun Johar
(*Cassia siamea* Lamk.)

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pemimbing I	: Prof. Dr. Atiek Soemiati, MS.	(.....)
Pembimbing II	: Dr. Abdul Mun'im, M.Si., Apt.	(.....)
Penguji I	: Dra. Maryati Kurniadi., M.Si., Apt.	(.....)
Penguji II	: Dra. Retnosari A., MS., Ph.D., Apt.	(.....)
Penguji III	: Dr. Katrin, MS., Apt.	(.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 7 Juli 2011



*Menjadi mozaik penyusun visi besar:
Membangun Peradaban*

*“Who is better in speech than one who calls (men) to
Allah, works righteousness, and says, ‘I am of those who bow in Islam’?”
(Qs.41[3])*

KATA PENGANTAR

“...and curiosity leading us to the new path.”

(Walt Disney)

Segala puji syukur penulis panjatkan kepada *Robb* semesta alam, Allah swt., karena berkat sifat *Rahman* dan *Rahim-Nya*, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Penulis menyadari tidak akan mampu menyelesaikan penyusunan skripsi ini tanpa bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Prof. Dr. Atiek Soemiati, M.S. dan Dr. Abdul Mun'im, M.Si. selaku pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi ini, serta membantu berjalannya penelitian ini.
- (2) Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc. selaku pembimbing akademik yang sudah banyak memberikan arahan kepada penulis sejak awal belajar di Farmasi UI
- (3) Orang tua dan saudara-saudara penulis yang sudah memberikan bantuan dukungan material dan moral; dan
- (4) Teman-teman penelitian fitokimia, terutama Siti, Ary, Fitri atas diskusi-diskusi dan bantuannya selama penelitian.
- (5) Sahabat seperjuangan Farmasi UI angkatan 2007.

Akhir kata, penulis berharap Allah swt, berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu dengan hal yang lebih baik lagi. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi ilmu pengetahuan.

Penulis

2011

**LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR
UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : M. Gama Ramadhan

NPM : 0706163382

Program Studi : Farmasi

Departemen : Farmasi

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**Skrining dan Uji Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase dari Kapang
Endofit Daun Johar (*Cassia siamea* Lamk.)**

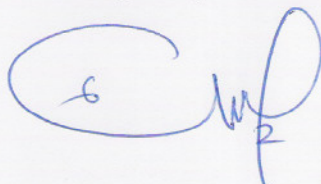
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya,

Dibuat di: Depok

Pada tanggal: 7 Jul 2011

Yang menyatakan



(M. Gama Ramadhan)

ABSTRAK

Nama : M. Gama Ramadhan
Program Studi : Farmasi
Judul : Skrining dan Uji Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase dari Kapang Endofit Daun Johar (*Cassia siamea* Lamk.)

Diabetes melitus merupakan salah satu masalah kesehatan utama di Indonesia, oleh karena itu obat-obat bagi penderita diabetes terus dikembangkan. Salah satunya adalah obat-obat penghambat α -glukosidase yang dinilai memiliki efek samping yang lebih kecil dibanding obat anti diabetes oral dari golongan lain. Hal ini menyebabkan pencarian senyawa penghambat α -glukosidase dari bahan alam sering dilakukan, terutama senyawa yang berasal dari mikroorganisme. Kapang endofit merupakan salah satu mikroorganisme yang merupakan sumber senyawa metabolit aktif. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi kapang endofit dari daun Johar (*Cassia siamea* Lamk.) dan memperoleh hasil uji aktivitas penghambatan α -glukosidase dari hasil fermentasi kapang endofit sebagai daun *C. siamea* Lamk. Pada penelitian ini dilakukan isolasi kapang endofit dari daun *C. siamea* Lamk. yang telah terbukti melalui penelitian secara *in vivo* dapat mengontrol kadar gula darah tikus diabetes. Lima koloni kapang endofit berhasil diisolasi dari daun Johar, dan selanjutnya setiap isolat difermentasi. Hasil fermentasi diekstraksi dengan pelarut etil asetat dan metanol. Pada penelitian ini diperoleh sembilan ekstrak yang memiliki aktivitas penghambatan α -glukosidase lebih baik dari akarbose dengan nilai IC_{50} terkecil sebesar 28,40 ppm.

Kata Kunci : aktivitas penghambatan α -glukosidase, anti diabetes, *Cassia siamea* Lamk., kapang endofit,
XIV+63 halaman : 5 tabel; 22 gambar
Daftar Pustaka : 50 (1985-2011)

ABSTRACT

Name : M. Gama Ramadhan
Program Study : Pharmacy
Title : Screening and α -Glucosidase Inhibitory Assay of
Endophytic Fungi from Johar Leaves (*Cassia siamea*
Lamk.)

Diabetes mellitus is one of the major health problems in Indonesia. Thus, medications for this disease keep going to develop, which one of them is α -glucosidase inhibitor known for their fewer side effects than other antidiabetic oral drugs. Moreover, searching of α -glucosidase inhibitor from natural compound was recently done by many scientists to find the new active compounds. Endophytic fungi have great potential as a source of α -glucosidase inhibitory compounds. This research aims to isolate the endophytic fungi from Johar leaves and to obtain the results of α -glucosidase inhibition assay from fermentation culture of endophytic fungi from *Cassia siamea* Lamk. On this research, we isolated the endophytic fungi from leaves of *Cassia siamea* Lamk., proven through *in vivo* studies, are able to control the blood glucose level of diabetic rats. We successfully isolated five endophytic fungi colonies, and then each isolate was fermented and extracted with ethyl acetate and methanol solvent. Nine extracts showed better α -glucosidase inhibitory activity than acarbose with the smallest IC_{50} value was 28.40 ppm.

Key Words: α -glucosidase inhibitory activity, anti diabetic, *Cassia siamea* Lamk., endophytic fungi,.

XIV+63 pages; 5 tables; 22 pictures

Bibliography: 50 (1985-2011)

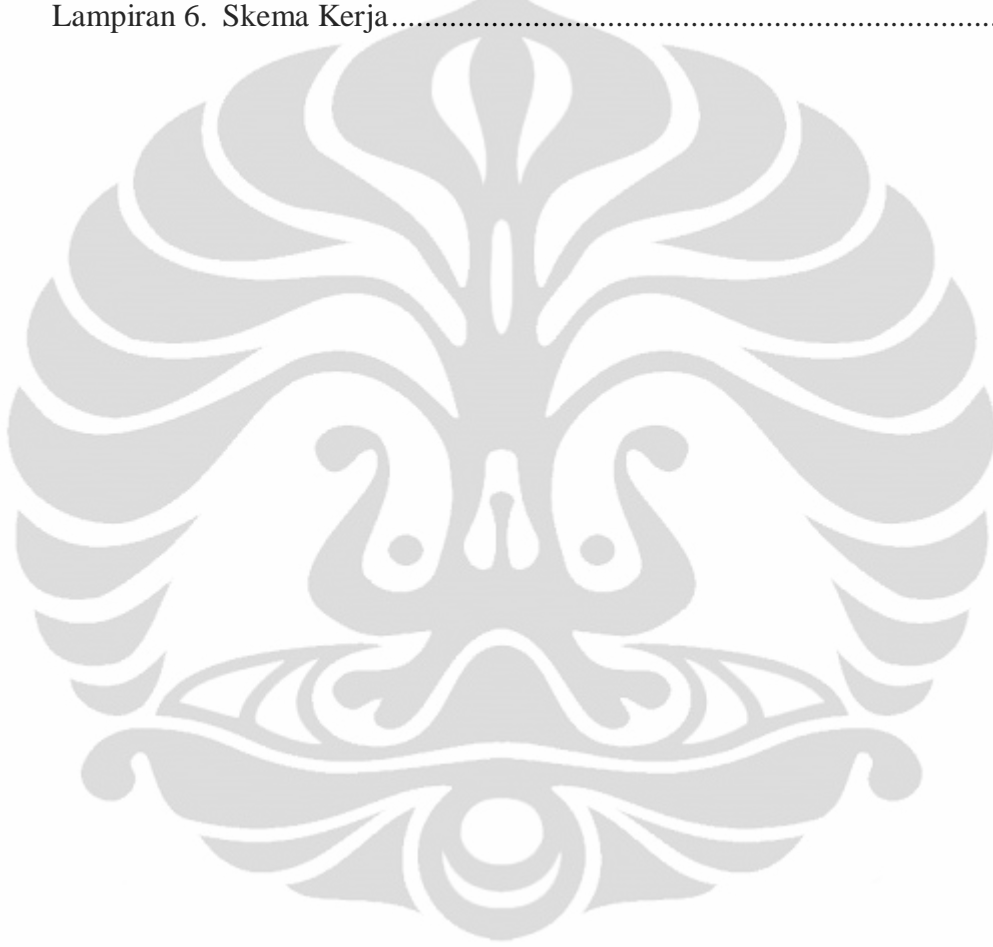
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR	vi
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan.....	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Gambaran Umum Kapang Endofit	4
2.2 Isolasi dan Kultur Kapang Endofit	5
2.3 Pohon Johar	6
2.4 Terapi Diabetes Melitus Tipe 2	7
2.5 Penghambat Enzim α -Glukosidase.....	9
2.6 Uji Penghambatan α -Glukosidase	11
2.7 Kinetika Enzim.....	12
2.8 Kromatografi Lapis Tipis.....	13
2.9 Spektrofotometri UV-Vis.....	14
3. METODE PENELITIAN	16
3.1 Lokasi Penelitian	16
3.2 Bahan	16
3.2.1 Sampel.....	16
3.2.2 Medium	16
3.2.3 Bahan Kimia.....	16
3.3 Alat	17
3.4 Metode Kerja.....	17
3.4.1 Pembuatan Media	17
3.4.1.1 Pembuatan Media CMM.....	17
3.4.1.2 Pembuatan Media PDA.....	18
3.4.1.3 Pembuatan Media WA	18
3.4.1.4 Pembuatan Media PDY.....	18
3.4.2 Isolasi Kapang Endofit.....	19
3.4.3 Pemurnian Kapang Endofit	19
3.4.4 Identifikasi Kapang Endofit	19
3.4.4.1 Identifikasi Makroskopik	19
3.4.4.2 Identifikasi Mikroskopik	20

3.4.5 Fermentasi Kapang Endofit	20
3.4.6 Ekstraksi Hasil Fermentasi Kapang Endofit	20
3.4.7 Pemeriksaan Pola Kromatogram Ekstrak dengan KLT	21
3.4.8 Uji Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase	21
3.4.8.1 Preparasi Enzim	21
3.4.8.2 Preparasi Ekstrak	21
3.4.8.3 Preparasi Standar	21
3.4.8.4 Uji Pendahuluan	22
3.4.8.5 Uji Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase	23
3.4.8.6 Uji Kinetika Penghambatan α -Glukosidase	25
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	27
4.1 Isolasi Kapang Endofit	27
4.2 Identifikasi Kapang Endofit	29
4.2.1 Isolat 3.CMM.2b.....	29
4.2.2 Isolat 5.PDA.5a.....	29
4.2.3 Isolat 5.PDA.1b	30
4.2.4 Isolat 3.WA.5b.....	30
4.2.5 Isolat 4.WA.3a.....	30
4.3 Fermentasi Kapang Endofit	30
4.4 Ekstraksi Hasil Fermentasi Kapang Endofit	32
4.5 Pemeriksaan Pola Kromatogram Ekstrak dengan Metode KLT	33
4.6 Uji Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase	34
4.6.1 Uji Pendahuluan	34
4.6.2 Pengujian Standar	35
4.6.3 Uji Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase	35
4.6.4 Uji Kinetika Penghambatan Enzim	37
5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	39
5.1 Kesimpulan	39
5.2 Saran	39
6. DAFTAR ACUAN.....	40

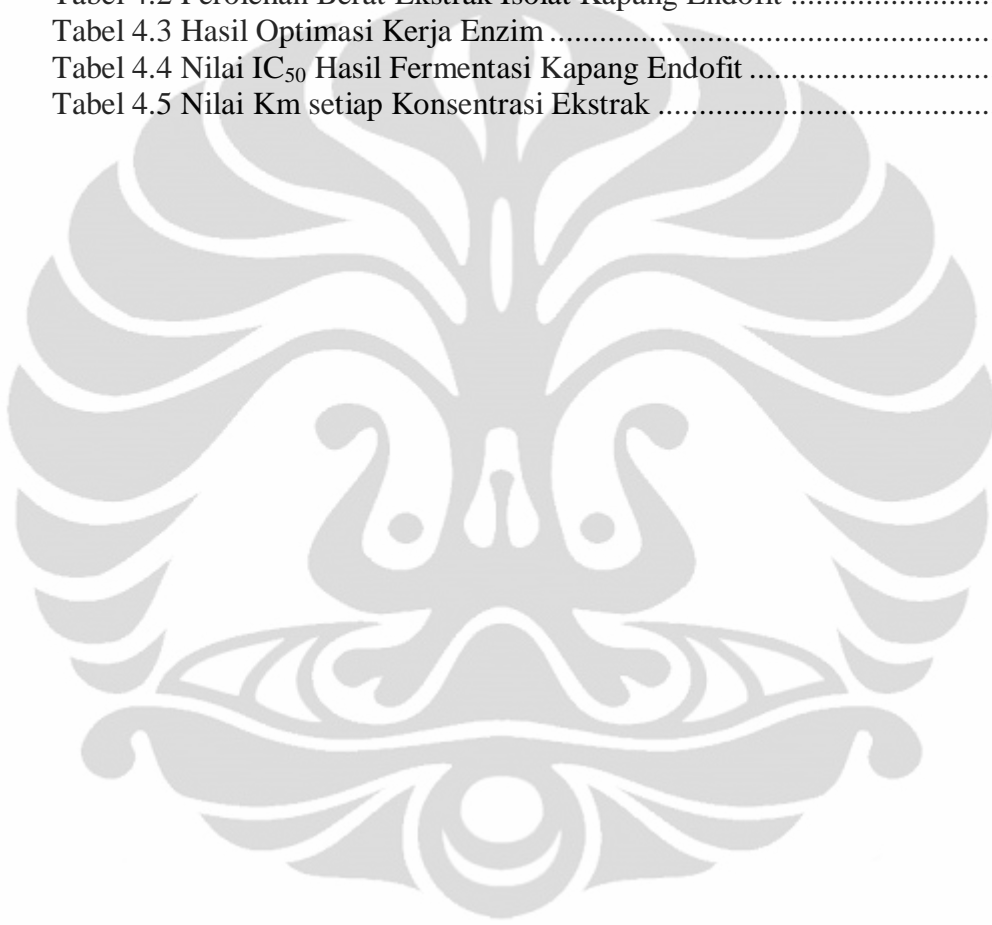
DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Determinasi Sampel Tanaman.....	45
Lampiran 2. Sertifikat Analisis Akarbose	46
Lampiran 3. Sertifikat Analisis Enzim α -Glukosidase	47
Lampiran 4. Spektrum serapan aktivitas penghambatan α -glukosidase dari ekstrak etil asetat isolate 5.PDA.5a.....	48
Lampiran 5. Data Pengukuran Absorbansi	49
Lampiran 6. Skema Kerja.....	53



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Jenis Sediaan Insulin	8
Tabel 2.2 Jenis Anti Diabetes Oral	9
Tabel 3.1 Skema penambahan reagen uji optimasi enzim α -glukosidase	22
Tabel 3.2 Skema penambahan reagen uji penghambatan α -glukosidase	25
Tabel 3.3. Skema uji kinetika penghambatan enzim	26
Tabel 4.1 Hasil Isolasi Kapang Endofit	27
Tabel 4.2 Perolehan Berat Ekstrak Isolat Kapang Endofit	32
Tabel 4.3 Hasil Optimasi Kerja Enzim	35
Tabel 4.4 Nilai IC_{50} Hasil Fermentasi Kapang Endofit	36
Tabel 4.5 Nilai K_m setiap Konsentrasi Ekstrak	38



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Pohon Johar	6
Gambar 2.2	Struktur kimia Akarbose dan Miglitol	10
Gambar 2.3	Persamaan Reaksi Enzimatis α -Glukosidase.....	11
Gambar 2.4	Plot Lineweaver-Burk $1/v_i$ versus $1/[S]$	13
Gambar 4.1	Kultur Kapang Endofit pada Media Isolasi.....	55
Gambar 4.2	Isolat koloni 3.CMM.2b.....	55
Gambar 4.3	Hasil identifikasi mikroskopik isolat 3.CMM.2b	56
Gambar 4.4	Isolat koloni 5.PDA.5a	56
Gambar 4.5	Hasil identifikasi mikroskopik isolat 5.PDA.5a	56
Gambar 4.6	Isolat koloni 5.PDA.1b.....	57
Gambar 4.7	Hasil identifikasi mikroskopik isolat 5.PDA.1b.....	57
Gambar 4.8	Isolat koloni 3.WA.5b	58
Gambar 4.9	Hasil identifikasi mikroskopik isolat 3.WA.5b	58
Gambar 4.10	Isolat koloni 4.WA.3a	59
Gambar 4.11	Hasil identifikasi mikroskopik isolat 4.WA.1b	59
Gambar 4.12	Kurva Pertumbuhan Kapang	60
Gambar 4.13	Kromatografi lapis tipis ekstrak etil asetat 5.PDA.5a dengan fase gerak heksana-etil asetat (7:3)	60
Gambar 4.14	Kromatografi lapis tipis ekstrak etil asetat 5.PDA.5a dengan fase gerak heksana-etil asetat (4:6)	61
Gambar 4.15	Kromatografi lapis tipis ekstrak etil asetat 5.PDA.5a dengan fase gerak heksana-etil asetat-aseton (1:4:2)	61
Gambar 4.16	Kromatografi lapis tipis ekstrak etil asetat 5.PDA.5a dengan fase heksana-etil asetat (8:2).....	62
Gambar 4.17	Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Enzim.....	62
Gambar 4.18	Grafik Lineweaver-Burk pada Ekstrak dengan konsentrasi 25 ppm	63

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus adalah suatu penyakit hiperglikemia yang ditandai oleh ketiadaan absolut insulin atau insensitivitas sel terhadap insulin. Diabetes melitus merupakan penyakit yang dapat disebabkan oleh faktor pola hidup yang tidak sehat, genetik, virus, gangguan hormonal atau penyebab lainnya (Corwin, 1996). Diabetes melitus menjadi masalah besar bagi dunia kesehatan karena angka penderita diabetes melitus semakin meningkat baik di negara berkembang maupun di negara maju. Prevalensi penderita diabetes melitus di Indonesia tergolong mengkhawatirkan. Sebuah studi yang dilakukan berdasarkan data WHO (*World Health Organization*) menunjukkan bahwa prevalensi penderita diabetes (semua umur) di Indonesia menempati peringkat ke-4 di dunia pada tahun 2000 (8,4%) dan diperkirakan akan meningkat hingga 21,3% pada tahun 2030 (Wild, Roglid, Green, Sicree, & King, 2004). Hal ini menunjukkan bahwa diabetes melitus menjadi salah satu masalah kesehatan utama di Indonesia.

