



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENAPISAN DAN UJI EFEK PENGHAMBATAN KAPANG
ENDOFIT BIJI MAHONI (*Swietenia macrophylla* King)
TERHADAP AKTIVITAS α -GLUKOSIDASE**

SKRIPSI

**RAHMI RAMDANIS
0806327982**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENAPISAN DAN UJI EFEK PENGHAMBATAN KAPANG
ENDOFIT BIJI MAHONI (*Swietenia macrophylla* King)
TERHADAP AKTIVITAS α -GLUKOSIDASE**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

**RAHMI RAMDANIS
0806327982**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2012**

ii

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa skripsi ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, Juli 2012



Rahmi Ramdanis

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Rahmi Ramdanis

NPM : 0806327982

Tanda Tangan : 

Tanggal : Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Rahmi Ramdanis
NPM : 0806327982
Program Studi : Sarjana Farmasi
Judul Skripsi : Penapisan dan Uji Efek Penghambatan Kapang
Endofit Biji Mahoni (*Swietenia macrophylla* King)
terhadap Aktivitas α -Glukosidase

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Abdul Mun'im MS., Apt. ()

Pembimbing II : Prof. Dr. ~~Atiek Soemiaty~~ MS ()

Penguji I : Dr. Berna Elya M.Si, Apt. ()

Penguji II : Drs. Hayun M.Si ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 2 Juli 2012

KATA PENGANTAR

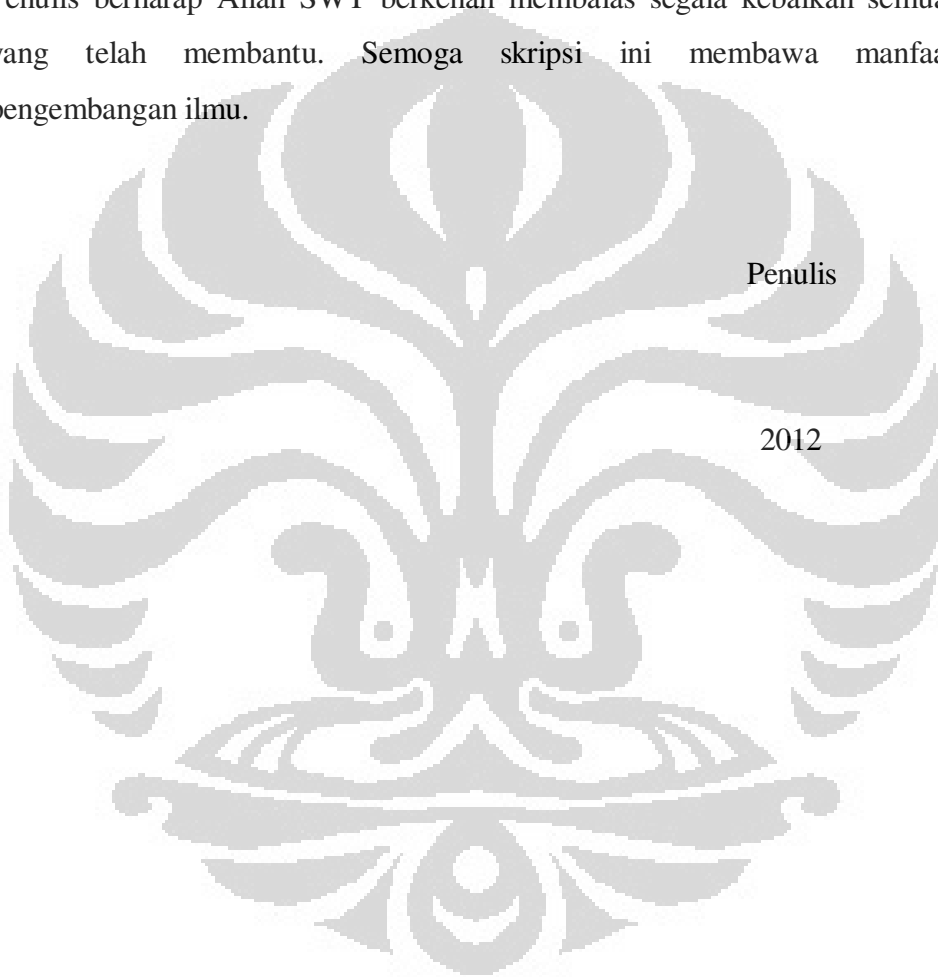
Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Penulis menyadari sangat sulit menyelesaikan skripsi ini tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Dr Abdul Mun'im MS., Apt, dan Prof. Dr. Atiek Soemiaty M.S. selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi ini, serta membantu berjalannya skripsi ini;
- (2) Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S., selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI;
- (3) Dra. Maryati Kurniadi, M.Si., Apt, selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan dan bantuan selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI;
- (4) Bapak dan Ibu staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI atas ilmu pengetahuan dan bantuan yang telah diberikan selama menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI;
- (5) Kedua orang tua, Bapak Syarif Hidayat dan Mama Nana Nuryana, yang tak pernah henti memberikan dukungan material, moral, dan doa demi kelancaran studi penulis;
- (6) Kakak-kakak (Aminudin Abdul Aziz, Rina Parliana, Endang Kartiwa, Deri S), bi edoh, mang ahmad, teteh, dan sepupu (mbak dita, t echi) yang senantiasa memberikan bantuan, semangat dan doa demi kelancaran studi penulis;
- (7) Karya Salemba Empat (KSE) dan Perusahaan Gas Negara (PGN) atas

- bantuannya baik moral maupun material selama satu tahun terakhir;
- (8) Rekan penelitian mikrobiologi dan fitokimia, Mey, Lia, Elsa, Mamik, Nita, Indah, Devin, serta kak Ninin, Suci, Dewi dan seluruh teman-teman farmasi 2008
 - (9) Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu per satu yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.



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

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

Nama : Rahmi Ramdanis
NPM : 0806327982
Program Studi : Sarjana
Departemen : Farmasi
Fakultas : MIPA
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 :

Penapisan dan Uji Efek Penghambatan Kapang Endofit Biji Mahoni (*Swietenia macrophylla* King) terhadap Aktivitas α -Glukosidase

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 memublikasikan 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 : Juli 2012
Yang menyatakan



(Rahmi Ramdanis)

ABSTRAK

Nama : Rahmi Ramdanis
Program Studi : Farmasi
Judul : Penapisan dan Uji Efek Penghambatan Kapang Endofit Biji Mahoni (*Swietenia macrophylla* King) terhadap Aktivitas α -Glukosidase

Diabetes melitus adalah penyakit metabolik yang ditandai oleh hiperglikemia. Tujuan utama terapi penyakit ini adalah mengontrol kadar gula darah. Salah satu terapi yang digunakan adalah penghambat α -glukosidase yang dapat mengurangi hiperglikemia postprandial dengan menghambat pencernaan karbohidrat menjadi monosakarida di usus halus. Kemampuan kapang endofit untuk menghasilkan senyawa bioaktif yang sama dengan tanaman inangnya merupakan sumber yang potensial untuk mendapatkan senyawa penghambat α -glukosidase. Tujuan penelitian ini diantaranya adalah untuk memperoleh isolat kapang endofit dari biji mahoni (*Swietenia macrophylla* King), mengetahui efek penghambatan hasil fermentasi isolat terhadap aktivitas α -glukosidase, dan mengetahui golongan senyawa dari ekstrak paling aktif. Enam kapang endofit berhasil diisolasi. Setiap isolat difermentasi dalam kultur cair berisi media *Potato Dextrose Broth* dan *yeast extract* selama 7 hari, kemudian diekstraksi dengan etil asetat dan metanol. Ekstrak kemudian diuji efek penghambatannya terhadap aktivitas α -glukosidase dengan menggunakan metode spektrofotometri dan diukur dengan *microplate reader*. Ekstrak paling aktif diuji dengan Kromatografi Lapis Tipis. Lima ekstrak etil asetat menunjukkan aktivitas lebih baik dibandingkan dengan akarbose dengan nilai IC_{50} terkecil 73,64 μ g/mL. Ekstrak paling aktif menunjukkan penghambatan kompetitif. Berdasarkan penapisan kimia, ekstrak ini mengandung flavonoid.

Kata Kunci : diabetes melitus, kapang endofit, mahoni, penghambat α -glukosidase, *Swietenia macrophylla* King
xii+77 halaman : 32 gambar; 20 tabel, 8 lampiran
Daftar Pustaka : 60 (1983-2011)

ABSTRACT

Name : Rahmi Ramdanis
Program Study : Pharmacy
Title : Screening and Inhibitory Assay of Endophytic Fungi from Mahagony (*Swietenia macrophylla* King) Seeds on α -Glucosidase Activity

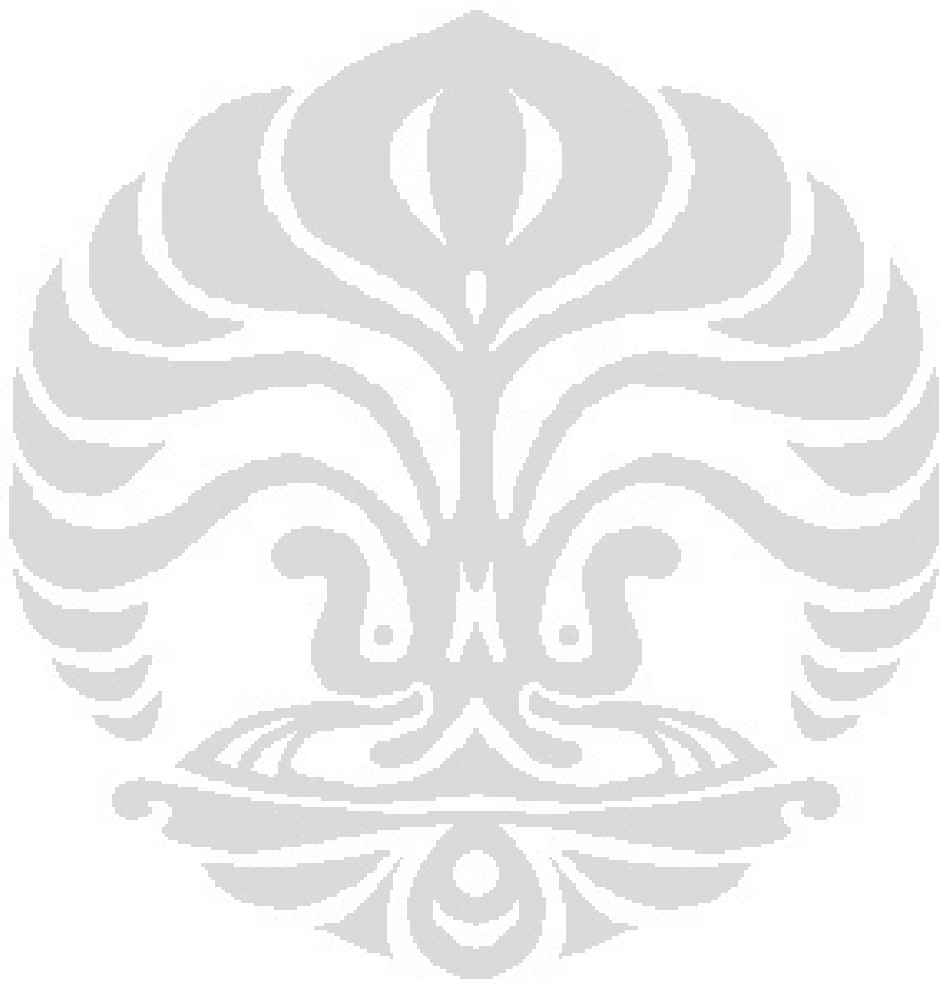
Diabetes mellitus is a metabolic syndrome characterized by hyperglycemia. The major goal in the treatment of this disease is to achieve normoglycemia. One of medication used is α -glucosidase inhibitor that could reduce postprandial hyperglycemia with delay of digestion of carbohydrate to monosaccharides in the small intestine. The ability of endophytic fungi to produce similar bioactive compounds to its host plant is potential source to get α -glucosidase inhibitory compounds. This research was aimed to isolate the endophytic fungi from *Swietenia macrophylla* King seeds, to evaluate the inhibitory activity of α -glucosidase from fermentation culture of its isolate, and to know the chemical compounds from the most active extract. Six endophytic fungi were isolated. Each isolate was fermented in submerged culture with Potato Dextrose Broth and yeast extract medium for 7 days, then extracted with ethyl acetate and methanol. α -Glucosidase inhibitory activity of those extract was assayed by spectrophotometric method using microplate reader. The most active extract was tested by Thin Layer Chromatography (TLC). Five ethyl acetate extracts showed better activity than acarbose with smallest IC₅₀ values was 73.64 μ g/mL. The most active extract showed competitive inhibition. This extract contained flavonoids.

Key Words : α -glucosidase inhibitor, diabetes mellitus, endophytic fungi, mahagony, *Swietenia macrophylla* King,
xii+77 pages : 32 pictures; 20 tables, 8 appendixes
Bibliography : 60 (1983-2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN BEBAS PLAGIARISME	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan	2
1.3 Manfaat	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Kapang Endofit	4
2.2 <i>Swietenia macrophylla</i> King (Mahoni)	5
2.3 Terapi Diabetes Melitus Tipe 2.....	7
2.4 Enzim α -Glukosidase dan Penghambat Enzim α -Glukosidase.....	10
2.5 Uji Efek Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase.....	12
2.6 Kinetika Enzim.....	13
2.7 <i>Microplate Reader</i>	15
2.8 Kromatografi Lapis Tipis	16
2.9 Identifikasi Golongan Senyawa dari Fraksi yang Aktif	16
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	19
3.1 Lokasi Penelitian	19
3.2 Bahan	19
3.3 Alat	20
3.4 Metode Kerja.....	20
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	31
4.1 Isolasi Kapang Endofit	31
4.2 Identifikasi Isolat Kapang Endofit	33
4.3 Fermentasi Kapang Endofit	35
4.4 Ekstraksi Hasil Fermentasi Kapang Endofit	35
4.5 Uji Efek Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase.....	36
4.6 Pemeriksaan Pola Kromatogram Ekstrak dengan Metode KLT	40
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	42
5.1. Kesimpulan	42

5.2. Saran	42
DAFTAR ACUAN	43



DAFTAR GAMBAR

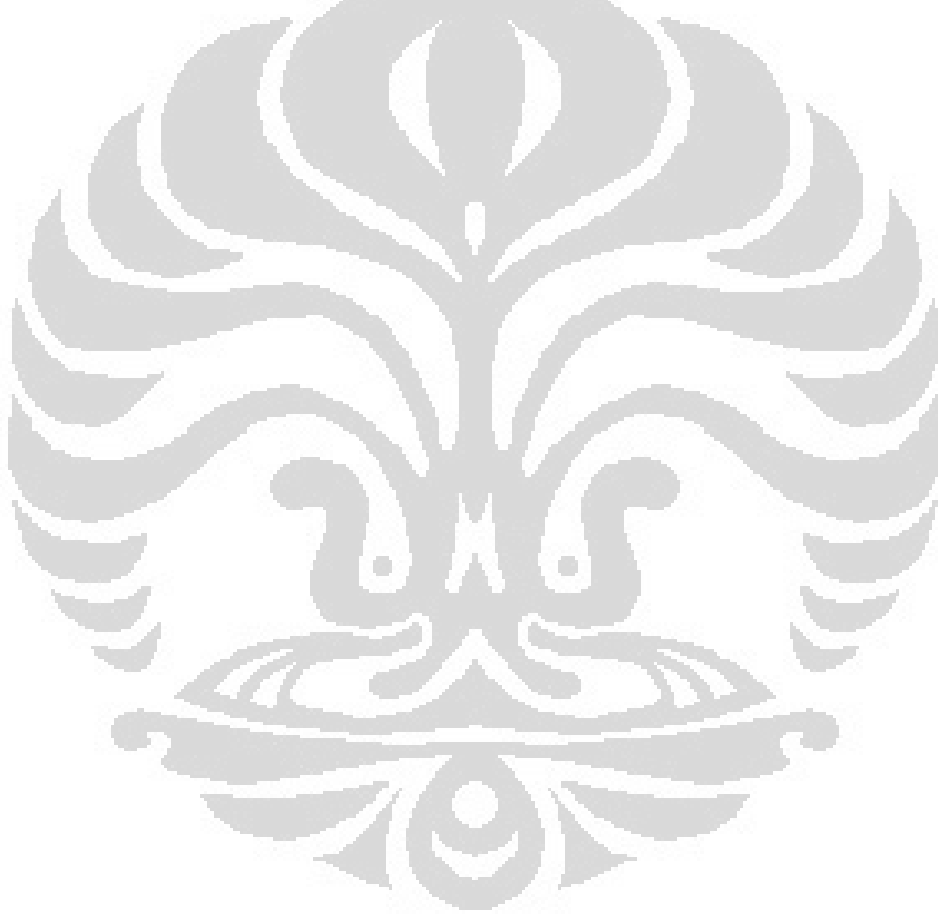
Gambar 2.1	Pohon Mahoni.....	5
Gambar 2.2	Struktur Kimia Akarbose.....	11
Gambar 2.3	Struktur Kimia Miglitol.....	12
Gambar 2.4	Persamaan Reaksi Enzimatis α -Glukosidase dan p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida.....	13
Gambar 2.5	Plot Lineweaver-Burk	14
Gambar 2.6	Plot Lineweaver-Burk dari Penghambatan Kompetitif.....	14
Gambar 2.7	Plot Lineweaver-Burk dari Penghambatan Non Kompetitif	15
Gambar 2.8	<i>Microplate reader</i>	15
Gambar 4.1	Kultur Kapang Endofit pada Media Isolasi	49
Gambar 4.2	Isolat koloni CMM4B (a) dan sebalik koloni (b).....	50
Gambar 4.3	Hasil identifikasi mikroskopik isolat CMM4B.....	50
Gambar 4.4	Kapang referensi marga <i>Fonsecaea</i>	50
Gambar 4.5	Isolat koloni CMM11A (a) dan sebalik koloni (b)	51
Gambar 4.6	Hasil identifikasi mikroskopik isolat CMM11A	51
Gambar 4.7	Kapang referensi marga <i>Aspergillus</i>	51
Gambar 4.8	Isolat koloni CMM19A (a) dan sebalik koloni (b)	52
Gambar 4.9	Hasil identifikasi mikroskopik isolat CMM19A	52
Gambar 4.10	Isolat koloni PDA1A (a) dan sebalik koloni (b).....	53
Gambar 4.11	Hasil identifikasi mikroskopik isolat PDA1A.....	53
Gambar 4.12	Kapang referensi marga <i>Aspergillus</i>	53
Gambar 4.13	Isolat koloni WA6B (a) dan sebalik koloni (b)	54
Gambar 4.14	(a) Hasil identifikasi mikroskopik isolat WA 6B (b) Kapang referensi marga <i>Aspergillus</i>	54
Gambar 4.15	Isolat koloni WA8A (a) dan sebalik koloni (b)	55
Gambar 4.16	Hasil identifikasi mikroskopik isolat WA8.....	55
Gambar 4.17	Kapang referensi marga <i>Penicillium</i>	55
Gambar 4.18	Pengaruh konsentrasi substrat terhadap absorbansi	56
Gambar 4.19	Pengaruh waktu inkubasi terhadap absorbansi.....	56
Gambar 4.20	Grafik Lineweaver-Burk pada ekstrak dengan konsentrasi 25 μ g/mL	57
Gambar 4.21	Kromatografi lapis tipis ekstrak etil asetat CMM4B dengan fase gerak heksana-etil asetat (9:1) pada sinar UV 366 nm dengan disemprot H_2SO_4 10%.....	57
Gambar 4.22	Kromatografi lapis tipis ekstrak etil asetat CMM4B dengan fase gerak heksana-etil asetat (8:2) pada sinar UV 366 nm dengan disemprot H_2SO_4 10%.....	58
Gambar 4.23	Kromatografi lapis tipis ekstrak etil asetat CMM4B dengan fase gerak heksana-etil asetat (7:3) pada sinar UV 366 nm dengan disemprot H_2SO_4 10%.....	58
Gambar 4.24	Kromatografi lapis tipis ekstrak etil asetat CMM4B dengan fase gerak heksana-etil asetat (7:3) pada sinar UV 366 nm dengan disemprot $AlCl_3$ 5%	59

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Onset, Puncak, dan Berbagai Durasi dari Berbagai Jenis Sediaan insulin	9
Tabel 2.2	Jenis Hipoglikemik Oral	10
Tabel 3.1	Penambahan Reagen Uji pada Optimasi.....	26
Tabel 3.2	Penambahan Reagen Uji Penghambatan α -glukosidase	28
Tabel 3.3	Uji Kinetika Penghambatan Enzim	29
Tabel 4.1	Hasil Isolasi Kapang Endofit.....	32
Tabel 4.2	Perolehan Berat Ekstrak Isolat Kapang Endofit.....	36
Tabel 4.3	Nilai IC ₅₀ Ekstrak Etil Asetat Isolat Kapang Endofit	39
Tabel 4.4	Optimasi Aktivitas Enzim dengan Konsentrasi Substrat 0,031; 0,063; 0,125; 0,25; 0,5; dan 1,0 mM.....	60
Tabel 4.5	Optimasi Aktivitas Enzim dengan Waktu Inkubasi 15; 20; 30; 40 menit.....	60
Tabel 4.6	Hasil Uji Penentuan Potensi Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase oleh Isolat Kapang Endofit pada Konsentrasi Ekstrak 1000 μ g/mL	61
Tabel 4.7	Hasil Uji Efek Penghambatan Aktivitas Enzim oleh Ekstrak Etil Asetat Isolat CMM4B	61
Tabel 4.8	Hasil Uji Efek Penghambatan Aktivitas Enzim oleh Ekstrak Etil Asetat Isolat CMM11A	62
Tabel 4.9	Hasil Uji Efek Penghambatan Aktivitas Enzim oleh Ekstrak Etil Asetat Isolat CMM19A	63
Tabel 4.10	Hasil Uji Efek Penghambatan Aktivitas Enzim oleh Ekstrak Etil Asetat Isolat PDA1A.....	64
Tabel 4.11	Hasil Uji Efek Penghambatan Aktivitas Enzim oleh Ekstrak Etil Asetat Isolat WA6B	65
Tabel 4.12	Hasil Uji Efek Penghambatan Aktivitas Enzim oleh Ekstrak Etil Asetat Isolat WA8A	66
Tabel 4.13	Hasil Pengujian Standar Akarbose	67
Tabel 4.14	Hasil Uji Kinetika Penghambatan Enzim oleh Ekstrak Etil Asetat Isolat CMM4B	68
Tabel 4.15	Hasil Perhitungan Tetapan Michaelis-Menten Ekstrak Etil Asetat 25 μ g/mL.....	68

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Determinasi Sampel Tanaman	69
Lampiran 2. Sertifikat Analisis Enzim α -Glukosidase.....	70
Lampiran 3. Sertifikat Analisis p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida	71
Lampiran 4. Skema Proses Isolasi Kapang Endofit	72
Lampiran 5. Skema Proses Fermentasi Kapang Endofit.....	73
Lampiran 6. Skema Ekstraksi Hasil Fermentasi Kapang Endofit	74
Lampiran 7. Skema Proses Uji Efek Penghambatan Aktivitas α -glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia	75
Lampiran 8. Perhitungan Unit Enzim dan Pembuatan Larutan Enzim α -Glukosidase.....	76



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus merupakan suatu penyakit atau gangguan metabolisme kronis yang ditandai dengan tingginya kadar gula darah disertai dengan gangguan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein sebagai akibat penurunan fungsi insulin. Penurunan fungsi insulin tersebut dapat disebabkan oleh defisiensi produksi insulin oleh sel-sel beta Langerhans kelenjar pankreas, atau disebabkan oleh kurang responsifnya sel-sel tubuh terhadap insulin (WHO, 1999).

