

Bidang Penelitian : MIPA

**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN UNGGULAN KOMPETIF
UNIVERSITAS SRIWIJAYA**

**ISOLASI DAN SKRINING FUNGI ENDOFITIK TUMBUHAN
KARDIA (*Bellucia pentamera* Naudin) PENGHASIL
ANTIOKSIDAN**



**DR.HARY WIDJAJANTI, M.Si / NIDN.0012126112
DR.LAILA HANUM, M.Si / NIDN. 0031087304
DR.ELISA NURNAWATI, M.Si / NIDN. 0027047502**

**Dibiayai dari :
Anggaran DIPA Badan Layanan Umum
Universitas Sriwijaya tahun anggaran 2017
No.042.01.2.400953/2018 tanggal 5 Desember 2017
Sesuai dengan Kontak Penelitian Unggulan Kompetitif Universitas Sriwijaya
Nomor : 0007/UN9/SK.LP2M.PT/2018
Tanggal 6 Juni 2018**

**UNIVERSITAS SRIWIJAYA
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MIPA
NOPEMBER, 2018**

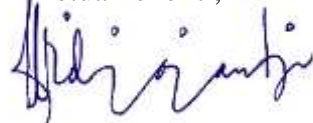
**HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR
PENELITIAN UNGGULAN KOMPETITIF
TAHUN ANGGARAN 2018**

1. Judul Penelitian	:	Isolasi dan skrining fungi endofitik tumbuhan kardia (<i>Bellucia pentamera</i> Naudin) penghasil senyawa antioksidan
2. Bidang Penelitian	:	MIPA/Biologi
3. Ketua Peneliti		
a. Nama lengkap	:	Dr.Hary Widjajanti, MSi
b. Jenis kelamin	:	Perempuan
c. NIP/NIDN	:	196112121987102001
d. Pangkat dan Golongan	:	Pembina/IV-a
e. Jabatan Struktural	:	Ketua Program Studi S3 MIPA
f. Jabatan fungsional	:	Lektor Kepala
g. Perguruan Tinggi	:	Universitas Sriwijaya
h. Fakultas/Jurusan	:	MIPA/Biologi
i. Alamat kantor	:	Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Sriwijaya. Jl.Raya Palembang-Prabumulih Km 32, Ogan Ilir 30662.
j. Telepon/Fax	:	(0711) 580306/Fax (0711) 580056
k. Alamat rumah	:	Komplek Pusri Sukamaju, Jalan Brantas No.N-7 Palembang - 30164
l. Telepon/HP/Fax/E-mail	:	(0711)811619/085273651116/haryunsri@yahoo.com
4. Jangka waktu penelitian	:	1 (satu) tahun
5. Jumlah dana yang disetujui	:	Rp.71.500.000,- (Tujuh puluh satu juta lima ratus ribu rupiah)

Mengetahui :
Dekan Fakultas MIPA Unsri,

Prof.Dr.Iskhaq Iskandar, M.Sc
NIP.197210041997021001

Inderalaya, 28 Nopember 2018
Ketua Peneliti,



Dra.Hary Widjajanti, MSi
NIP.196112121987102001

Menyetujui :
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat
Universitas Sriwijaya,

Prof.Drs.Tatang Suhery, M.A.Ph.D
NIP.195904121984031002

I. Identitas Penelitian

- 1. Judul Usulan** : Isolasi dan skrining fungi endofitik tumbuhan kardia (*Bellucia pentamera* Naudin) penghasil senyawa antioksidan
- 2. Ketua Peneliti**
- a). Nama lengkap : Dr. Hary Widjajanti, MSi
- b). Bidang keahlian : Biologi (Mikrobiologi)

3. Anggota Peneliti

No.	Nama dan Gelar Akademik	Bidang Keahlian	Instansi	Alokasi Waktu (jam/minggu)
1.	Dr.Laila Hanum, MSi	Biologi molekuler	UNSRI	5
2.	Dr.Elisa Nurnawati, MSi	Bioteknologi	UNSRI	5

- 4. Isu Strategis** : Pencarian bahan baku obat dari fungi
- 5. Topik Penelitian** : Eksplorasi fungi endofitik penghasil senyawa antioksidan
- 6. Objek Penelitian** : Fungi endofitik dari tumbuhan kardia (*Bellucia pentamera* Naudin) penghasil senyawa antioksidan
- 7. Lokasi Penelitian** : Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Genetika & Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA UNSRI
- 8. Hasil yang ditargetkan** : Diperoleh fungi endofitik tumbuhan kardia yang dapat menghasilkan senyawa antioksidan
- 9. Institusi lain yang terlibat** : -
- 10. Sumber biaya lain** : -
- 11. Keterangan lain** : -

