

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI FUNGI ENDOFIT DAUN DAN UMBI BAWANG DAYAK (*Eleutherine palmifolia* Merr) SEBAGAI PENGHASIL SENYAWA ANTI OKSIDAN

Andi Arfah

STIKES Amanah Makassar

ABSTRAK

Fungi endofit adalah kelompok fungi yang sebagian atau seluruh hidupnya berada dalam jaringan tumbuhan hidup dan biasanya tidak merugikan pada inangnya. Fungi endofit umumnya memproduksi metabolit sekunder yang memiliki aktivitas biologis yang bermanfaat. Metabolit fungi endofit memiliki aktivitas senyawa-senyawa seperti anti kanker, anti virus, anti bakteri dan anti oksidan. Sumber-sumber antioksidan dapat berupa antioksidan sintetik maupun antioksidan alami. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan fungi endofit dari tanaman bawang dayak sebagai sumber penghasil senyawa antioksidan dan mengetahui golongan senyawa antioksidan yang dihasilkan. Isolasi fungi endofit dilakukan dengan metode tanam langsung (*direct seed plant*) pada media PDA yang ditambahkan kloramfenikol 0,005% b/v. Identifikasi fungi endofit secara molekuler serta uji mikroskopik. Pengukuran aktivitas antioksidan dari ekstrak hasil fermentasi menggunakan metode penangkap radikal bebas DPPH. Identifikasi golongan senyawa antioksidan dilakukan dengan metode pereaksi warna. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat 3 isolat fungi dari daun Bawang Dayak dengan kode DBD1, DBD2 dan DBD3 serta 1 isolat fungi dari umbi Bawang Dayak dengan kode UBD. Analisis hasil BLAST menunjukkan kekerabatan isolat UBD, DBD1 dan DBD3 ke dalam jamur marga *Aspergillus*. Namun kekerabatan spesies DBD3 lebih dekat dengan *Aspergillus* tamari isolat 27-M-3 daripada UBD dan DBD1, Hasil skrining fitokimia menunjukkan ekstrak hasil fermentasi dan ekstrak etil asetat positif mengandung alkaloid dan flavonoid. Hasil uji KLT autografi dengan menggunakan pereaksi DPPH menunjukkan ekstrak hasil fermentasi dan ekstrak etil asetat positif mengandung antioksidan. Perhitungan Kadar IC₅₀ (bpj) dari ekstrak hasil fermentasi yang termasuk sebagai antioksidan sedang adalah umbi bawang dayak sebesar 215,72 bpj dan daun bawang dayak 1 sebesar 164,29 bpj. Sedangkan yang termasuk sebagai antioksidan lemah adalah daun bawang dayak 2 sebesar 348,32 bpj dan daun bawang dayak 3 sebesar 368,06 bpj. Hal ini menunjukkan bahwa isolat fungi daun dan umbi bawang dayak memiliki kemampuan sebagai antioksidan sedang.

Kata Kunci : Anti Oksidan, Bawang Dayak, Fungi Endofit, : Isolasi Dan Identifikasi

PENDAHULUAN

Mikroba endofit merupakan mikroba yang hidup berkoloni dalam jaringan tumbuhan tanpa menimbulkan gejala penyakit pada tumbuhan inangnya (1). Istilah endofit diperkenalkan pertama kali oleh De Bary pada tahun 1866 sebagai mikroorganisme yang hidup dalam jaringan tanaman yang menyebabkan infeksi asimtomatis tetapi tidak berupa symptom penyakit (1).

Metabolit fungi endofit memiliki aktivitas senyawa-senyawa seperti anti kanker, anti virus, anti bakteri dan anti oksidan. Sumber-sumber antioksidan dapat berupa antioksidan sintetik maupun antioksidan alami. Tetapi saat ini penggunaan antioksidan sintetik mulai dibatasi karena ternyata dari hasil penelitian yang telah dilakukan bahwa antioksidan sintetik seperti BHT (*Butylated Hydroxy Toluena*) ternyata dapat meracuni binatang percobaan dan bersifat karsinogenik. Oleh karena itu industri makanan dan obat-obatan

beralih mengembangkan antioksidan alami dan mencari sumber-sumber antioksidan alami baru (2)

Isolasi fungi endofit dapat dilakukan dengan teknik *direct seed planting* dari bagian tanaman yang sudah disterilisasi terlebih dahulu

permukaannya. Kemudian jaringan bagian luar tanaman dihilangkan dengan pisau steril dan bagian dalam tanaman diletakkan hati-hati pada permukaan media isolasi (1).