Penderita diabetes melitus di dunia diperkirakan meningkat hingga 35% pada tahun 2025 (*American Association of Clinical Endocrinologists*, 2002). Begitu pula di Indonesia, berdasarkan data WHO, jumlah penderita diabetes melitus di Indonesia menduduki peringkat keempat di dunia pada tahun 2000 (8,4%) dan diperkirakan akan meningkat hingga 21,3% pada tahun 2030 (Wild, et al., 2004). Diabetes melitus tipe 2 merupakan tipe diabetes dengan kasus terbanyak yaitu sekitar 90% dari penderita diabetes (Williams dan Pickup, 2004). Oleh karena itu, diabetes melitus tipe 2 merupakan salah satu masalah kesehatan utama di Indonesia.

Walaupun diabetes melitus merupakan penyakit kronik yang tidak menyebabkan kematian secara langsung, tetapi dapat berakibat fatal bila pengelolaannya tidak tepat. Pengelolaan diabetes melitus memerlukan penanganan secara multidisiplin yang mencakup terapi non-obat dan terapi obat (Dirjen Binfar, 2005). Terapi dengan golongan penghambat α -glukosidase merupakan terapi pilihan untuk penderita diabetes melitus tipe 2. Obat-obat dari golongan ini memiliki efek samping hipoglikemia yang lebih kecil dan dapat diberikan sebagai obat tunggal atau dalam bentuk kombinasi dengan obat hipoglikemik lainnya (Suherman, 2007).

Agen-agen penghambat α -glukosidase yang berhasil ditemukan dari senyawa bahan alam memberikan aktivitas penghambatan yang potensial dan beberapa tanaman obat di Indonesia memiliki potensi sebagai sumber senyawa tersebut (Borges de Melo, Gomes, dan Carvalho, 2006; Elya, et al., 2011). Salah satunya adalah mahoni atau *Swietenia macrophylla* King. Ekstrak etanol dari biji

tanaman tersebut telah terbukti secara *in vivo* memiliki efek antidiabetes pada tikus diabet yang diinduksi streptozotisin (Kalaivanan dan Pugalendi, 2011).

Adanya eksplorasi tanaman obat sebagai bahan baku senyawa aktif dapat mengancam keseimbangan alam dan punahnya spesies tanaman. Oleh karena itu, diperlukan alternatif lain sebagai sumber senyawa aktif. Produksi senyawa aktif dapat ditingkatkan dengan bioteknologi kapang endofit untuk memenuhi kebutuhan dan menjaga serta melestarikan keanekaragaman hayati dan ekosistem (Onifade, 2007). Penggunaan fermentasi mikroba endofit sebagai penghasil senyawa aktif memiliki beberapa keuntungan diantaranya lebih cepat, lebih mudah diproduksi, tidak terbatas dan tidak bergantung pada cuaca atau musim (Dompeipen, et al., 2011).

Kapang endofit dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang mirip dengan tanaman inangnya. Kapang dari spesies *Aspergillus aculeatus* memiliki aktivitas penghambatan α -glukosidase yang baik (Ingavat, et al., 2009). Oleh karena itu, kapang endofit adalah salah satu sumber alam senyawa antidiabetes yang potensial (Dompeipen, et al., 2011). Penelitian mengenai efek penghambatan aktivitas α -glukosidase dari kapang endofit biji mahoni, belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan penapisan dan uji efek penghambatan aktivitas α -glukosidase dari kapang endofit biji mahoni.

1.2 Tujuan

Adapun tujuan dari penelitian ini antara lain:

- 1.2.1 Memperoleh isolat kapang endofit dari biji mahoni (*Swietenia macrophylla* King)
- 1.2.2 Mengetahui efek penghambatan dari ekstrak hasil fermentasi kapang endofit biji mahoni (*Swietenia macrophylla* King) terhadap aktivitas α -glukosidase
- 1.2.3 Mengetahui golongan senyawa kimia dari ekstrak paling aktif

1.3 Manfaat

Penelitian ini merupakan penelitian tahap awal yaitu berupa penapisan kapang endofit dari biji mahoni dan pengujian efek penghambatan isolat tersebut

Universitas Indonesia

terhadap aktivitas α -glukosidase. Oleh karena itu, penelitian ini merupakan langkah awal untuk dilakukannya penelitian lebih lanjut untuk mengisolasi senyawa kimia dari kapang endofit yang memiliki efek penghambatan paling baik terhadap aktivitas α -glukosidase dan selanjutnya dapat digunakan sebagai terapi alternatif dalam pengobatan diabetes melitus.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kapang Endofit

2.1.1 Definisi

Kapang endofit adalah kapang yang hidup di dalam tanaman. Secara luas kapang endofit didefinisikan sebagai kapang yang setidaknya separuh siklus hidupnya berada di dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan gejala penyakit pada tanaman inang (Carlile, et al., 2001). Berbagai jenis endofit telah berhasil diisolasi dari tanaman inangnya, dan telah berhasil dibiakkan dalam media perbenihan yang sesuai (Radji, 2005).

Endofit dan inangnya dapat memiliki hubungan simbiosis mutualisme hingga simbiosis parasitisme yang bergantung pada metabolit sekunder yang dihasilkan oleh keduanya (Strobel, et al., 2004). Beberapa endofit mampu menghasilkan senyawa atau metabolit sekunder yang sama seperti inangnya. Hal ini diduga sebagai akibat adanya koevolusi atau transfer genetik dari tanaman inang ke dalam mikroba endofit (Tan, et al., 2001).

Metabolit sekunder yang diproduksi oleh endofit telah berhasil diisolasi dan dimurnikan serta telah dielusidasi strukturnya. Metabolit sekunder yang dihasilkan kapang endofit lebih banyak dibandingkan kelas mikroorganisme endofit lainnya. Hal ini disebabkan tingginya frekuensi isolasi kapang endofit dari tanaman. Produk dari kapang endofit memiliki aktivitas biologi dengan spektrum yang luas seperti antibiotika, antikanker, antimalaria, antivirus, antioksidan, antidiabetes dan senyawa immunosupresif. Produk tersebut dapat dikelompokkan menjadi berbagai kategori seperti alkaloid, steroid, terpenoid, isokumarin, quinon, fenilpropanoid dan lignan, fenol dan asam fenolat, metabolit alifatik, lakton dan lain-lain (Radji, 2005; Zhang, et al., 2006).

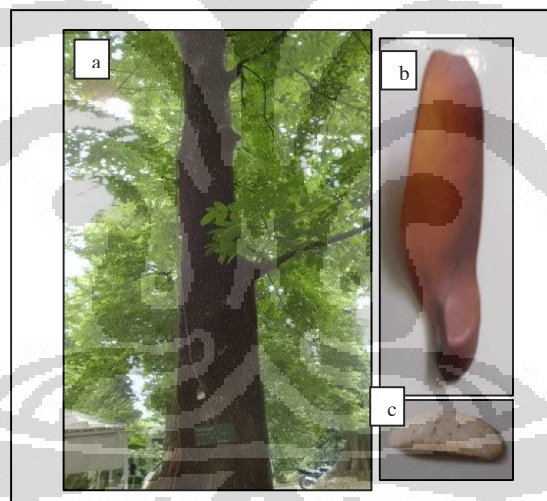
2.1.2 Isolasi dan Kultur Kapang Endofit

Teknik *direct seed planting* dapat digunakan untuk isolasi kapang endofit. Endofit diisolasi setelah masing-masing organ dari tanaman dipotong menjadi beberapa segmen berukuran 1-3 mm yang selanjutnya disterilisasi permukaan dengan oksidan kuat atau desinfektan lalu dibiarkan mengering di bawah LAF.

Sterilisasi permukaan dapat dilakukan dengan NaOCl 2-10%, etanol 70%, H₂O₂ 3% dan KMnO₄ 2%. Sterilisasi permukaan dilakukan untuk mengeliminasi kontaminasi mikroba epifit atau mikroba yang berada di permukaan tanaman. Kemudian, dengan menggunakan pisau steril, jaringan luar tanaman dihilangkan dan secara hati-hati bagian dalam tanaman diletakkan pada permukaan media isolasi (Strobel dan Daisy, 2003; Zhang, et al., 2006).

Media isolasi yang dapat digunakan adalah *Corn Meal Malt Agar* (CMMA), *Water Agar* (WA), dan *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang masing-masing diberi suplemen kloramfenikol 0,05 mg/mL (Crozier, et al., 2006; Theantana, et al., 2007). Penambahan kloramfenikol ditujukan untuk menghindari adanya kontaminasi.

2.2 *Swietenia macrophylla* King (Mahoni)



[sumber: data koleksi pribadi]

Gambar 2.1 a. Pohon mahoni; b. kulit biji; c. biji

2.2.1 Klasifikasi

Pohon mahoni memiliki klasifikasi (Krisnawati, H., Kallio, M., dan Kanninen, M., 2011)

Kerajaan : Plantae
 Divisi : Spermatophyta
 Kelas : Dicotyledoneae

Universitas Indonesia

Bangsa : Rutales
 Suku : Meliaceae
 Marga : Swietenia
 Jenis : *Swietenia macrophylla* King
 Sinonim : *Swietenia candolei* Pittier, *Swietenia krukovii* Gleason, *Swietenia belizensis* Lundel, *Swietenia macrophylla* King var. *Marabaensis* Ledoux et Lobato, *Swietenia tessmanii* Harms.

Nama Daerah : mahoni daun lebar (Indonesia)

2.2.2 Morfologi (Direktorat Perbenihan Hutan, 2001)

Pohon mahoni memiliki tinggi antara 30 - 35 m. Kulit batang berwarna abu-abu dan halus ketika masih muda, berubah menjadi coklat tua, menggelembung dan mengelupas setelah tua. Daun bertandan dan menyirip. Bunga kecil berwarna putih. Buah tanaman ini umumnya berbentuk kapsul bercuping 5, panjang 12-15 cm, dan berwarna abu-abu coklat. Bagian tengah buah mengeras seperti kayu, berbentuk kolom dengan 5 sudut yang memanjang menuju ujung. Buah akan pecah mulai dari ujung atau pangkal pada saat masak dan kering. Umumnya setiap buah memiliki 35 - 45 biji. Biji dilapisi kulit berwarna coklat, lonjong padat, bagian atas memanjang seperti sayap dengan panjang mencapai 7,5 - 15 cm.

2.2.3 Ekologi

Pohon ini dapat tumbuh di berbagai tipe hutan, mulai dari sabana sampai hutan hujan, tetapi paling banyak tumbuh di daerah dengan tanah aluvial. Pohon ini tumbuh di daerah dengan ketinggian 0 - 1500 m, dengan temperatur 20 - 28°C, dan curah hujan bervariasi dari 1600 hingga 2500 mm (Orwa et al., 2009).

2.2.4 Kandungan Kimia

Buah mahoni mengandung flavonoid dan saponin. Bagian daun mengandung swietefragmin dan swietemakrofin (Tan, et al., 2009). Biji mengandung tetranortriterpenoid yaitu swietenin (Dewanjee, et al., 2009).

2.2.5 Manfaat

Biji mahoni telah lama digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati diabetes (Dewanjee dan Maiti, 2011). Ekstrak metanol dan etanol biji mahoni terbukti secara *in vivo* memiliki efek antidiabetes pada tikus yang diinduksi streptozotosin (Maiti, et al., 2009; Kalaivanan dan Pugalendi, 2011).

2.3 Terapi Diabetes Melitus Tipe 2

Diabetes melitus tipe 2 terjadi ketika terdapat resistensi insulin yang signifikan dan penurunan sekresi insulin (WHO, 1999). Terapi diabetes mempunyai tujuan akhir untuk mengurangi gejala hiperglikemia, mengurangi onset terjadinya komplikasi retinopati, nefropati dan neuropati, mengurangi faktor resiko kardiovaskular, dan meningkatkan kualitas dan kuantitas hidup (Dipiro, et al., 2005).

Pada dasarnya ada dua terapi diabetes, yaitu terapi non farmakologi dan terapi farmakologi. Langkah pertama yang harus dilakukan adalah terapi non farmakologi berupa pengaturan diet dan olah raga. Apabila dengan langkah pertama ini belum tercapai, dapat dikombinasikan dengan langkah farmakologis berupa terapi insulin atau terapi obat hipoglikemik oral, atau kombinasi keduanya (Dirjen Binfar, 2005).

2.3.1 Terapi Non Farmakologi

Terapi non farmakologi yang dapat dilakukan antara lain:

2.3.1.1 Diet

Diet atau terapi nutrisi yang baik merupakan strategi terapi diabetes untuk mengontrol kadar glukosa darah, mengurangi obesitas, dan mengontrol keseimbangan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein. Diet yang dianjurkan adalah makanan dengan komposisi yang seimbang dalam hal karbohidrat (50-60%), protein (12-15%) dan lemak (30%) (Codario, 2011).

2.3.1.2 Olah raga

Berolah raga secara teratur dapat menjaga kadar gula darah tetap normal dan mengurangi faktor resiko kardiovaskular sehingga dapat mengurangi onset terjadinya diabetes melitus tipe 2. Selain itu, olah raga merupakan faktor penting dalam mengontrol berat badan. Olah raga akan memperbanyak jumlah dan meningkatkan aktivitas reseptor insulin dalam tubuh dan juga meningkatkan penggunaan glukosa. Beberapa contoh olah raga yang disarankan adalah jalan atau lari pagi, bersepeda, berenang, dan lain sebagainya (Chisholm-Burns, et al., 2008).

2.3.2 Terapi Farmakologi

Apabila pelaksanaan terapi non farmakologi belum berhasil mengendalikan kadar glukosa darah penderita, maka perlu dilakukan terapi farmakologi, baik dalam bentuk terapi insulin, terapi obat hipoglikemik oral, atau kombinasi keduanya.

2.3.2.1 Terapi Insulin

Terapi insulin merupakan pilihan utama untuk diabetes melitus tipe 1 dan beberapa jenis diabetes melitus tipe 2, yaitu ketika terjadi penurunan fungsi sel β dan resistensi insulin perifer. Insulin dapat diberikan sebagai monoterapi atau berupa kombinasi dengan hipoglikemik oral. Suntikan insulin dapat diberikan melalui intravena, intramuskuler, atau subkutan pada penggunaan jangka panjang (Suherman, 2007; Linn, et al., 2009). Insulin dapat diklasifikasikan menjadi empat kategori, yaitu insulin dengan mula kerja cepat (lispro, aspart), insulin dengan masa kerja singkat (reguler), insulin dengan masa kerja sedang atau intermediet (NPH, lente) dan insulin dengan masa kerja panjang seperti ultralente dan glargin (lihat Tabel 2.1). Efek samping dari insulin antara lain hipoglikemia dan penambahan berat badan (Linn, et al., 2009).

Tabel 2.1 Onset, puncak dan durasi dari berbagai jenis sediaan insulin

Insulin	Onset (menit)	Puncak (jam)	Durasi Efektif (jam)	Durasi Maksimum (jam)
Aspart	5-10	1-3	3-5	4-6
Lispro	15	0,5-1,5	2-4	4-6
Reguler	30-60	2-3	3-6	6-10
NPH	2-4	4-10	10-16	14-18
Lente	3-4	4-12	12-18	16-20
Ultralente	6-10	-	18-20	20-24
Glargin	1-2	-	24	24

[sumber: Codario, 2011]

2.3.2.2 Hipoglikemik Oral

Pemilihan obat hipoglikemik oral yang tepat sangat menentukan keberhasilan terapi diabetes. Pemberian hipoglikemik oral dapat dilakukan dengan menggunakan satu jenis obat atau berupa kombinasi. Kombinasi dari hipoglikemik oral dinilai efektif karena memiliki mekanisme kerja yang berbeda (Linn, et al., 2009).

Tabel 2.2 Jenis hipoglikemik oral

Golongan	Mekanisme Kerja	Contoh
Sulfonilurea	a. Meningkatkan sekresi insulin b. Menstimulasi sel β pankreas	Gliplizid, Gliburid, Glimepirid
Meglitinid	a. Meningkatkan sekresi insulin b. Menstimulasi sel β pankreas	Repaglinid
Biguanida	a. Menurunkan produksi glukosa hati b. Menurunkan penyerapan glukosa di usus halus c. Meningkatkan ambilan glukosa perifer d. Meningkatkan sensitivitas insulin	Metformin
Penghambat α -Glukosidase	Menghambat penguraian karbohidrat	Akarbose, Miglitol
Tiazolidindion	a. Meningkatkan sensitivitas insulin b. Memelihara fungsi sel β c. Dapat meregenerasi sel β	Pioglitazon, Rosiglitazon
Penghambat Dipeptidil Peptidase-4 (DPP-4)	a. Meningkatkan pengeluaran insulin dari pankreas b. Menekan glukagon	Sitagliptin, Vildagliptin, Saxagliptin

[sumber: Codario, 2011]

2.4 Enzim α -Glukosidase dan Penghambat Enzim α -Glukosidase

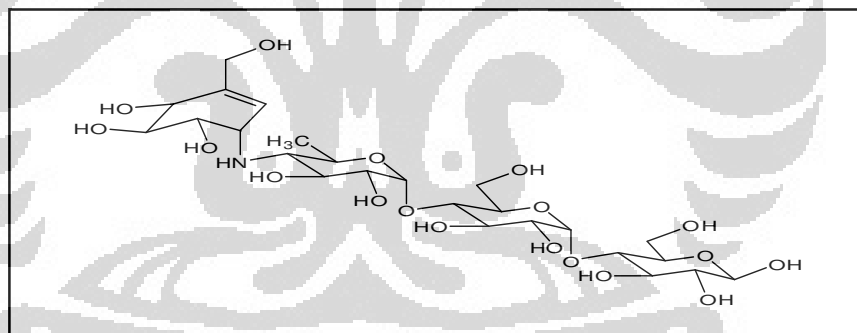
Enzim merupakan polimer biologis yang mengkatalisis reaksi kimia yang memungkinkan berlangsungnya kehidupan. Enzim bersifat spesifik baik bagi tipe reaksi yang dikatalisis maupun substrat atau substrat-substrat yang berhubungan erat. Enzim merupakan katalis yang efektif. Enzim dapat meningkatkan laju reaksi hingga lebih dari 10^6 kali (Murray, Granner, dan Rodwel, 2009).

α -Glukosidase merupakan enzim yang berada di sepanjang dinding usus halus. α -Glukosidase adalah enzim yang bertanggung jawab terhadap penguraian karbohidrat menjadi glukosa. Karbohidrat akan dicerna oleh enzim di dalam

mulut dan usus menjadi gula yang lebih sederhana, kemudian diserap ke dalam tubuh dan meningkatkan kadar gula darah (Chisholm-Burns, et al., 2008). Adapun yang termasuk enzim ini adalah maltase, isomaltase, sukrase, laktase, trehalase, dan α -dextrinase (Soumyanath, 2006).

Penghambat α -glukosidase bekerja secara kompetitif menghambat kerja enzim maltase, isomaltase, sukrase, dan glucoamilase sehingga dapat menunda penguraian sukrosa dan karbohidrat kompleks di usus halus (Dipiro, et al., 2005). Efek utama yang timbul akibat aksi ini adalah dapat mengurangi peningkatan kadar glukosa darah *postprandial* yang merupakan faktor resiko penyebab komplikasi kardiovaskular (Ceriello, 2005). Adapun senyawa yang termasuk penghambat α -glukosidase adalah akarbose dan miglitol.