II. Substansi Penelitian

RINGKASAN

Fungi endofitik adalah fungi (jamur) yang hidup di dalam jaringan tanaman pada periode tertentu dan mampu hidup dengan membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya. Setiap tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa fungi endofitik yang mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder yang diduga sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik (*genetic recombination*) dari tanaman inang ke fungi endofitik. Kemampuan fungi endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya merupakan peluang yang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder dari mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman inangnya tersebut. Kendala yang dihadapi dalam memperoleh senyawa bioaktif dari tumbuhan obat adalah sedikitnya ekstrak murni yang diperoleh ketika mengisolasi senyawa bioaktif dari tumbuhan. Kendala tersebut menjadikan sangat sulit jika akan dilakukan pengembangan senyawa bioaktif dari tumbuhan obat yang bersifat langka dan endemik, hal ini dikarenakan jika tumbuhan langka dilakukan eksplorasi untuk diambil senyawa bioaktifnya, maka kelestarian tumbuhan tersebut menjadi terancam. Dalam pengembangan obat berbasis tumbuhan obat harus dipertimbangkan aspek kelestarian tumbuhan obat yang akan dikembangkan. Salah satu teknologi yang bisa dilakukan adalah dengan mengisolasi fungi endofitik dari bagian tumbuhan obat yang sering digunakan sebagai obat secara tradisional dan dilakukan seleksi senyawa metabolit sekunder yang bersifat bioaktif seperti bersifat antibakteri dan antioksidan dari kultur fungi endofitik tersebut, dengan demikian pengembangan senyawa obat berbasis tumbuhan obat dapat dilakukan dan kelestarian tumbuhan obat terutama yang sudah langka dapat dipertahankan. Dari hasil penelitian tumbuhan obat dan jamu di Sumatera Selatan pada tahun 2015 dijumpai permasalahan yaitu di 5 (lima) etnis yang diteliti (Daya, Lintang, Meranjat, Pegagan, dan Teloko) ditemukan beberapa tumbuhan obat yang belum ada upaya pelestarian terhadap tumbuhan obat tersebut, sehingga akan kesulitan untuk memperoleh tumbuhan obat tersebut jika diperlukan. Salah satu tumbuhan obat yang sulit didapatkan adalah tumbuhan kardia (*Bellucia pentamera* Naudin) yang oleh masyarakat Etnis Meranjat digunakan dalam proses penyembuhan beberapa penyakit. Oleh karena itu akan dicari upaya untuk memperoleh fungi endofitik dari tumbuhan obat yang sulit didapatkan tersebut yang mampu menghasilkan metabolit sekunder sebagai bahan bioaktif untuk pengembangan obat asal tumbuhan dan melestarikan tumbuhan obat sulit dari etnis Meranjat di Sumatera Selatan. Dalam upaya pengembangan obat berbasis tumbuhan obat dan sekaligus tetap menjaga kelestarian tumbuhan obat terutama yang sudah langka maka penelitian ini perlu dilakukan. Serangkaian kegiatan yang akan dilakukan meliputi : isolasi dan pemurnian fungi endofitik, seleksi fungi endofitik yang menghasilkan metabolit sekunder, isolasi metabolit sekunder, uji aktivitas antioksidan dan antibakteri, dan karakterisasi dan identifikasi secara fenotipik dan molekuler fungi endofitik yang berpotensi tinggi dalam menghasilkan senyawa bioaktif yang bersifat antioksidan dan antibakteri. Hasil isolasi fungi endofit dari tumbuhan kardia (*Bellucia pentamera* Naudin) diperoleh 9 isolat yang terdiri atas 2 isolat dari batang dan 7 isolat dari daun. Metabolit sekunder isolat fungi endofit DKJ3a, DKJ3c, dan DKJ4 berpotensi sebagai antioksidan. Isolat DKJ3a yang memiliki potensi kuat sebagai antioksidan. Isolat fungi endofit DKJ3a teridentifikasi sebagai *Penicillium rolfsii* dan DKJ4 termasuk kedalam jenis *Penicillium oxalicum* sedangkan isolat fungi endofit DKJ3c merupakan *Aspergillus fumigatus* group.

Kata kunci : fungi endofitik, *Bellucia pentamera*, antibakteri, antioksidan

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
IDENTITAS PENELITIAN	iii
RINGKASAN.....	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. STUDI PUSTAKA	4
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	10
BAB IV. PETA JALAN PENELITIAN	11
BAB V. METODE PENELITIAN.....	12
BAB VI. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	20
BAB VII. KESIMPULAN.....	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN	

BAB I.PENDAHULUAN

Latar Belakang

Sejumlah tumbuhan sudah secara turun temurun dari generasi ke generasi digunakan sebagai obat oleh hampir setiap masyarakat termasuk di Indonesia. Tumbuhan yang digunakan sebagai tumbuhan obat, sekarang sudah mulai digali secara ilmiah dengan menganalisis kandungan bahan aktif yang menyebabkan berkasiat obat. Secara umum bahan aktif yang terkandung di dalam tumbuhan tersebut terlalu sedikit atau minor, oleh karena itu jika akan dikembangkan dalam skala besar mengalami kendala dari bahan baku tumbuhan tersebut yaitu harus dalam jumlah yang besar.