Fermentasi adalah proses yang dilakukan oleh mikroorganisme baik melalui proses aerobik ataupun anaerobik yang menyebabkan terjadinya perubahan kimia spesifik dari suatu substrat organik dan menghasilkan produk yang bernilai ekonomis (3).

Umbi bawang dayak mengandung senyawa-senyawa turunan anthrakinon yang mempunyai daya pencacah, yaitu senyawa-senyawa *eleutherin*, *isoeleutherin* dan senyawa-senyawa sejenisnya; senyawa-

senyawa lakton yang disebut eleutherol dan senyawa turunan pyron yang disebut eleutherinol. Adapun kandungan yang terdapat dalam bawang dayak terdiri dari senyawa alkaloid, glikosida, flavonoid, fenolik, saponin, triterpenoid, tannin, kuinon dan steroid yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku obat (4). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa antioksidan dari ekstrak hasil fermentasi Daun dan Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia* Merr).

BAHAN DAN METODE

Desain penelitian adalah studi eksperimental dan telah dilaksanakan pada bulan Juli 2016 – Agustus 2017 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi, Laboratorium Biofarmaka Pusat Kegiatan Penelitian, Sains Building Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin.

Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan adalah autoklaf (All American Model 25x2[®]), cawan petri, corong pisah (Pyrex[®]), gelas ukur (Pyrex[®]), labu Erlenmeyer (Pyrex[®]), labu tentu ukur (Pyrex[®]), LAF, lemari pendingin (Panasonic[®]), mikropipet (Socorex[®]), ose bulat, oven (Fisher[®]), pinset, sonikator (Elena[®]), spoit (OneMed[®]), Spektrofotometri UV-Vis, tabung reaksi (Pyrex[®]), timbangan analitik (Sartorius[®]), Instrumen FTIR, vial, vortex mixer..

Bahan yang digunakan yaitu air suling, sampel umbi dan daun bawang dayak, etanol 70%, NaOCl 5,20%, chlorampenikol, medium PDA, Medium PDY, Medium PDB, etil asetat, DPPH, vanillin, H₂SO₄, kloroform, methanol

Penyiapan Ekstrak

Sampel penelitian yang digunakan berupa daun dan umbi tanaman Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia* Merr). Tanaman dipotong ukuran ± 1 cm, kemudian sampel didesinfeksi dengan etanol 70% (masing-masing 1 menit), natrium hipoklorit 5,20% selama 1 menit, dan dibilas dengan air suling steril (3 kali). Sampel ditiriskan kemudian dipotong dengan pisau scalpel steril dengan ukuran 1 x 1 cm.

Skrining Komponen Senyawa

Pada dasarnya prinsip kerjanya sama dengan KLT biasa, namun untuk uji spesifik golongan senyawa kimia yang terkandung pada suatu sampel maka dilakukan dengan menyempatkan reagen kimia yang sesuai pada profil KLT (5).

- a. Uji Alkaloid
Uji alkaloid dilakukan dengan menyempatkan Pereaksi Dragendorff pada profil KLT. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya bercak merah pada profil KLT.
- b. Uji Fenolik
Uji fenolik dilakukan dengan menyempatkan Pereaksi FeCl₃ pada profil KLT. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya bercak ungu pada profil KLT.
- c. Uji Flavonoid
Uji flavonoid dilakukan dengan menyempatkan Pereaksi DPPH pada profil KLT. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya bercak kuning pada profil KLT.

Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Hasil Fermentasi Menggunakan Metode Penangkap Radikal Bebas DPPH

- a. Pembuatan Larutan Sampel
Larutan stok dibuat dengan menimbang sampel Ekstrak tanaman Bawang Dayak sebanyak 25 mg kemudian dilarutkan dan dicukupkan volumenya dengan etanol absolut hingga 25 ml, sehingga didapatkan larutan stok dengan konsentrasi 1000 bpj (6).
- b. Pembuatan Larutan DPPH 0,4 mM
DPPH ditimbang sebanyak 7,9 mg. kemudian dilarutkan dengan etanol absolut hingga volume 50 ml (6).
- c. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Ekstrak Hasil Fermentasi
Dipipet masing- masing larutan uji sebanyak 75 µl, 150 µl, 225 µl, 300 µl, dan 375 µl dari larutan stok yang telah dibuat ke dalam labu tentukur, lalu masing-masing ditambah 900 µL DPPH 0,4 mM dan dicukupkan volumenya dengan etanol absolut hingga 5 mL. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu kamar dan di tempat gelap selama 30 menit kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer. Sebagai blanko, larutan DPPH 0,4 mM dipipet sebanyak 900 µL kedalam labu tentukur, kemudian ditambahkan etanol absolut hingga 5 mL dan diinkubasi pada suhu kamar dan di tempat gelap selama 30 menit. Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan persentase pengikatan radikal bebas dengan rumus :