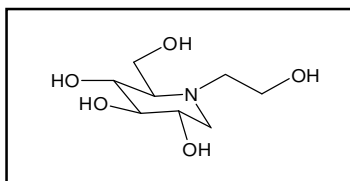
Akarbose merupakan suatu senyawa pseudo-tetrasakarida yang memiliki ikatan nitrogen antara unit glukosa pertama dan kedua. Akarbose sangat efektif dalam menghambat enzim glucoamilase, namun tidak memiliki efek penghambat pada enzim β -glukosidase (Hanefeld, 2008).



[Sumber : Merck Index, 2001]

Gambar 2.2. Struktur kimia akarbose

Miglitol adalah penghambat α -glukosidase generasi kedua. Miglitol merupakan turunan dari 1-desoksinojirimisin, dan berikatan secara *reversible* pada enzim α -glukosidase. Berbeda dengan akarbose, miglitol diabsorpsi secara lengkap di usus halus (Sels, et al., 1999). Miglitol memiliki efek yang sama seperti akarbose, tetapi dosis terapeutiknya lebih rendah (Scott L.J. dan Spencer C.M., 2000).



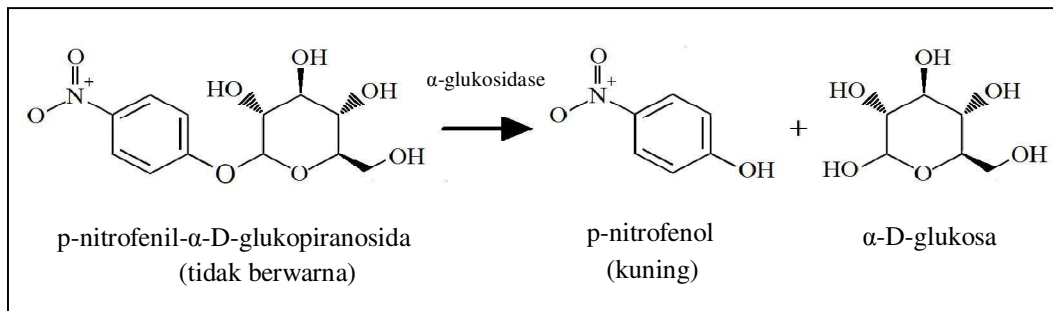
[Sumber : Merck Index, 2001]

Gambar 2.3. Struktur kimia miglitol

Penghambat α -glukosidase menimbulkan efek samping pada sistem gastrointestinal seperti diare, pembentukan gas berlebihan di lambung atau usus, dan rasa tidak nyaman pada perut (Chisholm-Burns, et al., 2008). Oleh karena itu, penghambat α -glukosidase dikontraindikasikan pada pasien dengan gangguan saluran cerna kronis seperti *short-bowel syndrome* atau inflamasi di usus besar, ulkus, malabsorpsi atau obstruksi parsial usus halus (*American Association of Clinical Endocrinologists*, 2002; Dipiro, et al., 2005). Meskipun terdapat kasus gangguan hati yang jarang terjadi, penghambat α -glukosidase tidak menyebabkan hipoglikemia serius bahkan saat overdosis dan tidak menimbulkan kenaikan berat badan (Chiasson, et al., 2003).

2.5 Uji Efek Penghambatan Aktivitas Enzim α -Glukosidase

Pengujian efek penghambatan aktivitas α -glukosidase secara *in vitro* dilakukan berdasarkan reaksi enzimatik dan pengukuran secara spektrofotometri. Reaksi enzimatik yang terjadi yaitu hidrolisis p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida oleh α -glukosidase menjadi p-nitrofenol. Aktivitas enzim diukur berdasarkan hasil pengukuran absorbansi p-nitrofenol. Pada pengujian penghambatan α -glukosidase biasa digunakan akarbose (Chen, et al., 2004), ekstrak koji (Najib, 2010), atau nojirimisin (Dewi, et al., 2007) sebagai standar.



[sumber: Kikkoman, 2001, telah diolah kembali]

Gambar 2.4 Persamaan reaksi enzimatis α -glukosidase dan p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida

2.6 Kinetika Enzim

Kinetika enzim adalah bidang biokimia mengenai pengukuran kuantitatif reaksi yang dikatalisis oleh enzim dan studi sistematis faktor-faktor yang mempengaruhi laju reaksi tersebut. Faktor yang mempengaruhi laju reaksi yang dikatalisis enzim diantaranya suhu, pH, dan konsentrasi substrat (Murray, Granner, dan Rodwell, 2009).

Konsentrasi substrat mempengaruhi laju reaksi. Jika konsentrasi substrat meningkat sementara kondisi lain tetap dipertahankan konstan, laju reaksi akan meningkat hingga batas maksimum yaitu saat enzim dalam keadaan jenuh substrat sehingga peningkatan konsentrasi substrat tidak akan mempercepat laju reaksi. Hal ini dirumuskan dalam persamaan Michaelis-Menten:

$$v_i = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (2.1)$$

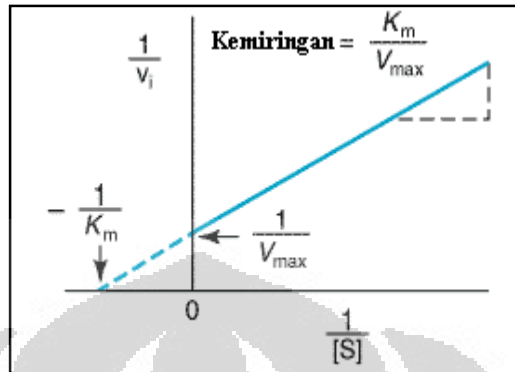
dengan v_{\max} adalah kecepatan maksimal reaksi enzimatis, v_i adalah kecepatan separuh dari kecepatan maksimal, $[S]$ adalah konsentrasi substrat dan K_m adalah *Konstanta Michaelis* (Murray, Granner, dan Rodwell, 2009).

Jenis penghambatan enzim ditentukan dengan analisis data menggunakan persamaan *Lineweaver-Burk* yang diturunkan dari persamaan Michaelis-Menten, yaitu:

$$\frac{1}{v_i} = \left(\frac{K_m}{v_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (2.2)$$

Persamaan di atas adalah persamaan dalam suatu garis lurus, $y = a + bx$, di mana $y = 1/v_i$ dan $x = 1/[S]$. $1/v_i$ sebagai fungsi y sebanding dengan $1/[S]$ sebagai fungsi dari x sehingga memberikan garis lurus yang memotong sumbu y yaitu

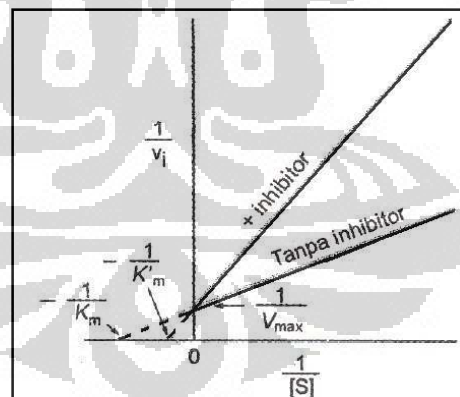
$1/V_{max}$ dan memiliki kemiringan K_m/V_{max} . Plot seperti itu disebut Plot resiprokal-ganda atau Lineweaver-Burk (Gambar 2.5).



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

Gambar 2.5 Plot Lineweaver-Burk

Pada penghambatan kompetitif, garis yang menghubungkan titik data eksperimen bertemu di sumbu y (Gambar 2.6). Karena perpotongan sumbu $y = 1/V_{max}$, pola ini menunjukkan bahwa ketika $1/[S] = 0$, v_i akan sama seperti pada keadaan tanpa penghambat.

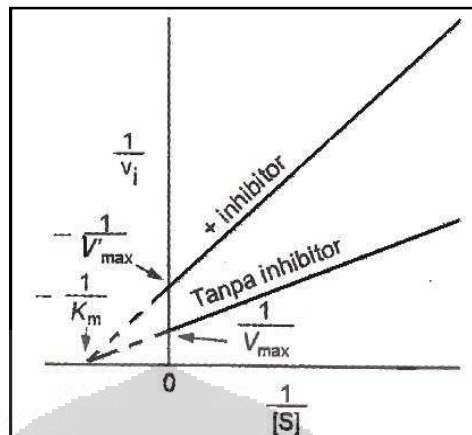


[Sumber : Murray, Granner, & Rodwell, 2009]

Gambar 2.6 Plot Lineweaver-Burk dari penghambatan kompetitif

Pada penghambatan non kompetitif, garis yang menghubungkan titik data eksperimen bertemu di sumbu x (Gambar 2.7). Karena perpotongan sumbu $x = 1/K_m$, pola ini menunjukkan bahwa ketika $1/V_i = 0$, K_m akan sama seperti pada keadaan tanpa penghambat.

Universitas Indonesia

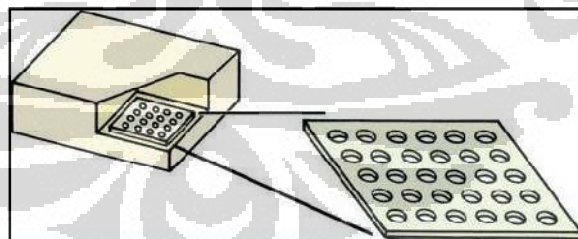


[Sumber : Murray, Granner, & Rodwell, 2009]

Gambar 2.7 Plot Lineweaver-Burk untuk penghambatan non kompetitif

2.7 *Microplate Reader* (Lakowicz, 2010)

Microplate reader merupakan alat untuk pengukuran sampel dalam jumlah banyak. Alat ini dilengkapi dengan 96 sumuran atau lebih. Sampel dimasukkan ke dalam setiap sumuran *microplate* kemudian dimasukkan ke dalam alat untuk pengukuran. Jenis pengukuran seperti ini tidak menyediakan informasi yang detail seperti pada spektroskopi, tetapi dapat dengan cepat mengukur sampel dalam jumlah banyak.



[sumber: Lakowicz, 2010]

Gambar 2.8. *Microplate reader*

Optik yang digunakan dalam *microplate reader* berbeda dengan alat yang didesain untuk menggunakan kuvet. Sumuran dalam *plate* harus diletakkan secara horizontal, dan tidak bisa dilakukan pengukuran dari sebelah kanan seperti yang biasa dilakukan pada kuvet. Sumber cahaya yang digunakan adalah xenon. Panjang gelombang dipilih menggunakan monokromator. Cermin dengan lubang

digunakan untuk mentransmisikan cahaya. *Microplate* bergerak ke setiap sumuran dengan arah x-y (*x-y scanning stage*). Beberapa jenis *microplate* dilengkapi dengan cermin kedua di bawah *microplate* untuk pengukuran sampel yang berbasis sel atau pengukuran absorpsi.

2.8 Kromatografi Lapis Tipis (Waksmundzka-Hajnos, Sherma, dan Kowalska, 2008)

Analisis kimia pada tanaman dengan metode kromatografi memiliki peranan yang penting dan telah terdapat dalam farmakope modern. Keuntungan dari metode kromatografi antara lain dapat digunakan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif. Kromatografi lapis tipis merupakan teknik kromatografi yang dapat digunakan secara luas yaitu untuk analisis kualitatif senyawa organik, isolasi senyawa dari campuran multikomponen, analisis kuantitatif, dan isolasi pada skala preparatif.

Adsorben yang digunakan pada KLT memiliki perbedaan karakteristik pada permukaan dan sifat fisikokimianya. Pemilihan fase gerak yang luas dapat digunakan untuk memisahkan komponen campuran. Pada metode ini, larutan fase gerak yang dapat mengabsorpsi UV tidak berpengaruh negatif secara signifikan terhadap deteksi dan kuantifikasi analit. Hal ini disebabkan fase gerak diupkan terlebih dahulu dari lempeng sebelum dilakukan deteksi. Elusi gradien dengan variasi komposisi fase gerak yang digunakan pada kromatografi cair kinerja tinggi, dapat diaplikasikan pada metode ini. Derajat retensi pada kromatografi lempeng biasanya dinyatakan sebagai faktor retensi, R_f :

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa pelarut}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}} \quad (2.3)$$

2.9 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi yang Aktif

Penapisan kimia merupakan pemeriksaan kualitatif kandungan kimia untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam tanaman (Harborne, 1987). Hal ini juga dapat dilakukan untuk identifikasi senyawa kimia pada kapang endofit. Berbagai golongan senyawa kimia telah diisolasi dari kapang

endofit, antara lain alkaloid, steroid, terpenoid, isokumarin, kuinon, fenilpropanoid dan lignan, fenol dan asam fenolat, metabolit alifatik, lakton, dan lain-lain (Zhang, et al., 2006).

2.9.1 Alkaloid

Alkaloid merupakan golongan senyawa yang bersifat basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen yang umumnya dalam gabungan berbentuk siklik (Harborne, 1987). Alkaloid yang terdapat pada kapang endofit antara lain amin dan amida, turunan indol, pirolizidin, dan kuinazolin. Alkaloid ini umumnya terdapat pada kapang endofit dengan inang berupa semak (Zhang, et al., 2006).

2.9.2 Steroid

Steroid tersebar luas pada tanaman dan memiliki efek fisiologi yang penting dan beberapa metabolit steroid telah diisolasi dari kapang endofit diantaranya adalah turunan ergosterol (Zhang, et al., 2006).

2.9.3 Terpenoid

Turunan terpenoid yang diproduksi dari kapang endofit telah banyak diisolasi selama periode tahun 2001-2005. Beberapa diantaranya adalah seskuiterpen, diterpen dan beberapa analog hasil dari degradasi metabolit terpenoid (Zhang, et al., 2006).

2.9.4 Flavonoid

Flavonoid terdapat dalam tumbuhan sebagai glikosida dan aglikon flavonoid. Pada umumnya dalam menganalisis flavonoid, yang diperiksa adalah aglikon dalam ekstrak tumbuhan yang sudah dihidrolisis (Harborne, 1987). Trisin dan beberapa glikosida flavon telah diisolasi dari endofit *Poa ampla* (Tan et al., 2001).

2.9.5 Fenol dan Asam Fenolat

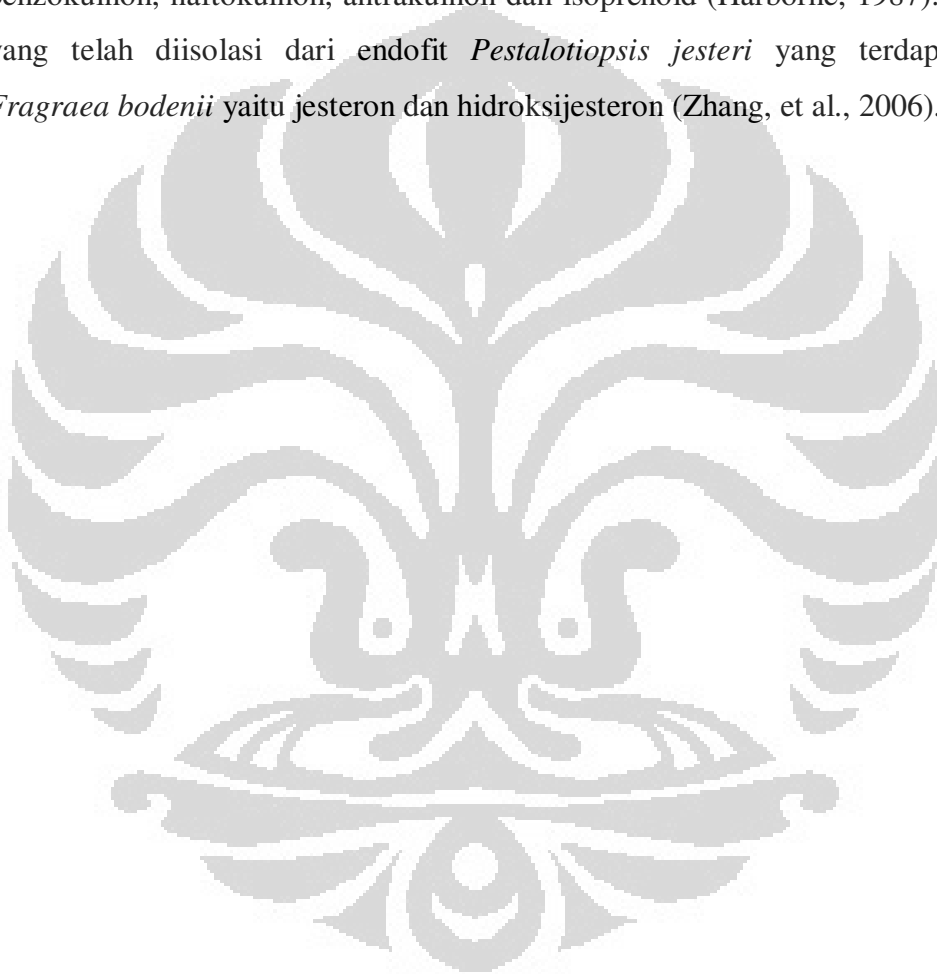
Fenol dari kapang endofit umumnya memiliki aktivitas biologi dan antioksidan. Beberapa senyawa fenol yang telah diisolasi antara lain, pestasin dan

Universitas Indonesia

isopestasin serta asam orselinat yang diketahui memiliki efek penghambatan proliferasi sel kanker paru-paru, kanker payudara, dan karsinoma pankreas (Zhang, et al., 2006).

2.9.6 Kuinon

Kuinon merupakan senyawa yang memiliki kromofor. Untuk tujuan identifikasi, kuinon dibagi menjadi empat kelompok, diantaranya adalah benzokuinon, naftokuinon, antrakuinon dan isoprenoid (Harborne, 1987). Kuinon yang telah diisolasi dari endofit *Pestalotiopsis jesteri* yang terdapat pada *Fragaria bodenii* yaitu jesteron dan hidroksijesteron (Zhang, et al., 2006).



BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi-Bioteknologi dan Laboratorium Fitokimia Departemen Farmasi FMIPA UI dari bulan Februari sampai Juni 2012.

3.2 Bahan

3.2.1 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah biji mahoni (*Swietenia macrophylla* King) yang telah jatuh dari pohon yang diperoleh dari daerah Beji, Depok dan telah dideterminasi oleh Herbarium Bogorinense Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI).

3.2.2 Medium

Medium yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari *Corn Meal Agar* (Difco), *Malt Extract* (BD), *Potato Dextrose Agar* (BD), *Potato Dextrose Broth* (BD), *Granulated Agar* (BD) dan *Yeast Extract* (BD).

3.2.3 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan antara lain akuades, akuades demineralisata (Brataco), etanol 70% dan 96% (One-Med), natrium hipoklorit 5,25% (Proclin), *Lactophenol Cotton Blue* (LFCB, Sigma), etil asetat teknis, metanol teknis, n-heksana teknis, enzim α -glukosidase yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae* rekombinan (Sigma-Aldrich), p-nitrofenil α -D-glukopiranosida (Sigma-Aldrich), kalium dihidrogenfosfat (Merck), dikalium hidrogen fosfat (Merck), dimetil sulfoksida (Merck), natrium karbonat (Merck), kalsium karbonat (Merck), kloramfenikol (Brataco), dan akarbose (Dexa Medica).

3.3 Alat

Bio Safety Cabinet khusus jamur, inkubator (Hammert), autoklaf (Hirayama), timbangan analitik (Acculab), *vortex mixer* (Barnstead), *centrifuge* (Kubota 6800), *orbital shaker* (Labline), penangas air (Labline), mikroskop cahaya (Euromex), pH meter (Eutech), filter bakteri 0,22 μm , *rotary vacuum evaporator* (Buchi), *hot plate* (Corning), mikropipet (Finnpipette), kabinet UV (Camag), oven (WTB Binder), lempeng KLT silika gel 60 F₂₅₄ (Merck), *microplate reader* (BioTek Elx808), *microplate*, *freeze dryer* (Scanvac), dan alat-alat gelas yang biasa digunakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Fitokimia.

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, kemudian ditambah akuades. Larutan tersebut kemudian dipanaskan dan diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga homogen. Selanjutnya larutan disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Kloramfenikol ditambahkan setelah suhu larutan media steril berkisar 55°C secara aseptis di dalam *bio safety cabinet* (BSC). Selanjutnya dituangkan ke dalam cawan petri secara aseptis lalu dibiarkan di suhu ruang hingga memadat.

3.4.1.2 Pembuatan Media PDA

Potato Dextrose Agar ditimbang sebanyak 39 gram, kemudian ditambahkan akuades hingga 1 liter. Larutan tersebut dipanaskan 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 memadat pada suhu ruang. Media agar miring PDA (*slant agar*) dibuat dengan cara medium PDA dituang ke dalam

tabung *slant* masing-masing 5 mL. Selanjutnya tabung berisi media diletakkan dalam posisi miring 30° dari alas horizontal dan dibiarkan hingga memadat.

3.4.1.3 Pembuatan Media Water Agar

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. Kloramfenikol ditambahkan setelah suhu larutan media steril berkisar 55°C secara aseptis di dalam *bio safety cabinet* (BSC). Selanjutnya dituangkan ke dalam cawan petri secara aseptis lalu dibiarkan di suhu ruang hingga memadat.

