

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Peremajaan Fungi Endofit Tumbuhan Bengkal (*Nauclea orientalis* L.)

Isolat fungi endofit tumbuhan fungi endofit yang diperoleh dari koleksi isolat Harwati (2019), Amelia (2019) dan Alharza (2019). Dari sumber tersebut diperoleh 12 isolat fungi endofit (Tabel 4.1). fungi endofit yang diperoleh dari beberapa bagian tumbuhan Bengkal dapat menghasilkan beberapa jenis fungi. Menurut Noverita *et al.* (2009). Isolasi fungi endofit dari beberapa bagian tumbuhan inang dapat memiliki jenis isolat yang berbeda yang disebabkan dari mekanisme adaptif dari masing-masing endofit terhadap mikroekologis dan kondisi fisiologis yang spesifik dari tumbuhan inang.

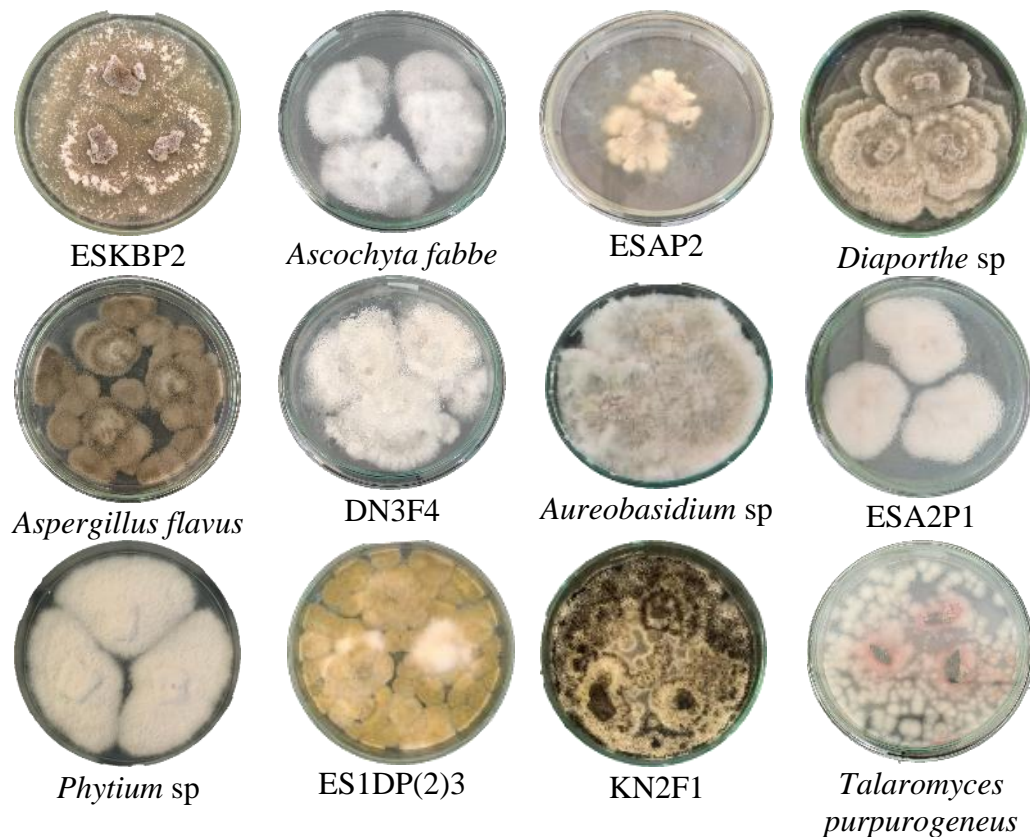
Tabel 4.1 Isolat Fungi Endofit Tumbuhan Bengkal (*Nauclea orientalis* L.)

Keterangan	Isolat Harwati (2019)	Isolat Amelia (2019) dan Alharza(2019)
<b>Kode Isolat</b>	<i>Ascochyta fabbe</i> , DN3F4, <i>Talaromyces purpurogeneus</i> , KN2F1 dan <i>Aspergillus flavus</i>	<i>Diaporthe</i> sp, ESAP2, ESA2P1, <i>Aureobasidium</i> sp, ESKBP2, <i>Phytium</i> sp, dan ES1DP2(3)
<b>Bagian Tumbuhan</b>	Daun dan kulit batang	Akar, kulit batang dan daun
<b>Jumlah Isolat</b>	5	7

Dari ketiga sumber diatas diketahui bahwa daun dan kulit batang digunakan dalam mengisolasi fungi endofit. Pemilihan kulit batang tumbuhan bengkal karena bagian ini dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang dapat berpotensi sebagai antioksidan. Menurut Saefudin dan Efrida (2015), tiga ekstrak kulit kayu dari famili Rubiaceae juga memiliki senyawa antioksidan yaitu *G. augusta* dan *N. orientalis* L. mengandung senyawa flavonoid, polifenol dan saponin yang cukup tinggi.

Morfologi dari 6 isolat fungi endofit tumbuhan bengkal serta *Ascochyta fabbe*, *Talaromyces purpurogeneus*, *Aspergillus flavus*, *Diaporthe* sp, *Aureobasidium* sp dan *Phytium* sp dapat dilihat pada Gambar 4.1. dari semua fungi endofit yang telah murni dapat dilanjutkan pada tahap kultivasi. Fungi endofit yang dihasilkan berbeda-beda berdasarkan penampakan morfologi dari masing-masing isolat walaupun dari jenis tumbuhan yang sama. Menurut Agusta (2018),

diperkirakan bahwa pada tiap jenis tumbuhan hidup berasosiasi dengan minimal 1-4 jenis jamur endofit.



Gambar 4.1 Isolat Murni Fungi Endofit Tumbuhan Bengkal (*Nauclea orientalis L.*)

#### 4.2. Kultivasi dan Ekstraksi Metabolit Sekunder Isolar Fungi Endofit Tumbuhan Bengkal (*Nauclea orientalis L.*)

Isolat fungi endofit yang telah dikultivasi selama  $\pm 35$  hari terjadi perubahan warna medium dibandingkan dengan kontrol (Gambar 4.2.). Perubahan warna pada medium terjadi karena fungi endofit akan menghasilkan metabolit sekunder dan akan dikeluarkan ke media yang menyebabkan medium mengalami perubahan warna baik memudar atau menjadi lebih gelap tergantung pada metabolit sekunder yang dihasilkan dari masing-masing fungi. fungi endofit akan tumbuh selama kultivasi yang awalnya hanya enam potongan agar, kemudian selama kultivasi akan mengapung dipermukaan botol dan menutupi permukaan botol karena kultivasi dilakukan dalam keadaan statis. Menurut Li *et al.* (1996), isolat fungi endofit memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa biologis aktif yang tinggi pada kultur. Menurut Gandjar *et al.* (2006), kapang yang ditumbuhkan pada medium cair

tanpa digoyang setelah kultivasi beberapa hari akan terlihat perubahan yaitu lapisan miselium yang tumbuh pada permukaan, warna medium yang semula bening akan berubah menjadi keruh.