$$\% \text{ pengikatan radikal bebas} = \left(\frac{\text{serapan blanko} - \text{serapan sampel}}{\text{serapan blanko}} \right) \times 100 \%$$

Karakteristik Fungsi Endopit

- a. Secara Makroskopik dan Mikroskopik

Identifikasi fungi endofit dilakukan secara makroskopik dan mikroskopik. Identifikasi makroskopik dilakukan untuk mengetahui morfologi dari koloni yang dilakukan dengan pengamatan langsung pada koloni tersebut dengan melihat warna permukaan koloni, warna sebalik koloni dan bentuk koloni. Sedangkan identifikasi mikroskopik dilakukan untuk mengetahui genus fungi endofit dihasilkan dari tanaman Bawang Dayak. Sebelum melakukan identifikasi, terlebih dahulu koloni fungi ditumbuhkan kembali dengan menginokulasikan pada media yang sesuai kemudian diamati secara mikroskopik dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali.(7)

b. Karakteristik Senyawa Antioksidan dari Ekstrak Hasil Fermentasi

KLT dilakukan dengan menotolkan ekstrak ekstrak metabolit pada lempeng silica gel F254 kemudian dielus dengan menggunakan eluen kloroform : metanol dengan perbandingan 4 : 1. Noda yang muncul kemudian dilihat pada lampu UV 366 nm dan 256 nm, setelah itu disemprot dengan larutan DPPH lalu spot yang berwarna kuning diukur nilai Rfnya (7).

Identifikasi Molekuler dengan Metode PCR (Polymerase Chain Reaction)

a. Ekstraksi

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan kit Geneaid Presto™ Mini gDNA Tissue yang merupakan kit ekstraksi DNA jaringan. Bagian miselia pada jamur diambil sebanyak 25 mg dan di potong-potong kecil, ditempatkan dalam tabung eppendorf 1,5 mL lalu ditambahkan 180 µL Buffer ATL d mana berfungsi untuk mempermudah proses lisis. Ditambahkan 20 µL Proteinase K kemudian dihancurkan dengan mikropastel. Proteinase K berfungsi untuk memutus ikatan peptida pada protein yang terdapat pada miselia. Kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit sehingga miselia jamur tersebut benar-benar hancur (8).

Tahapan selanjutnya adalah lisis, pada tahapan ini dilakukan penambahan GBT buffer pada sampel kemudian sampel diinkubasi selama 10 menit pada suhu 60°C untuk membantu mempercepat terjadinya lisis pada sel (8).

Berikutnya dilakukan penambahan etanol absolut untuk mengumpulkan DNA, tahapan ini juga disebut DNA binding karena pada tahapan ini DNA sampel dikumpulkan, dalam hal ini konsentrasi

etanol yang tinggi tidak akan merusak DNA, melainkan dengan semakin tinggi konsentrasi etanol yang digunakan maka semakin kuat etanol mengumpulkan DNA. DNA yang diperoleh kemudian dipindahkan ke dalam GD column. Matriks pada GD column akan mengikat DNA sementara kontaminan akan tersuspensi. Pada tahap ini dilakukan pencucian menggunakan wash buffer, wash buffer akan menghilangkan kontaminan sedangkan DNA tetap terikat dimatriks.

Pada tahapan selanjutnya dilakukan proses rehidrasi DNA yang bertujuan untuk mencairkan atau melepaskan DNA, karena produk DNA dalam bentuk sedimen. Rehidrasi dilakukan dengan menambahkan larutan pre-heated Elution buffer yang dapat melarutkan DNA. Setelah proses rehidrasi selesai maka dihasilkan produk DNA (8).

b. Amplifikasi Polymerase Chain Reaction

Amplifikasi DNA berlangsung dengan tahap sebagai berikut. Tahap awal denaturasi 95°C selama 3 menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, suhu annealing 50°C selama 30 detik dan extension 72°C selama 30 detik. Pada tahapan akhir proses PCR dilakukan Final Extension selama 3 menit pada suhu 75°C dengan 38 siklus (8).