Besarnya masalah kesehatan yang diakibatkan oleh diabetes melitus merupakan sebuah tantangan besar bagi dunia kesehatan. Berbagai jenis terapi pengobatan dengan obat-obat konvensional telah dikembangkan. Meskipun demikian, terapi tersebut banyak menimbulkan efek samping bagi pasien dan cukup mahal (Rao, Sreenivasulu, Cengaiyah, Reddy, & Chetty, 2010). Terapi penyakit diabetes dengan menggunakan obat penghambat enzim α -glukosidase cukup potensial, dimana obat-obat dari golongan ini memiliki efek samping hipoglikemia lebih kecil dan dapat digunakan sebagai monoterapi pada pasien diabetes melitus usia lanjut atau pasien dengan kadar glukosa postprandial yang tinggi (Suherman, 2007).

Agen-agen penghambat α -glukosidase yang berhasil ditemukan dari senyawa bahan alam memberikan aktivitas penghambatan yang potensial (Borges de Melo, Gomes, & Carvalho, 2006). Oleh karena itu, penelitian terhadap senyawa penghambat α -glukosidase untuk pencarian agen anti diabetes baru dari senyawa bahan alam banyak dilakukan.

Berbagai macam tanaman obat diteliti baik secara *in vitro* atau *in vivo* dan dinilai memiliki efek hipoglikemik yang baik (Bnouham, Ziyat, Mekhfi, Tahri, & Leggsyer, 2006). Salah satunya adalah *Cassia siamea* Lamk. (Leguminosae) atau dikenal sebagai tanaman Johar di Indonesia. Ekstrak daun dari tanaman tersebut telah diteliti memiliki efek mengontrol kadar gula darah dengan baik pada tikus diabetes (Kumar, Kumar, & Prakash, 2010). Meskipun aktivitas anti diabetes dari tanaman *Cassia siamea* Lamk. belum diteliti secara luas, tetapi potensi agen anti diabetes yang dimiliki tanaman tersebut menjadi sebuah harapan baru bagi terapi diabetes melitus terutama tipe 2.

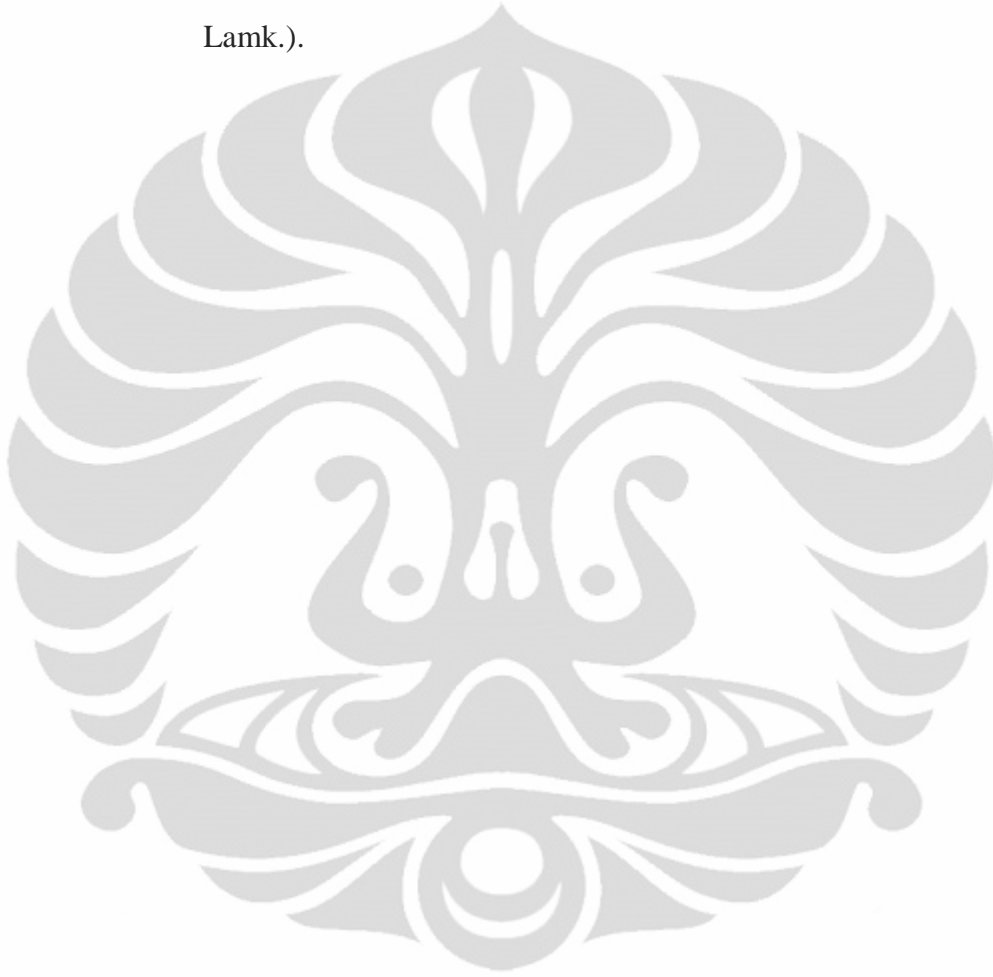
Penyediaan bahan baku yang diambil dari tanaman induk menjadi sebuah permasalahan karena dikhawatirkan dapat mengurangi keanekaragaman hayati jika dimanfaatkan secara berlebihan (Radji, 2005). Oleh karena itu, penyediaan sumber lain agar dapat mengatasi masalah tersebut sangat diperlukan. Mikroorganisme merupakan salah satu pilihan sumber senyawa penghambat α -glukosidase yang potensial. Kapang dari spesies *Aspergillus aculeatus* terbukti memiliki aktivitas penghambatan α -glukosidase yang baik (Ingavat, et al., 2009). Senyawa koji dan nojirimisin yang dihasilkan dari beberapa spesies kapang dan bakteri sudah dikenal sebagai agen penghambat α -glukosidase yang potensial (Dewi, et al., 2007; Borges de Melo, Gomes, & Carvalho, 2006).

Kapang endofit yang hidup secara interseluler atau intraseluler pada tumbuhan berpotensi menjadi sumber senyawa penghambat α -glukosidase. Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa kapang endofit dapat menghasilkan senyawa fitokimia yang mirip dengan senyawa yang dihasilkan oleh tanaman inangnya (Tan & Zou, 2001). Hal ini menjadi suatu keuntungan tersendiri karena dapat menggantikan fungsi tanaman sebagai penghasil senyawa kimia bahan alam. Selain itu, kapang endofit tidak memerlukan lahan luas untuk dapat tumbuh dan membutuhkan waktu yang lebih pendek untuk dapat menghasilkan senyawa metabolit aktif dibandingkan bila harus menumbuhkan tanaman inangnya. Keuntungan-keuntungan tersebut tentu saja baik dari segi ekonomi (Strobel & Daisy, 2003).

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Memperoleh isolat kapang endofit dari daun Johar (*Cassia siamea* Lamk.)
2. Memperoleh hasil uji aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase dari hasil fermentasi kapang endofit daun Johar (*Cassia siamea* Lamk.).



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Gambaran Umum Kapang Endofit

Mikroorganisme endofit dapat didefinisikan sebagai bakteri atau kapang yang menghabiskan separuh atau seluruh siklus hidupnya di dalam jaringan tanaman inangnya tanpa menyebabkan gejala penyakit pada tanaman inangnya (Tan & Zou, 2001). Koloni mikroorganisme endofit dari suatu spesies tanaman dapat terdiri dari banyak spesies mikroorganisme, namun mikroorganisme endofit yang lebih umum diisolasi adalah kapang. Kapang endofit dapat diisolasi dari jaringan tanaman dan dikultur pada media yang sesuai. Hubungan antara kapang endofit dengan tanaman inangnya dapat berupa simbiosis mutualisme atau komensalisme. Namun hasil studi lain menyebutkan bahwa hubungan tersebut dapat berubah menjadi parasitisme (Strobel & Daisy, 2003). Hal ini menjadikan kapang endofit dapat bersifat saprofit atau patogen bagi tanaman.

Pada umumnya, baik kapang endofit maupun tanaman inangnya saling menunjang satu sama lain. Di satu sisi, kapang endofit akan mendapatkan nutrisi dari tanaman inangnya, di sisi lain tanaman inang akan mendapatkan senyawa yang berguna dari kapang endofit seperti fitohormon yang dapat membantu pertumbuhan tanaman inang atau senyawa-senyawa lainnya yang dapat melindungi tanaman inang dari bakteri atau jamur patogen (Tan & Zou, 2001). Perubahan sifat simbiosis dapat terjadi akibat ketidakseimbangan pertukaran nutrisi antara kapang endofit dengan tanaman inangnya sehingga penyakit dapat timbul pada tanaman inang (Kogel, Franken & Huckelhoven, 2006).

Pemilihan secara rasional terhadap kapang endofit yang akan diteliti sangatlah penting. Pada setiap bagian tanaman dapat memiliki beragam spesies kapang endofit. Oleh karena itu, diperlukan orientasi agar dapat memperkirakan dengan baik kapang endofit yang mengandung senyawa yang diinginkan. Pada umumnya, metabolit sekunder dihasilkan sebagai respon unik atas kondisi lingkungan di sekitar tumbuhan tersebut. Beberapa strategi yang dapat digunakan untuk memilih tumbuhan yang tepat antara lain: (i) tanaman yang hidup pada

kondisi lingkungan yang unik, terutama yang memiliki karakteristik biologis yang tidak biasa dan memiliki cara yang istimewa untuk dapat bertahan hidup; (ii) tumbuhan yang memiliki sejarah etnobotani, berarti sudah digunakan secara turun-menurun oleh komunitas tertentu untuk menyembuhkan penyakit; (iii) tumbuhan endemik yang bertahan hidup dalam waktu yang sangat lama memiliki kemungkinan untuk menjadi inang mikroorganisme endofit dengan senyawa metabolit sekunder tertentu. Daerah-daerah yang memiliki tingkat biodiversitas tumbuhan yang tinggi memiliki prospek untuk mengandung kapang endofit dengan biodiversitas yang tinggi pula (Strobel & Daisy, 2003).

Kapang endofit dapat menghasilkan senyawa yang mirip secara fitokimia dengan tanaman inangnya. Tan dan Zou (2001) menyimpulkan bahwa hal ini terjadi akibat proses transformasi genetik antara kapang endofit dengan tanaman inangnya. Meskipun demikian, tidak semua kapang endofit menghasilkan senyawa metabolit yang mirip dengan inangnya dan oleh karenanya diperlukan penelitian-penelitian lebih lanjut untuk dapat memperoleh kapang endofit yang dapat menghasilkan senyawa metabolit yang mirip dengan inangnya.

2.2 Isolasi dan Kultur Kapang Endofit

Pemilihan bagian tanaman yang tepat menjadi hal yang penting untuk diperhatikan agar didapat isolat kapang endofit yang tepat pula. Bagian tanaman yang dipilih harus sehat dan segar. Sampel tanaman dapat disimpan dalam plastik bersegel dan kering, serta dapat disimpan pada suhu 4°C (Strobel & Daisy, 2003). Sterilisasi permukaan sampel tanaman perlu dilakukan untuk mengeliminasi mikroba yang berada pada permukaan tanaman. Sterilisasi permukaan dapat dilakukan dengan etanol 75%, NaOCl 2-10%, HgCl, Cu(NO₃)₂ dan formalin 30-50% (Stone, Polishook & White, 2004).

Isolasi kapang endofit dapat dilakukan dengan teknik *direct seed planting* dari bagian tanaman yang sudah disterilisasi terlebih dahulu permukaannya. Kemudian jaringan bagian luar tanaman dihilangkan dengan pisau steril dan bagian dalam tanaman diletakkan hati-hati pada permukaan media isolasi (Strobel & Daisy, 2003).

Media isolasi yang biasa digunakan adalah *malt extract agar* (1-2%) dan dapat dikombinasi dengan *yeast extract* (0,1-0,2%). Penggunaan media *water agar* terkadang lebih disukai karena dapat mengurangi kontaminasi mikroba lainnya (Stone, Polishook & White, 2004). Selain itu, media PDA (*Potato Dextrose Agar*) juga sering digunakan dalam mengisolasi kapang endofit. Antibiotik seperti kloramfenikol (0,005% b/v) dan anti jamur seperti nistatin (0,01% b/v) sering ditambahkan untuk menghindari kontaminasi mikroba asing (Kumala & Siswanto, 2007).

2.3 Pohon Johar

Pohon Johar merupakan pohon yang cukup besar dengan daun menyirip genap dan berbentuk bulat panjang (Gambar 2.1). Pohon ini memiliki bunga berwarna kuning dengan panjang 1,5-2 cm. Buah pohon ini berbentuk polong, pipih dengan panjang 15-20 cm dan biji berbentuk bulat telur berwarna hitam. Pohon ini berasal dari Asia Selatan dan biasa ditanam di pinggir jalan (Kardono, Artanti, Dewiyanti & Basuki, 2003).



Keterangan gambar: a. daun
 b. buah
 c. bunga

Gambar 2.1 Pohon Johar

Pohon johar memiliki taksonomi (Riset dan Teknologi Indonesia, 2002):

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Kelas : Dicotyledonae
Bangsa : Rosales
Suku : Leguminosae
Marga : *Cassia*
Jenis : *Cassia siamea* Lamk.

Kandungan kimia dari *Cassia siamea* Lamk. diketahui meliputi saponin, antrakuinon dan alkaloid (Smith, 2009). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol dan ekstrak air dari *C. siamea* Lamk. memiliki aktivitas anti malaria (Ajaiyeoba, Ashidi, Okpako, Houghton & Wright, 2008; Morita, 2007), anti diabetes (Kumar, Kumar & Prakash, 2010), antioksidan (Kaur, Alam, Jabbar, Javed & Athar, 2006), mempengaruhi sistem imun (Kusmardi, Kumala & Wulandari, 2006), analgesik dan anti inflamasi (Ntandou, et al., 2010). Penggunaan *C. siamea* Lamk. secara tradisional sebagai obat malaria dan diabetes dengan cara meminum air rebusan daun *C. siamea* Lamk. (Kardono, Artanti, Dewiyanti & Basuki, 2003).

Penelitian Kumar (2010) menunjukkan bahwa ekstrak daun *C. siamea* Lamk. dapat menurunkan kadar gula darah pada tikus diabetes secara bermakna setelah pemberian secara oral selama tiga minggu. Lebih jauh lagi, beberapa tanaman dengan marga yang sama juga diketahui memiliki aktivitas anti diabetes, seperti *C. occidentalis* (Verma, Khatri, Kaushik, Patil & Pawar, 2010), *C. glauca* (Salahudin & Jalalpure, 2009), *C. auriculata* (Sivaraj, et al., 2009).

2.4 Terapi Diabetes Melitus Tipe 2

Diabetes melitus merupakan penyakit kronik dengan tingkat morbiditas dan mortalitas yang tinggi, sehingga tujuan pengobatan jangka panjang dari penyakit diabetes melitus adalah menurunkan gejala dan komplikasi yang mungkin terjadi pada penderita. Hal ini didasarkan bahwa penyakit diabetes melitus bukanlah suatu penyakit tunggal melainkan suatu sindrom metabolik yang

disebabkan oleh kondisi hiperglikemia (Coopan, 2008). Tujuan jangka pendek dari terapi penyakit ini adalah mengontrol kadar gula darah pada kisaran normal.

Terapi penyakit diabetes melitus tipe 2 dapat diklasifikasikan menjadi dua:

a. Terapi insulin

Terapi insulin merupakan pilihan utama untuk diabetes melitus tipe 1 dan beberapa jenis diabetes melitus tipe 2. Terapi insulin biasa diberikan melalui suntikan oleh karena itu banyak pasien diabetes melitus tipe 2 lebih memilih obat anti diabetes oral. Suntikan insulin dapat diberikan melalui intravena, intramuskuler, atau subkutan pada penggunaan jangka panjang (Suherman, 2007). Terapi insulin diberikan pada penderita diabetes melitus tipe 2 terutama bila terjadi kecelakaan parah, pemberian terapi steroid, infeksi sehingga membutuhkan dekompensasi insulin; terjadi kondisi hiperglikemia parah yang disertai ketonuria atau ketonemia; terjadi penurunan berat badan yang tidak terkontrol, hamil, penyakit pada ginjal atau hati yang progresif; pasien yang akan dioperasi; terjadi reaksi alergi atau iodisinkrasi dengan berbagai pengobatan oral; dan terjadi diabetes autoimun laten pada orang dewasa (Codario, 2011). Sediaan insulin dibedakan berdasarkan lama kerjanya, yaitu kerja cepat, sedang, dan lambat (lihat Tabel 2.1).

Tabel 2.1 Jenis Sediaan Insulin

Jenis sediaan	Mula kerja (jam)	Puncak (jam)	Masa kerja (jam)
Kerja cepat			
<i>Reguler soluble</i> (kristal)	0,1-0,7	1,5-4	5-8
Lispro	0,25	0,5-1,5	2-5
Kerja sedang			
NPH (<i>isophan</i>)	1-2	6-12	18-24
Lente	1-2	6-12	18-24
Kerja panjang			
Protamin zink	4-6	14-20	24-36
Ultralente	4-6	16-18	20-36
Glargin	2-5	5-24	18-24

[Sumber: Suherman, 2007]

b. Obat anti diabetes oral

Golongan obat anti diabetes yang dapat berikan secara oral merupakan obat yang lebih disukai oleh pasien. Perkembangan obat-obat anti diabetes oral memungkinkan untuk memberikan terapi kombinasi kepada pasien dan mengontrol kadar gula darah dengan lebih baik. Meskipun demikian setiap jenis obat anti diabetes oral memiliki efek sampingnya masing-masing, oleh karena itu terapi kombinasi diperlukan untuk menutupi kekurangan salah satu jenis obat dan memberikan efek sinergis dalam mengontrol kadar gula darah.

Tabel 2.2 Jenis Anti Diabetes Oral

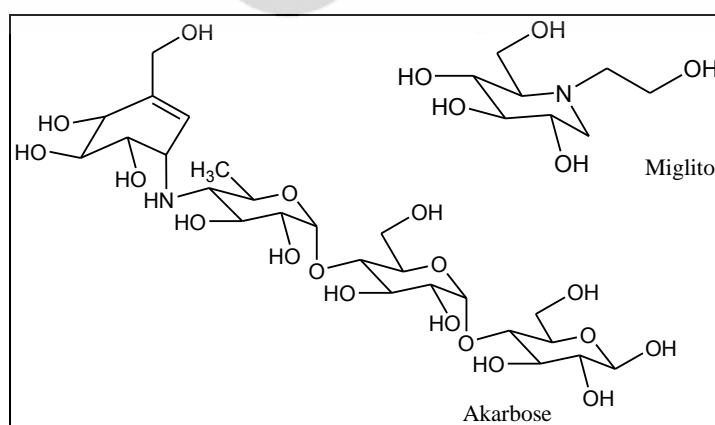
Golongan	Mekanisme kerja	Agen
Sulfonilurea	a. Meningkatkan sekresi insulin b. Menstimulasi sel beta pankreas	Glipizid, Gliburid, Glimepirid
Meglitinid	a. Meningkatkan sekresi insulin b. Menstimulasi sel beta pankreas	Repaglinid, Nateglinid
Biguanid	a. Menurunkan produksi glukosa hati b. Menurunkan absorpsi glukosa di usus c. Menaikkan pengambilan glukosa jaringan d. Meningkatkan sensitivitas insulin	Metformin
Penghambat α -glukosidase	Menghambat pencernaan karbohidrat	Akarbose, Miglitol
Tiazolindinedion	a. Meningkatkan sensitivitas insulin b. Menjaga fungsi sel beta c. Membantu regenerasi sel beta	Pioglitazon

[Sumber: Codario, 2011]

2.5 Penghambat Enzim α -Glukosidase

Obat dari golongan penghambat α -glukosidase secara spesifik menghambat enzim α -glukosidase pada usus halus sehingga akan menghambat pemecahan senyawa disakarida menjadi glukosa (Hanefeld, 2008). Enzim glukosidase adalah enzim yang mengatalisis pemecahan ikatan glikosida pada senyawa disakarida namun beberapa jenis enzim glikosidase secara spesifik hanya mengatalisis pemecahan ikatan glikosida α atau β saja (Borges de Melo, Gomes & Carvalho, 2006). Senyawa karbohidrat kompleks sebelumnya dipecah terlebih dahulu oleh enzim α -amilase dan β -amilase sehingga menghasilkan senyawa disakarida dengan ikatan glikosid α seperti maltosa atau ikatan glikosida β seperti laktosa. Selanjutnya α -glukosidase akan menghasilkan monosakarida dari produk-produk yang dihasilkan oleh enzim karbohidrase sebelumnya (Kimura, 2000).