Perubahan warna medium terjadi karena fungi akan mengeluarkan metabolit sekunder secara ekstraseluler ke lingkungan dan menyebabkan perubahan warna pada medium PDB. Metabolit sekunder dihasilkan oleh fungi paling banyak pada akhir fase pertumbuhan eksponensial dimana pada fase ini pertumbuhan fungi sangat tinggi dan sisa stok nutrisi di lingkungan tidak dapat mencukupi kebutuhan untuk keberlangsungan kehidupan sehingga fungi akan menghasilkan metabolit sekunder yang dapat dipanen pada akhir fase pertumbuhan eksponensial atau awal fase pertumbuhan stasioner dimana laju pertumbuhan telah menurun. Menurut (Moore-Landecker, 1996), fase stasioner merupakan fase jumlah sel yang bertambah dan jumlah sel yang mati relatif seimbang. Kurva pada fase ini memiliki bentuk garis lurus yang horizontal. Banyak senyawa metabolit sekunder dapat dipanen pada fase stasioner.



Gambar 4.2. Perubahan warna medium setelah kultivasi 30 hari dibandingkan dengan kontrol

Keterangan: a. Kontrol medium PDB

b. Fungi *Aureobasidium* sp pada medium PDB

Berdasarkan tabel 4.1. Berat kering biomassa tertinggi ada pada *Phytium* sp dengan berat 5,03 g, sedangkan isolat DN3F4 memiliki berat kering biomassa terendah yaitu 1,8g. Perbedaan tersebut dapat disebabkan oleh beberapa hal, salah satunya adalah nutrisi dimana setiap fungi membutuhkan nutrisi yang berbeda-beda setiap jenisnya. Hasil kultivasi fungi endofit pada medium menghasilkan berat kering biomassa dan berat ekstrak yang berbeda-beda hal ini disebabkan karena

perbedaan jenis fungi dari setiap isolat tersebut. Setiap jenis fungi memiliki kebutuhan nutrisi yang berbeda-beda dan waktu untuk pertumbuhannya juga berbeda. Menurut Gandjar *et al.* (2006), substrat merupakan sumber nutrisi utama bagi pertumbuhan fungi. Nutrien-nutrien baru dapat dimanfaatkan sesudah fungi mengekskresikan enzim-enzim ekstraselular yang dapat mengurai senyawa-senyawa yang lebih sederhana.

Berat ekstrak metanol yang diekstraksi dari biomassa secara keseluruhan lebih besar daripada berat ekstrak etil asetat yang diekstraksi dari filtrat. Hal ini mungkin terjadi akibat perbedaan polaritas pelarut yang digunakan dimana metanol bersifat polar sedangkan etil asetat bersifat semi polar sehingga akan membedakan senyawa yang diekstraksi oleh masing-masing pelarut sehingga dapat mempengaruhi berat ekstrak. Menurut Zhang *et al.* (2007), menyatakan bahwa ekstraksi dari suatu senyawa dari ekstrak bergantung terhadap kompatibilitas dari senyawa tersebut terhadap pelarut yang digunakan berdasarkan prinsip *like dissolve like*.

Tabel 4.2. Hasil Kultivasi Fungi Endofit Tumbuhan Bengkal *Nauclea orientalis* L.

No	Kode Isolat	Berat Kering Biomassa (g)	Berat Ekstrak Etil Asetat (g)	Berat Ekstrak Metanol (g)
1.	ESKBP2	3,77	0,43	0,36
2.	<i>Ascochyta fabbe</i>	2,7	0,31	0,36
3.	ESAP2	4,3	0,22	0,68
4.	<i>Diaporthe sp</i>	4,25	0,34	0,37
5.	<i>Aspergillus flavus</i>	3	0,76	0,81
6.	DN3F4	1,8	0,57	0,36
7.	<i>Aureobasidium sp</i>	3,03	0,55	1,65
8.	ESA2P1	2,59	0,23	1,35
9.	<i>Phytium sp</i>	5,03	0,33	1,44
10.	ES1(DP(2)3	2,31	0,31	0,56
11.	KN2F1	2,56	0,31	0,38
12.	<i>Talaromyces purpurogeneus</i>	2,26	0,18	1,54

Berat ekstrak yang didapatkan dari setiap isolat berbeda-beda dan tidak ada hubungan berbanding lurus antara berat kering dan berat ekstrak (Tabel 4.2). Isolat

*Aspergillus flavus* memiliki berat ekstrak tertinggi pada pelarut etil asetat yaitu sebesar 0,76 g. *Talaromyces purpurogeneus* memiliki berat ekstrak terendah yaitu 0,18 g. Isolat *Aureobasidium* sp memiliki berat ekstrak tertinggi pada pelarut metanol yaitu sebesar 1,65 g dan berat terendah pada isolat ESKBP2 dan DN3F4 serta *Ascochyta fabbe* yaitu 0,36 g. Setiap isolat fungi endofit berbeda satu sama lain baik perkembangan miselium, berat ekstrak yang didapat dan berat kering biomassa dari masing-masing isolat. Perbedaan tersebut terjadi karena setiap isolat memiliki identitas yang berbeda-beda dan memiliki sifat fisiologisnya sendiri dan spesifik sehingga dapat menyebabkan perbedaan-perbedaan tersebut. Menurut Alurappa *et al.* (2018), dibandingkan dengan metabolit sekunder yang esensial pada semua sistem kehidupan, metabolit sekunder biasanya spesifik spesies dan merupakan derivat dari intermediet metabolisme primer. Metabolit sekunder dari fungi endofit memiliki varietas struktur yang luas yaitu alkaloid, terpenoid, kuinon, xanthon, peptida, steroid, flavonoid, fenol dan senyawa fenolik.

#### **4.3. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metabolit Sekunder Isolat Fungi Endofit Tumbuhan Bengkal (*Nauclea orientalis* L.)**

Ekstrak dianalisa secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer. Hasil yang didapatkan berupa %inhibisi konsentrasi terhadap DPPH kemudian data tersebut dianalisis dan didapatkan nilai  $IC_{50}$ . Pemilihan ekstrak yang berpotensi berdasarkan standar Molyneux kemudian dipilih yang memiliki aktivitas kuat dan sangat kuat. Menurut Hidayat *et al.*, (2018),  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi yang dibutuhkan oleh suatu substrat dalam mengurangi aktivitas DPPH atau radikal bebas sebanyak 50%.

Ekstrak dipilih berdasarkan kemampuan antioksidannya yang masuk kategori sangat kuat dan kuat (Tabel 4.3). Ekstrak filtrat yang termasuk kategori sangat kuat adalah ES1DP(2)3, ESA2P1 dan *Diaporthe* sp dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 21  $\mu\text{g/ml}$ , 32  $\mu\text{g/ml}$  dan 48  $\mu\text{g/ml}$ . Ekstrak yang masuk kategori kuat adalah *Aureobasidium* sp, ESKBP2 dan KN2F1 dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 54  $\mu\text{g/ml}$ , 75  $\mu\text{g/ml}$  dan 88  $\mu\text{g/ml}$ . Ekstrak biomassa yang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat adalah *Aureobasidium* sp dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 97  $\mu\text{g/ml}$ . Semakin rendah nilai  $IC_{50}$  yang dimiliki oleh ekstrak maka kemampuan antioksidannya semakin

besar. Menurut Rachman *et al.*, (2018), nilai IC<sub>50</sub> berbanding terbalik dengan aktivitas antioksidannya. Semakin kecil nilai IC<sub>50</sub> maka aktivitas antioksidannya semakin kuat.