Dalam tahapan PCR digunakan primer Forward ITS5 dan Reverse ITS4 yang secara spesifik akan mengamplifikasi target sebagai berikut (8) :

Primer Forward :

(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')

Primer Reverse :

(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

c. Elektroforesis

Sebanyak 1 gr ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL Buffer TAE ke dalam Erlenmeyer, dipanaskan dalam microwave selama 2 menit hingga mendidih, kemudian ditambahkan 8 µL etidium bromida. Cairan gel dituang dalam container pencetak agarose hingga memadat. Dimasukkan 5 µL produk PCR masing-masing sampel yang di amplifikasi ke dalam sumur pada agarose yang terendam dalam tangki yang berisi TAE Buffer. Proses elektroforesis dijalankan pada tegangan 100 volt selama 50 menit. Lapisan gel hasil elektroforesis diamati dibawah sinar UV-transminator (8).

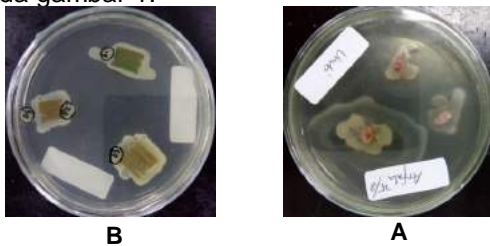
d. Sekuensing dan Identifikasi Spesies dengan menggunakan BLAST

Proses sekuensing dilakukan oleh 1st Base melalui PT Genetika Indonesia

kemudian dikirim ke Singapura. Sekuensing dilakukan secara “Single Pass DNA Sequencing” menggunakan primer yang sama dengan amplifikasi gen pada proses PCR. Hasil sekuensing diproses dengan menggunakan aplikasi Bioedit. Analisis hasil BLAST tersebut memberikan informasi dan memverifikasi mengenai organisme atau bakteri apa yang mempunyai kesamaan dengan urutan DNA sampel sehingga dapat digunakan untuk identifikasi bakteri. Informasi dari hasil BLAST tersebut berupa Query Coverage dan Maximum identity. Query coverage adalah persentasi dari panjang nukleotida yang selaras dengan database yang terdapat pada BLAST. Max identity adalah nilai tertinggi dari persentasi identitas atau kecocokan antara sekuen query dengan sekuen database yang tersejajarkan (8).

HASIL PENELITIAN

Isolasi Fungi Endofit Daun dan Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia* Merr) Didapatkan tiga isolat fungi endofit pada daun Bawang Dayak dan satu isolat pada umbi Bawang Dayak yang berhasil ditumbuhkan pada media PDAC. Dapat dilihat pada gambar 1:



Pengamatan Makroskopik dan Mikroskopik

Isolat setelah dilakukan pemurnian, berdasarkan bentuk dan warna koloni yang tampak secara makroskopik, dilakukan pengamatan makroskopik untuk memisahkan antara fungi yang satu dengan fungi yang lain. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel 1 dan 2 serta gambar 2.

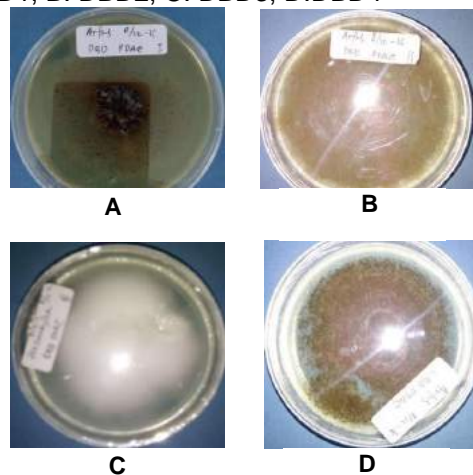
Tabel 1. Hasil Isolasi Fungi Endofit Bawang Dayak

Organ yang Digunakan	Jumlah Isolat	Kode Isolat
Daun	3	DBD 1
		DBD 2
		DBD 3
Umbi	1	UBD