Salah satu penelitian yang dilakukan oleh Munawar dan Elfita (2007) menunjukkan bahwa senyawa antibakteri berupa ekstrak kasar yang dihasilkan dari kulit akar tumbuhan Medang Seluang (*Litsea spatulata*) yang diekstraksi menggunakan n-heksan hanya 2,22% (b/b), jika senyawa tersebut dimurnikan maka jumlahnya akan lebih sedikit lagi. Kendala tersebut menjadikan sangat sulit jika akan dilakukan pengembangan senyawa bioaktif dari tumbuhan obat yang bersifat langka dan endemik. Hal ini dikarenakan jika tumbuhan langka dilakukan eksplorasi untuk diambil senyawa bioaktifnya, maka kelestarian tumbuhan tersebut menjadi terancam. Kendala tersebut dapat diantisipasi dengan mengisolasi mikroba terutama fungi (jamur) endofitik yang bersimbiosis dengan tumbuhan tersebut. Teknik yang dilakukan hanya mengambil sedikit bagian tumbuhan yang biasa digunakan dalam pengobatan secara tradisional, selanjutnya dilakukan isolasi jamur endofitik dari bagian tumbuhan tersebut, dengan demikian tumbuhan obat yang langka akan tetap lestari dan pengembangan senyawa obat dari tumbuhan tersebut melalui jamur endofitiknya dapat dikembangkan.

Mikroba endofitik adalah mikroba yang hidup di dalam jaringan tanaman pada periode tertentu dan mampu hidup dengan membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya. Setiap tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa mikroba endofit yang mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder yang diduga sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik (*genetic recombination*) dari tanaman inang ke mikroba endofit (Tan and Zou, 2001 dan Strobel and Daisy, 2003).

Kemampuan mikroba endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya merupakan peluang yang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder dari mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman inangnya tersebut. Dari sekitar 300.000 jenis tanaman yang tersebar di muka bumi

ini, masing-masing tanaman mengandung satu atau lebih mikroba endofit yang terdiri dari bakteri dan fungi (Strobel and Daisy, 2003). Apabila endofit yang diisolasi dari suatu tanaman obat dapat menghasilkan alkaloid atau metabolit sekunder sama dengan tanaman aslinya atau bahkan dalam jumlah yang lebih tinggi, maka kita tidak perlu menebang tanaman aslinya untuk diambil sebagai simplisia, yang kemungkinan besar memerlukan puluhan tahun untuk dapat dipanen (Radji, 2005). Menurut Stierlie *et al.* (1995), pemanfaatan mikroba endofitik dalam memproduksi senyawa aktif memiliki beberapa kelebihan, antara lain (1) lebih cepat menghasilkan dengan mutu yang seragam, (2) dapat diproduksi dalam skala besar, dan (3) kemungkinan diperoleh komponen bioaktif baru dengan memberikan kondisi yang berbeda.

Sumatera Selatan merupakan daerah yang mempunyai banyak etnis yang masih menggantungkan terhadap tumbuhan obat di sekitarnya untuk mengobati penyakit yang menyerang mereka. Lima etnis diantaranya adalah etnis Daya, Lintang, Meranjat, Pegagan, dan Teloko. Hasil penelusuran Tim peneliti Riset Tumbuhan Obat dan Jamu (RISTOJA) Sumatera Selatan tahun 2015, menunjukkan bahwa di lima etnis tersebut ditemukan beberapa tumbuhan obat yang sering mereka gunakan, namun tumbuhan tersebut sulit untuk ditemukan. Tumbuhan obat sulit dalam penelitian ini diartikan sebagai tumbuhan obat yang sangat sulit dicari karena jumlahnya sedikit pada etnis tertentu, dan tumbuhan obat tersebut memiliki ketidakmampuan dalam jumlah populasi yang kecil untuk mengembalikan populasinya secara alami ke jumlah semula. Salah satu contoh tumbuhan obat yang sulit ditemukan adalah tumbuhan kardia (*Bellucia pentamera* Naudin) yang oleh masyarakat Etnis Meranjat digunakan dalam proses penyembuhan berbagai macam penyakit.

Berdasarkan alasan tersebut di atas, maka dalam pengembangan obat berbasis tumbuhan obat harus dipertimbangkan aspek kelestarian tumbuhan obat yang akan dikembangkan. Salah satu teknologi yang bisa dilakukan adalah dengan mengisolasi fungi endofitik dari bagian tumbuhan obat yang sering digunakan sebagai obat secara tradisional dan dilakukan seleksi senyawa metabolit sekunder yang bersifat bioaktif seperti bersifat antibakteri dan antioksidan dari kultur fungi endofitik tersebut, dengan demikian pengembangan senyawa obat berbasis tumbuhan obat dapat dilakukan dan kelestarian tumbuhan obat terutama yang sudah langka dapat dipertahankan.