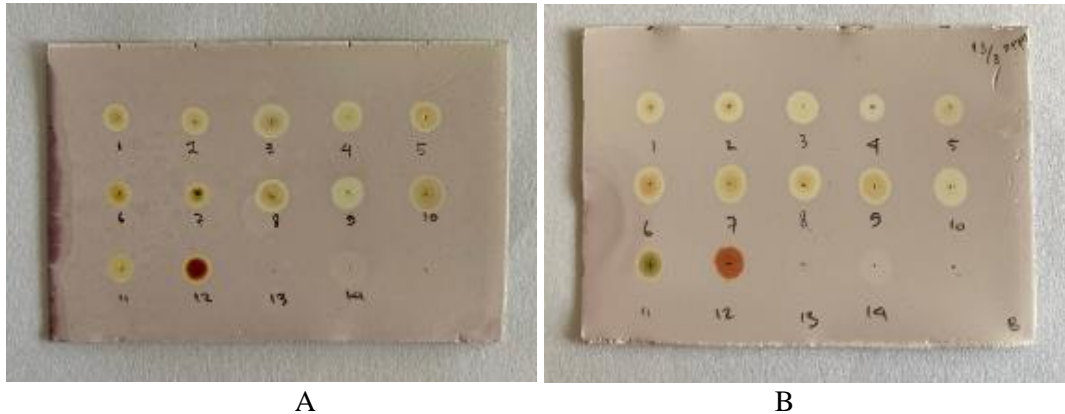
Tabel 4.3. Nilai IC<sub>50</sub> Ekstrak Metabolit Metabolit Sekunder Isolat Fungi Endofit Tumbuhan Bengkal dan Asam Askorbat (Standar)

No	Kode Isolat	Filtrat		Biomassa	
		IC <sub>50</sub> µg/ml	Aktivitas	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Aktivitas
1.	ESKBP2	75	<b>Kuat</b>	1082	Tidak Aktif
2.	<i>Ascochyta fabbe</i>	119	Sedang	1584893	Tidak Aktif
3.	ESAP2	189	Lemah	314	Sangat Lemah
4.	<i>Diaporthe sp</i>	48	<b>Sangat Kuat</b>	1352072563	Tidak Aktif
5.	<i>Aspergillus flavus</i>	220	Sangat Lemah	360828	Tidak Aktif
6.	DN3F4	127	Sedang	776	Sangat Lemah
7.	<i>Aureobasidium sp</i>	54	<b>Kuat</b>	97	<b>Kuat</b>
8.	ESA2P1	32	<b>Sangat Kuat</b>	885	Sangat Lemah
9.	<i>Phytium sp</i>	587	Sangat Lemah	5395	Tidak Aktif
10.	ES1(DP(2)3	21	<b>Sangat Kuat</b>	667	Sangat Lemah
11.	KN2F1	88	<b>Kuat</b>	106	Sedang
12.	<i>Talaromyces purpurogeneus</i>	206	Sangat Lemah	92045	Tidak Aktif
13.	Asam Askorbat	17	Sangat Kuat	17	Sangat kuat

Kriteria antioksidan: IC<sub>50</sub> >1000(Tidak Aktif), 1000-200 (Sangat Lemah), IC<sub>50</sub> 150-200 (Lemah), IC<sub>50</sub> 100-150 (Sedang), IC<sub>50</sub> 50-100 (Kuat), IC<sub>50</sub> <50 (Sangat Kuat) (Molyneux, 2004).

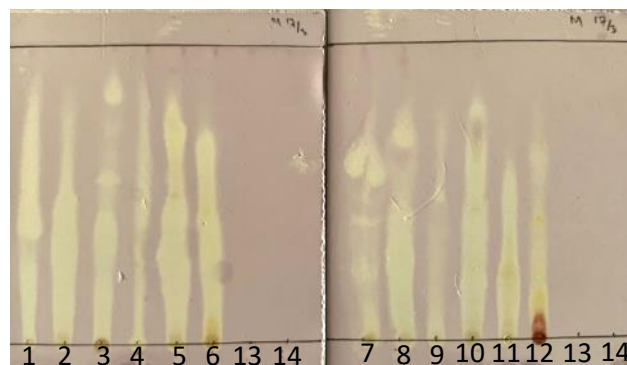
Penotolan dilakukan pada plat KLT dan dilakukan tanpa elusi dan dapat dipilih ekstrak yang berkemampuan. Berdasarkan Gambar 4.3. dapat dilihat bahwa hampir seluruh ekstrak menghasilkan warna kuning dengan latar ungu yang mengindikasikan bahwa isolat tersebut memiliki kemampuan antioksidan karena dapat mereduksi DPPH yang disemprotkan pada plat. Beberapa isolat menghasilkan penampakan kuning yang tidak terlalu jelas karena adanya zat pengotor seperti pada gambar A. yaitu ekstrak fungi endofit nomor 5, 6, 8, 10,11 dan 12 kurang jelas penampakan warna kuningnya dan pada gambar B. pada ekstrak fungi endofit nomor 6, 7, 8, 9, 11 dan 12. Oleh karena itu analisis dilanjutkan dengan mengelusi ekstrak dengan tujuan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan dalam ekstrak kental tersebut menggunakan perbandingan eluen sebesar nheksan : etil asetat = (1 : 2). Hasil elusi ekstrak dengan eluen etil asetat : nheksan = (2 : 1) dapat dilihat pada Gambar 4.3. dan 4.4. Menurut Isnindar *et al.* (2011), penentuan kemampuan antioksidan dilakukan dengan

digunakan pereaksi semprot larutan DPPH, senyawa aktif antioksidan akan menunjukkan bercak kuning pucat dengan latar belakang ungu. Menurut Stahl (2013), KLT merupakan pemisahan dengan prinsip adsorpsi dan partisi yang ditentukan oleh fase diam (adsorben) dan fase gerak (eluen).



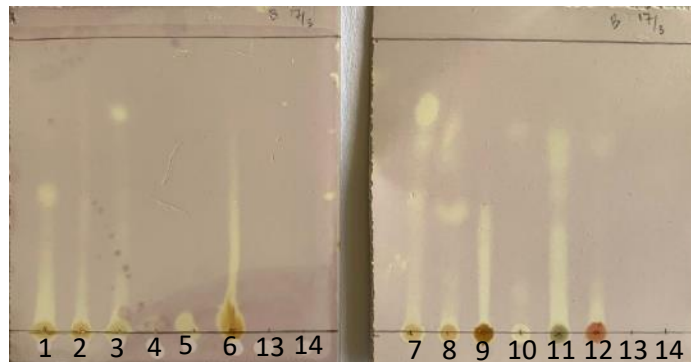
Gambar 4.3. Profil KLT aktivitas antioksidan ekstrak fungi endofit tumbuhan Bengkulu .  
Keterangan: A. ekstrak filtrat, B. ekstrak biomassa  
1. ESKBP2, 2. *Ascochyta fabbe*, 3. ESAP2, 4. *Diaporthe* sp, 5. *Aspergillus flavus*, 6. DN3F4, 7. *Aureobasidium* sp, 8. ESA2P1, 9. *Phytium* sp, 10. ES1DP(2)3, 11. KN2F1, 12. *Talaromyces purpurogeneus*, 13. Etil asetat (A) 13. Metanol (B), 14. Asam askorbat.