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) 1 gram. Semua bahan kecuali kalsium karbonat dimasukkan ke dalam labu bulat dan ditambahkan akuades hingga 1 liter. Larutan 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 lalu disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

3.4.2 Isolasi Kapang Endofit

Sampel biji tanaman dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan pengotor. Sampel disterilisasi permukaan dengan cara direndam dalam etanol 70% selama 3 menit, kemudian di larutkan natrium hipoklorit 5,25% selama 5 menit. Setelah itu, 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 BSC. Sampel biji yang telah disterilisasi selanjutnya dibuka kulit luarnya dengan menggunakan sarung tangan steril. Biji kemudian ditumbuk di lumpang steril dan secara hati-hati

diletakkan pada media isolasi. Setiap cawan petri berisi empat potongan. Media tersebut kemudian 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 dengan cara menginokulasikan sedikit hifa dengan ose dari setiap koloni endofit yang berbeda morfologinya ke dalam cawan petri yang berisi media PDA dan diinkubasi selama 5-7 hari pada suhu 27°C. Isolat kapang yang telah murni dipindahkan ke dalam agar miring PDA. Proses ini dilakukan dua kali sehingga diperoleh *working culture* dan *stock culture*.

3.4.4 Identifikasi Kapang Endofit

3.4.4.1 Identifikasi Makroskopik

Identifikasi makroskopik dilakukan dengan pengamatan morfologi dan kecepatan pertumbuhan koloni, bentuk koloni, warna koloni dan warna sebalik koloni.

3.4.4.2 Identifikasi Mikroskopik

Identifikasi mikroskopik dilakukan dengan melakukan pengamatan preparat kapang menggunakan mikroskop. Pengamatan yang dilakukan meliputi bentuk sel serta bentuk dan warna hifa. Preparat diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran kecil kemudian ditingkatkan ke perbesaran yang lebih besar.

Pembuatan preparat dilakukan dengan membersihkan kaca obyek dan kaca penutup dengan alkohol 70%, kemudian satu tetes LFCB ditetaskan di atas kaca obyek. Miselium yang telah bersporulasi diambil dengan menggunakan ose steril dan diletakkan di atas kaca obyek. Kaca penutup diletakkan di atas permukaan preparat dan kelebihan LFCB diserap dengan kertas saring.

Pembuatan preparat juga dapat dilakukan dengan cara menggunakan selotape (*cellotape flag preparations*). Hal ini lebih menguntungkan karena dapat menjaga bentuk sel reproduksi kapang. Selotape dengan ukuran 2 x 2 cm ditekan bagian menempelnya pada permukaan kultur secara aseptis. Selanjutnya selotape diangkat dan diletakkan pada kaca obyek yang telah dibersihkan dan telah ditetesi

Universitas Indonesia

LFCB. Kaca obyek tersebut kemudian ditetesi LFCB dan ditutup dengan kaca penutup. Kelebihan LFCB diserap dengan kertas saring (Ellis, et al., 2007).

3.4.5 Fermentasi Kapang Endofit

Fermentasi dilakukan untuk memperoleh metabolit sekunder kapang endofit. Isolat kapang endofit yang difermentasi adalah isolat kapang dengan usia pertumbuhan yang sama yang dihitung sejak dimurnikan pada medium baru. Hifa atau potongan agar yang mengandung hifa seukuran $2 \times 2 \text{ cm}^2$ diinokulasikan ke dalam labu Erlenmeyer berisi 500 mL medium PDY. Selanjutnya kultur diinkubasi pada suhu kamar dengan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 7 hari.

3.4.6 Ekstraksi Hasil Fermentasi Kapang Endofit

Suspensi koloni hasil fermentasi dibagi menjadi dua. Suspensi koloni I disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, lalu supernatan dipisahkan dari biomassa. Supernatan ini selanjutnya digunakan sebagai ekstrak uji I.

Metanol sebanyak 15 mL ditambahkan ke dalam biomassa, lalu dihomogenkan dengan *vortex mixer*, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh digunakan sebagai ekstrak uji II. Suspensi koloni II ditambahkan etil asetat sebanyak 15 mL dan dihomogenkan dengan *vortex mixer*, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan dari suspensi koloni II selanjutnya disebut ekstrak uji III. Larutan uji I dikeringkan dengan menggunakan *freeze dryer*, sedangkan larutan uji II dan III diuapkan dengan evaporator pada suhu 40°C .

3.4.7 Uji Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase

3.4.7.1 Preparasi Bahan dan Pereaksi Uji

a) Dapar Posfat pH 6,8

Larutan dapar fosfat pH 6,8 dibuat dari campuran larutan 1 M dikalium hidrogen fosfat (K_2HPO_4) dan larutan 1 M kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4). Larutan 1 M dikalium hidrogen fosfat dibuat dengan cara

Universitas Indonesia

87,09 g dikalium hidrogen fosfat dalam 500 mL akuademineralisata sementara 1 M kalium dihidrogen fosfat dibuat dengan cara 68,045 g kalium dihidrogen fosfat dalam 500 mL akuademineralisata.

b) Natrium Karbonat 0,2 M

Larutan natrium karbonat 0,2 M dibuat dengan cara menimbang 21,2 gram natrium karbonat kemudian dilarutkan dalam 1000 mL akuademineralisata.

c) Standar Akarbose

Akarbose ditimbang sebanyak 50 mg dan dilarutkan dengan dimetil sulfoksida (DMSO) secukupnya kemudian dicukupkan volumenya hingga 10 mL dengan dapar fosfat pH 6,8 hingga diperoleh konsentrasi ekstrak 5000 ppm. Kemudian diencerkan lagi sehingga diperoleh konsentrasi standar akarbose 500 ppm.

d) Enzim

Larutan enzim dibuat dengan cara melarutkan 5,0 mg enzim α -glukosidase dalam 100 mL dapar fosfat pH 6,8 yang mengandung *bovine serum albumin* 0,2%. Sebelum digunakan, larutan enzim tersebut diencerkan dengan dapar fosfat pH optimum hingga diperoleh konsentrasi enzim 0,049 U/mL.

e) Substrat

Larutan substrat dibuat dengan cara menimbang sebanyak 301,25 mg p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (BM: 301,25) kemudian dilarutkan dalam 50 mL akuademineralisata bebas CO₂ sehingga diperoleh larutan substrat 20 mM. Larutan substrat 20 mM kemudian diencerkan sehingga diperoleh larutan substrat 10; 5; 2,5; 1,25; dan 0,625 mM.

f) Ekstrak

Setiap ekstrak ditimbang sebanyak 50 mg dan ditambahkan larutan dimetil sulfoksida (DMSO) sampai larut. Ekstrak yang telah larut kemudian diencerkan dengan dapar fosfat pH 6,8 hingga mencapai volume 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi larutan ekstrak sebesar 5000 ppm. Selanjutnya diencerkan lagi dengan dapar fosfat pH 6,8 hingga diperoleh konsentrasi ekstrak 500 ppm.

3.4.7.2 Uji Pendahuluan (Ono, et al., 1988; Dewi, et al., 2007., Lee, et al., 2007)

Sebelum dilakukan uji efek penghambatan aktivitas α -glukosidase, terlebih dahulu dilakukan uji pendahuluan untuk mengetahui kondisi optimal kerja enzim. Optimasi dilakukan untuk menghilangkan penurunan kerja enzim akibat faktor kondisi inkubasi, pH dan konsentrasi substrat. Optimasi dilakukan dengan cara mengukur aktivitas enzim pada berbagai variasi konsentrasi substrat dan waktu inkubasi. Uji aktivitas penghambatan α -glukosidase dilakukan berdasarkan kondisi dimana aktivitas enzim paling baik.

Optimasi dilakukan dengan cara mengukur aktivitas enzim pada berbagai variasi konsentrasi substrat dan waktu inkubasi. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan adalah 20; 10; 5; 2,5; 1,25; dan 0,625 mM. Variasi waktu inkubasi yang digunakan adalah 15, 20, dan 30 menit.

Pengujian dilakukan dengan cara 2 μ L dimetil sulfoksida (DMSO) dicampurkan dengan 63 μ L dapar fosfat dan 10 μ L p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNPG), lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Pada larutan uji ditambahkan 25 μ L larutan enzim 0,049 U/mL dan selanjutnya diinkubasi selama 15 menit. Kemudian ditambahkan 100 μ L natrium karbonat 200 mM. Larutan uji diukur absorbansinya pada panjang gelombang 405 nm. Pada pengujian larutan kontrol, penambahan natrium karbonat dilakukan terlebih dahulu sebelum penambahan enzim (Tabel 3.1).

Tabel 3.1 Penambahan reagen uji pada optimasi

Reagen	Volume (μL)	
	Uji	Kontrol
DMSO	2	2
Dapar fosfat	63	63
Substrat	10	10
Inkubasi 37°C, 5 menit		
Enzim	25	-
Na ₂ CO ₃	-	100
Inkubasi 37°C, 15 menit		
Enzim	-	25
Na ₂ CO ₃	100	-
Ukur absorbansi pada $\lambda = 405 \text{ nm}$		

3.4.7.3 Uji Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase (Lee, et al., 2007)

a. Pengujian kontrol blanko (B₀)

Larutan B₀ berupa 2 μl larutan dimetil sulfoksida ditambah dengan 63 μL dapar fosfat pH 6,8 dan 10 μl substrat (p-nitrofenil α -D-glukopiranosida) yang diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Campuran kemudian ditambahkan 100 μL natrium karbonat 200 mM dan diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37°C. Sebanyak 25 μL larutan enzim yang telah diencerkan ditambahkan ke dalam campuran. Larutan ini kemudian diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm.

b. Pengujian blanko (B₁)

Larutan B₁ berupa campuran 2 μL larutan dimetil sulfoksida ditambah dengan 63 μL dapar fosfat pH 6,8 dan 10 μL p-nitrofenil α -D-glukopiranosida yang diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Campuran kemudian ditambahkan 25 μL larutan enzim yang telah diencerkan dan diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37°C. Kemudian campuran tersebut ditambah 100 μL natrium karbonat 200 mM. Larutan kemudian diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm.

c. Pengujian sampel (S_1)

Larutan sampel sebanyak 2-10 μL ditambah dengan 55-63 μL dapar fosfat pH 6,8 dan 10 μL p-nitrofenil α -D-glukopiranosida, kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya ditambahkan 25 μL enzim yang telah diencerkan dan diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, larutan sampel ditambah 100 μL natrium karbonat 200 mM. Larutan sampel diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm.

d. Pengujian kontrol sampel (S_0)

Larutan sampel sebanyak 2-10 μL ditambah dengan 55-63 μL dapar fosfat pH 6,8 dan 10 μL p-nitrofenil α -D-glukopiranosida, lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya ditambah 100 μL natrium karbonat 200 mM, sampel diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37°C. Setelah inkubasi selesai, 25 μL enzim yang telah diencerkan ditambahkan ke dalam larutan uji. Sampel diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm.

e. Pengujian Standar

Larutan standar (akarbose) sebanyak 2-10 μL ditambah dengan 55-63 μL dapar fosfat pH 6,8 dan 10 μL p-nitrofenil α -D-glukopiranosida, kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya ditambahkan 25 μL enzim yang telah diencerkan dan diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, larutan sampel ditambah 100 μL natrium karbonat 200 mM. Larutan diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm. Hitung % inhibisi setiap konsentrasi akarbose dan IC_{50} akarbose.

f. Penafsiran data

Pengukuran pada setiap pengujian penghambatan α -glukosidase dilakukan dua kali pengulangan (duplo). Persen penghambatan diukur dengan rumus:

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

Universitas Indonesia

dimana S adalah absorbansi S_1 - S_0 dan C adalah absorbansi B_1 - B_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 Penambahan reagen uji penghambatan α -glukosidase

Reagen	Volume (μ L)			
	B_0	B_1	S_1	S_0
Sampel	-	-	2-10	2-10
DMSO	2	2	-	-
Dapar fosfat	63	63	55-63	55-63
Substrat	10	10	10	10
Inkubasi 37°C, 5 menit				
Enzim	-	25	25	-
Na_2CO_3	100	-	-	100
Inkubasi 37°C, 30 menit				
Enzim	25	-	-	25
Na_2CO_3	-	100	100	-
Ukur absorbansi pada $\lambda = 405$ nm				

3.4.7.6 Uji Kinetika Penghambatan α -Glukosidase

Kinetika penghambatan enzim diukur dengan melihat aktivitas enzim saat konsentrasi substrat dinaikkan. 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. Konsentrasi substrat yang digunakan adalah 20; 10; 5; dan 2,5 mM.

a. Pengujian dengan penghambat

Dapar fosfat pH 6,8 sebanyak 55-63 μL dicampur dengan 10 μL p-Nitrofenil α -D-glukopiranosida dan 2-10 μL larutan sampel kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya 25 μL larutan enzim ditambahkan ke dalam larutan tersebut. Larutan diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37°C. Setelah inkubasi selesai, natrium karbonat 200 mM sebanyak 100 μL ditambahkan untuk menghentikan reaksi enzimatik. Larutan diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm.

b. Pengujian tanpa penghambat

Dapar fosfat pH 6,8 sebanyak 63 μL dicampur dengan 10 μL p-nitrofenil α -D-glukopiranosida dan 2 μL DMSO, dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian 25 μL larutan enzim ditambahkan ke dalam larutan tersebut. Larutan diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37°C. Setelah inkubasi selesai, natrium karbonat 200 mM sebanyak 100 μL ditambahkan untuk menghentikan reaksi enzimatik. Larutan diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm.

Tabel 3.3 Uji kinetika penghambatan enzim

Reagen	Volume (μL)	
	Tanpa Penghambat	Dengan Penghambat
Ekstrak	-	2-10
DMSO	2	-
Dapar	63	55-63
Substrat	10	10
Inkubasi 37°C selama 5 menit		
Enzim	25	25
Inkubasi 37°C selama 30 menit		
Na_2CO_3	100	100
Ukur absorbansi pada $\lambda = 405 \text{ nm}$		

c. Penafsiran data

Tetapan kinetika Michaelis-Menten dihitung berdasarkan persamaan regresi $y = a + b x$, dimana x adalah $1/[S]$ dan y adalah $1/A$. Jenis penghambatan dapat juga dilihat dari bentuk plot Lineweaver-Burk (Murray, Granner, dan Rodwell, 2009)

3.4.8 Pemeriksaan Pola Kromatogram Ekstrak dengan KLT

Ekstrak dengan aktivitas terkuat ditimbang sebanyak 5 mg kemudian dilarutkan dalam 5 mL pelarut yang digunakan untuk ekstraksi. Larutan kemudian dipipet menggunakan pipet kapiler dan ditotolkan pada lempeng KLT Silika F₂₅₄. Lempeng kemudian dielusi dengan menggunakan heksana-etil asetat dengan perbandingan yang sesuai (Dewi, et al., 2007). Setelah elusi selesai, lempeng diangin-anginkan sampai kering lalu diperiksa di bawah sinar ultraviolet 366 nm dan disemprot dengan larutan H₂SO₄ 10% dalam metanol. Proses tersebut hanya menunjukkan jumlah senyawa yang terdapat dalam fraksi bukan identifikasi golongan senyawa. Identifikasi golongan senyawa dilakukan dengan pereaksi semprot yang spesifik untuk masing-masing golongan.

Golongan flavonoid diidentifikasi dengan peraksi semprot AlCl₃ atau SbCl₃ dalam kloroform. Golongan alkaloid diidentifikasi dengan pereaksi semprot Dragendorff sedangkan golongan sterol/terpen diidentifikasi dengan pereaksi semprot anisaldehyd dalam H₂SO₄. Golongan steroid diidentifikasi dengan pereaksi semprot *Libermann-Bouchard*. Golongan tanin diidentifikasi dengan FeCl₃. Setelah itu, lempeng kromatogram diangin-anginkan sampai kering lalu diamati dengan sinar biasa dan sinar ultraviolet 254 nm dan 366 nm (Wagner, 1983). Bercak kemudian dilihat warna dan dihitung harga Rfnya.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

Secara garis besar penelitian ini terdiri dari empat tahapan. Tahap pertama adalah isolasi kapang endofit dari sampel tanaman. Selanjutnya, kapang endofit hasil isolasi difermentasi dan diekstraksi senyawa metabolit sekundernya. Ekstrak hasil fermentasi tersebut kemudian diuji efek penghambatannya terhadap aktivitas enzim α -glukosidase. Tahapan terakhir dari penelitian ini adalah menentukan golongan senyawa dari ekstrak hasil fermentasi yang memiliki efek penghambatan paling tinggi terhadap aktivitas enzim α -glukosidase.

4.1 Isolasi Kapang Endofit

Pada penelitian ini, isolasi kapang endofit dilakukan dengan metode *direct seed planting*, yaitu langsung menempelkan bagian tanaman pada media isolasi. Media isolasi yang digunakan adalah media yang dapat memenuhi kebutuhan nutrisi untuk dapat tumbuh, tetapi dapat mengurangi kemungkinan pertumbuhan dari kontaminan lainnya. Koloni kapang yang diisolasi adalah kapang yang memiliki ciri waktu tumbuh lebih dari 5 hari, tumbuh di sekitar sampel biji yang ditanam dan memiliki morfologi yang berbeda dari kapang yang tumbuh pada cawan petri kontrol BSC. Pada penelitian ini digunakan tiga media isolasi, yaitu media CMM (*Corn Meal Malt Agar*), WA (*Water Agar*) dan PDA (*Potato Dextrose Agar*). Semua media isolasi diberi suplemen berupa kloramfenikol 0,05 gram untuk mencegah pertumbuhan bakteri.

Tahapan isolasi kapang endofit dimulai dengan sterilisasi permukaan bagian biji mahoni yang akan diisolasi. Sterilisasi permukaan dilakukan dengan menggunakan oksidan kuat atau desinfektan yang diikuti proses pengeringan yang dilakukan secara aseptis. Desinfektan yang digunakan pada proses sterilisasi permukaan adalah larutan NaOCl 5,25% dan alkohol 70%. NaOCl merupakan desinfektan yang umum digunakan dalam prosedur sterilisasi permukaan (Zhang, et al., 2006). Zat kimia ini termasuk ke dalam golongan halogen dan dapat mengoksidasi gugusan sulfhidril (-SH) secara *irreversible* sehingga mengganggu reaksi enzimatik pada metabolisme mikroorganisme (Volk dan Wheeler, 1988).

Keberhasilan sterilisasi permukaan dapat ditingkatkan dengan menggunakan agen pembasah. Agen pembasah yang umum digunakan adalah alkohol (Zhang, et al., 2006). Alkohol dapat mendenaturasi protein dan melarutkan lemak pada membran protein mikroba. Proses tersebut memerlukan air sehingga alkohol 70% menunjukkan aktivitas anti mikroba yang lebih baik dibandingkan alkohol absolut (Siswandono, 1995).

Pada penelitian ini diperoleh enam koloni kapang endofit dari biji tanaman mahoni. Rincian hasil isolasi dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil isolasi kapang endofit

Media	Cawan Petri ke -	Nama Isolat
CMM	4B	CMM 4B
	11A	CMM 11A
	19A	CMM 19A
PDA	1A	PDA 1A
WA	6B	WA 6B
	8A	WA 8A

Keterangan :

CMM = medium *Corn Meal Malt Agar*

PDA = medium *Potato Dextrose Agar*

WA = medium *Water Agar*

Setiap kapang endofit yang berhasil tumbuh pada media isolasi kemudian dimurnikan dan diremajakan dengan menggunakan media PDA. Media ini merupakan media kaya dan lebih mudah dicerna sehingga memudahkan isolat kapang endofit 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 akibat faktor kompetisi memperoleh nutrisi (Gandjar, Syamsuridzal dan Oetari, 2006).

4.2 Identifikasi Isolat Kapang Endofit

Identifikasi isolat kapang endofit dilakukan dengan melakukan pengamatan makroskopik dan mikroskopik kemudian membandingkannya dengan literatur. Pengamatan makroskopik meliputi warna koloni, warna sebalik koloni, kecepatan pertumbuhan dan morfologi koloni. Sedangkan pada pengamatan mikroskopik yang diamati adalah bentuk dan warna hifa, serta bentuk reproduksi seksual atau aseksual dari masing-masing isolat kapang endofit. Pengamatan mikroskopik dilakukan dengan mewarnai hifa kapang dengan *Lactophenol cotton blue*. Fenol yang terdapat pada pewarna tersebut dapat mendeaktivasi enzim litik seluler sehingga sel tidak mengalami lisis. *Cotton blue* merupakan pewarna asam yang dapat mewarnai kitin yang merupakan zat pembentuk dinding sel kapang.

4.2.1 Isolat CMM4B

Koloni kapang isolat CMM4B berhasil diisolasi dari media isolasi CMM. Koloni awalnya berwarna abu-abu kemudian menjadi abu tua hingga coklat. Permukaan koloni seperti tepung halus dengan bagian tengah menggunung. Miselia tipis dan dan sebagian masuk ke dalam agar. Sebalik koloni berwarna coklat kekuningan dan menjadi hitam serta memberikan warna coklat pada media (Gambar 4.2). Pada pengamatan secara mikroskopik konidiofor bercabang dan berwarna coklat dengan dinding tebal. Konidiofor bersepta satu atau dua. Konidia berbentuk oval, bersel satu, berdinding tebal dan berwarna kehijauan di bagian tengah (Gambar 4.3). Isolat diduga termasuk ke dalam marga *Fonsecaea*.

4.2.2 Isolat CMM11A

Koloni isolat CMM11A berwarna hijau dengan miselia aerial berwarna putih dan berbentuk seperti kapas. Permukaan koloni tidak rata dengan bagian tengah menggunung. Koloni sebalik berwarna putih hingga kekuningan (Gambar 4.5). Pada pengamatan secara mikroskopik hifa tampak transparan dan memiliki septa. Konidiofor pendek dan tidak berwarna. Konidia berwarna coklat

Universitas Indonesia

kekuningan dan berbentuk oblong atau memanjang dengan ujung membulat (Gambar 4.6). Isolat diduga termasuk ke dalam marga *Aspergillus*.