Tabel 2. Deskripsi bentuk dan warna koloni isolat fungi endofit

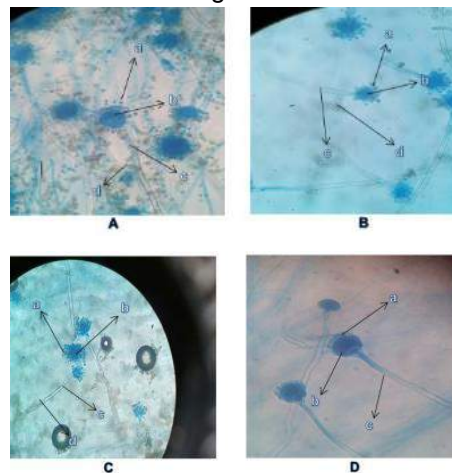
Kode Isolat	Ciri Makroskopis
DBD 1	Warna koloni coklat kehitaman miselium menyebar, pertumbuhan koloni halus melebar, dengan fragmen pada inti pertumbuhan isolat terlihat kaku dan mengeras
DBD 2	Warna koloni coklat, miselium menyebar, pertumbuhan koloni halus melebar.
DBD 3	Warna koloni putih, miselium menyebar, pertumbuhan koloni halus melebar
UBD	Warna koloni coklat tua, miselium menyebar, pertumbuhan koloni kasar melebar

Gambar 2 : Isolat Murni Fungi Endofit (Ket : A. DBD1, B. DBD2, C. DBD3, D. DBD4)



Identifikasi Isolat Fungi Endofit Bawang Dayak

Gambar 3. Isolat Fungi Endofit



Berdasarkan hasil pengamatan yang telah dilakukan, fungi endofit yang telah berhasil diisolasi dari daun dan umbi bawang dayak dapat diidentifikasi dengan melihat ciri makroskopik dan mikroskopik, dengan mengacu pada buku petunjuk klasifikasi (9).

Hasil pengamatan makroskopik diatas pada media PDA + kloramfenikol, *Aspergillus* sp dapat tumbuh cepat pada suhu ruang membentuk koloni yang granul, berserabut dengan beberapa warna sebagai salah satu ciri identifikasi. *Aspergillus fumigatus* koloni berwarna hijau, *Aspergillus niger* berwarna hitam dan *Aspergillus flavus* koloni berwarna putih atau kuning (10).

Hasil pengamatan mikroskopis *Aspergillus* sp mempunyai hifa bersekat dan bercabang, pada bagian ujung hifa terutama pada bagian yang tegak membesar merupakan konidiaforanya. Konidiafora pada bagian ujungnya membulat menjadi vesikel. Pada vesikel terdapat batang pendek yang disebut sterigmata. Stegmata atau fialida berwarna atau tidak berwarna dan tumbuh konidia yang membentuk rantai yang berwarna, hijau, coklat atau hitam (11)

Identifikasi Molekuler dengan Metode PCR

DNA hasil ekstraksi yang digunakan sebagai template rDNA jamur untuk amplifikasi. Primer yang digunakan dalam penelitian ini seperti pada tabel 3. Amplifikasi dilakukan dengan metode hotstart standar dengan parameter : denaturasi 94oC selama 30 detik, annealing 50oC selama 30 detik, dan extension 72oC selama 30 detik, diulang dalam 38 siklus PCR hal ini sudah sesuai dengan prinsip metode hotstart (12).

Tabel 3. Primer Amplifikasi

ITS5	Primer Forward	5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3'
ITS4	Primer Reverse	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

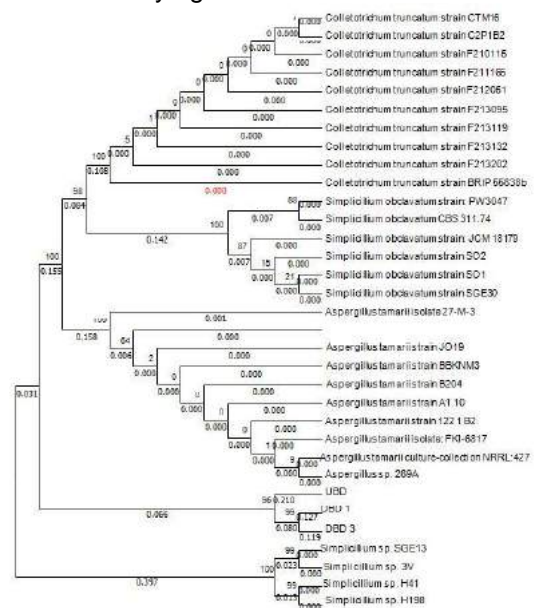
Gambar 4. Hasil Elektroforesis Produk DNA



Gambar 4 menunjukkan bahwa hasil DNA produk PCR yang berupa fragmen ITS berdasarkan hasil analisis dengan elektroforesis pada gel agarose 1% berkisar 600 bp dan tidak tampak adanya non-specific priming yang ditunjukkan dengan hanya

terdapat 1 pita DNA dari isolat UBD, DBD 1 dan DBD 3. menyatakan bahwa fragmen ITS untuk kapang berkisar 565-613 bp (12).