Gambar 4.4. menunjukkan pemisahan masih belum jelas karena pola masih terlalu tebal dan polanya kurang baik , seperti pada ekstrak fungi endofit nomor 12 terlihat masih ada zat pengotor pada titik awal penotolan, dan pada ekstrak fungi endofit nomor 1, 2, 5, 6, 8 dan 10 pola warna yang terbentuk terlalu tebal dan pemisahan kurang baik.



Gambar 4.4. Profil KLT ekstrak filtrat jamur endofit tumbuhan Bengkulu (*Nauclea orientalis* L.) yang dielusi dengan etil asetat: nheksan= 2:1.  
Keterangan: 1. ESKBP2, 2. *Ascochyta fabbe*, 3. ESAP2, 4. *Diaporthe* sp, 5. *Aspergillus flavus*, 6. DN3F4, 7. *Aureobasidium* sp, 8. ESA2P1, 9. *Phytium* sp, 10. ES1DP(2)3, 11. KN2F1, 12. *Talaromyces purpurogeneus*, 13. Etil asetat, 14. Asam askorbat.

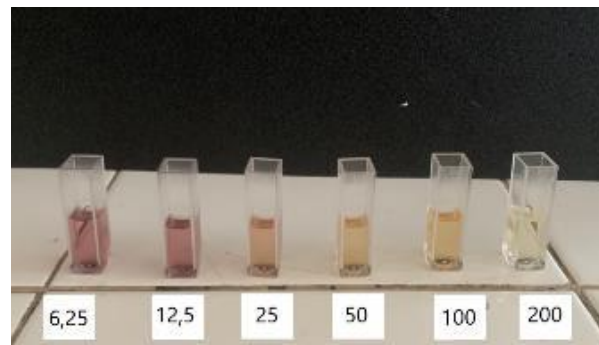
Gambar 4.5. menunjukkan bahwa hasil elusi lebih jelas dan pemisahan senyawa terlihat jelas sehingga dapat terlihat isolat yang berpotensi yaitu ekstrak fungi endofit nomor 1, 5, 7, 8, dan 11 yang memiliki potensi antioksidan. Sedangkan ekstrak lain tidak memiliki potensi sebagai antioksidan karena kaburnya warna kuning yang dihasilkan pada gambar profil KLT.



Gambar 4.5 Profil KLT ekstrak biomassa jamur endofit tumbuhan Bengkal (*Nauclea orientalis* L.) yang dielusi dengan etil asetat: nheksan= 2:1. Keterangan: 1. ESKBP2, 2. *Ascochyta fabbe*, 3. ESAP2, 4. *Diaporthe* sp, 5. *Aspergillus flavus*, 6. DN3F4, 7. *Aureobasidium* sp, 8. ESA2P1, 9. *Phytium* sp, 10. ES1DP(2)3, 11. KN2F1, 12. *Talaromyces purpurogeneus*, 13. metanol, 14. Asam askorbat.

Prinsip kerja dari DPPH adalah kemampuan ekstrak dalam mereduksi warna ungu dari DPPH, sehingga semakin pekat warna DPPH maka kemampuan ekstrak dalam mereduksi radikal bebas semakin kecil, begitu juga sebaliknya apabila warna DPPH semakin redup maka kemampuan ekstrak dalam mereduksi warna DPPH semakin tinggi. Pereduksian warna dapat dilihat pada Gambar 4.6. yang menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi asam askorbat maka reduksi warna ungu semakin besar dan warna ekstrak menunjukkan warna kuning. Menurut Molyneux (2004), reagen DPPH yang bereaksi dengan antioksidan akan terjadi perubahan warna larutan dari ungu ke kuning, dan intensitas warna tergantung dari kemampuan antioksidan. Didukung oleh pernyataan Zuhra *et al.* (2008), peredaman warna ungu DPPH dihasilkan oleh bereaksinya molekul DPPH dengan atom hidrogen yang dilepaskan satu molekul komponen sampel sehingga terbentuk senyawa 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin (DPPH-H) dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning.





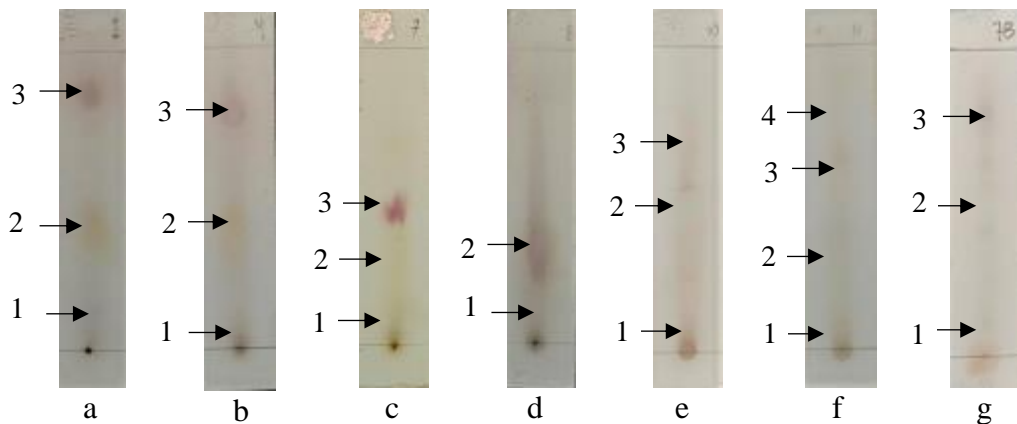
Gambar 4.6. Reduksi warna DPPH dari ungu menjadi kuning berdasarkan konsentrasi (ppm) asam askorbat.

#### 4.4. Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Metabolit Sekunder Isolat Fungi Endofit Tumbuhan Bengkal (*Nauclea orientalis* L.)

Ekstrak ESKBP2, *Diaporthe* sp, *Aureobasidium* sp, ESA2P1, ES1DP(2)3 dan KN2F1 dipilih karena ekstrakunya memiliki aktivitas antioksidan kuat dan sangat kuat. Ekstrak tersebut kemudian dianalisis dengan Kromatografi lapis tipis (KLT) untuk memisahkan senyawa-senyawa yang ada didalam ekstrak fungi endofit yang memiliki aktivitas antioksidan kuat dan sangat kuat. Kemudian dilanjutkan dengan perhitungan nilai Rf (*Retardation factor*) dari masing-masing ekstrak yang berpotensi. Pemisahan senyawa berfungsi untuk mengetahui jenis senyawa apa saja yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan. Menurut Alen *et al.* (2017), analisis dengan menggunakan KLT merupakan pemisahan komponen kimia berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisi yang ditentukan oleh fase diam (adsorben) dan fase gerak (eluen). Menurut Stahl (2013), Komponen kimia bergerak naik mengikuti fase gerak karena daya serap adsorben terhadap komponen-komponen kimia tidak sama sehingga komponen kimia dapat bergerak dengan jarak yang berbeda berdasarkan tingkat kepolarannya. Hal inilah yang menyebabkan terjadinya pemisahan komponen-komponen kimia di dalam ekstrak.