Peningkatan radikal bebas penyebab berbagai penyakit degeneratif tidak dapat dihindari, namun radikal bebas yang masuk kedalam tubuh dapat kurangi dengan melakukan langkah pencegahan. Antioksidan dibutuhkan untuk menangkal dan

melindungi tubuh dari radikal bebas (Wahdaningsih *et al.*, 2011). Antioksidan adalah senyawa yang mampu menangkap atau meredam dampak negatif oksidan dalam tubuh. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan bisa dihambat (Sashikumar, *et.al.*, 2009). Aktivitas antoksidan suatu senyawa dapat diukur dari kemampuannya meredam radikal bebas (Giorgio, *et.al.*, 2000; Shinta, *et.al.*, 2014). Radikal bebas yang biasa dipakai sebagai model dalam mengukur peredaman antioksidan adalah DPPH (2,2- -diphenyl-1-picrylhydrazyl) karena cepat, sederhana dan mudah digunakan (Marxen, *et.al.*, 2007).

Jamur endofitik dari tanaman obat potensial sebagai sumber senyawa bioaktif dan senyawa kimia. Metabolit bioaktif yang diproduksi oleh jamur endofitik berasal dari jalur biosintesis yang berbeda dan termasuk kelompok struktural yang beragam seperti terpenoid, steroid, kuinon, fenol, coumarin dan lain-lain. Oleh karena itu fungi endofitik sebagai penghasil senyawa baru seperti, antikanker, imunomodulator, antioksidan, antiparasit, antiviral, antituberkulosis, insektisida dll untuk digunakan dalam farmasi dan industri agrokimia (Kaul *et al.*, 2012).

Asam antioksidan alami Cajaninstilbene (46) (C₁₂H₂₂O₄) (CSA), 3-hidroksi-4-prenil-5-metoksibilbena-Asam 2 karboksilat telah dilaporkan dari *Fusarium* endofit dari kacang merpati, *Cajanus cajan* (Zhao *et al.*, 2012a, b). Begitu pula dengan antioksidan yang kuat aktivitas tersebut ditunjukkan oleh *Xylaria* sp.yang diisolasi dari *Ginkgo Biloba*. Kegiatan ini disebabkan oleh adanya fenolat dan flavonoid (Liu *et al.*, 2007). *Chaetomium* sp. dari *Nerium oleander* bisa menjadi sumber antioksidan potensial sebagai flavonoid dan asam fenolik turunan dari jamur ini menunjukkan antioksidan yang kuat aktivitas (Huang *et al.*, 2007).

Widjajanti *et al* (2017) telah memperoleh 4 (empat) jenis fungi penghasil antibakteri dari tumbuhan kardia (*Bellucia pentamera* Naudin), yaitu *Aspergillus costaricensis*, *Penicillium rolfsii*, *Aspergillus fumigatus*, dan *Penicillium oxalicum* yang memiliki aktivitas antibakteri yang kuat terhadap *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, dan *Staphylococcus aureus*. Pada penelitian ini akan dieksplorasi fungi endofitik dari tumbuhan Kardia yang memiliki potensi menghasilkan antioksidan.

BAB III. STUDI PUSTAKA

Fungi endofitik

Fungi endofit didefinisikan sebagai fungi yang ditemukan hidup di bagian jaringan tumbuhan pada kurun waktu tertentu dan berasosiasi didalamnya tanpa merugikan atau membahayakan inangnya. Fungi endofit ini dapat melakukan suatu proses metabolisme dimana akan menghasilkan suatu senyawa bioaktif yang berpotensi untuk dikembangkan (Srikandace *et al.*, 2007). Hal ini dikarenakan selain siklus hidup fungi yang pendek dan mudah untuk dikembangbiakkan, fungi juga mampu menghasilkan senyawa bioaktif dalam jumlah yang besar dalam waktu yang singkat (Zhao *et al.*, 2010). Fungi endofit mampu bertahan hidup di dalam jaringan tumbuhan karena adanya interaksi mutualisme dengan tumbuhan inangnya, yaitu fungi endofit mendapatkan nutrisi dan perlindungan dari tumbuhan inang untuk kelangsungan hidupnya, dan tumbuhan inang mendapatkan proteksi terhadap serangan patogen dari senyawa metabolit fungsional yang dihasilkan oleh fungi endofit (Tan and Zou, 2001).

Fungi endofit merupakan fungi yang hidup di dalam jaringan tumbuhan tanpa menimbulkan gejala penyakit pada tumbuhan inangnya. Fungi endofit mampu menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif misalnya senyawa antibakteri, antifungi, antivirus, antikanker, antimalaria dan sebagainya (Strobel and Daisy, 2003). Fungi endofit menghasilkan berbagai senyawa yang memiliki aktivitas biologi, diantaranya alkaloid, terpenoid, fenolik, dan sebagainya (Tan dan Zou, 2001). Fungi endofit yang tumbuh pada jaringan tumbuhan obat, juga dapat menghasilkan senyawa yang memiliki khasiat sama dengan tumbuhan inangnya, walaupun jenis senyawanya berbeda. Bahkan, senyawa yang dihasilkan fungi endofit seringkali memiliki aktivitas yang lebih besar dibandingkan aktivitas senyawa dari tumbuhan inangnya (Prihatiningtias, 2005).