4.2.3 Isolat CMM19A

Koloni memiliki permukaan dengan warna hijau dan seperti tepung halus dengan tepi koloni rata dan berwarna putih. Bagian tengah koloni tampak menggunung. Koloni sebalik berwarna coklat muda dan membuat media PDA berwarna hijau (Gambar 4.8). Pada pengamatan secara mikroskopik hifa tampak transparan dan terdapat septa disertai adanya pembengkakan. Konidiofor berbentuk seperti kuas dan tidak bercabang. Konidia berbentuk bulat dan berwarna hijau (Gambar. 4.9). Isolat belum dapat teridentifikasi.

4.2.4 Isolat PDA1A

Koloni isolat PDA1A memiliki miselia aerial lebat berwarna putih halus sehingga tampak seperti kapas. Koloni sebalik berwarna coklat muda (Gambar 4.10). Pada pengamatan mikroskopis, hifa tampak transparan dan memiliki septa. Konidiofor berdinding halus dan tidak bercabang. Konidia berbentuk oval dan berwarna hijau (Gambar 4.11). Isolat diduga termasuk ke dalam marga *Aspergillus*.

4.2.5 Isolat WA6B

Pada permukaan koloni terdapat miselia lebat berwarna putih. Bagian tengah koloni berwarna putih kemudian menjadi hijau dan tampak menggunung. Koloni sebalik berwarna putih hingga putih kekuningan (Gambar 4.13). Pada pengamatan mikroskopis, konidiofor berdinding halus dan agak agak membulat pada bagian ujungnya. Konidia berbentuk bulat atau semi bulat (Gambar 4.14). Isolat diduga termasuk ke dalam marga *Aspergillus*.

4.2.6 Isolat WA8A

Koloni kapang berwarna hijau tua yang menggunung pada bagian tengah. Bagian tepi koloni rata dan terdapat hifa berwarna putih. Koloni sebalik berwarna putih kekuningan (Gambar 4.15). Pada pengamatan mikroskopis tampak adanya

karpus atau tubuh buah. Hifa tampak sangat tipis sehingga tidak terlihat adanya septa. Konidia berwarna hijau dan berbentuk bulat (Gambar 4.16). Isolat diduga termasuk ke dalam marga *Penicillium*.

4.3 Fermentasi Kapang Endofit

Proses fermentasi dilakukan dengan menggunakan media PDY yang merupakan campuran dari PDB (*Potato Dextrose Broth*) dan *yeast extract* pada suhu ruang. PDB mengandung sumber karbon yang berasal dari ekstrak kentang dan dekstrosa serta *yeast extract* berperan sebagai sumber nitrogen yang diperlukan untuk pertumbuhan kapang selama fermentasi. Fermentasi dilakukan selama tujuh hari disertai agitasi dengan kecepatan 150 rpm (Dompeipen, et al., 2001). 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, yaitu pada rentang pH 6-7. Satu kali proses fermentasi menghasilkan 500 mL kultur fermentasi yang selanjutnya dilakukan ekstraksi untuk memperoleh senyawa metabolit aktif dari kapang endofit.

Fermentasi kapang endofit dilakukan dengan menggunakan media PDY yang berupa media cair (*submerged culture*). Penggunaan media cair lebih mudah dikerjakan secara aseptis dan lebih cocok untuk proses fermentasi dalam skala besar (Stanbury, Whitaker dan Hall, 1994). Proses fermentasi bertujuan untuk menghasilkan sel kapang endofit dalam jumlah banyak sehingga senyawa metabolit yang dihasilkan menjadi lebih optimal. Fase pertumbuhan dari kapang endofit yang akan difermentasi merupakan faktor penting yang harus diperhatikan. 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.

4.4 Ekstraksi Hasil Fermentasi Kapang Endofit

Senyawa penghambat α -glukosidase pada umumnya adalah senyawa semi polar hingga polar yang memiliki ikatan glikosida pada strukturnya (Borges de

Universitas Indonesia

Melo, Gomes, dan Carvalho, 2006). Hasil fermentasi diekstraksi dengan menggunakan pelarut organik yang bersifat semi polar hingga polar yaitu metanol dan etil asetat. Selain menggunakan pelarut organik, metabolit sekunder diperoleh dengan mengambil bagian air dari suspensi kapang endofit tersebut.

Setiap 20 mL kultur fermentasi diekstraksi dengan 15 mL larutan pengestrak. Campuran pengestrak dengan suspensi koloni kapang endofit dihomogenkan dengan *vortex mixer* lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Setiap ekstrak dikentalkan dengan evaporator dengan suhu 30-40°C, kecuali ekstrak air dikeringkan dengan *freeze dryer*. Dari proses ekstraksi didapatkan tiga ekstrak, yaitu ekstrak air, ekstrak metanol dan ekstrak etil asetat.

Tabel 4.2 Perolehan berat ekstrak isolat kapang endofit

Kode Isolat	Ekstrak		
	Air	Etil Asetat	Metanol
CMM4B	449,51 mg	176 mg	230,7 mg
CMM11A	849,02 mg	121,25 mg	217,9 mg
CMM19A	709,44 mg	350,36 mg	182,26 mg
PDA1A	805,62 mg	142,13 mg	95,19 mg
WA6B	499,93 mg	245,3 mg	179,98 mg
WA8A	517,23 mg	173,32 mg	274,6 mg

4.5 Uji Efek Penghambatan Aktivitas α -Glukosidase

Hal pertama yang dilakukan pada tahap ini adalah uji pendahuluan yang merupakan optimasi kerja enzim α -glukosidase. Selanjutnya dilakukan uji efek penghambatan aktivitas enzim dan uji kinetika dari ekstrak yang paling aktif.

4.5.1 Uji Pendahuluan

Enzim α -glukosidase menghidrolisis p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida menjadi p-nitrofenol yang dapat diukur serapannya pada panjang gelombang 405

nm. Oleh karena itu, aktivitas enzim sebanding dengan absorbansi p-nitrofenol. Semakin tinggi absorbansi p-nitrofenol, semakin tinggi aktivitas enzim.

Larutan enzim yang digunakan adalah larutan enzim dengan konsentrasi 0,049 U/mL. Pada setiap pengujian digunakan 25 μ L enzim sehingga diperoleh konsentrasi akhir enzim 0,006 U/mL. Uji optimasi konsentrasi substrat dilakukan dengan menggunakan variasi konsentrasi substrat 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; dan 20 mM. Pada setiap pengujian digunakan 10 μ L substrat sehingga diperoleh konsentrasi akhir substrat 0,031; 0,063; 0,125; 0,25; 0,5; dan 1,0 mM.

Absorbansi p-nitrofenol yang dihasilkan semakin meningkat seiring dengan penambahan konsentrasi substrat hingga mencapai suatu keadaan jenuh dimana penambahan konsentrasi substrat tidak meningkatkan nilai absorbansi yaitu pada konsentrasi substrat 0,5 mM. Dengan demikian, didapatkan kesimpulan bahwa enzim bekerja paling optimal pada konsentrasi substrat sebesar 0,5 mM dengan konsentrasi enzim 0,006 U/mL. Pada Gambar 4.18 terlihat titik puncak adalah pada saat konsentrasi substrat sebesar 0,5 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, dan Rodwell, 2009).

Proses inkubasi terdiri dari dua tahap. Pada tahap pertama, dilakukan inkubasi selama 5 menit. Inkubasi awal ini bertujuan untuk memberikan waktu bagi larutan uji untuk mencapai suhu 37°C. Inkubasi kedua merupakan waktu inkubasi berlangsungnya reaksi enzimatik. Uji optimasi waktu inkubasi dilakukan pada inkubasi kedua. Uji optimasi waktu inkubasi dilakukan dengan variasi waktu 15, 20, dan 30 menit. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa semakin lama waktu inkubasi semakin tinggi nilai absorbansi yang dihasilkan. Berdasarkan hasil tersebut, tidak diperoleh waktu inkubasi paling optimum karena belum mencapai kondisi jenuh. Oleh karena itu, dilakukan penambahan variasi waktu inkubasi yaitu 40 menit. Pada uji optimasi dengan waktu inkubasi 40 menit terjadi penurunan pada absorbansi. Hal ini mungkin disebabkan terjadinya umpan balik negatif dari p-nitrofenol dan α -D-glukosa yang dihasilkan. Berdasarkan hal tersebut, disimpulkan bahwa waktu inkubasi 30 menit merupakan waktu inkubasi yang paling optimum.

4.5.2 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 255,96 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} akarbose yang didapat berbeda dengan penelitian sebelumnya, yaitu 117,20 $\mu\text{g/mL}$ (Elya, et al., 2011). Hal ini disebabkan karena metode yang digunakan juga berbeda yaitu dengan digunakannya *microplate reader*. Pada penggunaan *microplate reader*, volume sampel uji yang digunakan lebih kecil daripada pada spektrofotometer dengan menggunakan kuvet, sehingga kesalahan pipetan sangat berpengaruh besar. Selain itu, tinggi volume juga berpengaruh pada proses pengujian. Akibatnya, perbedaan tinggi volume sedikit saja akan mempengaruhi nilai absorbansi yang didapat. 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 dan Kim, 2008). Hal ini juga terjadi seperti pada penelitian ini yang menggunakan enzim α -glukosidase yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae*.

4.5.3 Uji Aktivitas Penghambatan α -glukosidase

Uji penghambatan aktivitas α -glukosidase dilakukan dengan menggunakan larutan enzim 0,049 U/mL dan larutan substrat dengan konsentrasi 10 mM dengan waktu inkubasi 30 menit. Hasil uji efek penghambatan aktivitas α -glukosidase pada masing-masing ekstrak air, metanol dan etil asetat dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan bahwa potensi penghambatan atau persen inhibisi ekstrak etil asetat jauh lebih besar dibandingkan dengan ekstrak air dan metanol. Potensi penghambatan ekstrak air dan metanol dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ tidak terlalu besar (Tabel 4.3). Dengan demikian, nilai IC_{50} dari kedua ekstrak tersebut berada pada konsentrasi di atas 1000 $\mu\text{g/mL}$, jauh di atas nilai IC_{50} standar akarbose. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa-senyawa yang dapat menghambat aktivitas α -glukosidase pada isolat kapang endofit tertarik dengan baik oleh etil asetat. Oleh karena itu, untuk uji selanjutnya hanya digunakan ekstrak etil asetat.

Pada pengujian ekstrak etil asetat diperlukan pengenceran terhadap konsentrasi larutan uji karena hasil pengujian menunjukkan bahwa pada ekstrak dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ memberikan persen inhibisi terlalu besar yaitu mendekati 100%. Oleh karena itu, dilakukan pengenceran menjadi 100; 75; 50; 25; dan 10 $\mu\text{g/mL}$.

Pada hasil uji efek penghambatan aktivitas α -glukosidase dari standar akarbosa didapatkan nilai IC_{50} sebesar 255,56 ppm. Nilai IC_{50} dari akarbosa ini digunakan sebagai pembandingan terhadap nilai IC_{50} dari sampel uji. Pada penelitian ini, terdapat lima ekstrak etil asetat yang memiliki aktivitas penghambatan yang lebih baik daripada akarbosa yaitu ekstrak dari isolat CMM4B, CMM19A, PDA1A, WA6B, dan WA8A. Hal ini dapat disebabkan oleh efek sinergis dari senyawa-senyawa yang terdapat dalam ekstrak (Kim, Nam, Kurihara dan Kim, 2008). Ekstrak etil asetat dari isolat CMM4B memiliki aktivitas penghambatan yang paling potensial dengan IC_{50} 73,64 $\mu\text{g/mL}$.

Berdasarkan penelitian sebelumnya, ekstrak dari isolat kapang endofit memiliki aktivitas penghambatan lebih baik dari akarbosa yaitu dengan IC_{50} 8,6 $\mu\text{g/mL}$ (Dewi, et al., 2007) dan 28,40 $\mu\text{g/mL}$ (Ramadhan, 2011). Dari hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak dari isolat kapang endofit memiliki potensi yang baik sebagai agen penghambat α -glukosidase.

Tabel 4.3 Nilai IC_{50} ekstrak etil asetat isolat kapang endofit

No	Isolat	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
1	CMM4B	73,64
2	CMM11A	352,93
3	CMM19A	115,35
4	PDA1A	230,58
5	WA6B	229,67
6	WA8A	172,52

4.5.4 Uji Kinetika Penghambatan Enzim

Evaluasi kinetika penghambatan enzim dilakukan dengan cara melihat aktivitas enzim saat konsentrasi substrat dinaikkan. Larutan substrat yang digunakan adalah larutan substrat dengan konsentrasi substrat 2,5; 5; 10; dan 20 mM. Pengujian kinetika penghambatan enzim menghasilkan grafik yang menunjukkan jenis penghambatan kompetitif terdapat pada ekstrak etil asetat dari CMM4B pada konsentrasi ekstrak 25 µg/mL. Uji kinetika dilakukan dengan empat konsentrasi ekstrak dan tanpa adanya ekstrak. Pada konsentrasi ekstrak sebesar 25 µg/mL 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 penghambat. Hal ini terjadi karena terjadi pergeseran konstanta kesetimbangan antara enzim-penghambat 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, dan 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, dan Rodwell, 2009). Pada penelitian ini diperoleh nilai K_m yang meningkat dan nilai V_{maks} yang relatif konstan (lihat Tabel 4.15). Hasil ini memperlihatkan adanya tipe penghambatan kompetitif pada ekstrak.

4.6 Pemeriksaan Pola Kromatogram Ekstrak dengan Metode KLT

Pemeriksaan pola kromatogram bertujuan untuk mengetahui jumlah senyawa yang mungkin ada dalam ekstrak serta mengetahui harga R_f nya masing-masing. Hasil elusi dari metode ini belum dapat digunakan untuk mengetahui golongan senyawa yang ada dalam ekstrak. Pemeriksaan pola kromatogram dilakukan pada ekstrak dengan aktivitas penghambatan terhadap α -glukosidase terbaik yaitu ekstrak etil asetat dari CMM4B.

Pemeriksaan kandungan senyawa dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis menunjukkan bahwa dalam satu ekstrak terdapat lebih dari satu komponen senyawa yang terkandung di dalamnya. Hasil pengujian dengan menggunakan eluen heksana-etil asetat 9:1 menghasilkan satu bercak dengan Rf 0,24. Elusi dengan menggunakan campuran eluen heksana-etil asetat 8:2 menghasilkan empat bercak dengan Rf 0,09; 0,24; 0,33; 0,48. Elusi dengan menggunakan campuran eluen heksana-etil asetat 7:3 menghasilkan lima bercak dengan Rf 0,09; 0,24; 0,44; 0,51; 0,62. Pemisahan terbaik didapat dari campuran eluen heksana-etil asetat 7:3.

Golongan senyawa kimia diidentifikasi dengan menggunakan pereaksi semprot. Eluen yang digunakan adalah heksana-etil asetat 7:3 karena hasil elusinya menunjukkan pemisahan terbaik. Ekstrak yang diuji adalah ekstrak etil asetat yang bersifat semi polar, maka senyawa yang terdapat dalam ekstrak tersebut juga kemungkinan bersifat semi polar. Oleh karena itu, golongan senyawa kimia yang diidentifikasi adalah senyawa yang bersifat semi polar dan berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui dapat dihasilkan oleh isolat kapang endofit. Golongan senyawa yang diuji adalah alkaloid, flavonoid, tanin, dan antrakuinon. Ekstrak mengandung alkaloid apabila berwarna jingga setelah disemprot dengan pereaksi semprot alkaloid yaitu Dragendorff. Berdasarkan hasil identifikasi, ekstrak etil asetat dari isolat CMM4B tidak mengandung alkaloid.

Golongan senyawa flavonoid diidentifikasi dengan pengujian di bawah sinar UV 366 nm dengan penyemprot AlCl_3 5%. Ekstrak mengandung flavonoid apabila menghasilkan fluoresensi hijau kuning (Harborne, 1987). Berdasarkan hasil identifikasi, terdapat fluoresensi hijau kuning pada bercak dengan nilai Rf 0,09 sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etil asetat dari isolat CMM4B mengandung flavonoid.

Antrakuinon diidentifikasi dengan menggunakan pereaksi semprot KOH. Hasil positif jika terbentuk warna ungu. Berdasarkan hasil identifikasi, ekstrak etil asetat dari isolat CMM4B tidak mengandung antrakuinon.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengujian, dapat disimpulkan bahwa:

- a. Pada penelitian ini diperoleh enam isolat kapang endofit dari biji tanaman *Swietenia macrophylla* King yaitu isolat CMM4B, CMM11A, CMM19A, PDA1A, WA6B, dan WA8A yang diduga merupakan isolat dari marga *Fonsecaea*, *Penicillium*, dan *Aspergillus*.
- b. Terdapat lima ekstrak etil asetat isolat dengan efek penghambatan aktivitas α -glukosidase lebih baik dari akarbose dan ekstrak dari isolat CMM4B merupakan ekstrak paling aktif dengan IC_{50} 73,64 ppm.
- c. Ekstrak etil asetat isolat CMM4B mengandung flavonoid.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut yaitu uji molekular pada isolat kapang untuk identifikasi sampai ke tingkat spesies, penentuan golongan senyawa yang aktif sebagai agen penghambat α -glukosidase serta melakukan isolasi senyawa tersebut.

DAFTAR ACUAN

- American Association of Clinical Endocrinologists. (2002). Medical guidelines for the management of diabetes mellitus: The AACE system of intensive diabetes self-management—2002 update. *Endocrine Practice*. 8, 40–82.
- 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.
- Carlile, M.J., Watkinson, S.C., dan G.W. Gooday. (2001). *The Fungi, 2nd ed.* UK: Elsevier Academic Press.
- Ceriello, A. (2005). Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat? *Diabetes*, 54, 1–7.
- 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.
- Chiasson JL, Josse RG, dan R. Gomis. (2003). Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance: the STOP-NIDDM trial. *Journal of American Medical Association*, 290, 486–487.
- Chisholm-Burns, Marie A, Barbara G. Wells, Terry L. Schwinghammer, Patrick M. malone, Jill M Kolesar, John C. Rotschafer dan Joseph T. Dipiro. (2008). *Pharmacotherapy principles and practice*. New York : Mc Graw-Hill Companies, Inc, 649; 657.
- Codario, R. A. (2011). *Type 2 Diabetes, pre-diabetes, and the metabolic syndrome 2nd edition*. New York: Humana Press.
- Corwin, E. (1996). *Buku saku patofisiologi*. Jakarta: EGC.
- Crozier, J., S.E. Thomas, M.C. Aime, H.C. Evan dan K.A. Holmes. (2006). Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies isolated from stem and pods of *Theobroma cacao*. *Plant Pathology* 55, 783-791.
- Departemen Kesehatan RI. (1979). *Farmakope Indonesia edisi III*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.

- Departemen Kesehatan RI. (1995). *Farmakope Indonesia edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. 1061.
- Dirjen Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan. (2005). *Pharmaceutical care untuk penyakit diabetes melitus*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Dewanjee, S., dan A. Maiti. (2011). Swietenine, big leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) seed extract as a hypoglycemic agent. *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*. 205-212.
- 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., Robert L. Talbert., Gary C. Yees., Gary R. Matzke., Barbara G. Wells., dan L. Michael Posey. (2005). *Pharmacotherapy a pathophysiologic approach*. New York: McGraw-Hill Companies, Inc, 1342-1343; 1352.
- Direktorat Perbenihan Tanaman Hutan. (2001). *Informasi singkat benih: Swietenia macrophylla* King. 5.
- Dompeipen, E. J., Srikandace, Y., Suharso, W. P., Cahyana, H., dan P. Simanjuntak. (2011). Potential endophytic microbes selection for antidiabetic bioactive compounds production. *Asian Journal of Biochemistry*, 6, 465-471.
- Ellis, D., Davis, S., Alexiou, H., Handke, R., dan R. Bartley. (2007). *Description of medical fungi 2nd edition*. Australia: Mycology Unit Women's and Children's Hospital University of Adelaide.
- Elya, B., Basah, K., Mun'im, A., Bangun, A., dan E.K. Septiana. (2011). Screening of α -Glucosidase inhibitory activity from some plants of Apocynaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae, and Rubiaceae. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012, 1-6.
- 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.