Akarbose merupakan suatu senyawa pseudotetrasakarida yang memiliki ikatan nitrogen antara unit glukosa pertama dan kedua. Namun obat penghambat α -glukosidase lainnya, Miglitol, memiliki struktur molekul yang kecil seperti glukosa, tetapi memiliki unsur nitrogen pada cincin sikliknya. Komponen nitrogen adalah bagian terpenting pada struktur penghambat α -glukosidase karena berpengaruh pada afinitas ikatan dengan enzim α -glukosidase sehingga dapat menghalangi reaksi enzimatik tersebut. Akarbose sangat efektif dalam menghambat enzim glucoamilase, namun tidak memiliki efek penghambat pada enzim β -glukosidase. Sedangkan Miglitol memiliki efek penghambatan yang baik pada enzim yang mencerna disakarida, namun tidak memiliki efek pada α -amilase (Hanefeld, 2008).



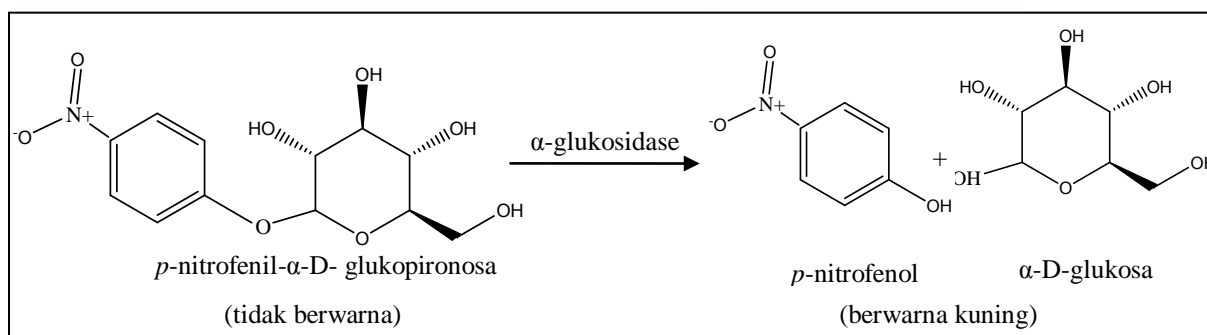
[Sumber: Hanefeld, 2008]

Gambar 2.2 Struktur kimia Akarbose dan Miglitol

Obat penghambat α -glukosidase merupakan anti diabetes oral yang paling aman, meskipun tetap memiliki efek samping pada saluran gastrointestinal berupa meteorisme, flatulens dan diare, sehingga dapat menyebabkan ketidaknyamanan pada pasien. Hal ini menjadi alasan utama penghentian terapi dengan menggunakan obat penghambat α -glukosidase (Codario, 2011). Meskipun demikian obat penghambat α -glukosidase dapat menjadi pilihan sebagai obat pertama pada terapi awal diabetes dan dikombinasi dengan obat anti diabetes oral lainnya pada terapi diabetes lanjutan (van de Laar, 2008).

2.6 Uji Penghambatan α -Glukosidase

Penghambat α -glukosidase bekerja menghambat kerja enzim tersebut di usus halus, sehingga akan menunda pemecahan sukrosa dan karbohidrat kompleks menjadi senyawa-senyawa gula yang lebih sederhana (Dipiro, 2008). Prinsip pengujian penghambatan α -glukosidase adalah perubahan warna substrat menjadi warna produk setelah terjadi reaksi enzimatik (Gambar 2.3). Perubahan warna tersebut selanjutnya dapat diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis (Sugiwati, Setiasih & Afifah, 2009). Penggunaan enzim α -glukosidase juga dapat digantikan dengan enzim glucoamilase. Baik enzim α -glukosidase maupun glucoamilase berasal dari golongan karbohidrase dimana dapat memutus rantai α -glukosil pada substrat yang sama (Chen, Yan, Lin, Zheng & Zhang, 2004). Pada pengujian inhibisi α -glukosidase biasa digunakan akarbose (Chen, Yan, Lin, Zheng & Zhang, 2004), ekstrak koji (Najib, 2010), atau nojirimisin (Dewi, et al., 2007) sebagai standar.



[Sumber: Sugiwati, Setiasih & Afifah, 2009]

Gambar 2.3 Persamaan Reaksi Enzimatis α -Glukosidase

2.7 Kinetika Enzim

Enzim dapat didefinisikan sebagai polimer biologis yang mengatalisis reaksi kimia yang memungkinkan berlangsungnya kehidupan seperti yang kita kenal. Enzim secara umum berupa protein dengan pengecualian ribozim atau molekul RNA katalitik. Enzim merupakan katalis yang spesifik baik bagi tipe reaksi yang dikatalisis maupun substrat atau substrat-substrat yang berhubungan erat. Enzim meningkatkan laju reaksi kimia dalam tubuh hingga 10^6 kali (Murray, Granner & Rodwell, 2009).

Bidang biokimia yang berkaitan dengan pengukuran kuantitatif laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim dan studi tentang faktor-faktor yang mempengaruhinya disebut kinetika enzim. Seperti reaksi kimia pada umumnya, reaksi enzimatik merupakan suatu persamaan kesetimbangan kimia yang semuanya dalam proporsi yang tepat (stokiometri). Banyak faktor yang dapat mempengaruhi laju reaksi di antaranya suhu, pH, dan konsentrasi reaktan (Murray, Granner & Rodwell, 2009).

Konsentrasi substrat dapat mempengaruhi laju reaksi, dimana peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan laju reaksi hingga enzim berada dalam keadaan jenuh substrat sehingga peningkatan konsentrasi substrat tidak akan mempercepat laju reaksi. Efek dari konsentrasi substrat ini dirumuskan dalam persamaan Michaelis-Menten:

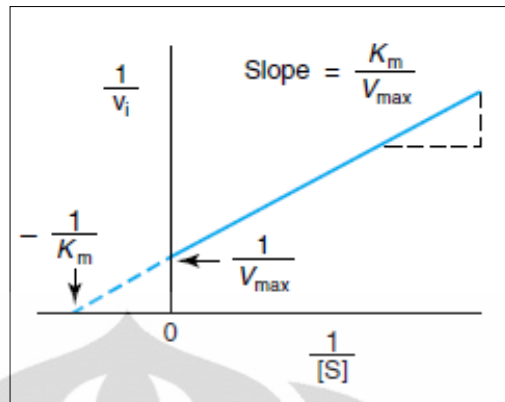
$$v_i = \frac{V_{maks}[S]}{K_m + [S]} \quad (2.3)$$

dengan V_{maks} adalah kecepatan maksimal reaksi enzimatik, v_i adalah kecepatan separuh dari kecepatan maksimal ($V_{maks}/2$), $[S]$ adalah konsentrasi substrat, dan K_m (Konstanta Michaelis) adalah konsentrasi substrat saat v_i separuh dari kecepatan maksimal (Murray, Granner & Rodwell, 2009).

Analisis kinetik dalam evaluasi penghambat enzim dapat dilakukan dengan menggunakan persamaan Lineweaver-Burk yang diturunkan dari persamaan Michaelis-Menten di atas, yaitu:

$$\frac{1}{v_i} = \left(\frac{K_m}{V_{maks}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \quad (2.4)$$

jika persamaan garis lurus adalah $y = a + bx$, maka $y = 1/v_i$ dan $x = 1/[S]$, dengan gradien garis = K_m/V_{maks} (Murray, Granner & Rodwell, 2009).



[Sumber: Murray, Granner, & Rodwell, 2009]

Gambar 2.4 Plot Lineweaver-Burk $1/v_i$ versus $1/[S]$

2.8 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan distribusi dari komponen-komponen yang ada dalam campuran tersebut di antara dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Pada kromatografi lapis tipis pemisahan fisikokimia didasarkan atas penyerapan, partisi, atau gabungannya (Harmita, 2006).

Pada kromatografi lapis tipis, zat penyerap (adsorben) merupakan lapisan tipis serbuk halus yang dilapiskan pada lempeng kaca, plastik atau logam secara merata (Departemen Kesehatan, 1995). Kombinasi yang tepat antara pelarut, adsorben, dan eluen penting dalam efisiensi eluasi. Sebagai contoh untuk memisahkan campuran yang bersifat non polar maka diperlukan adsorben aktif dan pelarut yang bersifat non polar agar menghasilkan eluasi yang baik (Harmita, 2006).

Teknik kromatografi lapis tipis sangat bermanfaat untuk menganalisis obat, senyawa-senyawa organik, dan bahan lainnya. Teknik ini hanya memerlukan peralatan sederhana, waktu yang cukup singkat, jumlah sampel yang diperiksa cukup kecil (10 mg senyawa murni atau 100 mg simplisia) dan teknik pengerjaan sederhana (Harmita, 2006).

2.9 Spektrofotometri UV-Vis

Metode pengujian enzim dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis adalah metode yang paling sering dilakukan. Metode ini menghasilkan pengujian yang akurat dalam jumlah sampel yang banyak. Spektrofotometer UV-Vis akan mengukur besarnya energi yang diabsorpsi atau diteruskan oleh suatu zat (Harmita, 2006).

Suatu larutan yang mengandung zat yang dapat menyerap cahaya monokromatik akan menyebabkan terjadinya pemantulan (refleksi), penyerapan (absorbansi), atau penerusan (transmisi) dari cahaya tersebut (Harmita, 2006). Sehingga nilai intensitas cahaya yang diabsorbansi dari suatu zat dapat diketahui dengan cara mengurangi nilai intensitas cahaya yang datang dengan nilai intensitas cahaya yang dipantulkan dan nilai intensitas cahaya yang diteruskan. Nilai intensitas cahaya yang dipantulkan dapat dihilangkan dengan penggunaan blanko atau kontrol sehingga nilai intensitas cahaya yang diabsorpsi dapat diperoleh hanya dengan mengurangi nilai intensitas cahaya yang datang dengan nilai intensitas cahaya yang diteruskan yang terdeteksi oleh detektor.

Senyawa-senyawa yang memiliki gugus kromofor, yaitu senyawa dengan gugus fungsional yang mengabsorpsi radiasi ultraviolet dan cahaya tampak jika terikat oleh gugus-gugus yang bukan pengabsorpsi (Harmita, 2006), secara alami akan menurunkan intensitas cahaya yang ditransmisikan (John, 2002). Absorbansi mengacu pada rasio antara nilai intensitas cahaya yang datang dengan nilai intensitas cahaya yang diteruskan dan hubungan ini bukanlah linear namun logaritma,

$$A = \log \frac{I_0}{I_t} \quad (2.1)$$

dan hukum Lambert-Beer telah menjelaskan hubungan antara absorbansi dengan tebalnya larutan dan konsentrasi zat,

$$A = \log \frac{I_0}{I_t} = \varepsilon \cdot b \cdot c = a \cdot b \cdot c \quad (2.2)$$

dengan I_0 adalah intensitas cahaya yang datang, I_t adalah intensitas cahaya yang diteruskan, ε adalah absorpsivitas molekuler, a adalah daya serap, b adalah tebal larutan atau kuvet dan c adalah konsentrasi larutan (Harmita, 2006).

Metode pengujian enzim secara spektrofotometri berdasarkan prinsip dasar tersebut dimana terjadi perubahan nilai absorbansi larutan uji akibat hasil dari reaksi enzimatik yang terjadi. Meskipun demikian, perubahan fluoresensi atau turbiditas larutan dapat juga menjadi metode pada pengujian enzim (John, 2002).



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi-Bioteknologi dan Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Departemen Farmasi FMIPA UI selama bulan Februari sampai Mei 2011.

3.2 Bahan

3.2.1 Sampel

Sampel yang digunakan terdiri dari:

- a. Sampel tanaman: Daun dari *Cassia siamea* Lamk. yang diperoleh dari daerah Depok. Tanaman ini dideterminasi oleh Herbarium Bogorinensis Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI).
- b. Sampel uji: Isolat kapang endofit yang diperoleh dari hasil isolasi kapang endofit dari bagian daun *Cassia siamea* Lamk.

3.2.2 Medium

Medium yang digunakan terdiri dari:

- a. Medium isolasi kapang endofit: *Corn Meal Agar* (Himedia), *Malt Extract* (Oxoid), *Yeast Extract* (Oxoid), *Potato Dextrose Agar* (Difco), *water agar* (Difco).
- b. Medium peremajaan kapang endofit: *Potato Dextrose Agar* (Difco)
- c. Medium fermentasi: *Potato Dextrose Broth* (Difco), *Yeast Extract* (Oxoid)

3.2.3 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan antara lain pewarna *Lactophenol Cotton Blue* (LFCB) (Sigma), akuades, larutan etanol 70%, larutan natrium hipoklorit 5,25% (Baycline), aseton p.a (Merck), etil asetat p.a (Merck), metanol teknis, n-heksana p.a (Mallinckrodt), enzim α -glukosidase yang berasal dari *Saccharomyces*

cerevisiae rekombinan (Sigma), p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida (Wako Pure Chemical Industry), dapar fosfat pH 7, dimetil sulfoksida (Merck), Na_2CO_3 (Merck), CaCO_3 (Merck) dan Akarbose (Actavis).

3.3 Alat

Laminar air flow (Esco dan Faster Bio 48), inkubator, otoklaf (Hirayama), timbangan analitik (Acculab), *vortex mixer* (Barnstead), *centrifuge* (Kubota 6800), *orbital shaker* (Labline), *waterbath* (Labline), *shakingbath incubator* (Labline), mikroskop cahaya (Euromex), pH meter (Eutech), filter bakteri 0,22 μm , *hot plate* (Corning), mikropipet (Socorex), kabinet UV (Camag), oven (WTB Binder), lempeng KLT silika gel 60 F₂₅₄ (Merck), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-265), kuvet dan alat-alat gelas yang biasa digunakan di Laboratorium Mikrobiologi.

3.4 Metode Kerja

3.4.1 Pembuatan Media

3.4.1.1 Pembuatan Media CMM

Media CMM dibuat dengan cara *Corn Meal Agar* ditimbang sebanyak 17 gram; *Malt Extract* 20 gram; *Yeast Extract* 2 gram; kloramfenikol 0,05 gram. Semua bahan dicampur kecuali kloramfenikol, ke dalam labu bulat lalu ditambah akuades. Larutan tersebut kemudian dipanaskan di atas *hot plate* dan diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga homogen. Selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Kloramfenikol ditambahkan setelah suhu larutan media steril berkisar 55°C secara aseptis di dalam *laminar air flow* (LAF). Selanjutnya dituangkan ke dalam cawan petri secara aseptis lalu dibiarkan di suhu ruang hingga membeku.

3.4.1.2 Pembuatan Media PDA

Media PDA dibuat dengan cara *Potato Dextrose Agar* ditimbang sebanyak 39 gram, kemudian ditambahkan akuades hingga 1 liter. Larutan tersebut kemudian dipanaskan di atas *hot plate* dan diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga homogen. Selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Media yang telah steril dituang ke dalam cawan petri secara aseptis dan dibiarkan membeku pada suhu ruang.

3.4.1.3 Pembuatan Media Agar Miring PDA

Media agar miring PDA (*slant agar*) dibuat dengan cara medium PDA dituang ke dalam tabung *slant* masing-masing 5 mL. Selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Media yang telah steril diletakkan dalam posisi miring 30° dari alas horizontal dan dibiarkan hingga mengeras.

3.4.1.3 Pembuatan Media WA

Media *Water Agar* (WA) dibuat dengan cara *Granulated Agar* ditimbang sebanyak 15 gram kemudian ditambahkan akuades hingga 1 liter. Larutan tersebut kemudian dipanaskan di atas *hot plate* dan diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga homogen. Selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Media yang telah steril dituang ke dalam cawan petri secara aseptis dan dibiarkan membeku pada suhu ruang.

3.4.1.4 Pembuatan Media PDY

Media PDY dibuat dengan cara *Potato Dextrose Broth* ditimbang sebanyak 24 gram; *Yeast Extract* 2 gram; dan kalsium karbonat (CaCO_3) 5 gram. Semua bahan kecuali kalsium karbonat dimasukkan ke dalam labu bulat dan ditambahkan akuades hingga 1 liter, dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* di atas *hot plate*. Kalsium karbonat ditambahkan sedikit demi sedikit ke larutan media tersebut hingga dicapai pH 6-7. Selanjutnya 500 mL larutan media dituang ke labu Erlenmeyer 1000 mL dan disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

3.4.2 Isolasi Kapang Endofit

Isolasi kapang endofit dilakukan dengan teknik tanam langsung (*direct seed planting*) potongan daun tanaman Johar yang sebelumnya dilakukan proses sterilisasi permukaan dahulu. Caranya adalah sampel daun dicuci dengan air mengalir. Kemudian sampel dipotong-potong menjadi beberapa bagian kecil dengan ukuran $\pm 1 \times 1 \text{ cm}^2$ dengan menggunakan pisau steril. Sterilisasi permukaan dilakukan dengan cara sampel direndam dalam etanol 70% selama 3 menit, kemudian di larutan natrium hipoklorit 5,25% selama 5 menit. Langkah selanjutnya sampel dicuci dalam etanol 70% selama 30 detik. Selanjutnya sampel dibiarkan kering di atas tisu steril. Semua proses sterilisasi hingga proses pengeringan dilakukan secara aseptis di dalam kabinet LAF.

Sampel daun yang telah disterilisasi selanjutnya ditumbuk di lumpang steril untuk menyobek jaringan luar dari daun. Selanjutnya secara hati-hati diletakkan pada media isolasi. Setiap cawan petri berisi empat potongan. Selanjutnya media tersebut diinkubasi pada suhu 27-29°C selama 5-21 hari.

3.4.3 Pemurnian Kapang Endofit

Kapang endofit yang telah tumbuh pada media isolasi kemudian dimurnikan ke dalam media PDA dengan cara menginokulasikan sedikit hifa dengan ose dari setiap koloni endofit yang berbeda ke PDA dan diinkubasi selama 5-7 hari pada suhu 27°C. Selanjutnya isolat kapang yang telah murni dipindahkan ke dalam *slant* agar PDA untuk digunakan sebagai *working culture* dan yang lain digunakan sebagai *stock culture*. Kultur kapang endofit diinkubasi selama 5-10 hari pada suhu 27°C.