Berdasarkan gambar 4.7. terlihat beberapa macam pola warna pada plat KLT. Perbedaan warna ini disebabkan oleh adanya perbedaan senyawa dalam suatu ekstrak sehingga pada saat dipisahkan dengan menggunakan KLT yang dielusi akan terpisah senyawa yang berbeda tersebut. Eluen yang digunakan pada KLT dengan perbandingan n heksan : etil asetat = 1:2. Setelah dielusi kemudian plat KLT disemprotkan dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% dan dipanaskan dan diamati pola

kromatogramnya. Berdasarkan Fransworth (1966), penyemprotan reagen pada plat KLT akan menghasilkan warna yang dapat diketahui jenis senyawa pada ekstrak dengan menggunakan reagen.



Gambar 4.7. Kromatogram Ekstrak Metabolit Sekunder Fungi Endofit Tumbuhan Bengkal (*Nauclea orientalis* L.)

Keterangan: a. ESKBP2, b. *Diaporthe* sp, c. *Aureobasidium* sp, d. ESA2P1, e. ES1DP(2)3, f. KN2F1, g. *Aureobasidium* sp (biomassa). 1-3 pola warna pada plat.

Pola warna yang terbentuk pada 6 fungi endofit tumbuhan bengkal didapatkan dari kebanyakan senyawa antioksidan yang berhasil diisolasi terdiri dari senyawa tanin, flavonoid, terpenoid dan alkaloid. Pola kromatogram diukur nilai Rf pada isolat yang memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat yaitu pada isolat ESA2P1 dan ES1DP(2)3 serta *Diaporthe* sp (Tabel 4.3). Tanin dan flavonoid umumnya ditemukan pada senyawa dengan aktivitas antioksidan sangat kuat hal ini terjadi karena kedua senyawa ini merupakan senyawa fenolik. Menurut Huyut *et al.* (2017), senyawa fenolik yang umum ditemukan di tumbuhan dapat diklasifikasikan menjadi asam fenolik, *tocopherols*, dan flavonoid. Fenolik dan flavonoid dapat menjadi antioksidan untuk antialergi, antiinflamasi, antidiabetes, antimikroba, antipatogen, antivirus dll. Menurut Diaz *et al.* (2012), ekstrak bioaktif herba dengan kadar tinggi pada senyawa fenolik dan flavonoid menunjukkan aktivitas antioksidan sangat kuat dan aktivitas antiinflamasi.

Sebagian besar jenis senyawa yang berhasil diisolasi berasal dari tanin dan flavonoid yang merupakan kelompok senyawa fenolik dan terpenoid. Senyawa fenolik berperan penting dalam pembentukan antioksidan alami. hal ini didukung

dengan pernyataan Desmiaty *et al.* (2008), tanin merupakan senyawa aktif metabolit sekunder yang mempunyai beberapa khasiat seperti sebagai astringen, anti diare, antibakteri dan antioksidan. Selain itu menurut Zuraida *et al.* (2017), flavonoid merupakan salah satu golongan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman yang termasuk dalam kelompok besar polifenol yang memiliki kemampuan sebagai penangkap radikal bebas dan menghambat oksidasi lipid. Menurut Al-Jaber *et al.* (2011), menyatakan bahwa komponen fenolik (flavonoid dan tanin), alkaloid, terpenoid dan komponen sulfur organik berperan sebagai antioksidan alami.

Flavonoid dapat menghambat enzim yang menghasilkan anion superoksida yaitu xanthine oksida dan protein kinase C. Selain itu flavonoid dapat menghambat cyclooxygenase, lipooxygenase dan NADH oxidase yang terlibat dalam pembentukan ROS (*reactive oxygen species generation*). Beberapa flavonoid juga secara efisien dapat mengikat logam bebas yang memiliki pengaruh besar dalam metabolisme oksigen. Besi dan tembaga yang bebas berpotensi dalam meningkatkan formasi ROS. Flavonoid memiliki potensi redoks yang rendah, secara termodinamik dapat mengurangi oksidasi radikal bebas dengan potensial redoks. Dan yang terakhir adalah struktur dari flavonoid yang memungkinkan untuk mengikat senyawa radikal bebas di tubuh (Pietta, 2000).

Tanin didefinisikan sebagai antinutrien yang berasal dari tumbuhan karena dapat mengendapkan protein, menghambat enzim pencernaan dan mengurangi penggunaan vitamin dan mineral. Namun, tanin juga dianggap dapat meningkatkan kesehatan pada makanan atau minuman yang berasal dari tumbuhan. Tanin tidak hanya berfungsi sebagai antioksidan primer (karena tanin dapat mendonasikan atom hidrogen atau elektron), tanin juga dapat berfungsi sebagai antioksidan sekunder. Tanin memiliki kemampuan untuk mengikat ion logam seperti Fe(II) dan mengganggu salah satu tahapan reaksi pada reaksi Fenton sehingga memperlambat oksidasi. Inhibisi dari lipid peroksidase oleh komponen tanin dapat berlangsung via inhibisi *cyclooxygenase* (Amarowicz, 2007).

Terpenoid merupakan senyawa yang dihasilkan dari isoprene sehingga terpenoid juga sering disebut isoprenoid. Terpenoid dibagi berdasarkan basis rantai C yaitu monoterpen, sesquiterpen, diterpen, triterpen, tetraterpen dan polyterpen.

Monoterpen dan sesquiterpen merupakan komponen utama dari minyak atsiri (contoh: buah jeruk, herba dan rempah). Monoterpen dapat menghambat karsinogenesis pada saat inisiasi dan stase progresi/promosi. Monoterpen, sesquiterpen dan diterpen menunjukkan adanya aktivitas antioksidan karena memiliki kemampuan sebagai donor hidrogen atau aktivitas *radical scavenging*, selain itu juga dapat secara efektif menghambat lipid peroksidase (LPO). Minyak atsiri yang terdiri dari terpenoid juga dapat mencegah oksidasi lipoprotein densitas rendah (LDL) yang terinduksi oleh adanya senyawa tembaga. Namun terpenoid tidak bisa mengikat senyawa logam bebas (Graßmann, 2005).

Tabel 4.4. Nilai Rf Ekstrak Etil Asetat Metabolit Sekunder Fungi Endofit Tumbuhan Bengkal (*Nauclea orientalis* L.) dengan Eluen N-Heksan:Etil Asetat=1:2.