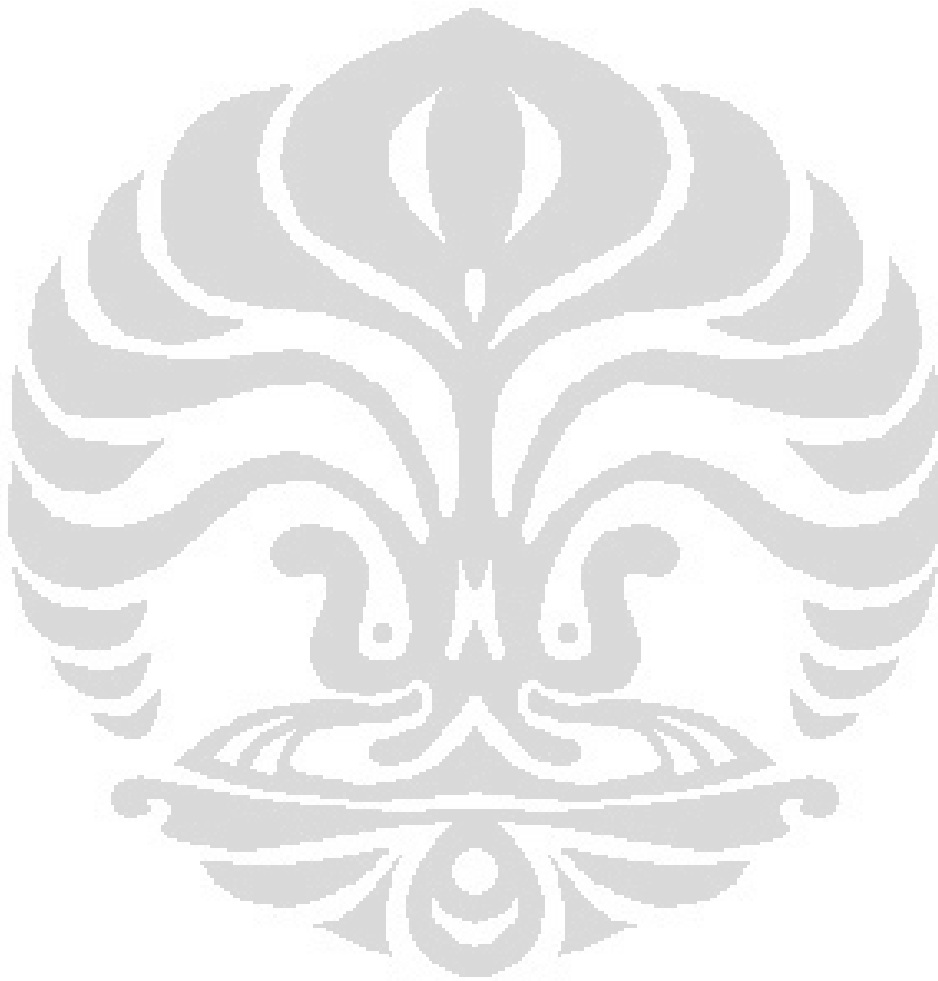
- Hanefeld, M. (2008). *Alpha-glucosidase inhibitors*. In B. J. Goldstein dan D. Muller-Wieland (Ed.). *Type 2 diabetes principles and practice second edition* (hlm. 27-43). New York: Informa Healthcare USA Inc.
- Hanson, J. R. (2008). *The Chemistry of fungi*. Cambridge: RCS Publishing.
- Harborne, J.B. (1987). *Metode fitokimia. ter. dari Phytochemical methods oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro*. Bandung: Penerbit ITB; 47-69; 102-109; 123; 245.
- 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.
- Jimenez, M. B., Aguilar-Flores S., del Valle, M.V., Perez, A., Zepeda, A., dan A, Zenteno. (2001). Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. *Journal of Soil Biology and Biochemistry*, 167-172.
- Kalaivanan, K., dan K.V., Pugalendi. (2011). Antihyperglycemic effect of the alcoholic seed extract of *Swietenia macrophylla* on streptozotocin-diabetic rats. *Pharmacognosy Research* 3(1), 67-71.
- Kikkoman. (2001). α -Glucosidase (α GLS-SE) from recombinant *E. Coli*, 95-98.
- 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.
- Krisnawati, H., Kallio, M., dan M., Kanninen. (2011). *Swietenia macrophylla King: Ecology, silviculture and productivity*. Bogor: CIFOR. 1-4.
- Lakowicz, J.R. (2010). *Principles of fluorescence spectroscopy 3rd edition*. New York: Springer Science+Business Media, LLC.
- Lee, S.K., Hwang, J.Y., Song, J.H., Jo, J.R., Kim, M.J., Kim, M.E., dan J.I., Kim. Inhibitory activity of *Euonymus alatus* against alpha-glucosidase *in vitro* and *in vivo*. *Nutrition Research and Practice* 1 (3): 184-188.
- Linn, W.D., Wofford, M.R., O'Keefe, M.E., dan L.M., Pose. (2009). *Pharmacotherapy in primary care*. New York: McGraw-Hill.

- Maiti, A., Dewanjee, S., Kundu, M., dan S. C., Mandal. (2009). Evaluation of antidiabetic activity of the seeds of *Swietenia macrophylla* in diabetic rats. *Pharmaceutical Biology* 47(2), 132-136.
- Murray, Robert K, Daryl K.G., dan W.R, Victor. (2009). *Biokimia Harper edisi 27* terjemahan dari *Harper's Biochemistry 27th* oleh Brahm U.Pendit. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- 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.
- Onifade, A.K. (2007). Research trends: Bioactive metabolites of fungal origin. *Journal of Biological Sciences* 2, 81-84.
- 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.
- Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., dan A. Simons. (2009). *Swietenia macrophylla* King. *Agroforestry Database: a tree reference and selection guide*. 1-5.
- Radji, M. (2005). Peranan bioteknologi dan mikroba endofit dalam pengembangan obat herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 2(3), 113-126.
- Ramadhan, M. Gama. (2011). *Skrining dan Uji Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase dari Kapang Endofit Daun Johar (Cassia siamea Lamk.)*. Skripsi Departemen Farmasi UI. Depok: Universitas Indonesia, 2011.
- Scott, L.J., dan C.M. Spencer. (2000). Miglitol: a review of its therapeutic potential in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 59(3), 21-49.
- Sels, J. P., Huijiberts, M.S., dan B.H. Wolffenbuttel. (1999). Miglitol, a new alpha-glucosidase inhibitor. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 1(1), 49-56.
- Siswandono, S. B. (1995). *Kimia Medisinal*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Soumyanath, Amala. (2006). *Traditional medicines for modern times: Antidiabetic plant*. Boca Raton: Taylor & Francis Group.

- Strobel, G. dan B. Daisy. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4), 491-502.
- Strobel, G., B. Daisy, U. Castillo dan J. Harper, 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67, 257-268.
- 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*. Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran-Universitas Indonesia. 481-495.
- Tan, R. X. dan W. X. Zou. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolite. *Natural Product Reports* 18, 448-459.
- The Merck Index, Thirteenth Edition*. (2001). USA: Merck and Company.
- Theantana, T., K.D. Hyde dan S. Lumyong. (2007). Asparaginase production by endophytic fungi isolated from some thai medicinal plants. *KMITL Journal of Science and Technology* 7, 13-18.
- Volk W. A. dan Wheeler M. F. (1988). *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Wagner, H., Bladt, S., dan E.M. Zgainski. (1983). *Plant drug analysis*. New York: Springer, 299-304.
- Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., dan T., Kowalska. (2008). *Thin layer chromatography in phytochemistry*. CRC Press. 3-9
- WHO Department of Noncommunicable Disease Surveillance Geneva. (1999). Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. *Report of a WHO Consultation Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*.
- Wild, S., G. Roglid, A. Green, R. Sicree dan H. King. (2004). Global prevalence of diabetes. *Diabetes Care* 27(5), 1047-1053.

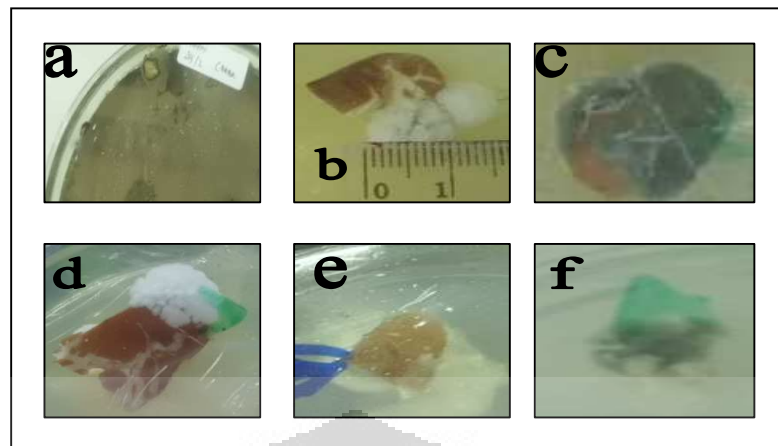
Williams, G. dan J.C. Pickup. (2004). *Handbook of Diabetes*, 3rd ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. pp. 55-71.

Zhang, H.W., Y.C. Song dan R.X. Tan, (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Natural Products Reports* 23, 753-771.



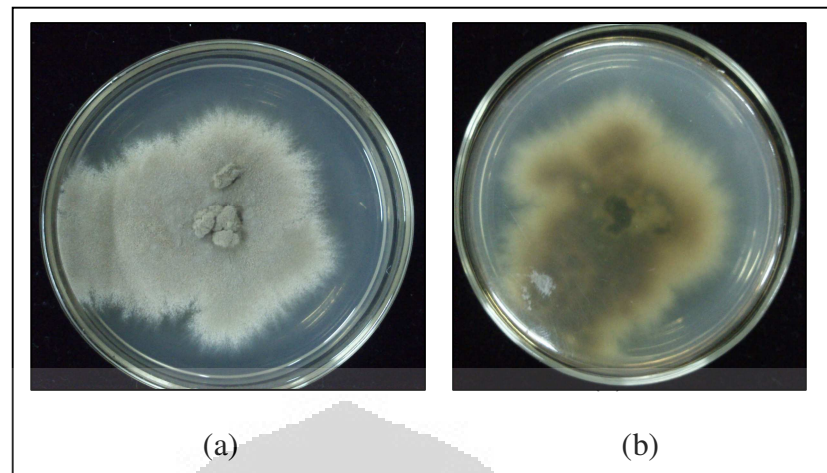


GAMBAR

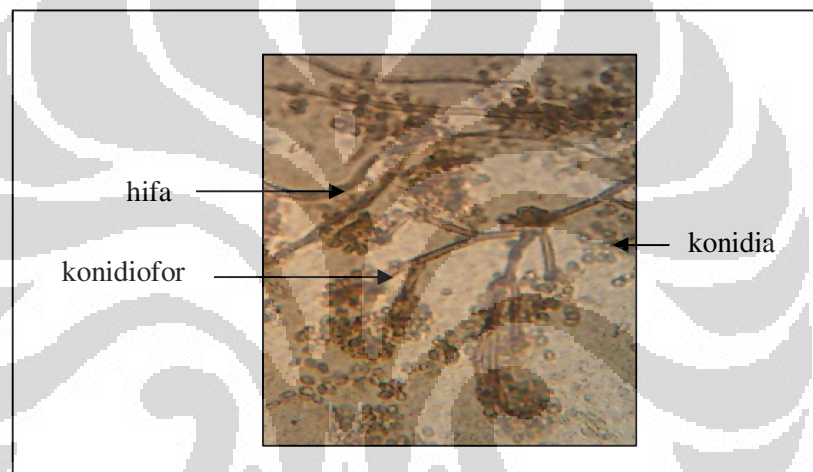


Keterangan gambar: a. CMM4B
b. CMM11A
c. CMM19A
d. PDA1A
e. WA6B
f. WA8A

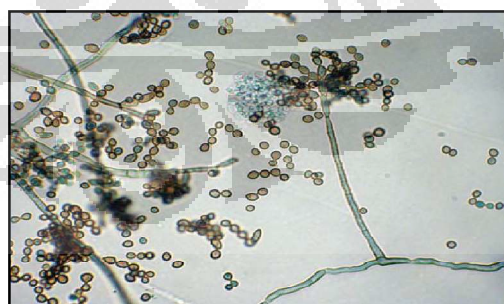
Gambar 4.1 Kultur kapang endofit pada media isolasi



Gambar 4.2 Isolat koloni CMM4B (a) dan sebalik koloni (b)

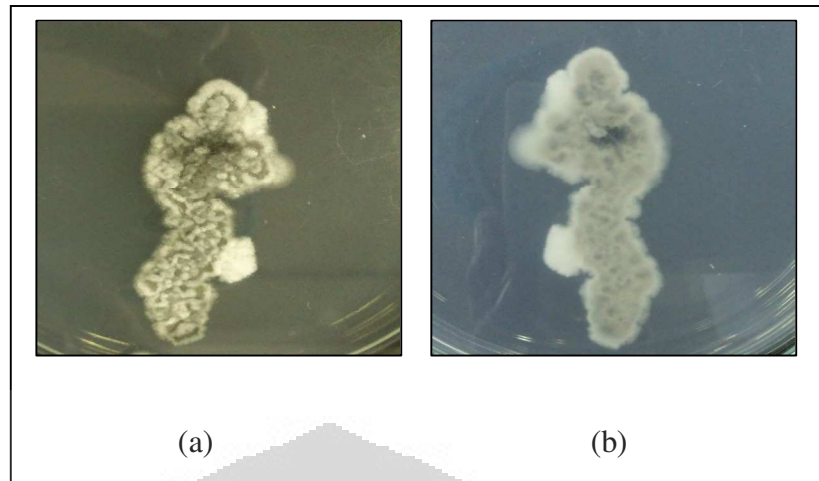


Gambar 4.3 Hasil identifikasi mikroskopik isolat CMM4B (perbesaran 400x)

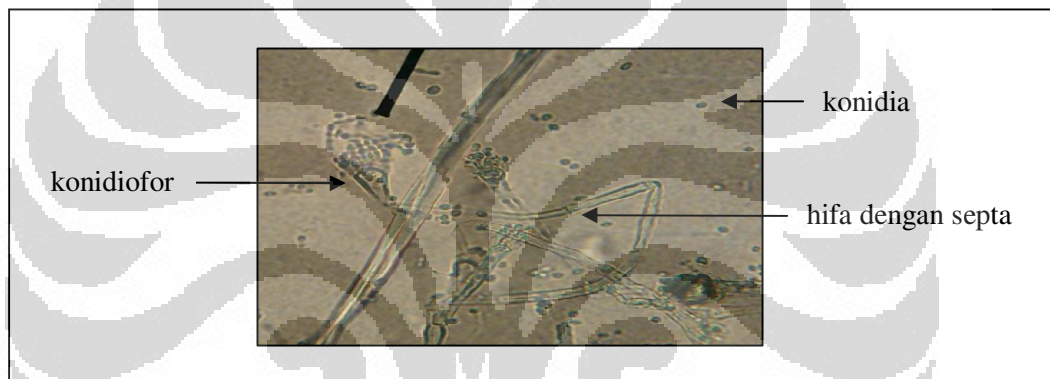


[sumber: Ellis, et al., 2007]

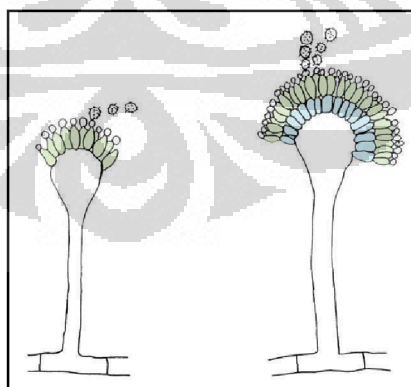
Gambar 4.4 Kapang referensi marga *Fonsecaea*



Gambar 4.5 Isolat koloni CMM11A (a) dan sebalik koloni (b)

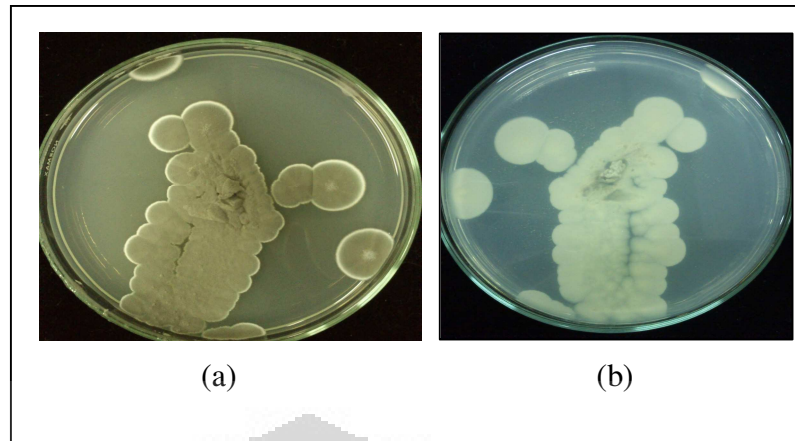


Gambar 4.6 Hasil identifikasi mikroskopik isolat CMM11A (perbesaran 400x)

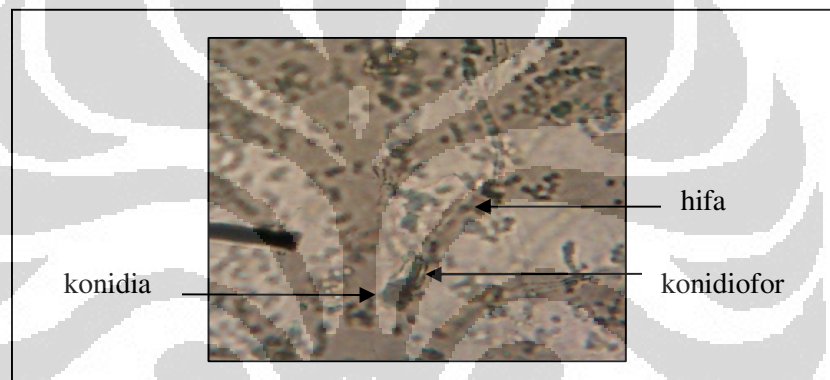


[sumber: Ellis, et al., 2007]

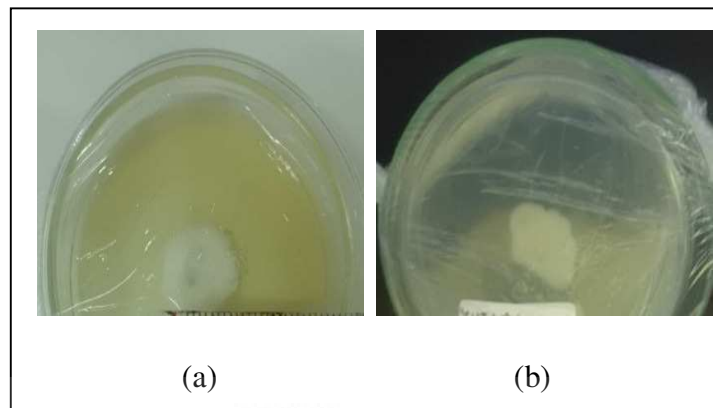
Gambar 4.7 Kapang referensi marga *Aspergillus*



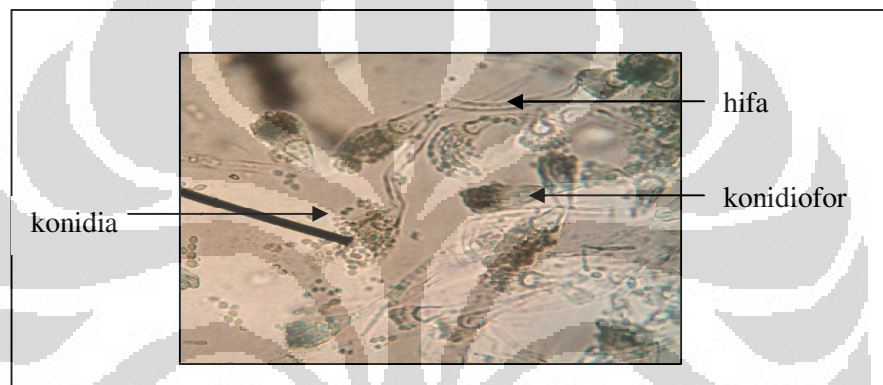
Gambar 4.8 Isolat koloni CMM19A (a) dan sebalik koloni (b)



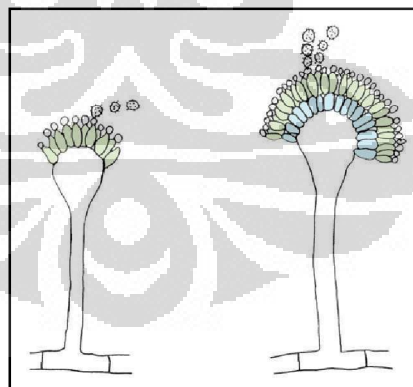
Gambar 4.9 Hasil identifikasi mikroskopik isolat CMM19A (perbesaran 400x)



Gambar 4.10 Isolat koloni PDA1A (a) dan sebalik koloni (b)

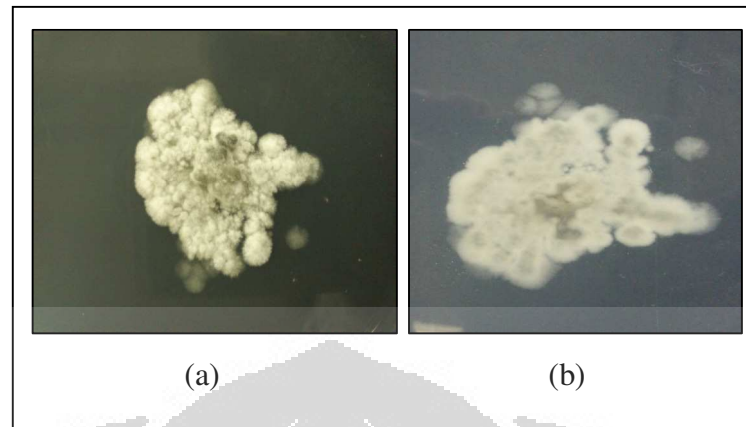


Gambar 4.11 Hasil identifikasi mikroskopik isolat PDA1A (perbesaran 400x)