Tumbuhan kardia (*Belucia pentamera* Naudin)

Tumbuhan kardia (*Bellucia pentamera*) berupa pohon tegak, tinggi sekitar 3-5m. Berbatang kurus tinggi, berbonggol-bonggol, kulit batang coklat keabu-abuan sampai kehitaman, beralur atau memecah dangkal. Bertajuk renggang dengan cabang dan ranting yang ramping dan melengkung, membentuk payung. Daun tunggal terletak berhadapan, bertangkai panjang 2-7 cm. Lembaran daun besar-besar dan lebar, hingga 35 x 25 cm, dengan 5 tulang daun sejajar dan melengkung (*curvinervis*) khas Melastomataceae, 2 di antaranya intramarginal; pertulangan menonjol di sebelah bawah. Pangkal daun bentuk baji

dan ujungnya meruncing, tepi daun bergerigi kecil, nampak jelas pada daun yang muda. Sisi atas gundul, hijau muda sampai agak tua, sisi bawah sedikit berbulu pada pertulangannya dan berwarna agak keputihan. Karangan bunga bentuk payung menggarpu, berisi (1-)3-12 kuntum, muncul di batang (*cauliflory*), ranting tak berdaun, atau di ketiak (Verheij & Coronel, 1997). Bunga berbilangan 5-7, harum. Tabung kelopak serupa lonceng serupa periuk berukuran lk. 14 x 20 mm, tajuk kelopak bentuk segitiga, 6 x 7 mm, hijau muda berbintil dan berbintik halus. Daun mahkota putih, bertaju membengkok dan berparuh kecil, 20 x 13 mm, pada akhirnya coklat kemerah-jambuan. Benang sari 2 kali jumlah daun mahkota, bertangkai 8-10 mm, dengan kepala sari yang besar dan membengkok serupa sabit, panjang lk. 9 mm, kuning, tegak berbaris rapat-rapat membentuk lingkaran. Tangkai putik sekitar 22 mm, dengan kepala putih yang beralur-alur radial, tinggi 2 mm dan diameter 4 mm, muncul sedikit di atas barisan kepala sari (Gambar 1). Buah buni berbentuk bulat seperti periuk bermahkotakan tajuk kelopak yang berdaging, tinggi 2-3,5 cm dan diameter 2,5-4 cm, berwarna kuning gading. Daging buah keputihan dan banyak mengandung sari buah, kurang beraroma, manis asam dengan rasa mirip jambu biji, mudah menjadi kecoklatan karena teroksidasi, berbiji banyak dan kecil-kecil (Backer & Bakhuizen, 1963 dan Tjitrosoepomo, 2011).



Gambar 1. Morfologi tumbuhan kardia (*Bellucia pentamera* Naudin)
 Keterangan : a. Batang b. Daun c. Buah d. Bunga

Klasifikasi tumbuhan kardia (*Bellucia pentamera* Naudin) menurut Backer dan Bakhuizen (1963) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisio : Magnoliophyta
Classis : Magnoliopsida
Ordo : Myrtales
Familia : Melastomataceae
Genus : *Bellucia*
Spesies : *Bellucia pentamera* Naudin

Metabolit Sekunder Fungi Endofit

Dalam hidupnya, makhluk hidup akan melakukan suatu proses biosintesis dimana akan dihasilkan suatu senyawa yang disebut dengan metabolit. Berdasarkan fungsinya senyawa metabolit dibedakan menjadi metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit primer merupakan suatu senyawa esensial yang dibutuhkan untuk kelangsungan hidup, yaitu tumbuh dan berkembang. Contoh dari senyawa metabolit primer adalah asam amino, nukleotida, protein, asam nukleat, lemak, dan karbohidrat. Berbeda dari metabolit primer, metabolit sekunder merupakan senyawa yang dihasilkan oleh makhluk hidup sebagai kebutuhan pelengkap yang berfungsi untuk pertahanan dalam berinteraksi dengan ekosistemnya. Dengan kata lain, metabolit sekunder bukan dibutuhkan untuk tumbuh maupun berkembang melainkan untuk pertahanan diri dalam berinteraksi dengan ekosistem. Beberapa senyawa metabolit sekunder, yaitu antibiotik, pigmen, vitamin, dan steroid (Kumala, 2014).

Metabolit sekunder dapat dihasilkan dari bagian-bagian tumbuhan seperti akar, batang, daun, bunga, dan buah. Masing-masing bagian tumbuhan didalamnya terdapat mikroba endofit salah satunya adalah fungi. Fungi endofit yang diisolasi dari jaringan tumbuhan dan ditumbuhkan pada medium fermentasi dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang sama atau sejenis seperti inangnya dengan bantuan aktivitas enzim didalamnya. Berdasarkan dari beberapa penelitian, senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh fungi endofit dapat berperan sebagai antibiotik (antibakteri dan antifungi), antikanker, antivirus, dan antiserangga (Shibuya *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2010; dan Kumala, 2014).