No.	Kode Isolat	Jumlah Bercak	Nilai Rf	Warna Terbentuk	Golongan Senyawa (Farnsworth,1966)
1.	ESKBP2	3	0,2	Coklat	Tanin
			0,15	Kuning	Flavonoid
			0,125	Ungu	Terpenoid
2.	<i>Diaporthe</i> sp	3	0,125	Coklat	Tanin
			0,25	Kuning	Flavonoid
			0,15	Ungu	Terpenoid
3.	<i>Aureobasidium</i> sp	3	0,15	Coklat	Tanin
			0,25	Kuning	Flavonoid
			0,125	Merah muda	Terpenoid
4.	ESA2P1	2	0,225	Coklat	Tanin
			0,625	Ungu	Terpenoid
5.	ES1DP(2)3	3	0,075	Coklat	Tanin
			0,45	Kuning	Flavonoid
			0,2	Ungu	Terpenoid
6.	KN2F1	4	0,075	Coklat	Tanin
			0,25	Kuning	Flavonoid
			0,275	Ungu	Terpenoid
			0,4	Kuning	Flavonoid

Ekstrak *Aureobasidium* sp yang dihasilkan dari baik dari filtrat dan biomassa menghasilkan senyawa dengan golongan yang sama yaitu pada ekstrak terdapat senyawa tanin, flavonoid dan terpenoid (Tabel 4.4. dan Tabel 4.5.). walaupun memiliki jenis senyawa yang sama itu nilai Rf yang dihasilkan berbeda yaitu pada ekstrak filtrat memiliki nilai Rf sebesar 0,15; 0,25 dan 0,125 sedangkan nilai Rf yang dihasilkan ekstrak biomassa sebesar 0,5; 0,25 dan 0,25. Perbedaan

aktivitas tersebut bisa diakibatkan beberapa hal yaitu senyawa antioksidan sudah dikeluarkan ke filtrat sehingga senyawa yang berpotensi menghasilkan antioksidan di dalam biomassa berkurang. Menurut Widowati *et al.* (2016), nilai % inhibisi filtrat lebih besar dibandingkan biomassa karena senyawa aktif antioksidan yang dihasilkan berada banyak di filtrat (ekstraseluler) dibandingkan di biomassa (intraseluler).

Kemungkinan lain yang mengakibatkan perbedaan aktivitas yaitu perbedaan pelarut yang digunakan, yaitu pada filtrat digunakan etil asetat dan biomassa menggunakan metanol sehingga akan terjadi perbedaan senyawa yang ditarik karena perbedaan kepolaran pelarut. Menurut Santoso *et al.* (2012), proses ekstraksi dapat menggunakan 3 jenis pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda, yaitu nheksana (nonpolar), etil asetat (semipolar) dan etanol/metanol (polar). Perbedaan polaritas pelarut dalam ekstraksi dapat mempengaruhi kandungan total senyawa bioaktif.

Tabel 4.5. Nilai Rf Ekstrak Metanol Metabolit Sekunder Fungi Endofit Tumbuhan Bengkal (*Nauclea orientalis* L.) dengan Eluen N-Heksan:Etil Asetat=1:2.

No.	Kode Isolat	Jumlah Bercak	Nilai Rf	Warna Terbentuk	Golongan Senyawa (Farnsworth, 1966)
1.	<i>Aureobasidium</i> sp	3	0,5	Coklat	Tanin
			0,25	Kuning	Flavonoid
			0,25	Ungu	Terpenoid

Pemilihan eluen dengan perbandingan nheksan : etil asetat = 1:2. Perbandingan ini digunakan pada penelitian ini karena dapat memunculkan bercak dengan baik serta rona warna yang jelas sehingga dapat terlihat jelas pemisahan dari masing-masing ekstrak yang berpotensi dalam menghasilkan senyawa antioksidan yang memiliki aktivitas kuat dan sangat kuat. Menurut Stahl (2013), KLT dilakukan beberapa kali menggunakan bermacam eluen dengan tingkat kepolaran yang berbeda untuk mendapatkan pelarut yang mampu memberikan pemisahan yang baik serta rona warna yang terlihat jelas.

#### **4.5. Karakterisasi dan Identifikasi Isolat Fungi Endofit Tumbuhan Bengkal (*Nauclea orientalis* L.) yang Berpotensi Sangat Kuat dan Kuat Sebagai Antioksidan**

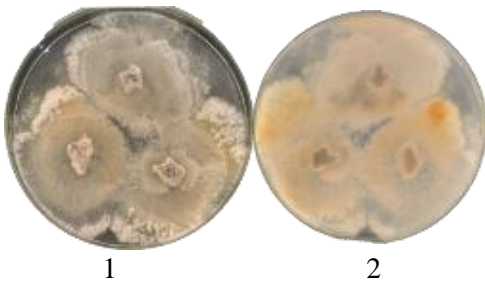


Fungi endofit tumbuhan Bengkal yang memiliki aktivitas antioksidan kuat dan sangat kuat terdiri atas 6 fungi, 2 diantaranya telah teridentifikasi berdasarkan penelitian Amelia (2019) yang terdiri atas *Aureobasidium* sp dan *Diaporthe* sp. empat isolat yang lain akan dilakukan karakterisasi dan identifikasi yaitu terdiri atas isolat ESKBP2, ESA2P1, ES1DP(2)3 dan KN2F1.

##### **4.4.1. Isolat ESKBP2**

Isolat ESKBP2 memiliki karakteristik makroskopis pada medium CDA yaitu koloni berwarna abu-abu dengan diameter  $\pm 4$  cm, sebaliknya koloni berwarna kuning pucat, tidak terlihat adanya eksudat pada medium sekitar koloni. Ciri pada medium MEA isolat ini memiliki warna putih pada koloninya dengan diameter  $\pm 5$  cm, sedangkan pada sebaliknya koloni berwarna coklat. Ciri pada medium PDA, isolat ini memiliki warna abu-abu sedikit putih dengan diameter  $\pm 5$  cm, warna sebalik koloni yaitu coklat pucat. Pertumbuhan isolat ESKBP2 pada medium CDA lebih lambat dibandingkan dengan pertumbuhan pada medium PDA dan MEA, namun secara keseluruhan pertumbuhan jamur ini relatif cepat. Pertumbuhan pada medium CDA sedang, pertumbuhan pada medium MEA dan PDA cepat. Isolat ESKBP2 tidak menyebabkan perubahan warna pada medium dilihat dari warna sekitar koloni pada setiap medium yang berwarna bening (Tabel 4.6).

Karakteristik mikroskopis isolat ESKBP2 (Tabel 4.7) memiliki ciri yaitu memiliki hifa hialin bersekat, pada perbesaran 100x terlihat adanya klamidospora yang digunakan sebagai alat reproduksi aseksual. Konidiofor terlihat berwarna hialin dengan cabang 2, selain konidiofor terlihat juga adanya klamidospora yang berbentuk oval biasanya terlihat pada bagian tengah hifa dan didapati dalam jumlah banyak pada pengamatan mikroskopis, klamidospora berbentuk oval dan tidak beraturan. Hifa isolat ini kecil dan tipis selain itu berbentuk seperti benang kusut dan bertumpuk-tumpuk. Konidia ditemukan pada medium MEA pada waktu inkubasi 7 hari.