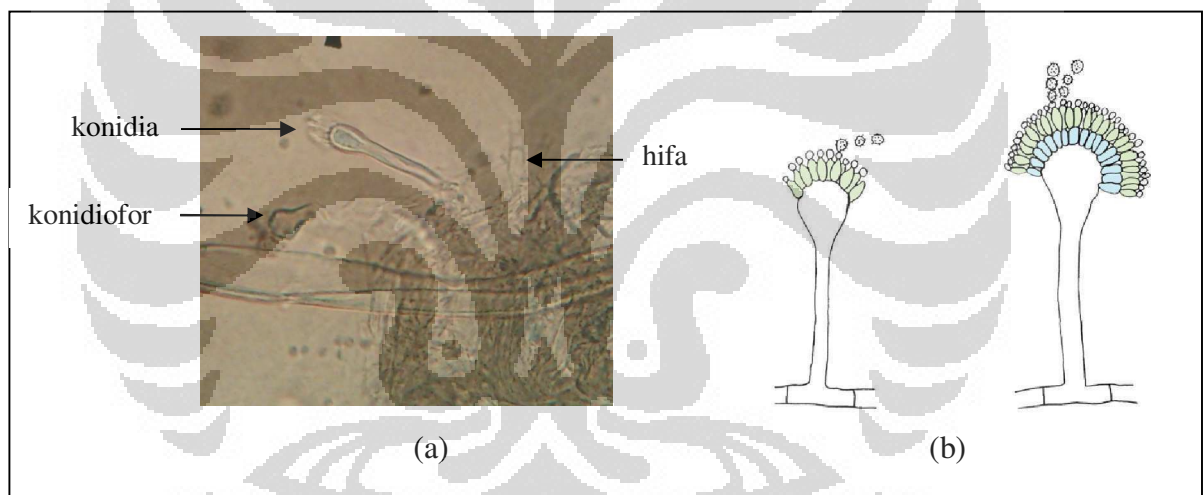


[sumber: Ellis, et al., 2007]

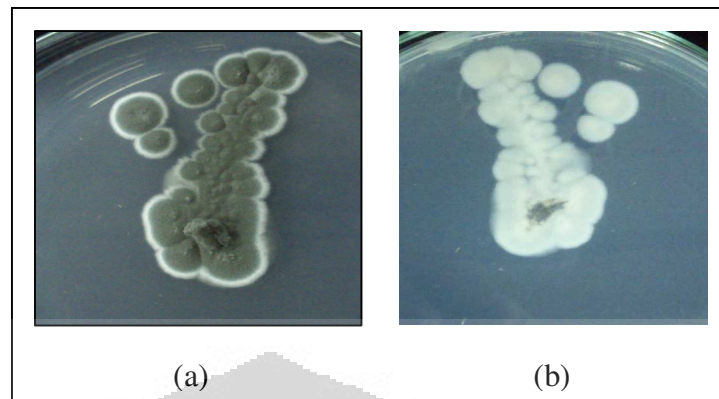
Gambar 4.12 Kapang referensi marga *Aspergillus*



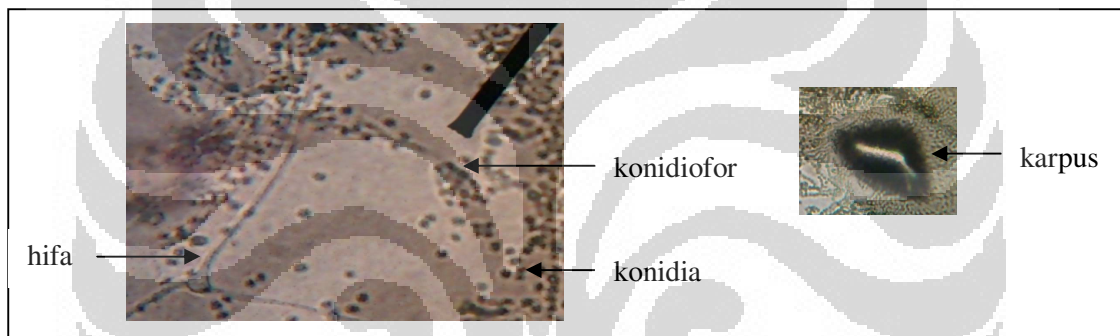
Gambar 4.13 Isolat koloni WA6B (a) dan sebalik koloni (b)



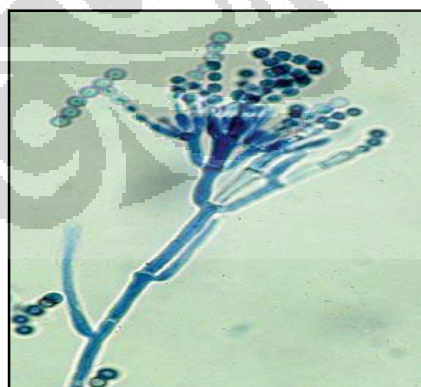
Gambar 4.14 (a) Hasil identifikasi mikroskopik isolat WA 6B (perbesaran 400x)
 (b) Kapang referensi marga *Aspergillus* (Ellis, et al., 2007)



Gambar 4.15 Isolat koloni WA8A (a) dan sebalik koloni (b)

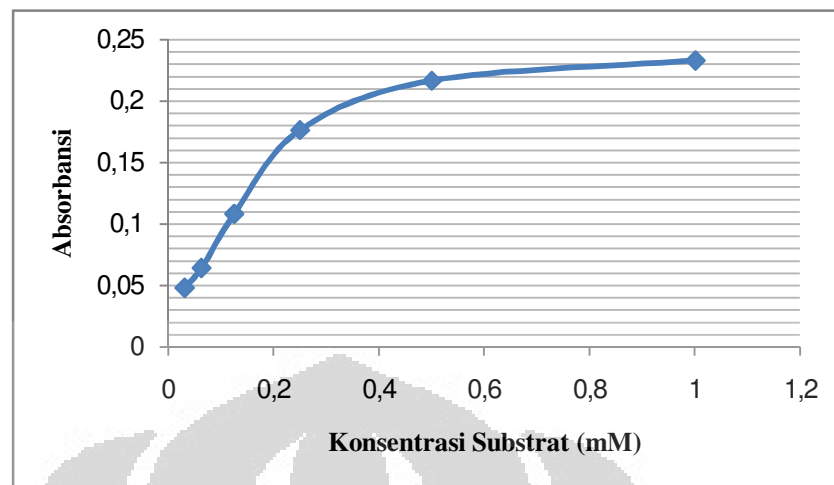


Gambar 4.16 Hasil identifikasi mikroskopik isolat WA8A (perbesaran 400x)

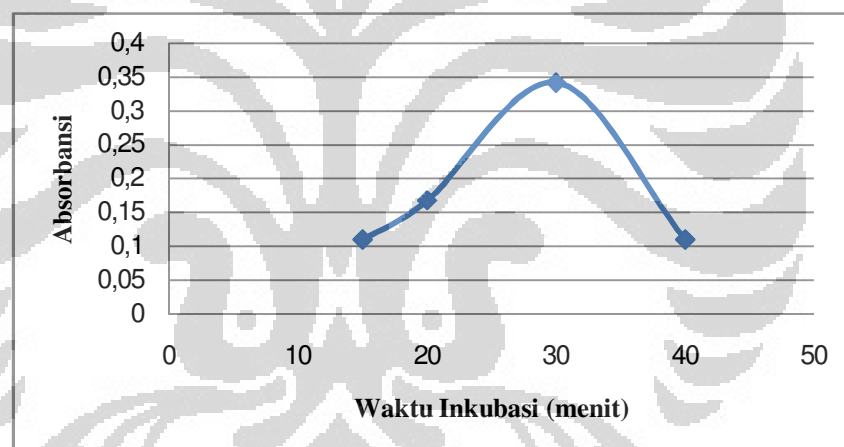


[sumber: Ellis, et al., 2007]

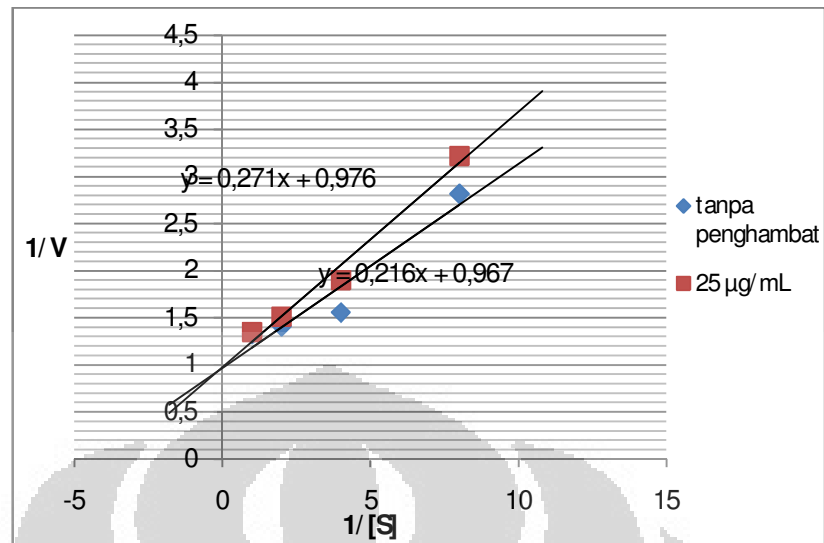
Gambar 4.17 Kapang referensi marga *Penicillium*



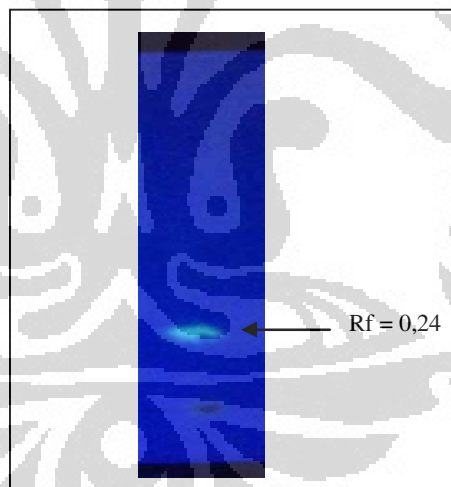
Gambar 4.18 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap absorbansi



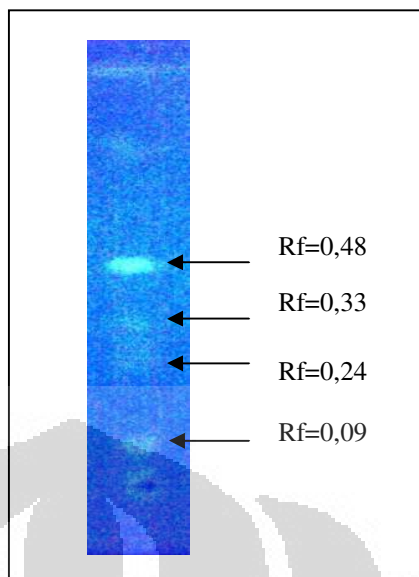
Gambar 4.19 Pengaruh waktu inkubasi terhadap absorbansi



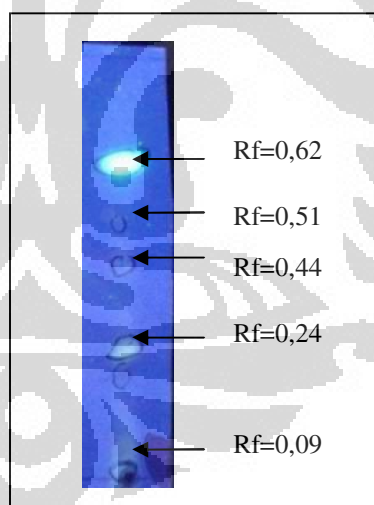
Gambar 4.20 Grafik Lineweaver-Burk pada ekstrak dengan konsentrasi 25 µg/mL



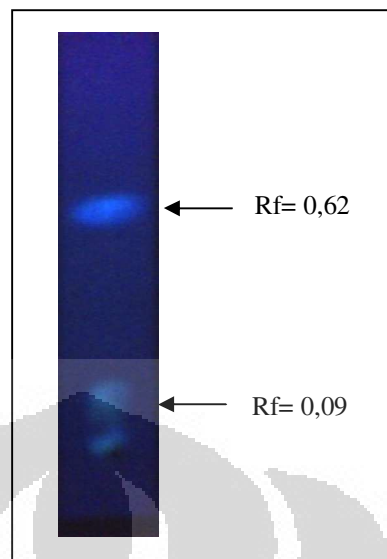
Gambar 4.21 Kromatografi lapis tipis ekstrak etil asetat CMM4B dengan fase gerak heksana-etil asetat (9:1) pada sinar UV 366 nm dengan disemprot H_2SO_4 10%



Gambar 4.22 Kromatografi lapis tipis ekstrak etil asetat CMM4B dengan fase gerak heksana-etil asetat (8:2) pada sinar UV 366 nm dengan disemprot H_2SO_4 10%



Gambar 4.23 Kromatografi lapis tipis ekstrak etil asetat CMM4B dengan fase gerak heksana-etil asetat (7:3) pada sinar UV 366 nm dengan disemprot H_2SO_4 10%



Gambar 4.24 Kromatografi lapis tipis ekstrak etil asetat CMM4B dengan fase gerak heksana-etil asetat (7:3) pada sinar UV 366 nm dengan disemprot AlCl_3 5 %



Tabel 4.4 Optimasi aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat 0,031; 0,063; 0,125; 0,25; 0,5; dan 1,0 mM

Konsentrasi Substrat		Serapan (A)		Serapan rata-rata	% RSD	U-B
		A ₁	A ₂			
0,031 mM	Uji (U)	0,058	0,048	0,053	13,34	0,0485
	Blanko (B)	0,003	0,006	0,0045	47,14	
0,063 mM	Uji (U)	0,069	0,071	0,07	2,02	0,0645
	Blanko (B)	0,011	0	0,0055	141,42	
0,125 mM	Uji (U)	0,118	0,116	0,117	1,21	0,1085
	Blanko (B)	0,008	0,009	0,0085	8,32	
0,25 mM	Uji (U)	0,172	0,182	0,177	3,99	0,1765
	Blanko (B)	0,001	0	0,0005	141,42	
0,5 mM	Uji (U)	0,22	0,226	0,223	1,90	0,2165
	Blanko (B)	0,003	0,01	0,0065	76,15	
1,0 mM	Uji (U)	0,259	0,239	0,249	5,68	0,233
	Blanko (B)	0,016	0,016	0,016	0	

Tabel 4.5 Optimasi aktivitas enzim dengan waktu inkubasi 15; 20; 30; 40 menit

Waktu Inkubasi		Serapan (A)		Serapan rata-rata	% RSD	U - B
		A ₁	A ₂			
15 menit	Uji (U)	0,113	0,114	0,1135	0,62	0,1115
	Blanko (B)	0,003	0,001	0,002	70,71	
20 menit	Uji (U)	0,193	0,188	0,1905	1,86	0,1655
	Blanko (B)	0,025	0,025	0,025	0	
30 menit	Uji (U)	0,345	0,362	0,3535	3,40	0,345
	Blanko (B)	0,002	0,015	0,0085	108,15	
40 menit	Uji (U)	0,169	0,187	0,178	7,15	0,1676
	Blanko (B)	0,098	0,110	0,0104	81,59	

Tabel 4.6 Hasil uji penentuan potensi penghambatan aktivitas α -glukosidase oleh isolat kapang endofit pada konsentrasi ekstrak 1000 $\mu\text{g/mL}$

Ekstrak	Potensi Penghambatan Ekstrak Kapang Endofit (% inhibisi)					
	CMM4B	CMM11A	CMM19A	PDA1A	WA6B	WA8A
Etil Asetat	99,95	90,68	98,98	98,48	98,22	98,99
Air	0,09	9,64	1,56	11,01	3,87	5,65
Metanol	1,69	8,82	4,06	11,19	13,59	7,44

Tabel 4.7 Hasil uji efek penghambatan aktivitas enzim oleh ekstrak etil asetat isolat CMM4B

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	% RSD	S_1-S_0	% Inhibisi	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
		A_1	A_2					
100	S_1	0,541	0,545	0,543	0,52	0,175	70,61	73,64
	S_0	0,366	0,370	0,368	0,77			
75	S_1	0,564	0,556	0,560	1,01	0,321	46,09	
	S_0	0,259	0,219	0,239	11,83			
50	S_1	0,568	0,566	0,567	0,25	0,385	35,35	
	S_0	0,189	0,175	0,182	5,44			
25	S_1	0,572	0,568	0,570	0,49	0,486	18,39	
	S_0	0,079	0,088	0,084	7,58			
10	S_1	0,589	0,599	0,594	1,19	0,565	5,12	
	S_0	0,026	0,032	0,029	14,63			
B (Blanko)						0,596		
Persamaan regresi						$y = 0,688x - 0,665$		

Keterangan: A_1 = Serapan pertama; A_2 = Serapan kedua (duplo); S_1 = Sampel; S_0 = Kontrol sampel;
 % RSD = Standar deviasi relatif; IC_{50} = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.8 Hasil uji efek penghambatan aktivitas enzim oleh ekstrak etil asetat isolat CMM11A

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	% RSD	S_1-S_0	% Inhibisi	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
		A_1	A_2					
100	S_1	0,515	0,495	0,505	2,80	0,479	18,39	352,93
	S_0	0,032	0,020	0,026	32,64			
75	S_1	0,513	0,507	0,510	0,83	0,489	16,69	
	S_0	0,025	0,017	0,021	26,94			
50	S_1	0,523	0,519	0,521	0,54	0,506	13,79	
	S_0	0,017	0,013	0,015	18,86			
25	S_1	0,546	0,528	0,537	2,37	0,525	10,56	
	S_0	0,015	0,009	0,012	35,36			
10	S_1	0,565	0,535	0,550	3,86	0,545	7,16	
	S_0	0,007	0,003	0,005	56,56			
B (Blanko)						0,587		
Persamaan regresi						$y = 0,122x + 6,943$		

Keterangan: A_1 = Serapan pertama; A_2 = Serapan kedua (duplo); S_1 = Sampel; S_0 = Kontrol sampel;
 % RSD = Standar deviasi relatif; IC_{50} = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.9 Hasil uji efek penghambatan aktivitas enzim oleh ekstrak etil asetat isolat CMM19A

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	% RSD	S_1-S_0	% Inhibisi	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
		A_1	A_2					
100	S_1	0,473	0,479	0,476	0,89	0,351	46	115,35
	S_0	0,122	0,127	0,125	2,83			
75	S_1	0,516	0,496	0,506	2,79	0,442	32	
	S_0	0,071	0,057	0,064	15,47			
50	S_1	0,513	0,497	0,505	2,24	0,454	30,15	
	S_0	0,058	0,043	0,051	20,78			
25	S_1	0,523	0,501	0,512	3,04	0,495	23,85	
	S_0	0,023	0,011	0,017	49,91			
10	S_1	0,595	0,601	0,598	0,71	0,586	9,85	
	S_0	0,015	0,009	0,012	35,36			
B (Blanko)						0,650		
Persamaan regresi						$y = 0,342x + 10,55$		

Keterangan: A_1 = Serapan pertama; A_2 = Serapan kedua (duplo); S_1 = Sampel; S_0 = Kontrol sampel;
 % RSD = Standar deviasi relatif; IC_{50} = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.10 Hasil uji efek penghambatan aktivitas enzim oleh ekstrak etil asetat isolat PDA1A

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	% RSD	S_1-S_0	% Inhibisi	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
		A_1	A_2						
100	S_1	0,476	0,482	0,479	0,89	0,445	23,80	230,58	
	S_0	0,031	0,037	0,034	12,48				
75	S_1	0,477	0,491	0,484	2,05	0,458	21,58		
	S_0	0,024	0,027	0,026	8,16				
50	S_1	0,485	0,507	0,496	3,14	0,483	17,29		
	S_0	0,012	0,013	0,013	5,44				
25	S_1	0,524	0,538	0,531	1,86	0,522	10,62		
	S_0	0,007	0,011	0,009	31,43				
10	S_1	0,532	0,558	0,545	3,37	0,542	7,19		
	S_0	0,002	0,003	0,003	23,57				
B (Blanko)						0,584			
Persamaan regresi						$y = 0,190x + 6,189$			

Keterangan: A_1 = Serapan pertama; A_2 = Serapan kedua (duplo); S_1 = Sampel; S_0 = Kontrol sampel;
 % RSD = Standar deviasi relatif; IC_{50} = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.11 Hasil uji efek penghambatan aktivitas enzim oleh ekstrak Etil Asetat Isolat WA6B

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	% RSD	S_1-S_0	% Inhibisi	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
		A_1	A_2					
100	S_1	0,476	0,468	0,472	1,19	0,465	21,78	229,67
	S_0	0,007	0,006	0,007	10,10			
75	S_1	0,501	0,497	0,499	0,57	0,496	16,57	
	S_0	0,004	0,002	0,003	47,14			
50	S_1	0,512	0,508	0,510	0,55	0,508	14,55	
	S_0	0,002	0,001	0,002	35,36			
25	S_1	0,558	0,548	0,553	1,28	0,551	7,32	
	S_0	0,001	0,003	0,002	70,71			
10	S_1	0,580	0,592	0,586	1,45	0,585	1,59	
	S_0	0	0,002	0,001	141,42			
B (Blanko)						0,595		
Persamaan regresi						$y = 0,212x + 1,310$		

Keterangan: A_1 = Serapan pertama; A_2 = Serapan kedua (duplo); S_1 = Sampel; S_0 = Kontrol sampel;
 % RSD = Standar deviasi relatif; IC_{50} = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.12 Hasil uji efek penghambatan aktivitas enzim oleh ekstrak etil asetat isolat WA8A

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	% RSD	S_1-S_0	% Inhibisi	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
		A_1	A_2					
100	S_1	0,433	0,441	0,437	1,29	0,413	30,06	172,52
	S_0	0,022	0,025	0,024	8,84			
75	S_1	0,473	0,471	0,472	0,29	0,458	22,44	
	S_0	0,015	0,013	0,014	10,10			
50	S_1	0,494	0,502	0,498	1,14	0,487	17,53	
	S_0	0,011	0,011	0,011	0			
25	S_1	0,514	0,518	0,516	0,55	0,511	13,46	
	S_0	0,005	0,004	0,005	14,14			
10	S_1	0,572	0,582	0,577	1,23	0,575	2,62	
	S_0	0,001	0,002	0,002	35,36			
B (Blanko)						0,591		
Persamaan regresi						$y = 0,272x + 3,075$		

Keterangan: A_1 = Serapan pertama; A_2 = Serapan kedua (duplo); S_1 = Sampel; S_0 = Kontrol sampel;
 % RSD = Standar deviasi relatif; IC_{50} = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.13 Hasil pengujian standar akarbose

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Serapan (A)		Serapan rata-rata	% RSD	S ₁ -S ₀	% Inhibisi	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
		A ₁	A ₂					
200	S ₁	0,325	0,333	0,329	1,72	0,317	40,38	255,96
	S ₀	0,008	0,016	0,012	47,14			
100	S ₁	0,395	0,391	0,393	0,72	0,384	19,67	
	S ₀	0,011	0,007	0,009	31,43			
75	S ₁	0,411	0,423	0,417	2,03	0,395	17,36	
	S ₀	0,024	0,02	0,022	12,86			
50	S ₁	0,424	0,453	0,439	4,67	0,415	13,18	
	S ₀	0,029	0,018	0,024	32,41			
25	S ₁	0,492	0,484	0,488	1,16	0,458	4,18	
	S ₀	0,026	0,034	0,03	18,86			
10	S ₁	0,480	0,486	0,483	0,89	0,460	3,77	
	S ₀	0,021	0,024	0,023	9,22			
B (Blanko)						0,478		
Persamaan regresi						$y = 0,189x + 1,624$		

Keterangan: A₁= Serapan pertama; A₂= Serapan kedua (duplo); S₁= Sampel; S₀= Kontrol sampel;
 % RSD = Standar deviasi relatif; IC₅₀ = Konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim dalam kondisi pengujian.