Fungi endofit memiliki kemampuan memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya beberapa mikroba endofit mampu menghasilkan berbagai senyawa antibiotik seperti senyawa-senyawa anti kanker, anti virus, atau antibakteri.

Berbagai jenis tanaman terutama tanaman obat, dapat digunakan sebagai sumber isolat jamur endofit. Salah satu contoh senyawa anti kanker yang dihasilkan dari fungi endofitik adalah senyawa taxol yang diisolasi dari tumbuhan *Taxus brevifolia*. Fungi endofit *Taxomyces andreanae* yang telah diisolasi dari tumbuhan *Taxus brevifolia* memiliki sifat antikanker karena menghasilkan senyawa taxol di dalamnya (Strobel and Daisy, 2003).

Sekitar 300 jenis tanaman yang tersebar dimuka bumi mengandung mikroba endofit yang mampu menghasilkan metabolit sekunder. Mikroba endofit yang menghasilkan metabolit sekunder yang berkhasiat sebagai obat diantaranya adalah *Cryptocandin* adalah antifungi *Candida albicans* dan *Trichopyton spp* yang dihasilkan oleh mikroba endofit *Cryptosporiopsis quercina*, *Pseudomonas viridiflava* menghasilkan *ecomycin* yang yang berkhasiat sebagai antifungi dan antibakteri, Phomopsichalasin merupakan metabolit yang diisolasi dari mikroba endofit *Phomopsis spp*. berkhasiat sebagai anti bakteri *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, dan juga dapat menghambat pertumbuhan jamur *Candida tropicalis*. Serta Endofit *Pseudomassaria sp* yang menghasilkan metabolit sekunder yang bekerja seperti insulin (Radji, 2005).

Radikal bebas dan Antioksidan

Senyawa radikal bebas merupakan salah satu produk samping dari metabolisme normal tubuh seperti metabolisme sel, fagositosis, dan metabolisme asam arakidonat. Produksi senyawa radikal bebas terutama *Reactive Oxygen Spicies* (ROS) dapat mengalami peningkatan selama dalam kondisi patologis (Singh *et al.*, 2004). Senyawa dari radikal bebas dapat menyerang kelompok biomakromolekul seperti lipid, protein atau enzim, karbohidrat, DNA dalam sel atau jaringan (Singh *et al.*, 2004; Babrowski, 2005). Radikal bebas (*free radical*) juga dapat diartikan sebagai senyawa atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital luarnya. Karena memiliki elektron yang tidak berpasangan, hal ini yang mengakibatkan sangat reaktif mencari pasangan, dengan cara menyerang dan mengikat elektron molekul yang berada disekitarnya (Winarsi, 2007).

Antioksidan adalah senyawa yang bertindak sebagai reduktan atau pemberian donor elektron (*electron donor*). Senyawa antioksidan memiliki berat molekul kecil. mampu menghambat kerusakan pada sel dengan cara mencegah terbentuknya radikal dan menginaktivasi radikal bebas agar tidak berkembang, serta berperan dalam menghambat reaksi oksidasi dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Status antioksidan bila berkaitan dengan reaksi oksidasi di dalam tubuh, merupakan parameter

akan kesehatan seseorang. Jumlah antioksidan yang terdapat dalam tubuh harus memadai. Radikal bebas dalam keadaan patologik akan terbentuk dalam jumlah berlebihan, dan menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas enzim-enzim yang berperan sebagai antioksidan endogen. Dalam keadaan seperti ini tubuh membutuhkan antioksidan eksogen atau antioksidan yang berasal dari luar tubuh dalam jumlah yang banyak, untuk dapat menetralkan atau mengurangi efek yang disebabkan radikal bebas. Reaksi-reaksi yang terjadi oleh radikal bebas alam maupun hasil metabolisme tubuh dengan protein mampu dicegah antioksidan, sehingga perubahan yang terjadi didalam DNA atau pembelahan sel akibat reaksi oksidan tidak terjadi. Hal inilah yang membuat antioksidan erat hubungannya sebagai obat kanker (Wahlqvist, 2013).

Antioksidan dikelompokkan berdasarkan sumbernya, yaitu endogen dan eksogen. Kelompok endogen merupakan antioksidan yang terdapat dalam tubuh seperti enzim superoksida dismutase (SOD), glutathione peroksidase (Gpx) dan katalase (Cat) yang memiliki sifat antioksidan. Kelompok eksogen terdiri dari sumber luar tubuh seperti flavonoid, organosulfur, phycoyanin, α -tokoferol, thymoquinon, provitamin A, vitamin C dan vitamin E yang banyak terdapat dalam makanan maupun bahan alami (Werdhasari, 2014).

Aktivitas antoksidan suatu senyawa dapat diukur dari kemampuannya meredam radikal bebas (Giorgio, *et.al.*, 2000; Shinta, *et.al.*, 2014). Radikal bebas yang biasa dipakai sebagai model dalam mengukur peredaman antioksidan adalah DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) karena cepat, sederhana dan mudah digunakan (Marxen, *et.al.*, 2007).