Tabel 4.6. Karakteristik makroskopis fungi endofit tumbuhan Bengkulu Isolat ESKBP2 inkubasi 7 hari

Makroskopis	
Gambar	Karakteristik
<p>Medium CDA</p>  <p>1                      2</p>	<p>a. Pertumbuhan:++  b. Warna koloni: abu-abu dengan pinggir putih  c. Diameter koloni:± 4 cm  d. Warna medium sekitar koloni: bening  e. Warna sebalik koloni: kuning pucat</p>
<p>Medium MEA</p>  <p>1                      2</p>	<p>a. Pertumbuhan:+++  b. Warna koloni: putih  c. Diameter koloni: ± 5 cm  d. Warna medium sekitar koloni: bening  e. Warna sebalik koloni: coklat</p>
<p>Medium PDA</p>  <p>1                      2</p>	<p>a. Pertumbuhan:+++  b. Warna koloni: abu-abu dengan sedikit putih  c. Diameter koloni: ± 5 cm  d. Warna medium sekitar koloni: bening  e. Warna sebalik koloni:coklat pucat</p>

Keterangan: + (lambat), ++ (sedang), +++ (cepat). 1. Depan dan 2. Belakang

Isolat ESKBP2 teridentifikasi sebagai *Trichoderma* sp. berdasarkan karakteristik yang dimiliki fungi pada pengamatan makroskopis dan mikroskopis yang ada. Menurut Gams dan Bissett (1998), *Trichoderma* biasanya tumbuh dengan cepat pada suhu 25°C, memiliki konidia yang satu sel dan kladospora biasanya dapat ditemukan dalam jumlah banyak. Warna pada sebalik koloni bisa tidak berwarna atau kekuningan. Konidiofor pada sebagian besar spesies dengan cabang utama yang bercabang pada interval teratur. Konidia satu sel, biasanya hijau atau tidak berwarna, abu-abu, atau coklat; biasanya berdinding halus; variasi bentuknya *globose*, *obovoid* dan *ellips*.

Tabel 4.7. Karakteristik mikroskopis fungi endofit tumbuhan Bengkulu Isolat ESKBP2.

Mikroskopis	
Gambar	Karakteristik
	a. Hifa: bersekat b. Warna hifa: hialin c. Warna konidiofor: hialin
	Keterangan: 1. Konidiofor 2. Phialid 3. Klamidospora 4. Konidia
Spesies: <i>Trichoderma</i> sp.	







#### 4.4.2. Isolat ESA2P1

Isolat ESA2P1 memiliki karakteristik makroskopis pada medium CDA yaitu koloni berwarna putih kekuningan dengan diameter  $\pm 4,7$  cm, sebaliknya berwarna kuning keabuan. Ciri pada medium MEA isolat ini memiliki warna putih dengan diameter  $\pm 4,6$  cm, sedangkan pada sebaliknya koloni berwarna jingga. Ciri pada medium PDA, isolat ini memiliki warna putih dengan diameter  $\pm 3,2$  cm, warna sebalik koloni yaitu putih. Pertumbuhan isolat ESA2P1 pada medium PDA sedang dibandingkan dengan CDA dan MEA yang pertumbuhannya cepat. Isolat ESA2P1 sekitar koloninya berwarna kuning pada medium MEA (Tabel 4.8).

Isolat ESA2P1 memiliki karakteristik mikroskopis yaitu memiliki hifa hialin bersekat dan tipis. Ditemukan konidia berbentuk fusoid sama sisi dan hialin, selain itu terlihat adanya *conidial chain* yang merupakan salah satu alat reproduksi. *Conidiogenous cell* juga ditemukan, sel ini akan berkembang dan menjadi konidia. Konidia yang dihasilkan oleh isolat ESA2P1 banyak dan bertumpuk dan terlihat berinti satu, dinding sel terlihat jelas pada pengamatan dengan menggunakan perbesaran 1000x (Tabel 4.9).



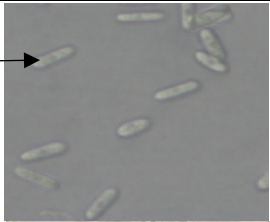

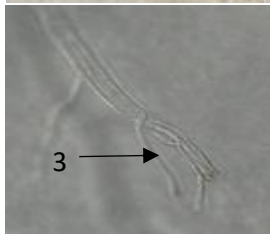
Tabel 4.8. Karakteristik makroskopis fungi endofit tumbuhan Bengkulu Isolat ESA2P1 inkubasi 7 hari

Gambar		Makroskopis	Karakteristik
Medium CDA			
			<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Pertumbuhan:+++</li> <li>b. Warna koloni: putih kekuningan</li> <li>c. Diameter koloni: ± 4,7 cm</li> <li>d. Warna medium sekitar koloni: bening</li> <li>e. Warna sebalik koloni: kuning keabuan</li> </ul>
1	2		
Medium MEA			
			<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Pertumbuhan:+++</li> <li>b. Warna koloni: putih</li> <li>c. Diameter koloni: ± 4,6 cm</li> <li>d. Warna medium sekitar koloni: kuning</li> <li>e. Warna sebalik koloni: jingga</li> </ul>
1	2		
Medium PDA			
			<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Pertumbuhan:++</li> <li>b. Warna koloni: putih</li> <li>c. Diameter koloni: ± 3,2 cm</li> <li>d. Warna medium sekitar koloni: bening</li> <li>e. Warna sebalik koloni: putih</li> </ul>
1	2		

Keterangan: + (lambat), ++ (sedang), +++ (cepat). 1. Depan dan 2. Belakang

Isolat ESA2P1 berdasarkan karakteristik fungi makroskopis dan mikroskopis yang ada, teridentifikasi sebagai *Acremonium* sp. Menurut Peberdy (1987), ciri dari Genus *Acremonium* yaitu koloni yang biasanya tumbuh lambat pada media. Hifa berdinding tipis dan hialin. Biasanya *conidiogenous cells* tumbuh lurus dan susunanya *single*, tetapi konidiofornya ada yang sederhana atau bercabang pada beberapa spesies. *conidiogenous cells* biasanya dibatasi oleh *basal septum*, biasanya dilanjutkan dengan hifa yang menipis pada ujung. Konidia hialin, biasanya terdiri atas satu sel berbentuk *globose*, *ovoid*, *ellipsoidal*, *cylindrical* atau *fusiform*.

Tabel 4.9. Karakteristik makroskopis fungi endofit tumbuhan Bengkal Isolat ESA2P1.

Mikroskopis	
Gambar	Karakteristik
	a. Hifa: bersekat b. Warna hifa: hialin c. Warna konidia: hialin
	Keterangan: 1. Konidia 2. <i>Conidial chains</i> 3. <i>Conidiogenous cells</i>
	
Spesies: <i>Acremonium</i> sp.	






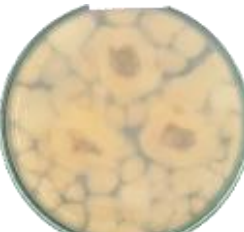
#### 4.4.3. Isolat ES1DP(2)3

Isolat ES1DP(2)3 memiliki karakteristik makroskopis pada medium CDA yaitu koloni berwarna hijau kekuningan dengan diameter  $\pm 1$  cm, sebaliknya berwarna putih. Ciri pada medium MEA isolat ini memiliki warna hijau sedikit putih dengan diameter  $\pm 1,5$  cm, sedangkan pada sebaliknya koloni berwarna jingga. Ciri pada medium PDA, isolat ini memiliki warna hijau sedikit putih dengan diameter  $\pm 4,5$  cm, warna sebalik koloni yaitu putih. Pertumbuhan isolat ES1DP(2)3 pada medium CDA dan MEA lebih lambat dibandingkan dengan PDA. Warna pada sekitar koloni pada setiap medium berwarna bening. Spora fungi terlihat sangat jelas pada bagian permukaan setiap medium yang dipakai (Tabel 4.10).