Gambar 5. Phylogenetic Tree



Phylogenetic Tree-Neighbour Joining (NJ) fungi UBD, DBD 1 dan DBD 3 dibentuk dengan program ClustalX menggunakan metode Kimura dengan dua parameter. Skema filogeni Gambar 8 dengan bootstrap sebanyak 1000 kali sampling menunjukkan similarity *Aspergillus tamarii* isolat 27- M-3 dengan persentase 100% dan *Simplicium* SP. SGE13 sebagai outgroup dengan persentase 99%. Identifikasi molekuler mendukung data karakterisasi isolat fungi UBD, DBD 1, DBD 2 dan DBD 3 secara makroskopis dan mikroskopis spesies yang terdekat berdasarkan hasil sekuen *Aspergillus* sp.

Skining Fitokimia

Tabel 5. Hasil Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Hasil Fermentasi Dan Ekstrak Etil Asetat

Uji Golongan	Kode Sampel	Reaksi yang Digunakan	Warna Spot	Warna Reukapan	Hasil Identifikasi	Nilai Rf
Alkaloid	UBD		tidak ada	coklat /coklat-hijau/ Merah-hijau dengan latar kuning sampai kelabu	-	-
	DBD 1		tidak ada	coklat /coklat-hijau/ Merah-hijau dengan latar kuning sampai kelabu	-	-
	DBD 2	Drazenoff	kemerahan	coklat /coklat-hijau/ Merah-hijau dengan latar kuning sampai kelabu	+	0.59
	DBD 3		kemerahan	coklat /coklat-hijau/ Merah-hijau dengan latar kuning sampai kelabu	+	0.56
	EEA	Bouchardat	coklat /kemerahan	Merah sampai ungu	+	0.33
Flavonoid	UBD		hitam	kuning yang sepat sudas	-	0.60
	DBD 1	Uae Antonia	hitam	kuning yang sepat sudas	-	0.60
	DBD 2		hitam	kuning yang sepat sudas	-	0.61
	DBD 3		hitam	kuning yang sepat sudas	-	0.61
	EEA	Silberstein	kuning	Berpendar di bawah sinar UV	+	0.51
	EEA	AlCl ₃	kuning	Ungu-kuning	+	0.54
	DBD 1		tidak ada	Biru/ merah-ungu/ hijau/ hitam /kuat	-	-
	DBD 2	FeCl ₃	tidak ada	Biru/ merah-ungu/ hijau/ hitam /kuat	-	-
DBD 3		tidak ada	Biru/ merah-ungu/ hijau/ hitam /kuat	-	-	

Hasil uji fitokimia alkaloid menunjukkan bahwa sampel *Eleutherine palmifolia* Merr positif mengandung alkaloid. Hal ini dibuktikan dengan terbentuknya warna merah pada profil KLT dengan penyemprotan pereaksi dragendorf (14) dengan nilai Rf pada sampel DBD 2 adalah 0,89 dan sampel DBD 3 adalah 0,86.

Hasil uji fitokimia flavonoid menunjukkan bahwa sampel *Eleutherine palmifolia* Merr positif mengandung flavonoid. Hal ini dibuktikan dengan terbentuknya warna pada profil KLT dengan penyemprotan H₂SO₄ dengan nilai Rf pada sampel UBD adalah 0,29, DBD 2 adalah 0,26, DBD 3 adalah 0,26 dan ekstrak etil asetat adalah 0,89. Terbentuk warna kuning pada profil KLT dengan penyemprotan pereaksi sitroborat dan AlCl₃ dengan nilai Rf untuk sampel ekstrak etil asetat masing-masing adalah 0,91 dan 0,94. Hal ini dikarenakan flavonoid mencakup banyak pigmen yang paling umum dan terdapat pada seluruh dunia tumbuhan mulai dari fungus sampai angiospermae (15). Hasil uji fitokimia flavonoid dengan penambahan pereaksi uap ammonia menunjukkan hasil positif dengan terbentuk warna hitam pada profil KLT dengan nilai Rf untuk sampel UBD adalah 0,60, DBD 1 adalah 0,60, DBD 2 adalah 0,60 dan DBD 3 adalah 0,61. Hal ini dikarenakan Flavonoid berupa senyawa fenol, karena itu warnanya berubah bila ditambahkan basa atau amoniak sehingga flavonoid mudah dideteksi pada kromatogram atau larutan (16). Warna merah pada uji flavonoid dikarenakan terbentuknya garam flavilium (17).

Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dengan Metode DPPH dan Pengukuran Kadar Total Flavonoid

DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam, terutama yang bersifat polar. Prinsip dari metode DPPH ini, atom hydrogen dari suatu senyawa antioksidan akan membuat larutan DPPH menjadi tidak berwarna yang dapat diukur menggunakan spektrofotometer akibat terbentuknya DPPH tereduksi (18). Hasil IC₅₀ ekstrak hasil fermentasi untuk UBD sebesar 215,7298 ppm dan tergolong memiliki aktivitas antioksidan yang sedang. Secara spesifik, suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan yang sedang bila nilai IC₅₀ 101 – 250 ppm (19). Hasil IC₅₀ ekstrak hasil fermentasi untuk DBD1 sebesar 164,2945 ppm dan tergolong

memiliki aktivitas antioksidan yang sedang. Hasil IC₅₀ ekstrak hasil fermentasi untuk DBD 2 sebesar 348,3251 ppm dan tergolong memiliki aktivitas antioksidan yang lemah. Hasil IC₅₀ ekstrak hasil fermentasi untuk DBD 3 sebesar 368,0655 ppm dan tergolong memiliki aktivitas antioksidan yang lemah.

Tabel 6. Pengujian Aktivitas Anti Oksidan

Kode Ekstrak	λ Maksimum (nm)	IC ₅₀ (ppm)	Keterangan
UBD	260,20	215,72476	Antioksidan Sedang
DBD 1	395,20	164,2945	Antioksidan Sedang
DBD 2	388,60	348,3251	Antioksidan Lemah
DBD 3	372,00	368,0655	Antioksidan Lemah

Hasil pengujian kuantitatif kadar total flavonoid dengan menggunakan kurva baku standar kuarsetin diperoleh untuk UBD rata-rata total flavonoid sebesar 0,912%. Untuk DBD 1 rata-rata total flavonoid sebesar 0,427%. Untuk DBD 2 rata-rata total flavonoid sebesar 0,324% dan untuk DBD 3 rata-rata total flavonoid sebesar 0,680%. Sehingga ekstrak yang diperoleh dinyatakan sebagai flavonoid.

Tabel 7. Pengukuran Kadar Total Flavonoid

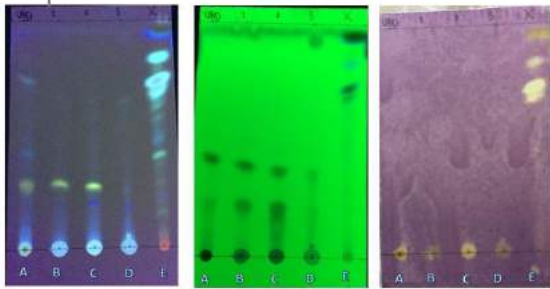
Nama Sampel	Konsentrasi Sampel	Absorban	Kadar Total Flavonoid (%)	Rata-rata % Total Flavonoid
UBD 1	0,598	0,064	0,199	0,192
UBD 2	0,562	0,061	0,187	
UBD 3	0,569	0,062	0,190	
DBD 1-1	1,142	0,107	0,381	0,42
DBD 1-2	1,346	0,123	0,449	
DBD 1-3	1,358	0,124	0,453	
DBD 2-1	1,012	0,097	0,337	0,324
DBD 2-2	0,961	0,093	0,320	
DBD 2-3	0,942	0,091	0,314	
DBD 3-1	1,958	0,171	0,653	0,680
DBD 3-2	2,050	0,1978	0,683	
DBD 3-3	2,112	0,183	0,704	

Pemisahan Senyawa Antioksidan dengan KLT Autografi

Hasil uji fitokimia pada ekstrak hasil fermentasi dan ekstrak etil asetat menunjukkan Bawang Dayak *Eleutherine palmifolia* Merr, mengandung senyawa antioksidan. Pembuktian kandungan antioksidan diperkuat dengan adanya identifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). KLT analitik ini digunakan untuk mencari eluen terbaik dari beberapa eluen yang baik dalam pemisahan senyawa antioksidan dan didapatkan eluen kloroform-metanol dengan perbandingan 3:1. Eluen yang baik adalah eluen yang menghasilkan senyawa dalam jumlah yang banyak ditandai dengan munculnya noda seperti pada gambar 10. Hal ini didukung dengan penjelasan bahwa Noda yang terbentuk tidak berekor dan jarak

antara noda satu dengan yang lainnya jelas (16).