3.4.4 Identifikasi Kapang Endofit

3.4.4.1 Identifikasi Makroskopik

Identifikasi makroskopik dilakukan dengan pengamatan morfologi koloni, diameter koloni, warna koloni dan warna sebalik (*adverse*) koloni.

3.4.4.2 Identifikasi Mikroskopik

Identifikasi mikroskopik dilakukan dengan melakukan pemeriksaan preparat kapang melalui mikroskop. Caranya adalah, kaca obyek dan kaca penutup dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70%, kemudian di atas kaca obyek ditetaskan LFCB satu tetes. Miselium yang telah bersporulasi diambil dengan ose steril dan diletakkan di atas kaca obyek. Pengamatan yang dilakukan meliputi bentuk sel serta bentuk dan warna hifa.

3.4.5 Fermentasi Kapang Endofit

Fermentasi dilakukan untuk memperoleh metabolit sekunder kapang endofit. Fermentasi dilakukan dengan cara mengambil hifa atau potongan agar yang mengandung hifa seukuran $2 \times 2 \text{ cm}^2$, lalu diinokulasikan ke dalam labu Erlenmeyer berisi 500 mL medium PDY. Selanjut kultur diinkubasi dengan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 7 hari.

3.4.6 Ekstraksi Hasil Fermentasi Kapang Endofit

Hasil fermentasi kapang endofit yang berupa suspensi koloni dibagi menjadi dua. Suspensi koloni I disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, kemudian akan terbentuk dua lapisan, yaitu lapisan supernatan dan lapisan biomassa. Lapisan supernatan ini selanjutnya digunakan sebagai ekstrak uji I. Lapisan biomassa ditambahkan 15 mL metanol, lalu dihomogenkan dengan *vortex mixer*, kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, dan diambil supernatannya. Larutan ini selanjutnya digunakan sebagai ekstrak uji II.

Suspensi koloni II ditambahkan etil asetat sebanyak 15 mL dan dihomogenkan dengan *vortex mixer*, lalu disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan dari suspensi koloni II selanjutnya disebut ekstrak uji III. Larutan uji I dibekukan dalam lemari es lalu dikeringkan dengan metode leofilisasi, sedangkan larutan uji II dan III dikeringkan dengan cara diuapkan di atas *waterbath* pada suhu 30-40°C. Ekstrak kering dapat direkonstitusi kembali dengan pelarutnya dan dibuat sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan.

3.4.7 Pemeriksaan Pola Kromatogram Ekstrak dengan Kromatografi Lapis Tipis

Masing-masing ekstrak ditimbang sebanyak 1 mg kemudian dilarutkan dalam 1 mL pelarut yang digunakan untuk ekstraksi. Larutan kemudian dipipet menggunakan pipet kapiler kemudian ditotolkan pada lempeng KLT silika F₂₅₄ yang telah diaktifkan. Lempeng kemudian dielusi menggunakan heksana-etil asetat dengan perbandingan yang sesuai (Dewi, et. al., 2007). Setelah proses elusi selesai, lempeng diangin-anginkan hingga kering lalu diperiksa di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm dan disemprot dengan larutan H₂SO₄ 10% dalam metanol. Bercak kemudian dihitung harga R_f-nya.

3.4.8 Uji Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase

3.4.8.1 Preparasi Enzim

Larutan enzim dibuat dengan cara melarutkan 4,2 mg enzim α -glukosidase (179 unit) dalam 100 mL dapar fosfat yang mengandung *bovine serum albumin* 0,2%. Sebelum digunakan, larutan enzim tersebut diencerkan hingga diperoleh 0,055 U/mL dengan dapar fosfat pH 7.

3.4.8.2 Preparasi Ekstrak

Setiap ekstrak ditimbang sebanyak 50 mg dan dilarutkan dalam dimetil sulfoksida (DMSO), kemudian diencerkan dapar fosfat pH7 hingga mencapai volume 5 mL sehingga diperoleh konsentrasi larutan ekstrak sebesar 10.000 ppm. Selanjutnya diencerkan lagi dengan dapar fosfat pH 7 hingga diperoleh konsentrasi ekstrak 5.000 ppm, demikian seterusnya hingga diperoleh konsentrasi ekstrak 2.500 ppm dan 1.250 ppm.

3.4.8.3 Preparasi Standar

Standar yang digunakan adalah akarbose yang ditimbang sebanyak 100 mg dan dilarutkan dengan dimetil sulfoksida (DMSO) secukupnya kemudian dicukupkan larutannya hingga 10 mL dengan dapar fosfat pH 7,0 hingga diperoleh konsentrasi ekstrak 10.000 ppm. Kemudian diencerkan lagi sehingga diperoleh konsentrasi standar akarbose 5000 ppm, 2500 ppm dan 1250 ppm.

3.4.8.4 Uji Pendahuluan (Ono, et al., 1988; Rauscher, et al., 1985)

Sebelum dilakukan uji aktivitas penghambatan α -glukosidase, dilakukan terlebih dahulu uji pendahuluan untuk mengetahui kondisi optimal enzim bekerja. Hal ini dilakukan untuk menghilangkan penurunan kerja enzim akibat faktor kondisi inkubasi dan konsentrasi substrat.

a. Pengujian larutan uji

Pengujian dilakukan dengan cara 500 μ L substrat enzim (p-nitrofenil- α -D-glukopiranososa) dengan konsentrasi 1,25; 2,5; 5; 10; 20 mM, masing-masing dicampurkan dengan 980 μ L dapar fosfat pH 7. Selanjutnya diinkubasi pada 37°C selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 500 μ L larutan enzim 0,055 U/mL, dan selanjutnya diinkubasi selama 15 menit. Setelah itu ditambahkan dengan 2000 μ L natrium karbonat 200 mM. Larutan uji diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400 nm.

b. Prosedur uji larutan blanko

Pengujian dilakukan dengan cara 500 μ L p-nitrofenil- α -D-glukopiranososa dengan konsentrasi 1,25; 2,5; 5; 10; 20 mM, masing-masing dicampurkan dengan 980 μ L dapar fosfat pH 7. Campuran diinkubasi pada 37°C selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 2000 μ L natrium karbonat 200 mM, dan diinkubasi selama 15 menit. Setelah itu ditambahkan dengan 500 μ L larutan enzim 0,055 U/mL. Larutan uji diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400 nm.

Tabel 3.1 Skema penambahan reagen uji optimasi enzim α -glukosidase

Reagen	Volume (μ L)	
	Uji	Blanko
Dapar	980	980
Substrat	500	500
Inkubasi	37°C, 5 menit	
Enzim	500	-
Na₂CO₃		2000
Inkubasi	37°C, 15 menit	
Enzim	-	500
Na₂CO₃	2000	-
Ukur absorbansi pada $\lambda=400$ nm		

c. Penafsiran data

$$\text{Unit/mL enzim} = \frac{(A_{400nm} \text{ Uji} - A_{400nm} \text{ Blanko}) \times V \times df}{18,1 \times V_e \times t} \quad (3.1)$$

$$\text{Unit/mg enzim} = \text{Unit/mL enzim} \times \frac{1}{C} \quad (3.2)$$

Keterangan:

V = Volume total

df = Faktor pengenceran

18.1 = Ekstinsi milimolar p-Nitrophenol pada 400 nm

V_e = Volume enzim (mL)

t = Waktu inkubasi (menit)

C = Banyaknya α -glukosidase dalam larutan uji (mg/mL)

Definisi Unit:

Satu unit akan melepaskan 1,0 μ mol D-glukosa dari p-nitrofenil α -D-glukosida per menit pada pH 7,0 dan suhu 37°C.

3.4.8.5 Uji aktivitas penghambatan α -glukosidase (Sugiwati, Setiasih & Afifah, 2009; Dewi, et al., 2007)

a. Pengujian kontrol C_0

Larutan C_0 berupa 1000 μ l dapar fosfat pH 7 ditambah 500 μ l substrat (p-Nitrofenil α -D-glukopiranos), kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Campuran kemudian ditambahkan 2000 μ L Na_2CO_3 200 mM dan diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Kemudian campuran tersebut ditambah 500 μ L larutan enzim yang telah diencerkan. Larutan kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm.

b. Pengujian kontrol C_1

Larutan C_1 berupa 1000 μ l dapar fosfat pH 7 dan 500 μ l p-Nitrofenil α -D-glukopiranos, kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Campuran kemudian ditambahkan 500 μ L larutan enzim yang telah diencerkan dan diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Kemudian campuran tersebut ditambah 2000 μ L Na_2CO_3 200 mM. Larutan kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm.

c. Pengujian sampel (S_1)

Larutan sampel sebanyak 20 μL ditambah dengan 980 μL dapar fosfat pH 7 dan 500 μL p-Nitrofenil α -D-glukopiranos, lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya ditambahkan 500 μL enzim yang telah diencerkan dan diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, larutan sampel ditambah 2000 μL Na_2CO_3 200 mM. Larutan sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm.

d. Pengujian sampel tanpa enzim (S_0)

Larutan sampel sebanyak 20 μL ditambah dengan 980 μL dapar fosfat pH 7 dan 250 μL p-Nitrofenil α -D-glukopiranos, lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya ditambah 2000 μL Na_2CO_3 200 mM, sampel diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai ditambahkan 500 μL enzim yang telah diencerkan. Sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm.

e. Penafsiran data

Pada setiap pengujian penghambatan α -glukosidase, pengukuran dilakukan dua kali pengulangan (duplo). Persen penghambatan diukur dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(C-S)}{C} \times 100\% \quad (3.3)$$

dimana S adalah absorbansi S_1-S_0 dan C adalah absorbansi C_1-C_0 .

Konsentrasi hambat 50% (IC_{50}) dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier, di mana sumbu x adalah konsentrasi sampel dan persentase inhibisi adalah sumbu y. Dari persamaan $y = a + bx$ didapat IC_{50} dengan menggunakan rumus:

$$IC_{50} = \frac{50-a}{b} \quad (3.4)$$

Tabel 3.2 Skema penambahan reagen uji penghambatan α -glukosidase

Larutan Reagen	C ₀ (μ L)	C ₁ (μ L)	S ₁ (μ L)	S ₀ (μ L)
Sampel	-	-	20	20
Dapar	980	980	980	980
DMSO	20	20	-	-
Substrat	500	500	500	500
Inkubasi	5 menit pada suhu 37°C			
Enzim	-	500	500	-
Na₂CO₃	2000	-	-	2000
Inkubasi	15 menit pada suhu 37°C			
Enzim	500	-	-	500
Na₂CO₃	-	2000	2000	-

3.4.8.6 Uji kinetika penghambatan α -glukosidase (Dewi, et al., 2007)

Pengujian kinetika penghambatan enzim α -glukosidase dilakukan untuk mengevaluasi tipe penghambatan dari penghambat enzim. Penghambat enzim yang digunakan adalah ekstrak sampel yang memiliki aktivitas penghambatan terkuat pada uji aktivitas penghambatan α -glukosidase. Kinetika penghambatan enzim diukur dengan melihat aktivitas enzim saat konsentrasi substrat dinaikkan. Uji Kinetika dilakukan dengan tiga konsentrasi ekstrak dan tanpa adanya ekstrak.

a. Pengujian dengan penghambat

Dapar fosfat pH 7,0 sebanyak 980 μ L dicampur dengan 500 μ L p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida dan 20 μ L larutan sampel, dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian 500 μ L larutan enzim ditambahkan ke dalam larutan tersebut. Selanjutnya larutan diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, natrium karbonat 200 mM sebanyak 2000 μ L ditambahkan untuk menghentikan reaksi enzimatik. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm.

b. Pengujian tanpa penghambat

Dapar fosfat pH 7,0 sebanyak 980 μ L dicampur dengan 500 μ L p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida dan 20 μ L DMSO, dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian 500 μ L larutan enzim ditambahkan ke dalam larutan tersebut. Selanjutnya larutan diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, natrium karbonat 200 mM sebanyak

2000 μL ditambahkan untuk menghentikan reaksi enzimatik. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm.

Tabel 3.3 Skema uji kinetika penghambatan enzim

Reagen	Volume (μL)			
	Tanpa Penghambat		Dengan Penghambat	
	C_1	C_0	S_1	S_0
Sampel	-	-	20	20
DMSO	20	20	-	-
Dapar	980	980	980	980
Substrat	500	500	500	500
Inkubasi penangas air 37°C selama 5 menit				
Enzim	500	-	500	-
Na₂CO₃	-	2000	-	2000
Inkubasi penangas air 37°C selama 15 menit				
Enzim	-	500	-	500
Na₂CO₃	2000	-	2000	-
Ukur absorbansi pada $\lambda=400$ nm				

c. Penafsiran data

Jenis inhibisi ditentukan dengan analisis data menggunakan metode Lineweaver-Burk. Konstanta Michaelis dapat ditentukan dari persamaan regresi linear $y = a + bx$, di mana

$$\frac{1}{v_i} = \left(\frac{K_m}{V_{max}}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (3.5)$$

$$\text{jika } y = 0 \rightarrow 0 = a + bx \quad (3.6)$$

$$x = -a/b = -1/K_m \quad (3.7)$$

$$K_m = b/a \quad (3.8)$$

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

Secara garis besar penelitian ini terbagi menjadi tiga tahap, yaitu tahap isolasi kapang endofit dari sampel tanaman; tahap fermentasi kapang endofit dan ekstraksi senyawa metabolit sekunder kapang endofit; dan pengujian aktivitas penghambatan α -glukosidase dari ekstrak hasil fermentasi kapang endofit.

4.1 Isolasi Kapang Endofit

Pada penelitian ini berhasil diisolasi lima koloni kapang endofit dari daun tanaman Johar (Gambar 4.1). Koloni kapang yang tubuh dianggap kapang endofit bila memiliki ciri, waktu tumbuh lebih dari 5 hari, tumbuh di sekitar sampel daun yang ditanam dan memiliki morfologi yang berbeda dari kapang yang tumbuh pada cawan petri kontrol LAF. Rincian hasil isolasi dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil Isolasi Kapang Endofit

Media	Inokulasi ke-	Cawan Petri ke-	Kode Isolat
CMM	3	2b	3.CMM.2b
PDA	5	5a	5.PDA.5a
	5	1b	5.PDA.1b
WA	4	3a	4.WA.3a
	3	5b	3.WA.5b

Keterangan : CMM = medium *Corn Meal Malt Agar*

PDA = medium *Potato Dextrose Agar*

WA = medium *Water Agar*

Proses isolasi dilakukan di media yang dapat memenuhi kebutuhan nutrisi dari kapang endofit untuk dapat tumbuh, namun mengurangi kemungkinan pertumbuhan dari kontaminan lainnya. Media isolasi yang digunakan adalah media CMM (*Corn Meal Malt Agar*), WA (*Water Agar*) dan PDA (*Potato Dextrose Agar*). Media CMM merupakan media yang umum digunakan untuk mengisolasi kapang yang berasal dari tanah atau tanaman. Media CMM

mengandung sumber karbon alami yaitu *corn meal* dan sumber nitrogen yaitu *malt extract*. Media ini mengandung karbohidrat yang sulit dicerna sehingga menguntungkan kapang endofit yang bersifat *slow grower* dalam berkompetisi dengan kapang yang bersifat *fast grower* (Anonim, 2000). Sedangkan media *Water Agar* termasuk ke dalam media lemah (*weak media*) dan terkadang lebih disukai penggunaannya karena dapat menghambat pertumbuhan kontaminan yang bersifat *fast grower* (Stone, Polishook & White, 2004).

PDA merupakan media umum yang digunakan untuk menumbuhkan kapang. PDA dapat digunakan sebagai media isolasi (Kumala, Syarmalina & Handayani, 2006) dan media peremajaan kapang endofit yang telah berhasil diisolasi. Pada media ini kapang akan lebih mudah tumbuh (Anonim, 2000).

Sterilisasi permukaan merupakan proses kritis yang harus dilakukan sebelum melakukan inokulasi sampel potongan daun ke atas media agar. Proses sterilisasi permukaan harus dapat menjamin sterilitas permukaan daun dari kontaminasi mikroorganisme. Pada penelitian ini digunakan larutan alkohol 70% dan NaOCl sebagai desinfektan pada proses sterilisasi permukaan. Mekanisme kerja dari alkohol adalah mendenaturasi protein dan melarutkan lemak pada membran protein mikroba sehingga dapat merusak sel mikroba. Proses tersebut memerlukan air sehingga alkohol 70% menunjukkan aktivitas anti mikroba yang lebih baik dibandingkan alkohol absolut (Siswandono, 1995). NaOCl merupakan desinfektan yang biasa digunakan dalam prosedur sterilisasi permukaan (Stone, Polishook & White, 2004). Zat kimia ini termasuk ke dalam golongan halogen dengan mekanisme kerja mengoksidasi gugusan sulfhidril (-SH) secara ireversibel sehingga mengganggu reaksi enzimatik pada metabolisme mikroorganisme (Volk & Wheeler, 1988).

Setiap kapang endofit yang berhasil tumbuh pada media isolasi kemudian dimurnikan dan diremajakan dengan menggunakan media PDA. Media ini merupakan media kaya yang mudah dicerna sehingga memudahkan untuk kapang endofit yang berhasil diisolasi untuk tumbuh. Peremajaan kapang endofit merupakan hal yang perlu dilakukan secara teratur untuk menjamin kapang endofit tidak berada pada fase kematian dipercepat dimana lebih banyak sel-sel yang mati daripada sel yang masih hidup (Gandjar, Syamsuridzal & Oetari, 2006).

4.2 Identifikasi Isolat Kapang Endofit

Identifikasi isolat kapang endofit dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis meliputi warna koloni, warna sebalik koloni dan morfologi koloni. Sedangkan pengamatan mikroskopis dilakukan dengan mewarnai hifa kapang dengan *Lactophenol cotton blue*. Pewarna ini mengandung fenol sehingga dapat mengdeaktivasi enzim litik seluler sehingga sel tidak mengalami lisis. *Cotton blue* merupakan pewarna asam yang dapat mewarnai kitin. Pengamatan mikroskopis ini meliputi bentuk dan warna hifa serta bentuk dan warna sel.

4.2.1 Isolat 3.CMM.2b

Koloni kapang isolat 3.CMM.2b berhasil diisolasi dari media isolasi CMM. Koloni ini memiliki warna hifa putih keabu-abuan dengan permukaan koloni kasar (tidak rata) seperti batu apung dengan tepi koloni tidak rata (Gambar 4.2). Hifa lebat pada pinggir koloni namun menipis menuju tengah koloni. Warna koloni coklat kehijauan dengan warna sebalik coklat. Pada umur sembilan hari muncul titik eksudat berwarna hitam. Koloni ini dapat tumbuh hingga berdiameter 6 cm. Pengamatan mikroskopik memperlihatkan hifa berbentuk seperti akar, berseptum dan berdinding kasar serta transparan (Gambar 4.3). Konidia berbentuk bulat atau elips dan berwarna biru. Isolat diduga termasuk ke dalam marga *Mucor*.

4.2.2 Isolat 5.PDA.5a

Koloni isolat 5.PDA.5a berwarna putih dengan hifa kaku berwarna putih. Permukaan koloni membentuk gelombang seperti kelopak bunga dengan bagian tepi tidak rata (Gambar 4.4). Koloni sebalik berwarna putih susu. Pengamatan mikroskopis memperlihatkan bentuk hifa halus menyerupai rambut dan memiliki septum. Konidia berwarna biru dan berbentuk lonjong (Gambar 4.5). Isolat belum dapat teridentifikasi.