Isolat ES1DP(2)3 memiliki karakteristik mikroskopis yaitu pada pengamatan dengan perbesaran 1000x yaitu memiliki ciri hifa hialin bersekat selain itu terlihat jelas konidia yang dihasilkan berwarna hijau, konidia dan konidiofor dihasilkan sangat banyak dan jelas, konidia memiliki bentuk elips. Berdasarkan

gambar terlihat vesikel yang dimiliki isolat ini hialin dan memiliki bentuk bulat (Tabel 4.11)

Tabel 4.10. Karakteristik makroskopis fungi endofit tumbuhan Bengkal Isolat ES1DP(2)3 inkubasi 7 hari

Gambar		Makroskopis	Karakteristik
Medium CDA			
			a. Pertumbuhan:++ b. Warna koloni: hijau kekuningan c. Diameter koloni: ± 1 cm d. Warna medium sekitar koloni: bening e. Warna sebalik koloni: putih
1	2		
Medium MEA			
			a. Pertumbuhan:++ b. Warna koloni: hijau sedikit putih c. Diameter koloni: ± 1,5 cm d. Warna medium sekitar koloni: bening e. Warna sebalik koloni: jingga
1	2		
Medium PDA			
			a. Pertumbuhan:+++ b. Warna koloni: hijau sedikit putih c. Diameter koloni: ± 4,5 cm d. Warna medium sekitar koloni: bening e. Warna sebalik koloni: putih
1	2		

Keterangan: + (lambat), ++ (sedang), +++ (cepat). 1. Depan dan 2. Belakang

Isolat ES1DP(2)3 berdasarkan karakteristik mikroskopis dan makroskopis teridentifikasi sebagai *Aspergillus flavus* Link. Menurut Gandjar *et al.* (1999), koloni pada medium CDA mencapai diameter 3-5 cm dalam waktu 7 hari dan berwarna hijau kekuningan karena lebatnya konidiofor yang terbentuk. Kepala konidia berbentuk bulat dan berwarna hijau kekuningan hingga hijau tua kekuningan. Konidiofor berwarna hialin dan kasar. Vesikula berberbentuk bulat. Fialid terbentuk langsung pada vesikula. Konidia berbentuk bulat hingga semibulat.

Tabel 4.11. Karakteristik mikroskopis fungi endofit tumbuhan Bengkal Isolat ES1DP(2)3.

Mikroskopis	
Gambar	Karakteristik
<p>The image consists of two panels. The top panel shows a cluster of greenish-yellow, branched structures. Arrow 1 points to a long, thin, clear filament (hypha). Arrow 2 points to a dense, rounded mass of small, greenish-yellow spheres (conidia). Arrow 3 points to a small, clear, spherical structure (vesicle). The bottom panel is a higher magnification view of a single vesicle, showing a central point from which a long, thin filament (sterigma) extends, ending in a small, clear, oval-shaped structure (conidium).</p>	<p>a. Hifa: bersekat  b. Warna hifa: hialin  c. Warna konidia: hijau</p> <p>Keterangan:  1. Hifa  2. Konidia  3. Vesikel</p>
Spesies: <i>Aspergillus flavus</i> Link	




#### 4.4.4. Isolat KN2F1

Isolat KN2F1 memiliki karakteristik makroskopis pada medium CDA yaitu koloni berwarna putih kehitaman dengan diameter  $\pm 2,3$  cm, sebaliknya berwarna putih. Ciri pada medium MEA isolat ini memiliki warna hitam dengan diameter  $\pm 1$  cm, sedangkan pada sebaliknya koloni berwarna jingga. Ciri pada medium PDA, isolat ini memiliki warna putih kehitaman dengan diameter  $\pm 3,6$  cm, warna sebalik koloni yaitu putih. Pertumbuhan isolat KN2F1 pada medium PDA lebih cepat dibandingkan dengan CDA dan MEA. Warna pada sekitar koloni pada setiap medium bening. Spora pada isolat ini berwarna hitam dan sudah terlihat sejak umur medium 3 hari. Struktur koloni isolat KN2F1 memiliki perbedaan dibanding isolat lain yang berhasil diisolasi dari tumbuhan Bengkal dimana pada bagian belakang koloni dapat terlihat struktur yang keras dan keriput (Tabel 4.12).

Isolat KN2F1 memiliki karakteristik mikroskopi dimana memiliki hifa hialin bersekat, menghasilkan konidiofor dan konidia yang banyak, konidia berwarna coklat kehitaman dan berbentuk elips. Konidia akan tumbuhan menutupi vesikel saat masih muda, lalu saat sudah matang maka konidia akan terlepas dari

vesikel dan menyebar . Vesikel yang dimiliki isolat KN2F1 memiliki bentuk bulat (Tabel 4.13).

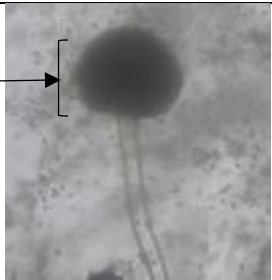
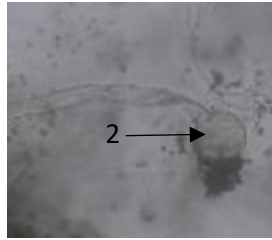
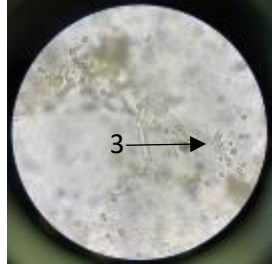
Tabel 4.12. Karakteristik makroskopis fungi endofit tumbuhan Bengkal Isolat KN2F1 inkubasi 7 hari

<b>Makroskopis</b>	
<b>Gambar</b>	<b>Karakteristik</b>
<p>Medium CDA</p>  <p>1                      2</p>	<p>a. Pertumbuhan:++  b. Warna koloni: putih kehitaman  c. Diameter koloni: ± 2,3 cm  d. Warna medium sekitar koloni: bening  e. Warna sebalik koloni: putih</p>
<p>Medium MEA</p>  <p>1                      2</p>	<p>a. Pertumbuhan:++  b. Warna koloni: hitam  c. Diameter koloni: ± 1 cm  d. Warna medium sekitar koloni: bening  e. Warna sebalik koloni: jingga</p>
<p>Medium PDA</p>  <p>1                      2</p>	<p>a. Pertumbuhan:+++  b. Warna koloni: putih kehitaman  c. Diameter koloni: ± 3,6 cm  d. Warna medium sekitar koloni: bening  e. Warna sebalik koloni: putih</p>

Keterangan: + (lambat), ++ (sedang), +++ (cepat). 1. Depan dan 2. Belakang

Berdasarkan karakter isolat KN2F1 pada pengamatan mikroskopis dan makroskopis. Isolat KN2F1 teridentifikasi sebagai *Aspergillus* sp. Menurut Silva *et al.* (2011), strain yang termasuk dalam genus *Aspergillus* Section *Nigri* secara karakteristik memiliki konidia coklat gelap hingga hitam, memiliki konidiofor yang uniseriate atau biseriate, vesikel berbentuk spherical dan hifa yang hialin atau terpigmentasi sedikit pada bagian ujung.

Tabel 4.13. Karakteristik makroskopis fungi endofit tumbuhan Bengkal Isolat KN2F1.

Mikroskopis	
Gambar	Karakteristik
	a. Hifa: bersekat b. Warna hifa: hialin c. Warna konidia: coklat kehitaman
	Keterangan: 1. Conidial head 2. Vesikel 3. Konidia
	
Spesies: <i>Aspergillus Section Nigri</i>	