Tabel 4.14 Hasil uji kinetika penghambatan enzim oleh ekstrak etil asetat isolat CMM4B

Konsentrasi Substrat [S]	Absorbansi Sampel				1/[S]	1/V ₀	1/V ₁	1/V ₂	1/V ₃
	V ₀	V ₁	V ₂	V ₃					
0,125 mM	0,355	0,351	0,311	0,229	8	2,8169	1,3889	3,2154	4,3668
0,25 mM	0,642	0,454	0,527	0,595	4	1,5589	1,7483	1,8993	1,6807
0,5 mM	0,709	0,572	0,663	0,986	2	1,4114	2,2026	1,5083	1,0142
1,0 mM	0,751	0,720	0,742	0,761	1	1,3316	2,8491	1,3477	1,3149

Keterangan: V₀ = tanpa penghambat; V₁ = konsentrasi sampel 10 µg/mL; V₂ = konsentrasi sampel 25 µg/mL; V₃ = konsentrasi sampel 50 µg/mL


Tabel 4.15 Hasil perhitungan tetapan Michaelis-Menten ekstrak etil asetat CMM4B 25 µg/mL

	a	b	V _{max}	K _m
Tanpa penghambat	0,967	4,333	1,0341	4,48
Penghambat 25µg/mL	0,976	5,422	1,0246	5,55



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, 9 April 2012

Nomor : 537/IPH.1.02/If.8/IV/2012
 Lampiran : -
 Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

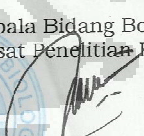
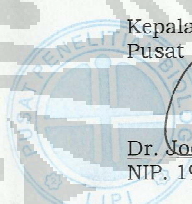
Kepada Yth.
 Bpk./Ibu/Sdr(i). Rahmi Ramdanis
 Npm : 0806327982
 Mhs. Univ. Indonesia
 Fak. MIPA
 Kampus UI Depok, 16424

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	Mahoni	<i>Swietenia macrophylla</i> King	Meliaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.


 Kepala Bidang Botani
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,

 Dr. Joeni Setijoe Rahajoe
 NIP. 196706241993032004

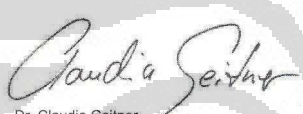
D:\Ident 2012\Rahmi Ramdanis.doc\IS-ABR

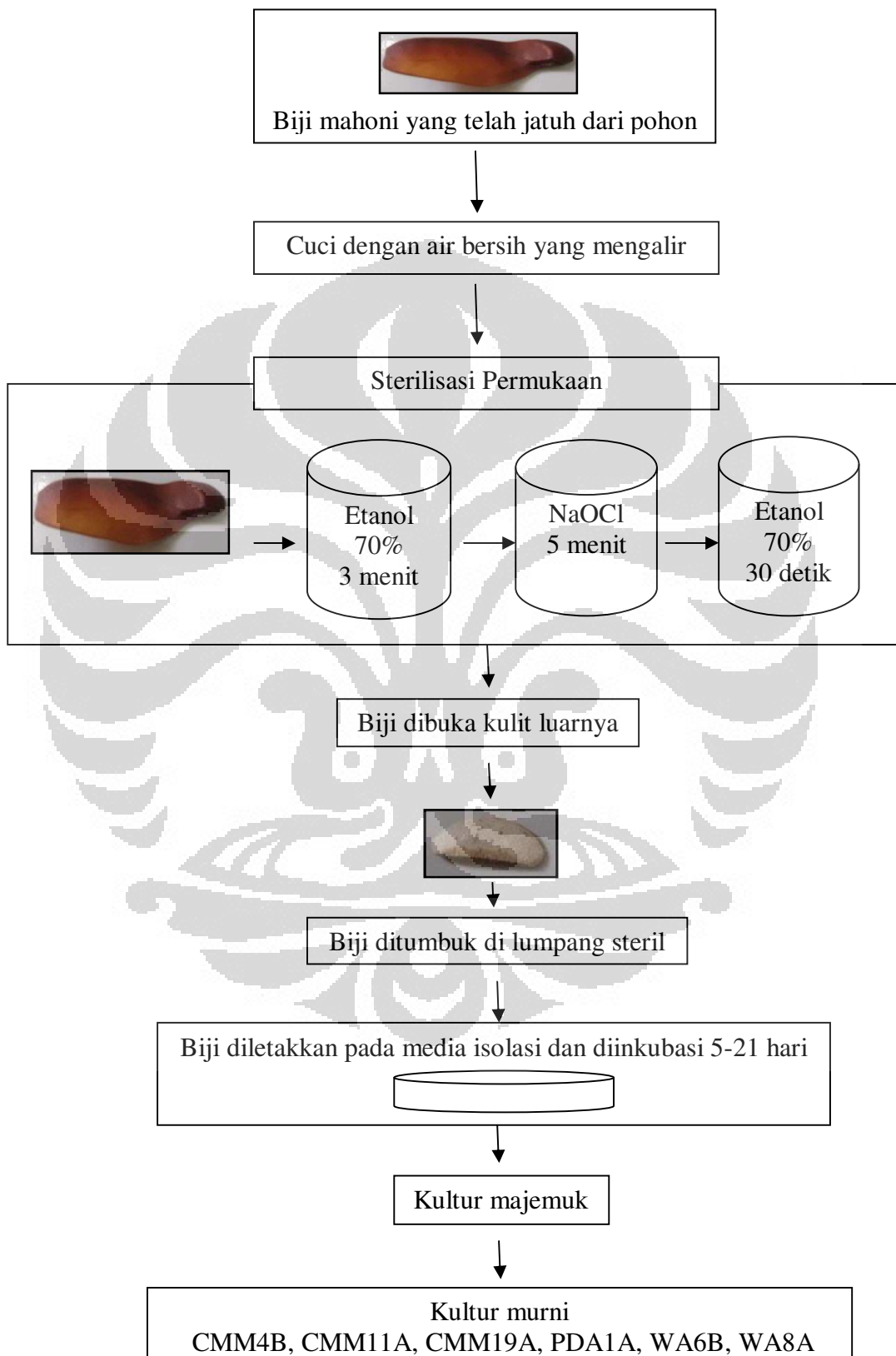
Page 1 of 1

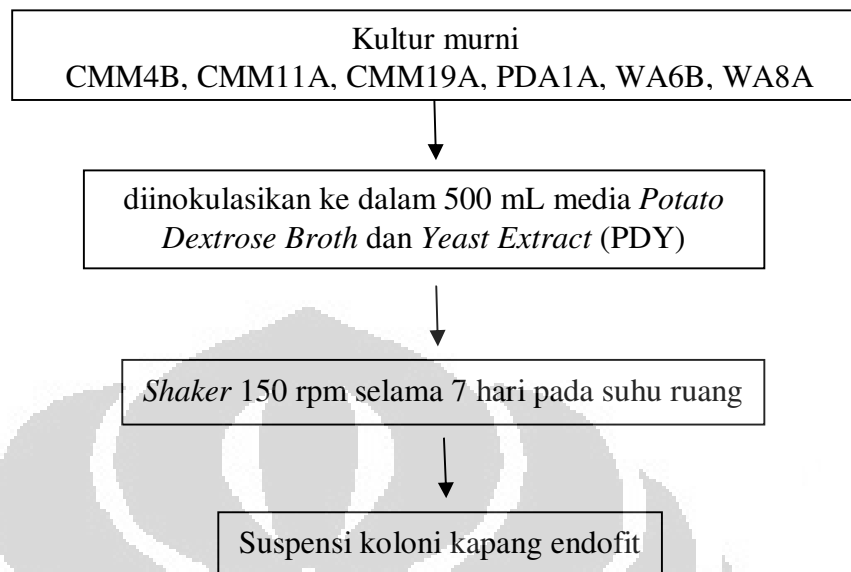
Lampiran 2. Sertifikat Analisis Enzim α -glukosidase

SIGMA-ALDRICH®		sigma-aldrich.com
3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA		
Website: www.sigmaaldrich.com		
Email USA: techserv@sial.com		
Outside USA: eurtechserv@sial.com		
Certificate of Analysis		
Product Name: α -Glucosidase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - recombinant, expressed in unspecified host, lyophilized powder, ≥ 125 units/mg protein		
Product Number:	G0660	
Lot Number:	SLBB4081V	
Brand:	SIGMA	
CAS Number:	9001-42-7	
MDL Number:	MFCD00081321	
Storage Temperature:	Store at 2 - 8 °C	
Quality Release Date:	04 JAN 2012	
Recommended Retest Date:	JAN 2016	
Test	Specification	Result
% Protein (Biuret)	≥ 10	23
units/mg protein	≥ 125	215
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	120
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		
 Rodney Burbach, Manager Analytical Services St. Louis, Missouri US		
Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com . For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.		
Version Number: 1	Page 1 of 1	

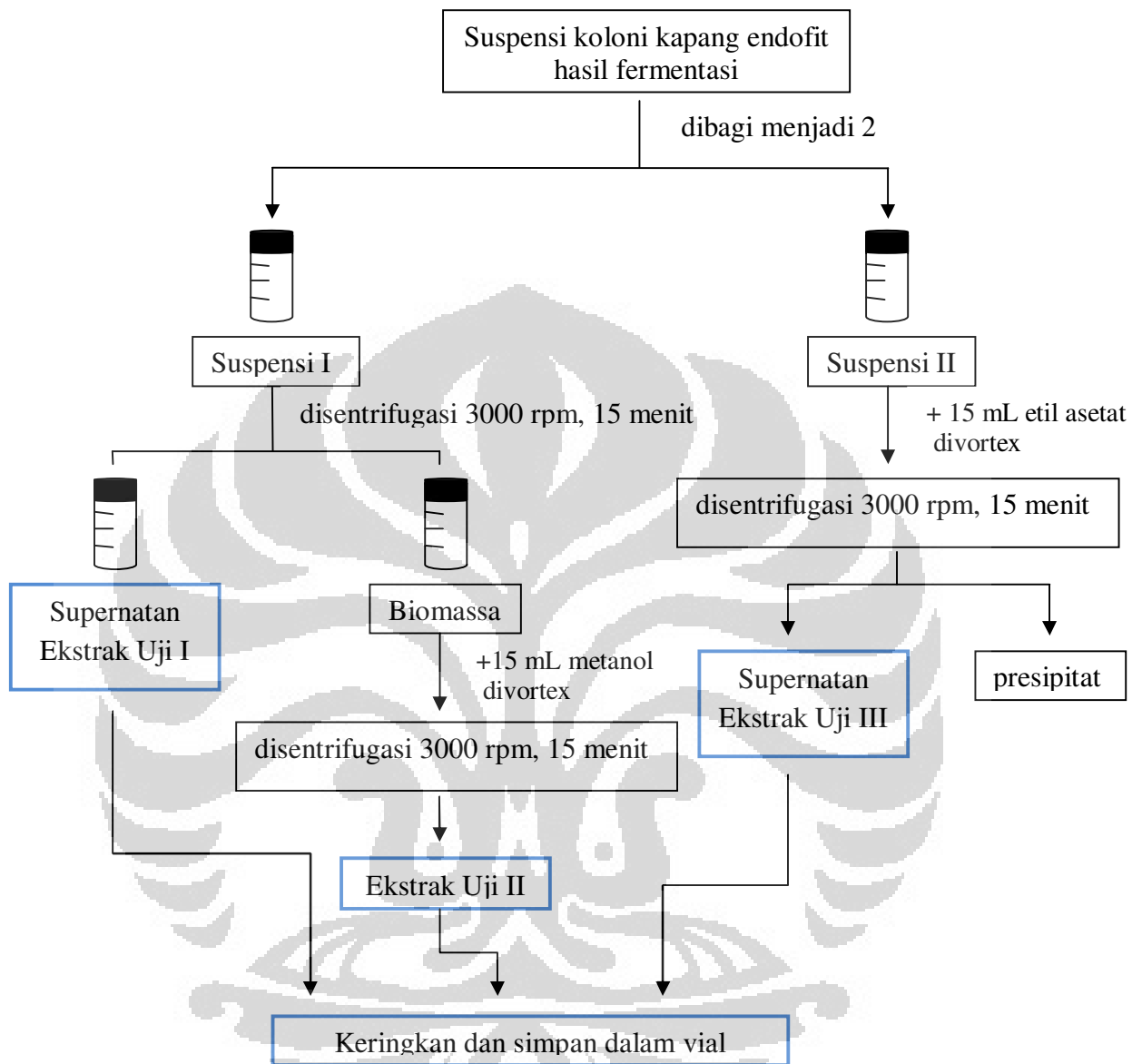
Lampiran 3. Sertifikat Analisis p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida

SIGMA-ALDRICH		SIGMA
		Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs (SG), Switzerland Tel: +41 81 755 2511 Fax: +41 81 756 5449
Certificate of Analysis		
Product Name:	4-NITROPHENYL α -D-GLUCOPYRANOSIDE	
	≥ 99 %	
Product Number:	N1377	
Product Brand:	Sigma	
Molecular Formula:	C ₁₇ H ₁₅ NO ₈	
Molecular Mass:	301.25	
CAS Number:	3767-28-0	
TEST	SPECIFICATION	LOT BCBG2931V RESULTS
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO OFF-WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
PURITY (TLC AREA %)	≥99 %	99.0 %
SPECIFIC ROTATION (20/D)	210 - 220 DEGREES	210.1 DEGREES
CONCENTRATION	C=1 IN WATER	C=1 IN WATER
SOLUBILITY (COLOR)	COLORLESS TO YELLOW-GREEN	VERY FAINT YELLOW-GREEN
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR TO VERY SLIGHTLY HAZY	CLEAR
SOLUBILITY (METHOD)	20 MG/ML IN METHANOL	20 MG/ML IN METHANOL
QC RELEASE DATE	09/AUG/11	
RECOMMENDED RETEST DATE	JUL/16	
 Dr. Claudia Geitner Manager Quality Control Buchs, Switzerland		
<p><small>Sigma-Aldrich warrants, that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the 'Certificate of Analysis' are the results determined at the time of analysis.</small></p>		
Sigma-Aldrich	Certificate of Analysis - Product N1377 Lot BCBG2931V	Page 1 of 1

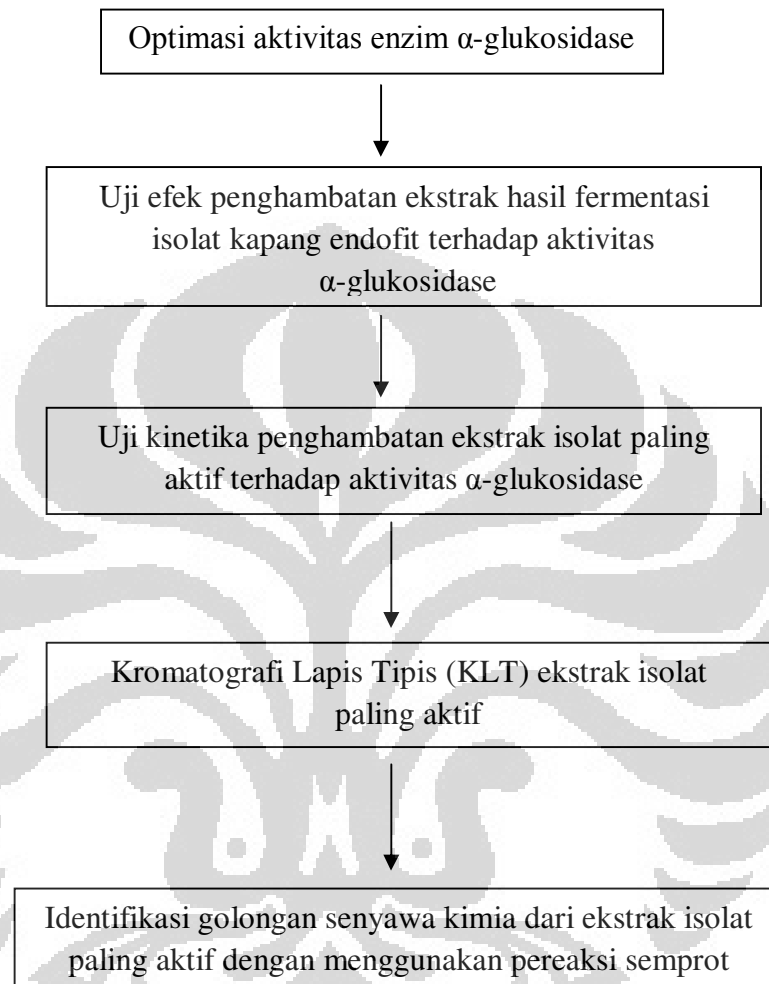
Lampiran 4. Skema Proses Isolasi Kapang Endofit

Lampiran 5. Skema Proses Fermentasi Kapang Endofit

Lampiran 6. Skema Ekstraksi Hasil Fermentasi Kapang Endofit



Lampiran 7. Skema Proses Uji Efek Penghambatan Aktivitas α -glukosidase dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia



Lampiran 8. Perhitungan Unit Enzim dan Pembuatan Larutan Enzim α -Glukosidase

- Perhitungan unit enzim :

Keterangan yang tertera pada pada kemasan enzim adalah 15,2 mg solid; 23% protein; 215 U/mg protein.

- Jumlah protein total di dalam kemasan :

$$23\% \times 15,2 \text{ mg solid} = 3,496 \text{ mg protein}$$

- Persamaan bobot solid dan satuan unit :

$$15,2 \text{ mg solid} \sim 3,496 \text{ mg protein}$$

$$\text{untuk 1 mg protein} = \frac{15,2 \text{ mg solid}}{3,496 \text{ protein}} = 4,348 \text{ mg solid}$$

maka, 1 mg protein ~ 4,348 mg solid ~ 215 unit

- Jumlah unit enzim di dalam kemasan 15,2 mg solid :

$$\frac{15,2 \text{ mg solid}}{4,348 \text{ mg solid}} \times 215 \text{ unit} = 751,60 \text{ unit}$$

- Perhitungan penimbangan solid enzim

$$\frac{5 \text{ unit}}{215 \text{ unit}} \times 4,348 \text{ mg solid} = 0,101 \text{ mg solid} \sim 0,1 \text{ mg solid}$$

Bobot penimbangan menggunakan timbangan analitik halus yang direkomendasikan adalah 5 mg :

$$4,348 \text{ mg solid} \sim 215 \text{ unit}$$

$$5 \text{ mg solid} \sim 247,24 \text{ unit}$$

Aktivitas enzim yang ditargetkan untuk pengujian adalah 0,05 U/mL, maka dengan bobot penimbangan yang direkomendasikan dilakukan pembuatan larutan enzim sebagai berikut :

a) Larutan induk

Larutan ini dibuat dengan menimbang 5 mg solid enzim (247,24 unit) kemudian volume dicukupkan hingga 100 mL dengan dapar fosfat pH 6,8.

Konsentrasi yang diperoleh :

$$\frac{247,24 \text{ unit}}{100 \text{ ml}} = 2,4724 \text{ U/ mL}$$

b). Larutan uji

Larutan induk dipipet sebanyak 2 mL, kemudian volume dicukupkan hingga 100 mL dengan dapar fosfat pH 6,8. Konsentrasi yang diperoleh :

$$\frac{2 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} \times 2,4724 \text{ U/ mL} = 0,049448 \text{ U/ mL}$$

- Konsentrasi akhir larutan enzim yang dipakai saat pengujian

Setiap kali pengujian pada *microplate reader*, digunakan 25 μ L larutan enzim 0,049 U/mL. Konsentrasi akhir yang diperoleh:

$$\frac{25\mu\text{L}}{200\mu\text{L}} \times 0,049 \text{ U/ mL} = 0,006125 \text{ U/ mL} \sim 0,006 \text{ U/ mL}$$