4.2.3 Isolat 5.PDA.1b

Koloni memiliki permukaan dengan warna hijau kehitaman dan membentuk lingkaran konsentris (Gambar 4.6). Koloni sebalik juga berwarna hijau kehitaman dengan tepi koloni tidak rata. Hifa berwarna hijau kehitaman dan berbentuk seperti beludru. Pada pengamatan mikroskopis hifa tampak transparan walaupun setelah diwarnai dengan LFCB. Konidia membentuk rantai, berwarna pucat atau transparan dan berdinding halus (Gambar 4.7). Konidia bersel satu, berbentuk elips atau mirip dengan buah jeruk lemon. Isolat diduga berasal dari marga *Cladosporium*.

4.2.4 Isolat 3.WA.5b

Koloni isolat 3.WA.5b memiliki hifa berwarna putih seperti kapas, menyebar dengan pola dari pusat membentuk lapisan hifa tipis kemudian hifa halus dan panjang pada bagian lingkaran luar dengan bagian tepi rata (Gambar 4.8). Koloni sebalik berwarna putih susu. Pengamatan mikroskopis memperlihatkan konidia (makrokonidia) dengan ujung tumpul, transparan, dengan warna dinding sel kebiruan (Gambar 4.9). Isolat diduga berasal dari marga *Fusarium*.

4.2.5 Isolat 4.WA.3a

Koloni kapang berwarna putih hingga krem dengan permukaan dan pinggir koloni tidak rata. Hifa pendek sekali sehingga tidak tampak pada pengamatan secara makroskopis (Gambar 4.10). Koloni sebalik berwarna putih hingga krem. Pada pengamatan secara mikroskopis miselium berwarna biru dan tampak seperti rambut. Konidia berbentuk bulat berwarna biru (Gambar 4.11). Isolat belum dapat teridentifikasi.

4.3 Fermentasi Kapang Endofit

Proses fermentasi dilakukan dalam media PDY yang merupakan campuran dari PDB (*Potato Dextrose Broth*) dan *yeast extract* pada kondisi suhu kamar dengan pH 6-7. Fermentasi dilakukan selama tujuh hari disertai agitasi dengan kecepatan 120 rpm (Kumala, Syarmalina & Handayani, 2006). Satu kali proses

fermentasi menghasilkan 500 mL kultur fermentasi yang selanjutnya dilakukan ekstraksi untuk memperoleh senyawa metabolit aktif dari kapang endofit.

Media fermentasi yang digunakan adalah PDY (*Potato Dextrose Yeast*) yang mengandung *potato dextrose broth* sebagai sumber karbon dan *yeast extract* sebagai sumber nitrogen. Fermentasi dilakukan pada suhu kamar selama tujuh hari dan disertai dengan pengocokan (agitasi) dengan kecepatan 120 rpm (Kumala Kumala, Syarmalina & Handayani, 2006). Fungsi dari pengocokan ini adalah untuk meningkatkan aerasi dari kultur fermentasi dan dispersi dari miselium (Hanson, 2008). Kalsium karbonat ditambahkan ke dalam media untuk menjaga stabilitas pH dari kultur fermentasi.

Fermentasi merupakan suatu proses yang berkaitan dengan pembentukan energi serta pembentukan metabolit yang berguna oleh biomassa mikroorganisme (Stanbury, Whitaker & Hall, 1994). Fermentasi kapang endofit dilakukan dengan menggunakan media PDY yang berupa media cair (*submerged culture*). Penggunaan media cair dibandingkan dengan media padat memiliki keuntungan yaitu lebih mudah dikerjakan secara aseptis dan lebih cocok untuk proses fermentasi dalam skala besar (Stanbury, Whitaker & Hall, 1994). Proses fermentasi bertujuan untuk menghasilkan sel kapang endofit dalam jumlah banyak sehingga mengoptimalkan senyawa metabolit yang dihasilkan.

Fase pertumbuhan dari kapang endofit yang akan difermentasi merupakan faktor penting yang harus diperhatikan. Fase pertumbuhan kapang dapat dilihat pada Gambar 4.12. Metabolit sekunder dari kapang dapat dipanen pada fase stasioner dari pertumbuhan kapang (Gandjar, Syamsuridzal & Oetari, 2006). Proses fermentasi dilakukan selama tujuh hari dimana kapang endofit diperkirakan sudah mencapai fase stasioner dalam jangka waktu demikian. Hal ini didukung oleh penelitian Kumala (2006) pada kapang endofit dari ranting tanaman Johar yang menghasilkan senyawa antimikroba.

4.4 Ekstraksi Hasil Fermentasi Kapang Endofit

Setiap 25 mL kultur fermentasi diekstraksi dengan 15 mL pengeksrak. Supernatan dipisahkn dari biomassa dengan cara mensentrifus campuran pengeksrak dan kultur fermentasi. Supernatan kemudian dikeringkan sehingga didapatkan ekstrak kental untuk selanjunya diuji aktivitasnya (lihat Tabel 4.2)

Tabel 4.2 Perolehan Berat Ekstrak Isolat Kapang Endofit

Kode Isolat	Ekstrak		
	Air	Etil Asetat	Metanol
3.CMM.2b	768,9 mg	11,0 mg	240,7 mg
5.PDA.5a	700,7 mg	25,6 mg	356,2 mg
5.PDA.1b	856,4 mg	127,6 mg	616,0 mg
4.WA.3a	673,8 mg	67,7 mg	198,9 mg
3.WA.5b	890,6 mg	90,3 mg	239,4 mg

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut yang biasa digunakan untuk mengekstraksi senyawa kimia dari sumber-sumber bahan alam lainnya. Dari proses ekstraksi didapatkan tiga ekstrak, yaitu ekstrak air, ekstrak metanol dan ekstrak etil asetat. Hasil fermentasi diekstraksi dengan menggunakan pelarut organik yang bersifat semi polar hingga polar. Senyawa penghambat α -glukosidase pada umumnya adalah senyawa semi polar hingga polar yang memiliki ikatan glikosida pada strukturnya (Borges de Melo, Gomes & Carvalho, 2006). Oleh karena itu senyawa yang diharapkan dapat diekstraksi dari hasil fermentasi kapang endofit adalah senyawa yang bersifat semi polar hingga polar. Ekstraksi menggunakan dua pelarut organik yaitu etil asetat dan metanol. Selain itu, metabolit sekunder juga diambil dari fraksi air dari suspensi koloni kapang endofit. Campuran pengeksrak dengan suspensi koloni kapang endofit dihomogenkan dengan *vortex mixer* lalu disentrifus pada kecepatan 3000 rpm. Setiap ekstrak dikeringkan di atas *waterbath* dengan suhu 30-40°C, kecuali ekstrak air dikeringkan dengan metode liofilisasi.

4.5 Pemeriksaan Pola Kromatogram Ekstrak dengan Metode KLT

Pemeriksaan pola kromatogram dilakukan pada Ekstrak dengan aktivitas penghambatan terhadap α -glukosidase terbaik. Hasil pengujian dengan menggunakan eluen heksana-etil asetat 7:3 menghasilkan dua bercak dengan nilai Rf 0,18 dan 0,61 (Gambar 4.13). Elusi dengan menggunakan campuran eluen heksana-etil asetat 4:6 menghasilkan tiga bercak dengan nilai Rf 0,14; 0,55; 0,71 (Gambar 4.14). Kemudian didapatkan empat bercak hasil elusi dari campuran eluen heksana-etil asetat-aseton 1:4:2 dengan nilai Rf 0,18; 0,48; 0,80; 0,89 (Gambar 4.15). Lima bercak dihasilkan dari hasil elusi dengan campuran eluen heksana-etil asetat dengan perbandingan 2:8 dengan nilai Rf masing-masing bercak adalah 0,05; 0,18; 0,36; 0,63; 0,9 (Gambar 4.16).

Pemeriksaan pola kromatogram bertujuan untuk mengetahui jumlah senyawa yang mungkin ada dalam ekstrak serta mengetahui harga Rf nya masing-masing. Hasil elusi dari metode ini belum dapat digunakan untuk mengetahui golongan senyawa yang ada dalam ekstrak karena belum ada referensi yang menyatakan golongan senyawa yang ada dalam kandungan ekstrak hasil fermentasi kapang endofit daun Johar.

Pemeriksaan kandungan senyawa dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis menunjukkan bahwa dalam satu ekstrak terdapat lebih dari satu komponen senyawa yang terkandung di dalamnya. Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan campuran eluen dengan derajat polaritas yang berbeda yaitu dari campuran yang lebih bersifat non polar hingga campuran yang bersifat lebih polar. Pemisahan terbaik didapat dari campuran eluen etil asetat-heksana 8:2 yang menghasilkan lima bercak pada pengamatan di bawah sinar UV 366 nm. Selanjutnya bercak yang dihasilkan menurun seiring dengan menurunnya polaritas dari campuran eluen. Fase diam yang digunakan adalah silika gel F₂₅₄ yang bersifat polar. Komponen senyawa yang terdapat pada ekstrak ini kemungkinan bersifat polar karena lebih mudah terpisah bila digunakan campuran eluen yang bersifat polar dibandingkan dengan eluen yang bersifat non polar. Hal ini sesuai dengan hasil yang diharapkan karena pada umumnya senyawa penghambat enzim α -glukosidase adalah senyawa mirip gula yang bersifat semi polar hingga polar (Borges de Melo, Gomes & Carvalho, 2006).

4.6 Uji Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase

Uji aktivitas penghambatan terhadap enzim α -glukosidase secara umum dibagi menjadi tiga tahap, yaitu uji pendahuluan yang merupakan optimasi kerja enzim, uji aktivitas penghambatan α -glukosidase dari sampel dan standar, serta evaluasi kinetika penghambatan enzim yang bertujuan untuk mengetahui jenis penghambatan dari sampel.

4.6.1 Uji Pendahuluan

Dari hasil pengujian ini diperoleh hasil bahwa aktivitas enzim paling optimal pada konsentrasi substrat sebesar 10 mM (lihat Tabel 4.3).

Tabel 4.3 Hasil Optimasi Kerja Enzim

Unit enzim	Konsentrasi Substrat		Absorbansi	U-K	Aktivitas Enzim
0,055 U/mL	20 Mm	Uji	1,852	1,796	1,89 U/mL
		Kontrol	0,056		45 U/mg
	10 Mm	Uji	1,9885	1,9625	2,07 U/mL
		Kontrol	0,026		49,17 U/mg
	5 mM	Uji	1,92	1,910	2,01 U/mL
		Kontrol	0,010		47,86 U/mg
	2,5 Mm	Uji	1,2505	1,242	1,31 U/mL
		Kontrol	0,0085		31,12 U/mg
	1,25 Mm	Uji	1,2305	1,228	1,29 U/mL
		Kontrol	0,0025		30,77 U/mg

Dari hasil pengujian didapatkan kesimpulan bahwa enzim bekerja paling optimal pada konsentrasi substrat sebesar 10 mM dengan konsentrasi enzim 0,055 U/mL. Pada Gambar 4.17 terlihat titik puncak pada grafik aktivitas enzim adalah pada saat konsentrasi substrat sebesar 10 mM. Pada konsentrasi tersebut enzim berada pada titik jenuh dimana semua tempat ikatan substrat pada enzim terisi penuh sehingga penambahan substrat tidak akan mempengaruhi laju reaksi enzimatik (Murray, Granner & Rodwell, 2009).

4.6.2 Pengujian Standar

Standar penghambat α -glukosidase yang digunakan adalah akarbose. Pengujian standar dilakukan dengan cara yang sama dengan pengujian sampel. Dari hasil pengujian standar akarbose didapat nilai IC_{50} sebesar 503,91 ppm. Berdasarkan penelitian terdahulu diketahui bahwa akarbose memiliki aktivitas penghambatan yang rendah terhadap enzim α -glukosidase yang berasal dari mikroba dibandingkan dengan enzim α -glukosidase yang berasal dari mamalia (Kim, Nam, Kurihara & Kim, 2008). Fenomena ini terjadi sama seperti pada penelitian ini yang menggunakan enzim α -glukosidase yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae*.

4.6.3 Uji Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase

Hasil uji aktivitas penghambatan α -Glukosidase memperlihatkan sembilan ekstrak memiliki IC_{50} lebih kecil daripada IC_{50} akarbose (lihat Tabel 4.4). Ekstrak etil asetat dari isolat 5.PDA.5a memiliki aktivitas penghambatan yang paling potensial dengan IC_{50} 28,4 ppm.

Tabel 4.4 Nilai IC_{50} Hasil Fermentasi Isolat Kapang Endofit

No.	Isolat	Ekstrak	IC_{50} (ppm)
1	5.PDA.5a	Air	9126,20
		Metanol*	397,06
		Etil asetat*	28,40
2	3.CMM.2b	Air	1132,87
		Metanol*	227,03
		Etil asetat*	262,46
3	5.PDA.1b	Air*	277,07
		Metanol	1335,18
		Etil asetat*	243,34

Keterangan: *) Ekstrak yang memiliki aktivitas lebih baik dari akarbose (IC_{50} kurang dari 503,91 ppm).

(Lanjutan)

No.	Isolat	Ekstrak	IC ₅₀ (ppm)
4	4.WA.3a	Air	1115,93
		Metanol	620,18
		Etil asetat*	157,94
5	3.WA.5b	Air	627,74
		Metanol*	416,67
		Etil asetat*	127,43

Keterangan: *) Ekstrak yang memiliki aktivitas lebih baik dari akarbose (IC₅₀ kurang dari 503,91 ppm).

Pada hasil uji aktivitas penghambatan α -glukosidase dari standar akarbose didapatkan nilai IC₅₀ sebesar 503,91 ppm. Nilai IC₅₀ dari akarbose ini digunakan sebagai perbandingan terhadap nilai IC₅₀ dari sampel uji. Pada pengujian sampel didapat ekstrak dengan nilai IC₅₀ paling rendah adalah ekstrak etil asetat dari isolat 5.PDA.5a yaitu sebesar 28,40 ppm. Sedangkan ekstrak dengan aktivitas penghambatan α -glukosidase yang lebih baik dari standar akarbose adalah ekstrak metanol dari isolat 3.CMM.2b, 5.PDA.5a dan 3.WA.5b; ekstrak air dari isolat 5.PDA.1b; dan ekstrak etil asetat dari isolat 3.CMM.2b, 5.PDA.1b, 3.WA.5b dan 4.WA.3a. Semua ekstrak etil asetat memiliki nilai IC₅₀ yang lebih kecil daripada IC₅₀ akarbose, hal ini menunjukkan bahwa senyawa-senyawa yang dapat menghambat enzim α -glukosidase tertarik dengan baik oleh etil asetat.

Pada penelitian ini, terdapat ekstrak yang memiliki aktivitas penghambatan yang lebih baik dari pada akarbose. Hal ini dapat disebabkan oleh efek sinergis dari senyawa-senyawa yang terdapat dalam ekstrak (Kim, Nam, Kurihara & Kim, 2008). Hal ini didukung oleh hasil elusi ekstrak dengan kromatografi lapis tipis memperlihatkan adanya lebih dari satu senyawa dalam satu ekstrak. Senyawa-senyawa ini dapat saling berefek sinergis dengan tipe penghambatan enzim yang juga dapat berbeda. Selain itu, penelitian terdahulu menunjukkan bahwa akarbose ternyata memiliki aktivitas penghambatan yang rendah terhadap enzim α -glukosidase yang berasal dari mikroba (Kim, Nam, Kurihara & Kim, 2008). Perbedaan aktivitas penghambatan yang disebabkan karena asal enzim α -glukosidase mungkin dipengaruhi oleh spesifitas substrat dari enzim. Aktivitas

penghambatan yang baik oleh beberapa ekstrak hasil fermentasi dari isolat kapang endofit ini berpotensi dikembangkan lebih lanjut sebagai agen terapi anti diabetes.

Pada penelitian ini terdapat kelemahan dimana nilai serapan yang diperoleh dari hasil pengukuran cukup besar (lihat Lampiran 5). Nilai serapan yang besar dapat menyebabkan bias pada hasil pengukuran sehingga nilai serapan yang didapat mungkin saja tidak menggambarkan nilai yang sebenarnya. Serapan yang terbaca pada spektrofotometer UV-Vis hendaknya berada dalam kisaran 0,2-0,8 dimana persen kesalahan pembacaan tidak lebih dari 0,5% (Gandjar & Rohman, 2007). Meskipun demikian, data hasil penelitian ini masih dapat diterima karena merupakan data awal dari proses skrining uji penghambatan α -glukosidase yang dapat menjadi acuan untuk penelitian lebih lanjut.

4.6.4 Uji Kinetika Penghambatan Enzim

Pengujian kinetika penghambatan enzim menghasilkan grafik yang menunjukkan jenis penghambatan kompetitif terdapat pada ekstrak etil asetat dari 5.PDA.5a pada konsenrasi ekstrak 25 ppm (lihat Gambar 4.18). Evaluasi kinetika penghambatan enzim dilakukan dengan cara melihat aktivitas enzim saat konsentrasi substrat dinaikkan. Uji Kinetika dilakukan dengan tiga konsentrasi ekstrak dan tanpa adanya ekstrak. Pada konsentrasi ekstrak sebesar 25 ppm menunjukkan tipe penghambatan kompetitif dimana grafik menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi substrat maka aktivitas enzim akan semakin besar sehingga akan sama dengan aktivitas enzim tanpa inhibitor. Hal ini terjadi karena terjadi pergeseran konstanta kesetimbangan antara enzim-inhibitor akibat semakin besarnya konsentrasi dari substrat. Penghambat kompetitif pada umumnya memiliki struktur yang mirip dengan substrat sehingga dapat menggantikan substrat pada tempat ikatannya di enzim (Murray, Granner & Rodwell, 2009).

Jenis penghambatan juga dapat diketahui dari nilai K_m suatu penghambat. Suatu penghambat kompetitif akan meningkatkan nilai K_m , namun tidak merubah nilai V_{max} . Sebaliknya, suatu penghambat non kompetitif akan menurunkan nilai V_{max} , namun tidak mempengaruhi nilai K_m (Murray, Granner & Rodwell, 2009). Pada penelitian ini diperoleh nilai K_m yang berbeda-beda pada tiap konsentrasi ekstrak yang diberikan (Tabel 4.5). Hasil ini memperlihatkan adanya tipe

penghambatan campuran pada ekstrak. Hal ini bisa dimungkinkan karena pada satu ekstrak dapat terdiri dari lebih dari satu senyawa yang terkandung di dalamnya.

Tabel 4.5 Nilai Km setiap Konsentrasi Ekstrak

Konsentrasi Ekstrak	Persamaan Garis	Nilai Km
Tanpa inhibitor	$y = 0,6911x + 0,479$	1,4419
25 ppm	$y = 0.3003x + 0,5874$	0,5112
12,5 ppm	$y = 0,7614x + 0,6949$	1,0957
6,25 ppm	$y = 8,9935x + 0,0801$	112,28



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Kapang endofit yang berhasil diisolasi dari daun Johar (*Cassia siamea* Lamk.) sebanyak lima isolat.
2. Sembilan ekstrak dari lima isolat kapang endofit yang memiliki nilai IC_{50} lebih kecil daripada nilai IC_{50} akarbose, dengan nilai IC_{50} terkecil yaitu sebesar 28,40 ppm.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan oleh penulis adalah:

1. Melakukan identifikasi molekular terhadap kapang endofit yang memiliki aktivitas penghambatan α -glukosidase yang potensial.
2. Melakukan optimasi produksi senyawa penghambat α -glukosidase
3. Melakukan isolasi senyawa yang terkandung dalam ekstrak dari isolat kapang endofit, serta elusidasi struktur senyawa dari ekstrak yang memiliki aktivitas penghambatan yang potensial.