Gambar 6. Hasil Elusi Ekstrak Hasil Fermentasi dan Ekstrak Etil Asetat



1. UV 366 nm 2. UV 254 nm, 3. DPPH

(Ket : A. UBD, B. DBD1, C. DBD2, D. DBD3, E. Ekstrak Etil Asetat)

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Terdapat 3 isolat dari daun Bawang Dayak dan 1 isolat dari umbi Bawang Dayak dan tergolong kedalam spesies *Aspergillus* tamari Isolat 27-M-3.
2. Hasil skrining fitokimia menunjukkan ekstrak hasil fermentasi dan ekstrak etil asetat positif mengandung alkaloid dan flavonoid.
3. Hasil uji KLT analitik dengan menggunakan pereaksi DPPH menunjukkan ekstrak hasil fermentasi dan ekstrak etil asetat positif mengandung antioksidan.
4. Perhitungan Kadar IC50 (bpj) dari ekstrak hasil fermentasi yang termasuk sebagai antioksidan sedang DBD 1 sebesar 164,29 bpj.

DAFTAR PUSTAKA

- Widiowati, T., dkk., 2016. Isolasi dan Identifikasi Kapang Endofit dari Tanaman Kunyit (*Curcuma longa* L.) Sebagai Penghasil Antioksidan. *Biopropal Industri*, Vol. 7 no. 1,9-16.
- Zuhra, C.F., dkk. 2008. Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid dari Daun Katuk (*Sauropus androgonus* L.Merr). *Jurnal Biologi Sumatera*, Hal. 7-10. ISSN 1907-5537.
- Ratno, Brava., 2012. Fermentasi. Indonesia Kefir Society.
- Saptowalyono, C.A., 2007. Bawang Dayak Tanaman Obat Kanker yang Belum Tergarap. <http://Kompas.Kesehatan.com>.
- Harbone, J.B., 1987, Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Terbitan Kedua. Bandung: ITB
- Hidayah, A.S., dkk. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Merr). *Prosiding Penelitian Spesia UNISBA*. ISSN 2460- 672
- Smith, A., dan Hursepuy, A., 2015. Isolasi dan Identifikasi Jenis Jamur pada Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crants) Dalam Proses Pembuatan Ubi Kayu Hitam Secara Tradisional oleh Masyarakat Banda. *Biopendix*, Volume 1, Nomor 2, Hal. 160-165
- Zuhriani, K. Y., 2010. Polymerase Chain Reaction (PCR). *Saintek* Vol. 5, No. 6.
- Barnett. 1960. *Illustrated Genera Of Imperfecty Fungi*. Second Edition. Burgess Publishing Company. 241 hlm
- Jawetz, dkk., 1996, Mikrobiologi Kedokteran, edisi 20, EGC, Jakarta.
- Makfoeld, Djarir. 1993. Mikotoksin pangan. Yogyakarta : kanisius.
- Barber, P.H., M.V. Erdmann & S.R. Palumbi. 2006. Comparative Phylogeography of Three Codistributed Stomatopods: Origins and Timing of Regional Lineage Diversification in the Coral Triangle. *Evolution*. 60(9): 1825-1839
- Magnani M, T Fernades, M Homechin EYS Ono. 2005. Moleculer identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. *Science Agricultural* 62, 45-49

- Farnsworth, N.R. 1966. Biological dan Phytochemical Screening of Plants, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 55(3):263
- Robinson, T.1995. Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi. Diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih Padnawinata. Bandung : ITB
- Harbone, J.B., 1987, Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Terbitan Kedua. Bandung: ITB
- Achmad, S.A. 1986. Kimia Organik Bahan Alam.
Jakarta: Kamunika
- Sharma OP dan Bhat TK. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*. 113:1202-1205
- Jun M, Fu HY, Hong J, Wan X, Yang CS, dan Ho CT 2003. Comparison of Antioxidant Activities of Isoflavones from Kudzu Root (*Pueraria lobata* Ohwi) *Journal Food Science*. Agustus 2003. 68 (6): Hal 2117-2122