DAFTAR ACUAN


- Ajaiyeoba, E.O., J. S. Ashidi, L. C. Okpako, P. J. Houghton dan C. W. Wright. (2008). Antiplasmodial compounds from *Cassia siamea* stem bark extract. *Phytoteraphy Research* 22(2), 254-255.
- Anonim. (2000). 4 Februari 2011, Culture Media for Fungi: <http://www.classes.plantpath.wsu.edu/plp521/word%20documents/421.media.doc>.
- Bnouham, M., A. Ziyat, H. Mekhfi, A. Tahri dan A. Leggsyer. (2006). Medicinal plants with potential antidiabetic activity – a review of ten years of herbal medicine research (1999-2000). *International Journal of Diabetes & Metabolism* 14, 1-25.
- Borges de Melo, E., A. S. Gomes dan I. Carvalho. (2006). α - and β -glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron* 62, 10277-10302.
- Chen, H., X. Yan, W. Lin, L. Zheng dan W. Zhang. (2004). A new method for screening α -glucosidase inhibitors and application to marine microorganisms. *Pharmaceutical Biology* 42(6), 416-421.
- Codario, R. A. (2011). *Type 2 Diabetes, Pre-Diabetes, and the Metabolic Syndrome 2nd Edition*. New York: Humana Press.
- Coopan, R. (2008). Rationale and goals for glucose control in diabetes mellitus and glucose monitoring. In B. J. Goldstein dan D. Muller-Wieland (Ed.). *Type 2 diabetes principles and practice second edition* (hlm. 27-43). New York: Informa Healthcare USA Inc.
- Corwin, E. (1996). *Buku saku patofisiologi*. Jakarta: EGC
- Departemen Kesehatan. (1995). *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Dewi, R. T., Y. M. Iskandar, M. Hanafi, L. B. S. Kardono, M. Angelina, I. D. Dewijanti dan S. D. S. Banjarnahor. (2007). Inhibitory effect of koji *Aspergillus terreus* on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10(8), 3131-3135.

- Dipiro, Joseph T. (2005). *Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach sixth edition*. New York : McGraw-Hill.
- Gandjar, I., W. Syamsuridzal dan A. Oetari. (2006). *Mikologi dasar dan terapan*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Gandjar, I., R. A. Samson, K. van den Tweel-Vermeulen, A. Oetari dan I. Santoso. (1999). *Pengenalan kapang tropik umum*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Gandjar, I. G. dan A. Rohman. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar Yogyakarta
- Hanefeld, M. (2008). Alpha-glucosidase inhibitors. In B. J. Goldstein dan D. Muller-Wieland (Ed.). *Type 2 diabetes principles and practice second edition* (hlm. 27-43). New York: Informa Healthcare USA Inc.
- Harmita. (2006). *Buku ajar analisis fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Hanson, J. R. (2008). *The Chemistry of Fungi*. Cambridge: RCS Publishing.
- Ingavat, N.,J. Dobereiner, S. Wiyakrutta, C. Mahidol, S. Ruchirawat dan P. Kittakoop. (2009). Aspergillusol A, an α -glucosidase inhibitor from marine-derived fungus *Aspergillus aculeatus*. *Journal of Natural Products* 72, 2049-2052.
- John, R. A. (2002). Photometric assays. In R. Eisenthal dan M. J. Danson (Ed.). *Enzyme assays* (hlm. 49-77). Oxford: Oxford University Press.
- Kardono, L. B. S., N. Artanti, I. D. Dewiyanti dan T. Basuki. (2003). *Selected Indonesian plants: monographs and descriptions vol. 1* (hlm. 183-199). Jakarta: Gramedia.
- Kaur, G., M. S. Alam, Z. Jabbar, K. Javed dan M. Athar. (2006). Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers. *Journal of Ethnopharmacology* 108(3), 340-348.
- Kim, K. Y., K. A. Nam, H. Kurihara dan S. M. Kim. (2008). Potent α -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*. *Phytochemistry* 69, 2820-2825.
- Kimura, A. (2000). Molecular Anatomy of α -Glucosidase. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 12(68), 373-380.

- Kogel, K. H., P. Franken dan R. Huckelhoven. (2006). Endophyte or parasite – what decides? *Current Opinion in Plant Biology* 9, 358-363.
- Kumala, S., Syarmalina dan A. R. Handayani. (2006). Isolasi dan Uji Antimikroba Substansi Bioaktif Mikroba Endofit Ranting Tanaman Johar (*Cassia siamea* Lamk.). *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* 4(1), 8-14.
- Kumar, S., V. Kumar dan O. Prakash. (2010). Antidiabetic and anti-lipemic effects of *Cassia siamea* leaves extract in streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pasific Journal of Tropical Medicine*, 871-873.
- Kusmardi, S. Kumala dan D. Wulandari. (2006). Pengaruh pemberian ekstrak etanol daun johar (*Cassia siamea* Lamk.) terhadap peningkatan aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag. *Makara Kesehatan* 10(2), 89-93.
- Kumala, S. dan E. B. Siswanto. (2007). Isolation and screening of endophytic microbes from *Morinda citrifolia* and their ability to produce anti-microbial substances. *Microbiology Indonesia* 1(3), 145-148.
- Murray R. K., D. K. Granner dan V. W. Rodwell. (2009). *Biokimia Harper*. Jakarta: EGC.
- Morita, H., S. Oshimi, Y. Hirasawa, K. Koyama, T. Honda, W. Ekasari, G. Indrayanto dan N. C. Zaini. (2007). Cassiarins A and B, novel antiplasmodial alkaloids from *Cassia siamea*. *Organic Letters* 9(18), 3691-3693.
- Najib, A. *Isolasi dan identifikasi senyawa aktif inhibitor α -glucosidase dari fraksi n-butanol rimpang Acorus calamus L.* Tesis Departemen Farmasi UI. Depok: Universitas Indonesia, 2010: 24-26.
- Ntandou, G. F. N., J. T. Banzouzi, B. Mbatchi, R. D. G. Elion-Itou, A. W. Eou-Ossibi, S. Ramos, F. Benoit Vical, A. A. Abena dan J. M. Oumba. (2010). Analgesic and anti-inflammatory effects of *Cassia siamea* Lam. stem bark extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 127(1), 108-111.
- Ono, T., J. Taniguchi, H. Mitsumaki, F. Takahata, A. Shibuya, Y. Kasahara dan F. Koshimizu. (1988). A new enzymatic assay of chloride in serum. *Clinical Chemistry* 34(3), 552-553.
- Radji, M. (2005). Peranan bioteknologi dan mikroba endofit dalam pengembangan obat herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 2(3), 113-126.


- Rao, M. U., M. Sreenivasulu, B. Cengaiyah, K. J. Reddy dan C. M. Chetty. (2010). Herbal medicines for diabetes: a review. *International Journal of PharmTech Research*. 2(3), 1883-1892.
- Rauscher, E., U. Neumann, E. Schalch, S. von Bulow dan A. W. Wahlefeld. (1985). Optimized conditions for determining activity concentration of α -amilase in serum, with 1,4- α -D-4-Nitrophenylmaltoheptaoside as substrate. *Clinical Chemistry* 31(1), 14-19.
- Riset dan Teknologi Indonesia. (2002). *Inventaris Tanaman Obat Jilid 1-5 Seri RISTEK* (CD-ROM Melestarikan Warisan Budaya Bangsa Seri ke-1). Jakarta: Kementerian Riset dan Teknologi.
- Salahudin, M. dan S. S. Jalapure. (2009). Evaluation of antidiabetic activity of *Cassia glauca* Lam. leaf in streptozotocin induced diabetic rats. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics* 9(1), 29-33.
- Siswandono, S. B. (1995). *Kimia Medisinal*. Surabaya: Airlangga University Press
- Sivaraj, A., K. Devi, S. Palani, P. V. Kumar, B. S. Kumar dan E. David. (2009). Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effect of combined plant extract of *Cassia auriculata* and *Aegle marmelos* in streptozotocin (STZ) induced diabetic albino rats. *International Journal of PharmTech Research* 1(4), 1010-1016.
- Smith, Y. R. A. (2009). Determination of chemical composition of *Senna-siamea* (*Cassia* leaves). *Pakistan Journal of Nutrition* 8(2), 119-121.
- Stanbury, P. F., A. Whitaker dan S. J. Hall. (1994). *Principles of fermentation technology*. Burlington: Elsevier Science Ltd.
- Stone, J. K., J. D. Polishook dan J. F. White Jr. (2004). Endophytic fungi. In M. S. Foster, G. F. Bills dan G. M. Mueller (Ed.). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods* (hlm. 241-270). Burlington: Elsevier Academic Press.
- Strobel, G. dan B. Daisy. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4), 491-502.

- Sugiwati, S., S. Setiasih dan E. Afifah. (2009). Antihyperglycemic activity of the mahkota dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.] leaf extracts as an alpha glucosidase inhibitor. *Makara Kesehatan* 13(2), 74-78.
- Suherman, S. K. (2007). Insulin dan antidiabetik oral. In Sulistia Gan Gunawan (Ed.). *Farmakologi dan terapi* (hlm. 481-495). Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran-Universitas Indonesia.
- Tan, R. X. dan W. X. Zou. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolite. *National Product Reports* 18, 448-459.
- van de Laar, F. A. (2008). Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vascular Health and Risk Management* 4(6): 1189-1195.
- Verma, L., A. Khatri, B. Kaushik, U. K. Patil dan R. S. Pawar. (2010). Antidiabetic activity of *Cassia occidentalis* (Linn) in normal and aloxan-induced diabetic rats. *Indian Journal of Pharmacology* 42(4), 224-228.
- Volk W. A. dan Wheeler M. F. (1988). *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Wild, Sarah, Gojka Roglid, Anders Green, Richard Sicree, dan Hilary King. (2004). Global prevalence of diabetes. *Diabetes Care* 27(5), 1047-1053.
- Wild, S., G. Roglid, A. Green, R. Sicree dan H. King. (2004). Global prevalence of diabetes. *Diabetes Care* 27(5), 1047-1053.



Lampiran

Lampiran 1. Hasil Determinasi Sampel Tanaman



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(Indonesian Institute of Sciences)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
(Research Center for Biology)

Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong
Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

Cibinong, 21 Januari 2011

Nomor : 085/IPH.1.02/If.8/1/2011
Lampiran : -
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan


Kepada Yth.
Bpk./Ibu/Sdr(i). M.Gama Ramadhan
NPM : 0706163382
Mhs. Univ. Indonesia
Fak. MIPA
Kampus UI Depok - 16424

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1		<i>Cassia siamea</i> Lam.	Fabaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.


Kepala Bidang Botani
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,
Prof. Dr. Eko Baroto Walujo
NIP. 195111041975011001

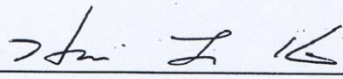
D:\Ident 2010\M.Gama Ramadhan.doc\JJA-DG

Page 1 of 1


Lampiran 2. Sertifikat Analisis Akarbose

ANALYTICAL ITEMS	RESULTS	SPECIFICATIONS
Description	Complies	White or yellowish, amorphous powder
1) Solubility	Complies	Very soluble in water, soluble in methanol, practically insoluble in methylene chloride
Identification		
1) IR	Positive	Positive
2) HPLC	Positive	Positive
Specific optical rotation (as anhydrous substance)	+172.50°	+168° ~ +183°
Absorbance	0.008	Not more than 0.15
Heavy metals	Complies	Not more than 20 ppm
Sulphated ash	0.01%	Not more than 0.2%
pH	6.62	5.5 ~ 7.5
Water	1.17%	Not more than 4.0%
Related substances		
1) Impurity A	< 0.1%	Not more than 0.6%
2) Impurity B	0.10%	Not more than 0.5%
3) Impurity C	0.72%	Not more than 1.5%
4) Impurity D	< 0.1%	Not more than 1.0%
5) Impurity E	Non-detected	Not more than 0.2%
6) Impurity F	Non-detected	Not more than 0.3%
7) Impurity G	Non-detected	Not more than 0.3%
8) Impurity H	< 0.1%	Not more than 0.2%
9) Any other impurity	0.06%	Not more than 0.2%
10) Total impurities	0.82%	Not more than 3.0%
Assay (as anhydrous substance)	99.12%	95.0% ~ 102.0%
Residual solvents		
1) Acetone	4 ppm	Not more than 5000 ppm
2) Ethyl acetate	Non-detected	Not more than 5000 ppm

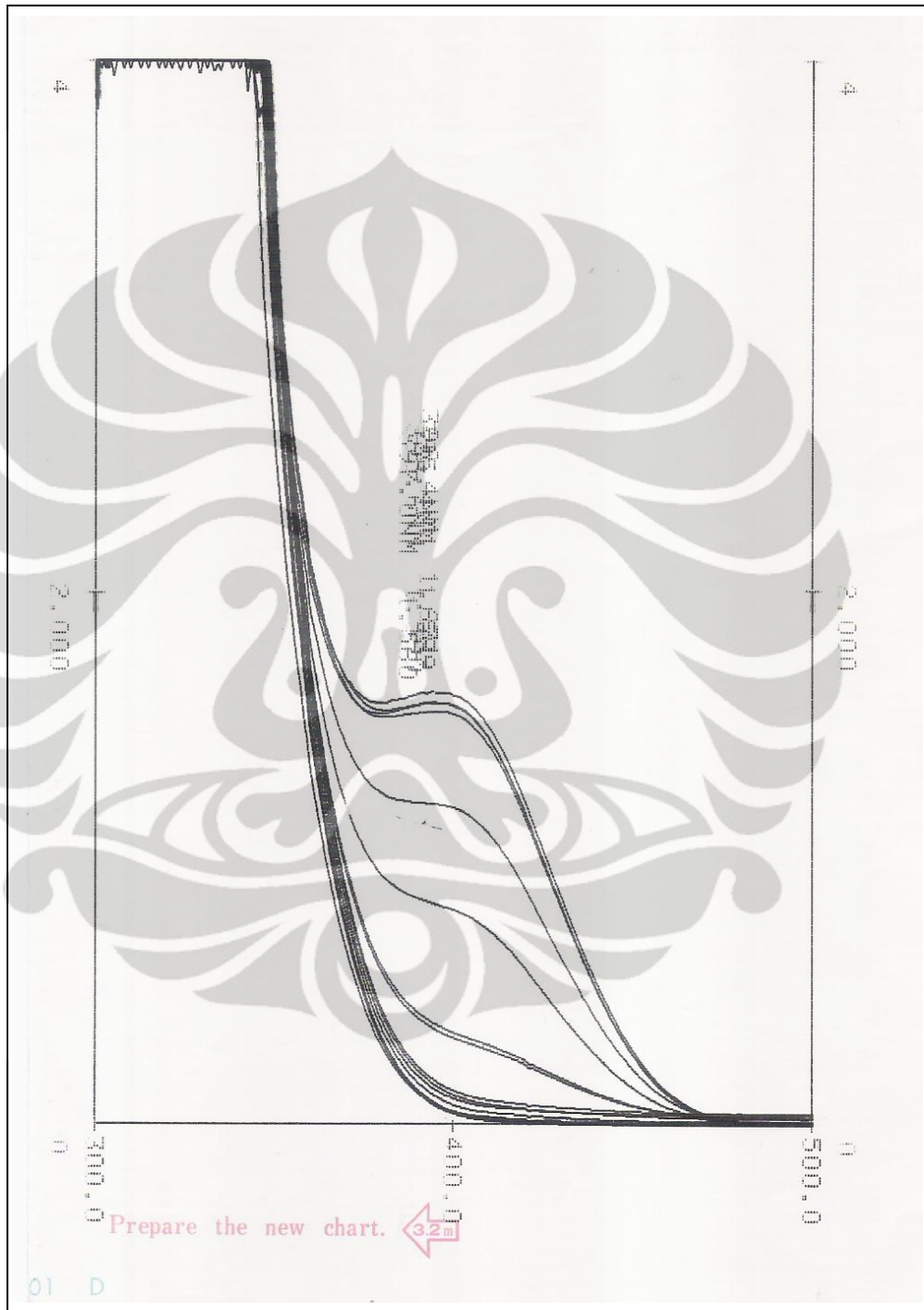
※ We certify that the quality of this product conforms to EP.
 ※ This batch was analysed and released by our authorized Quality Assurance Department and was found to meet the specifications as given above.
 ※ Store in an airtight container at a temperature not exceeding 25 °C.


 Han Jun Kim, General Manager
 Quality Assurance Dept.

Lampiran 3. Sertifikat Analisis Enzim α -Glukosidase

Certificate of Analysis		
SIGMA-ALDRICH		
Product Name	α -Glucosidase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , recombinant, expressed in unspecified host, lyophilized powder, ≥ 125 units/mg protein	
Product Number	G0660	
Product Brand	SIGMA	
CAS Number	9001-42-7	
TEST	SPECIFICATION	LOT 129K1426 RESULTS
% Protein (Biuret)	≥ 10	26
units/mg protein	≥ 125	179
	One unit will liberate 1.0 micromole of D-Glucose from P-Nitrophenyl Alpha-D-Glucoside per minute at pH 6.8 at 37 deg C.	
units/mg protein	≥ 50	114
	One unit will convert 1.0 micromole of Maltose to 2.0 micromoles of D-Glucose per minute at pH 6.0 at 25 deg C.	
Recommended Retest Period	-----	-----
	4 years	
Specification Date:		APR 2009
Date of QC Release:		JAN 2010
Recommended Retest Date:		DEC 2013
Print Date:		JAN 25 2010
 Rodney Burboch, Manager Quality Control St. Louis, Missouri USA		

Lampiran 4. Spektrum serapan aktivitas penghambatan α -glukosidase dari ekstrak etil asetat isolat 5.PDA.5a



Lampiran 5. Data Pengukuran Absorbansi

Tabel 1 Hasil Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Isolat 5.PDA.5a

Ekstrak	Konsentrasi (ppm)	Serapan	Inhibisi (%)	Pers. garis	IC ₅₀ (ppm)
Air	Blanko	1,7585	-	$y = 0,0054x + 0,7158$	9126,20
	50	1,741	0,9952		
	25	1,743	0,8814		
	12,5	1,744	0,8246		
	6,125	1,746	0,7108		
Metanol	Blanko	1,5985	-	$y = 0,1239x + 0,8037$	397,06
	50	1,4705	8,0075		
	25	1,5645	2,1270		
	12,5	1,575	1,4701		
	6,25	1,544	3,4094		
Etil asetat	Blanko	1,8435	-	$y = 1,6148x + 4,1379$	28,40
	50	0,213	88,4459		
	25	0,902	51,0713		
	12,5	1,502	18,5245		
	6,25	1,5075	18,2262		

Tabel 2 Hasil Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Isolat 3.CMM.2b

Ekstrak	Konsentrasi (ppm)	Serapan	Inhibisi (%)	Pers. garis	IC ₅₀ (ppm)
Air	Blanko	2,1412	-	$y = 0,0442x - 0,0729$	1132,87
	50	2,0725	3,2085		
	25	2,1355	0,2662		
	12,5	2,1265	0,6865		
	6,25	2,123	0,8500		
Metanol	Blanko	1,7585	-	$y = 0,195x + 5,7299$	227,03
	50	1,4715	16,3207		
	25	1,5685	10,8047		
	12,5	1,624	7,6486		
	6,25	1,623	7,7054		
Etil asetat	Blanko	1,8435	-	$y = 0,1452x + 11,891$	262,46
	50	1,4715	20,1790		
	25	1,5675	14,9715		
	12,5	1,5755	14,5376		
	6,25	1,6065	12,8560		

(Lanjutan)

Tabel 3 Hasil Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Isolat 5.PDA.1b

Ekstrak	Konsentrasi (ppm)	Serapan	Inhibisi (%)	Pers. garis	IC ₅₀ (ppm)
Air	Blanko	1,9655	-	$y = 0,1441x + 10,074$	277,07
	50	1,593	18,9519		
	25	1,751	10,9133		
	12,5	1,7225	12,3633		
	6,25	1,7215	12,4141		
Metanol	Blanko	1,9655	-	$y = 0,0299x + 10,078$	1335,18
	50	1,7295	12,0071		
	25	1,767	10,0992		
	12,5	1,765	10,2010		
	6,25	1,7505	10,9387		
Etil asetat	Blanko	1,87	-	$y = 0,1663x + 9,5327$	243,34
	50	1,496	20,0000		
	25	1,6185	13,4492		
	12,5	1,6485	11,8449		
	6,25	1,654	11,5508		

Tabel 4 Hasil Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Isolat 4.WA.3a

Ekstrak	Konsentrasi (ppm)	Serapan	Inhibisi (%)	Pers. garis	IC ₅₀ (ppm)
Air	Blanko	1,7585	-	$y = 0,04x + 5,3628$	1115,93
	50	1,6265	7,5064		
	25	1,6505	6,1416		
	12,5	1,6435	6,5397		
	6,25	1,6665	5,2317		
Metanol	Blanko	1,87	-	$y = 0,0716x + 5,5952$	620,18
	50	1,705	8,8235		
	25	1,719	8,0749		
	12,5	1,7275	7,6203		
	6,25	1,7815	4,7326		
Etil asetat	Blanko	1,5985	-	$y = 0,3362x - 3,098$	157,94
	50	1,3465	15,7648		
	25	1,5495	3,0654		
	12,5	1,5665	2,0019		
	6,25	1,5965	0,1251		

(Lanjutan)

Tabel 5 Hasil Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Isolat 3.WA.5b

Ekstrak	Konsentrasi (ppm)	Serapan	Inhibisi (%)	Pers. garis	IC ₅₀ (ppm)
Air	Blanko	1,5985	-	$y = 0,0755x + 2,6057$	627,74
	50	1,508	5,6616		
	25	1,482	7,2881		
	12,5	1,5825	1,0009		
	6,25	1,539	3,7222		
Metanol	Blanko	1,8435	-	$y = 0.105x + 6.2499$	416,67
	50	1,61	12,6661		
	25	1,695	8,0553		
	12,5	1,7315	6,0754		
	6,25	1,6785	8,9504		
Etil asetat	Blanko	1,5985	-	$y = 0,3927x - 0,0408$	127,43
	50	1,3205	17,3913		
	25	1,5045	5,8805		
	12,5	1,5185	5,0047		
	6,25	1,557	2,5962		

Tabel 6 Hasil Pengujian Akarbose

	Konsentrasi (ppm)	Serapan	Inhibisi (%)	Pers. garis	IC ₅₀
Akarbose	Blanko	2,5645	-	$y = 4,1943x + 0,0909$	503,91
	50	1,7465	8,56		
	25	1,781	6,76		
	12,5	1,801	5,71		
	6,25	1,8285	4,27		

(Lanjutan)

Tabel 7 Hasil Uji Kinetika Penghambatan Enzim

Konsentrasi substrat	Absorbansi sampel				1/S	1/V1	1/V2	1/V3	1/V4
	V1	V2	V3	V4					
1,25	0,9315	0,1305	0,807	1,258	0,8	1,0735	7,6628	1,2392	0,7949
2,5	1,4345	0,351	0,849	1,2875	0,4	0,6971	2,8490	1,1779	0,7767
5	1,845	0,536	1,29	1,47	0,2	0,5420	1,8657	0,7752	0,6803
10	1,771	1,001	1,4035	1,901	0,1	0,5647	0,9990	0,7125	0,5260
20	1,694	1,0375	1,333	1,601	0,05	0,5903	0,9639	0,7502	0,6246

Ket: V1 = tanpa inhibitor

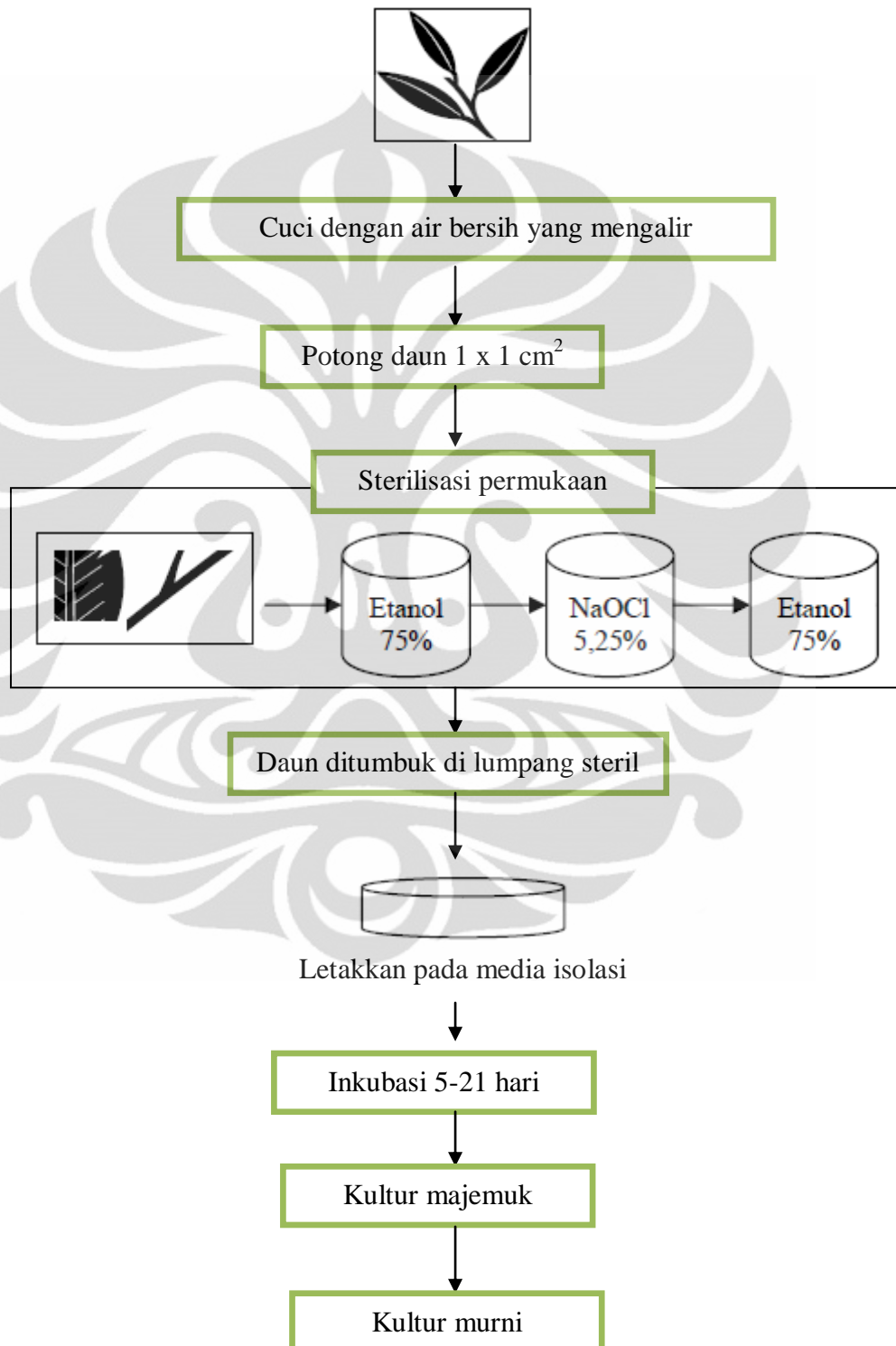
V2 = konsentrasi sampel 25 ppm

V3 = konsentrasi sampel 12,5 ppm

V4 = konsentrasi sampel 6,25 ppm

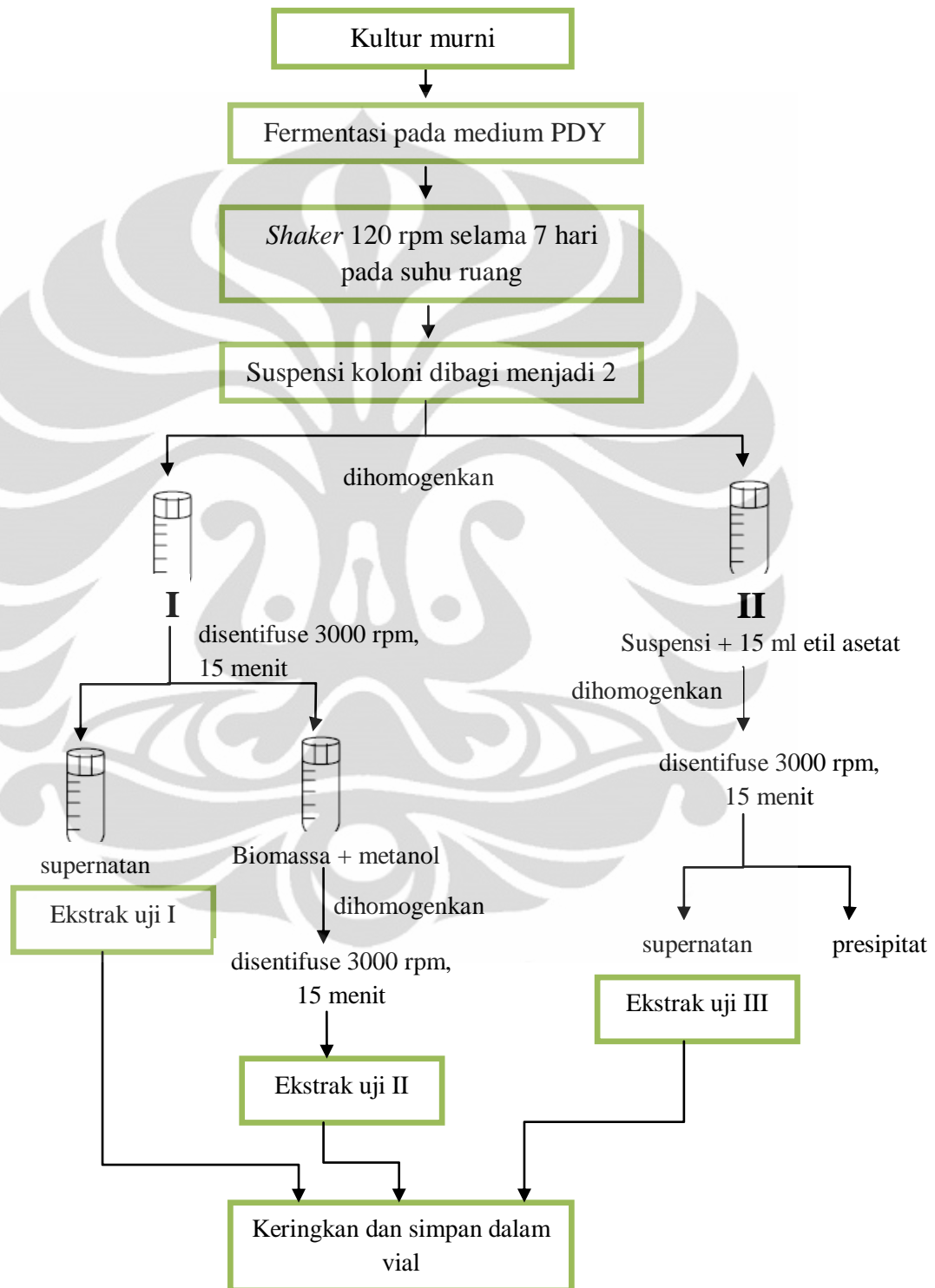
Lampiran 6. Skema Kerja

Skema 1. Proses Isolasi Kapang Endofit

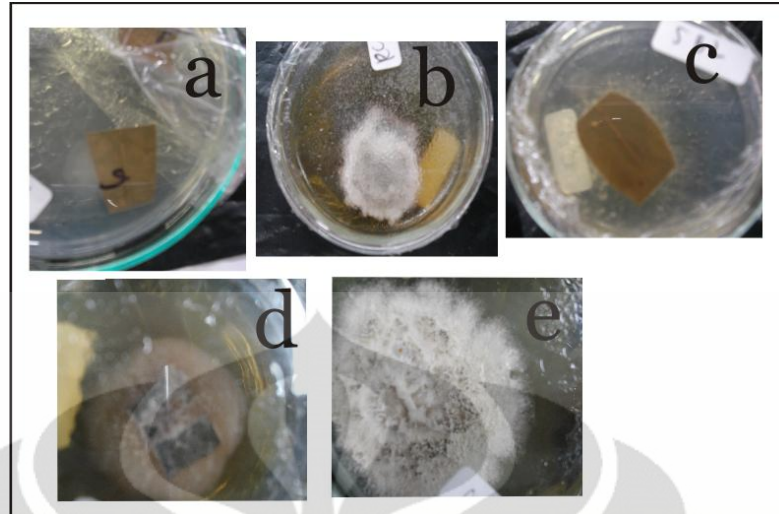


(Lanjutan)

Skema 2. Proses Ekstraksi Hasil Fermentasi Kapang Endofit

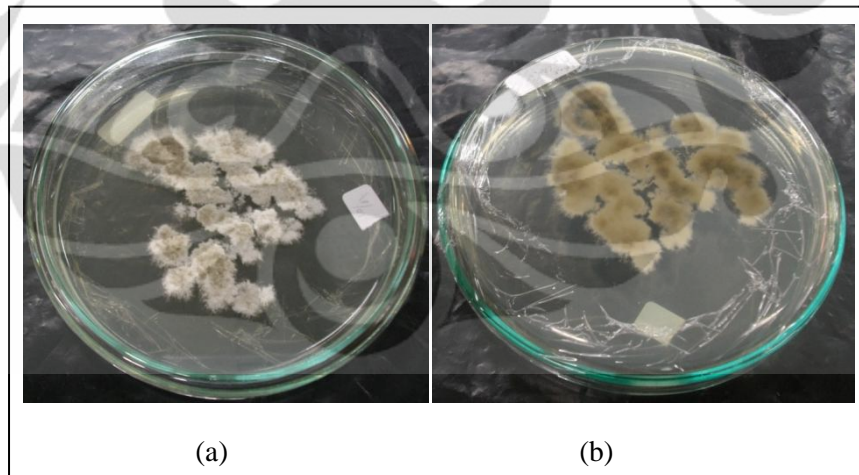




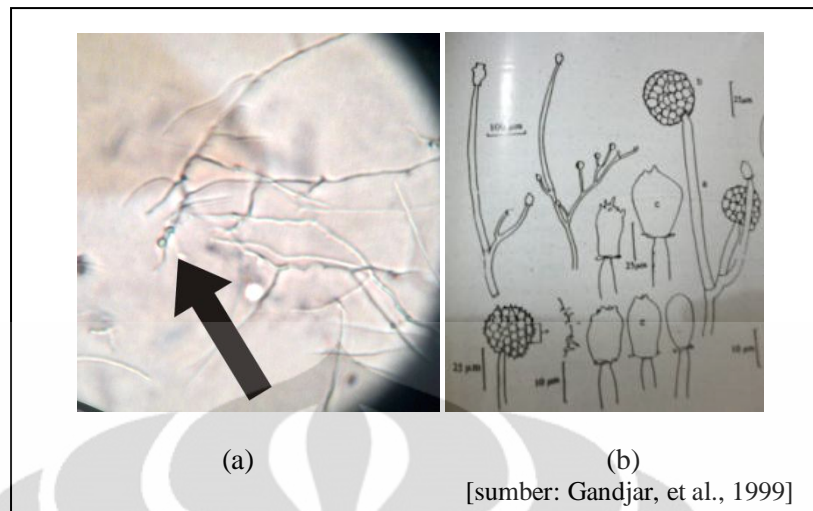


- Keterangan gambar:
- a. 4.WA.3a
 - b. 5.PDA.5a
 - c. 3.WA.5b
 - d. 5.PDA.1b
 - e. 3.CMM.2b

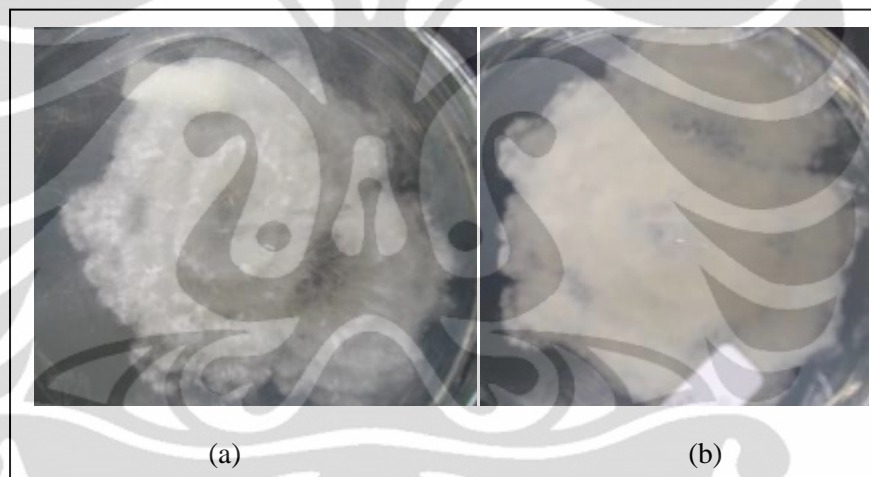
Gambar 4.1 Kultur kapang endofit pada media isolasi



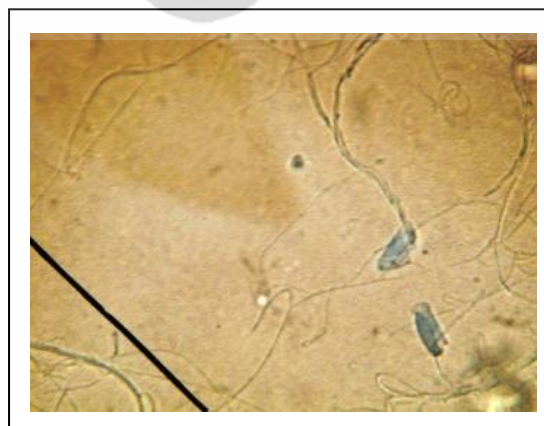
Gambar 4.2 Isolat koloni 3.CMM.2b (a) dan sebalik koloni (b)



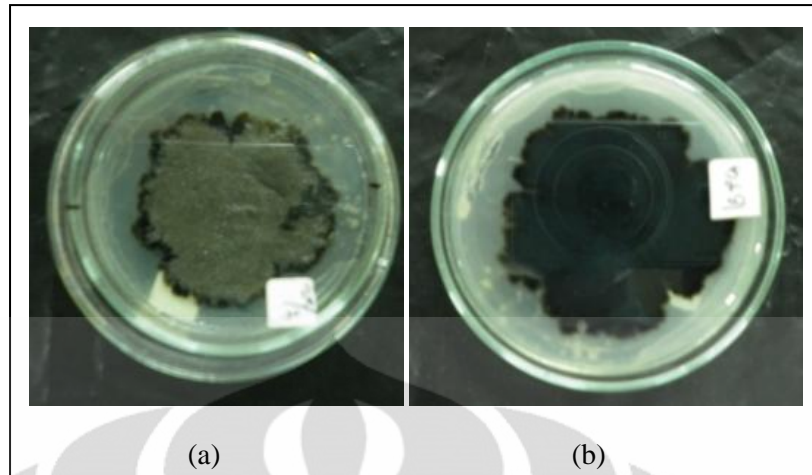
Gambar 4.3 (a) Hasil identifikasi mikroskopik isolat 3.CMM.2b (perbesaran 40x) dan (b) Kapang referensi marga *Mucor*



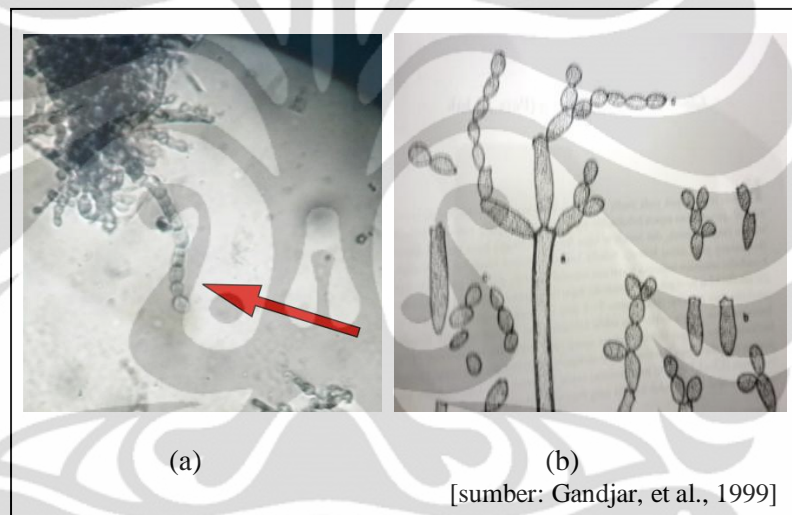
Gambar 4.4 Isolat koloni 5.PDA.5a (a) dan sebalik koloni (b)



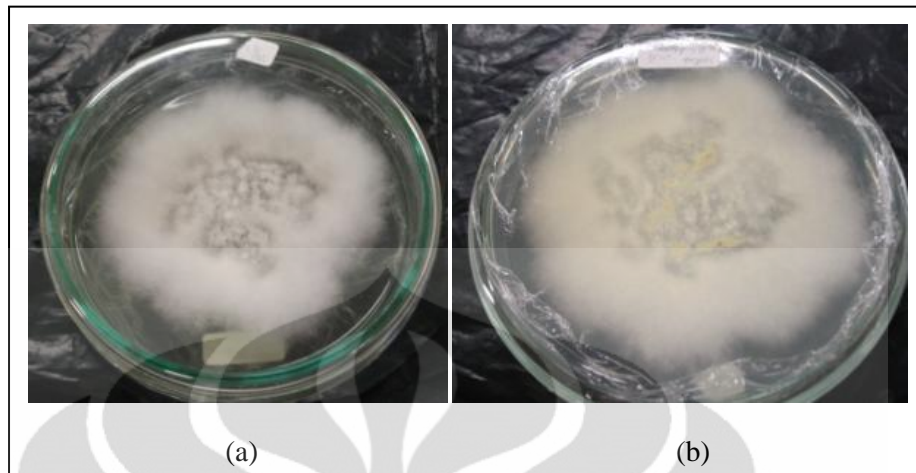
Gambar 4.5 Hasil identifikasi mikroskopik isolat 5.PDA.5a (perbesaran 40x)



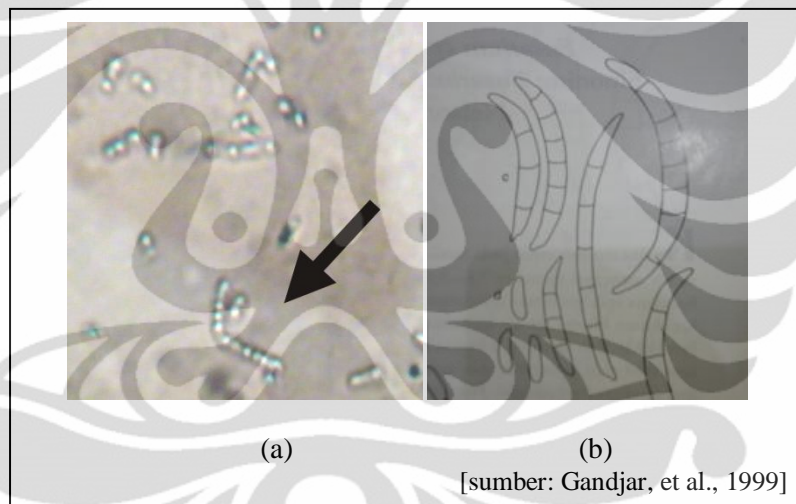
Gambar 4.6 Isolat koloni 5.PDA.1b (a) dan sebalik koloni (b)



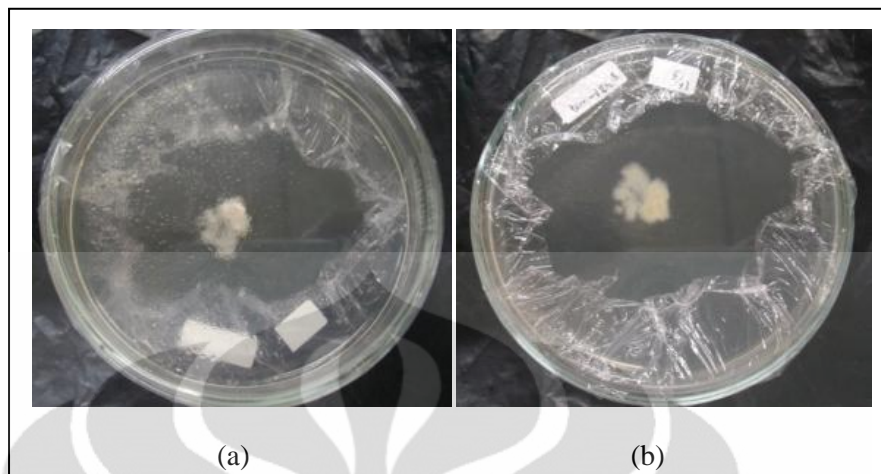
Gambar 4.7 (a) Hasil identifikasi mikroskopik isolat 5.PDA.1b (perbesaran 40x)
(b) Kapang referensi marga *Cladosporium*



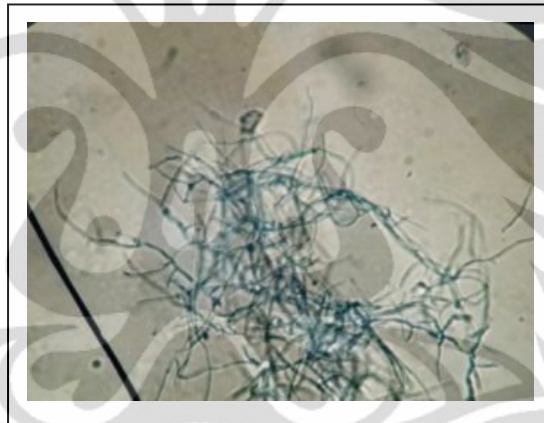
Gambar 4.8 Isolat koloni 3.WA.5b (a) dan sebalik koloni (b)



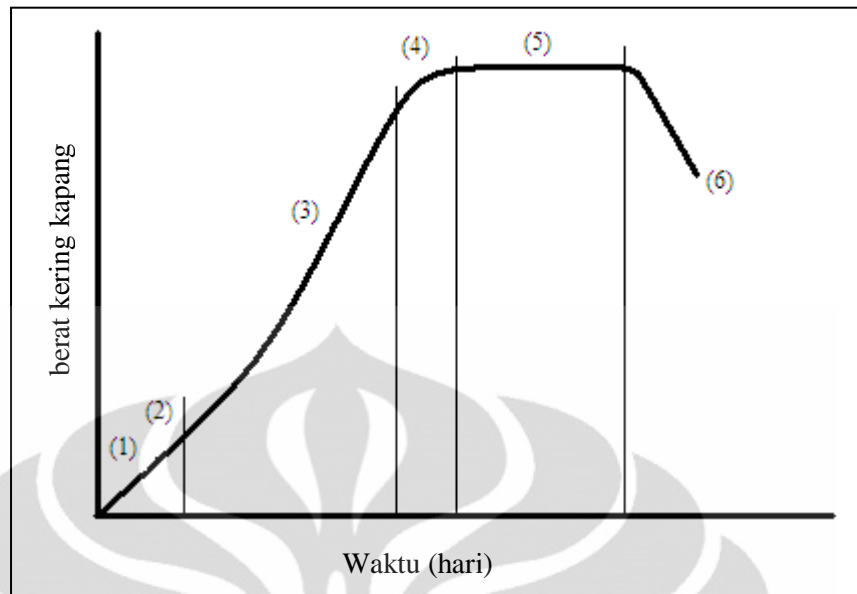
Gambar 4.9 (a) Hasil identifikasi mikroskopik isolat 3.WA.5b (perbesaran 40x)
(b) Kapang referensi marga *Fusarium*



Gambar 4.10 Isolat koloni 4.WA.3a (a) dan sebalik koloni (b)



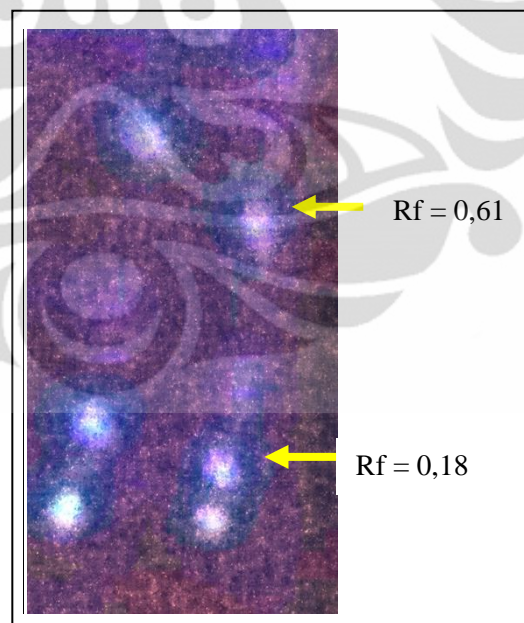
Gambar 4.11 Hasil identifikasi mikroskopik isolat 4.WA.1b (perbesaran 40x)



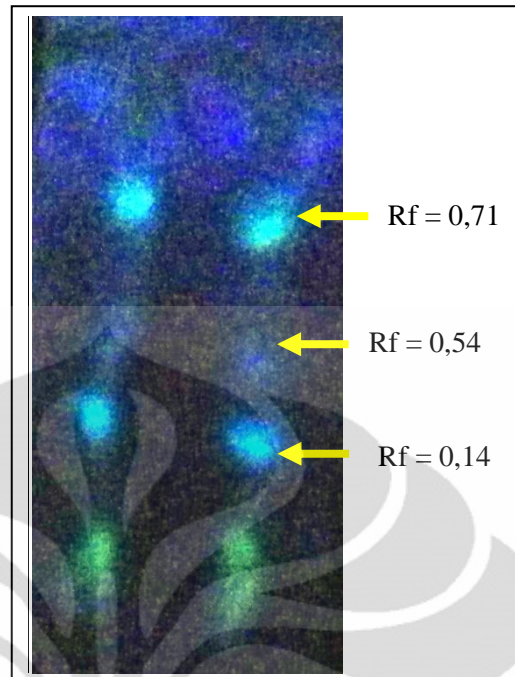
Keterangan: (1) fase lag; (2) fase akselerasi; (3) fase eksponensial; (4) fase deselerasi; (5) fase stasioner; (6) fase kematian dipercepat.

[Sumber: Gandjar, Syamsuridzal, & Oetari, 2006]

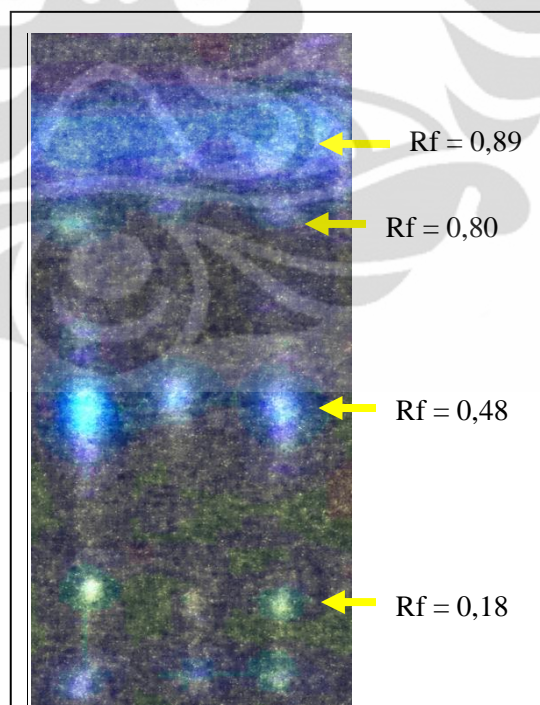
Gambar 4.12 Kurva Pertumbuhan Kapang



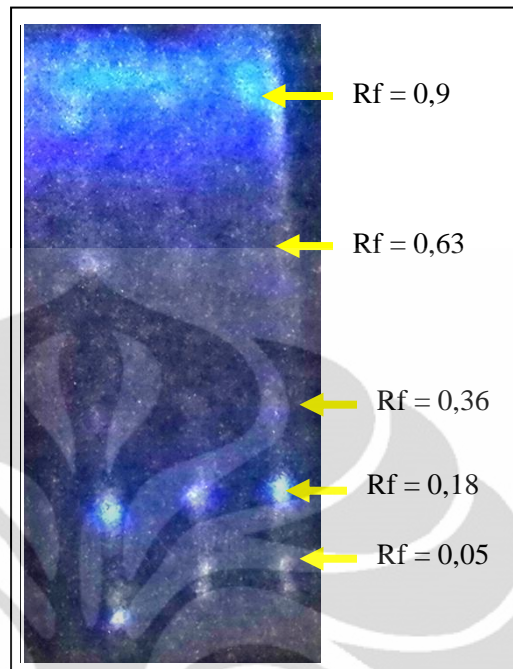
Gambar 4.13 Kromatografi lapis tipis ekstrak etil asetat 5.PDA.5a dengan fase gerak heksana-etil asetat (7:3) pada sinar UV 366 nm dengan disemprot H_2SO_4 10%



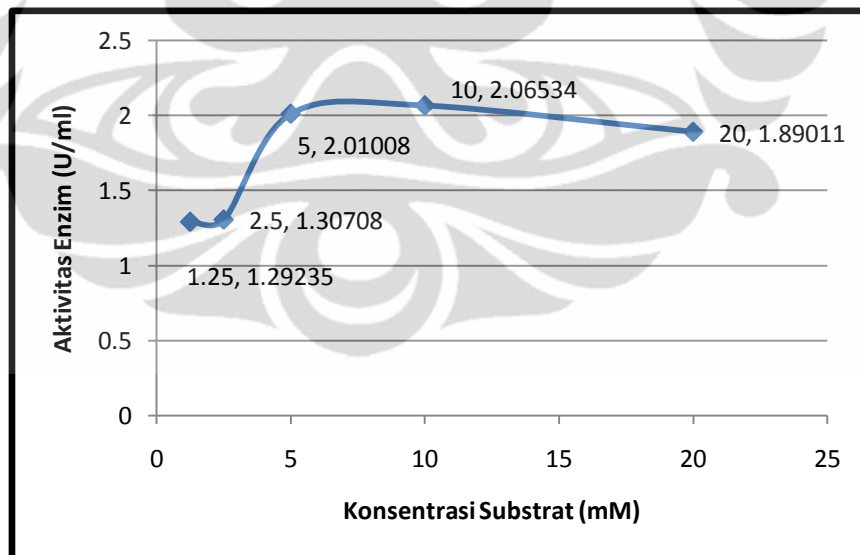
Gambar 4.14 Kromatografi lapis tipis ekstrak etil asetat 5.PDA.5a dengan fase gerak heksana-etil asetat (4:6) pada sinar UV 366 nm dengan disemprot H_2SO_4 10%



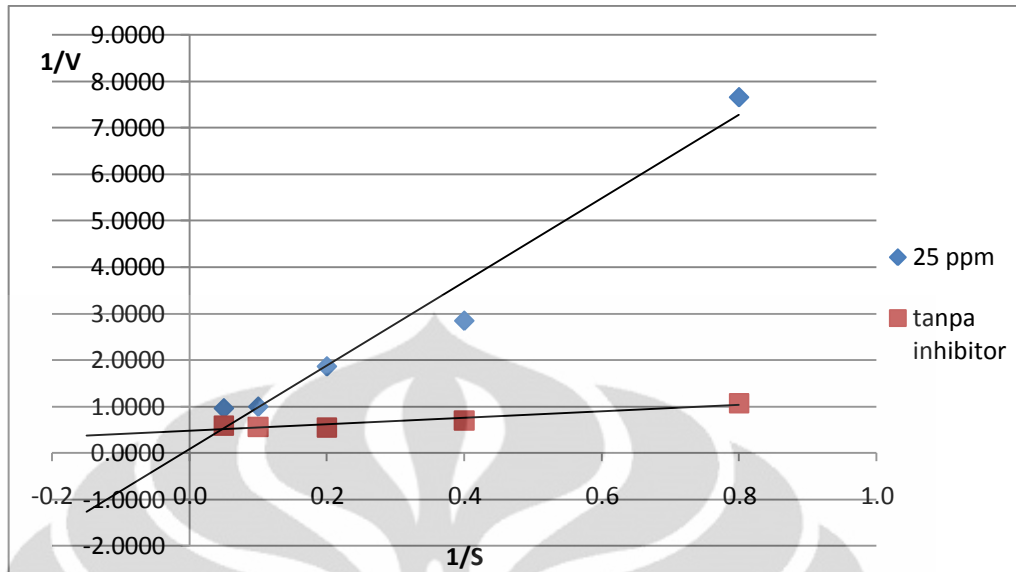
Gambar 4.15 Kromatografi lapis tipis ekstrak etil asetat 5.PDA.5a dengan fase gerak heksana-etil asetat-aseton (1:4:2) pada sinar UV 366 nm dengan disemprot H_2SO_4 10%



Gambar 4.16 Kromatografi lapis tipis ekstrak etil asetat 5.PDA.5a dengan fase gerak heksana-etil asetat (8:2) pada sinar UV 366 nm dengan disemprot H_2SO_4 10%



Gambar 4.17 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim



Gambar 4.18 Grafik Lineweaver-Burk pada ekstrak dengan konsentrasi 25 ppm