Fungi Endofit penghasil senyawa antioksidan

Menurut Yadav *et al.*, (2014) senyawa alkaloid, fenol, flavonoid, saponin, dan terpen adalah senyawa kimia yang dijumpai pada 21 isolat fungi endofit yang diisolasi dari *Eugenia jambolana* Lam. Korelasi positif yang signifikan dijumpai antara aktivitas antioksidan dan jumlah total fungi. Ada 36% ekstrak endofit yang memiliki kandungan fenol tinggi yang menunjukkan aktivitas antioksidan kuat. Strain *Chaetomium* sp., *Aspergillus* sp., *Aspergillus peyronelii* dan *Aspergillus niger* menunjukkan aktivitas antioksidan paling tinggi yang berkisar antara 50% sampai 80% yang memiliki total fenol 58 mg/g sampai 60 mg/g GAE. Asam askorbat digunakan sebagai standar menunjukkan potensial reduksi sebesar 90%.

Fungi endofit *Chaetomium* sp yang berasal dari bunga jepun (*Nerrium oleander*) mempunyai aktivitas sebagai antioksidan. Berdasarkan analisis kualitatif yang dilakukan,

fungi ini menghasilkan senyawa bioaktif berupa *phenolic* (asam fenolat dan derivat fenol). Selain itu metabolit sekunder fungi jenis *Aspergillus niger* dan *Alternaria alternata* dari tumbuhan *Tabebuia argentea*, menghasilkan senyawa lapachol alami yaitu, naphthoquinone yang telah terbukti memiliki aktivitas antioksidan (Kumala, 2014).

Ekstrak fungi endofit *Aspergillus* sp tumbuhan *Trigonella foenum-graecum* menunjukkan kandungan total fenol dalam bentuk ekuivalen dengan *gallic acid* ($89,9 \pm 7,1$) mg GAE/g dan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH yang paling tinggi dengan nilai IC₅₀ sebesar $18,0 \pm 0,1$ µg/mL (Khiralla *et al.*, 2015). Ekstrak fungi endofit yang diisolasi dari *Calotropis procera* yaitu *Penicillium* dan *Aspergillus* menunjukkan aktivitas sebagai antioksidan yang ditunjukkan dengan kandungan total flavonoid berturut-turut sebesar 130,50 µg/mg dan 94,91 µg/mg dan kandungan fenol berturut-turut sebesar 9,16 µg/mg dan 12,13 µg/mg (Nagda *et al.*, 2017)

Penelitian yang dilakukan Elfita *et al.* (2012b), fungi endofit *Acremonium* sp yang diisolasi dari tumbuhan kandis gajah (*Garcinia griffithii*) mampu menghasilkan senyawa golongan seskuiterpen yaitu 3,5-dihidroksi-2,5-dimetiltrideka-2,9,11-triena-4,8-dion. Senyawa ini memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang kuat dengan nilai IC₅₀ 10,3 µg/ml setara dengan dengan nilai IC₅₀ asam askorbat, yaitu 9,8 µg/ml. Menurut Strobel and Daisy (2003) fungi endofit *Pestalotiopsis microspora* yang diisolasi dari tumbuhan *Terminalia morobensis*, di Papua New Guinea menghasilkan senyawa antioksidan. Fungi tersebut menghasilkan metabolit sekunder pestacin dan isopestacin yang dapat berkhasiat sebagai antioksidan karena diduga strukturnya menyerupai flavonoid.

Hasil penelitian Widjajanti *et al* (2017) menunjukkan bahwa dari tumbuhan tunjuk langit (*Helminthostachys zeylanica* L. (Hook)) diperoleh 4 spesies fungi penghasil antioksidan, yaitu *Aspergillus section nigri*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingiensis*, dimana kemampuan antioksidan fungi tersebut dibandingkan asam askorbat berturut-turut adalah sebesar 15%, 17%, 17%, dan 15%. Dari tumbuhan Pelawan (*Tristaniopsis merguensis* Griff) diperoleh 3 spesies fungi endofitik penghasil antioksidan, yaitu *Phialophora fastigiata*, *Aspergillus wentii*, dan *Cladosporium* sp. Dari ketiga spesies fungi tersebut *Cladosporium* sp memiliki aktivitas antioksidan yang tergolong kuat (IC₅₀ = 74).

BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Tujuan Penelitian

1. Mendapatkan isolat fungi endofitik asal tumbuhan obat kardia (*Bellucia pentamera* Naudin) yang mampu memproduksi metabolit sekunder yang bersifat antioksidan.
2. Melakukan uji invitro untuk memverifikasi sifat antioksidan dari fungi endofitik asal tumbuhan obat kardia (*Bellucia pentamera* Naudin)
3. Mengidentifikasi berdasarkan sifat fenotipik dan molekuler isolat fungi endofitik dari tumbuhan obat kardia (*Bellucia pentamera* Naudin) yang berpotensi tinggi dalam menghasilkan metabolit sekunder yang bersifat antioksidan

Manfaat penelitian

Dari penelitian yang akan dilakukan diharapkan dapat diperoleh manfaat sebagai berikut :

1. Diperoleh fungi endofit dari tumbuhan obat kardia (*Bellucia pentamera* Naudin) penghasil antioksidan
2. Dapat diketahui potensi masing-masing fungi endofit dari tumbuhan obat kardia (*Bellucia pentamera* Naudin) dalam menghasilkan antioksidan
3. Dapat diketahui karakter dan identitas fungi endofit dari tumbuhan obat kardia (*Bellucia pentamera* Naudin) secara fenotipik dan secara molekuler yang berpotensi tinggi dalam menghasilkan senyawa bioaktif yang bersifat sebagai antioksidan yang dapat digunakan sebagai dasar upaya pengembangan selanjutnya.

BAB IV. PETA JALAN PENELITIAN



Gambar 2. Peta Jalan (*roadmap*) Penelitian

BAB V. METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian akan dilaksanakan dari bulan Mei 2018 sampai Desember 2018. Pengambilan sampel tumbuhan obat kardia (*Bellucia pentamera*) dari Etnis Meranjat di desa Bangun Jaya, kecamatan Tanjung Batu, kabupaten Ogan Ilir. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Genetika & Bioteknologi Jurusan Biologi Universitas Sriwijaya Inderalaya. Sekuensing DNA fungi endofitik dilakukan di 1st BASE Malaysia.

Pembuatan media dan sterilisasi alat dan bahan

Media yang dibuat meliputi *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Nutrient Agar* (NA), *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Potato Dextrose Broth* (PDB), *Saboroud Dextrose Agar* (SDA), dan medium *Potato Dextrose Yeast* (PDY). Medium yang telah ditimbang sesuai dengan ketentuan masing-masing medium dilarutkan dalam 1L akuades dan dipanaskan di atas *hot plate* yang dilengkapi *magnetic stirrer* dan ditunggu hingga mendidih. Setelah mendidih dimasukkan ke dalam tabung reaksi ± 10 ml. Semua media yang telah dibuat beserta semua bahan dan alat-alat yang akan digunakan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 lb selama 15 menit (Enriquez *et al*, 1994).

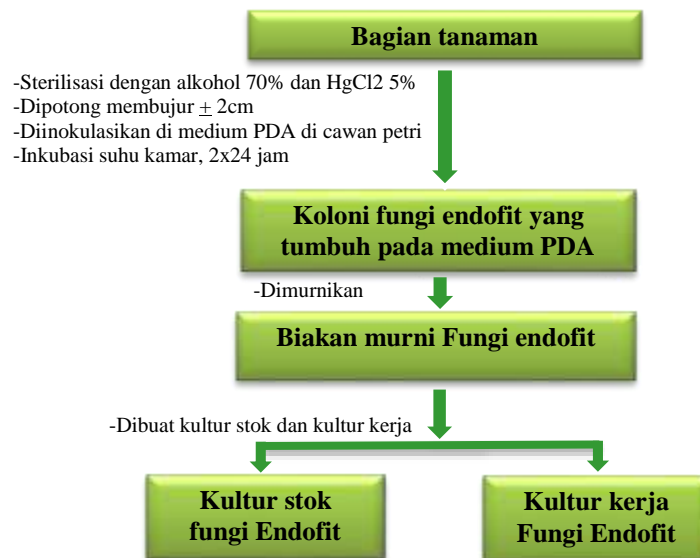
Sterilisasi sampel

Sampel berupa batang dan daun tumbuhan kardia (*Bellucia pentamera*) dicuci dengan air mengalir sampai bersih ± 5 menit. Kemudian dilakukan sterilisasi permukaan dengan cara masing-masing sampel diolesi alkohol 70 % selama ± 3 menit dengan menggunakan kapas, dibilas dengan akuades steril ± 1 menit, selanjutnya diolesi kembali dengan HgCl₂ (merkuri klorida) 5% (b/v) secukupnya. Setelah 1 menit, dibilas kembali dengan akuades steril selama ± 1 menit.

Isolasi dan pemurnian fungi endofitik

Batang dan daun yang telah steril dipotong membujur secara aseptik, kemudian diletakkan di medium PDA yang telah memadat di cawan petri. Diinkubasi pada suhu kamar dan dilakukan pengamatan setiap hari sampai tampak fungi yang tumbuh. Koloni

fungi yang tumbuh pada medium PDA yang menunjukkan sifat morfologi berbeda (bentuk, warna dan ukuran koloni) selanjutnya dimurnikan. Pemurnian dilakukan dengan memindahkan koloni ke medium PDA yang baru dan diinkubasi pada suhu kamar selama 2 x 24 jam. Koloni jamur yang terpisah telah murni lalu dibuat kultur kerja dan stok dengan cara menumbuhkan pada medium PDA miring. Skema isolasi dan pemurnian jamur endofitik dari tumbuhan inang disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Isolasi dan pemurnian fungi endofitik dari tumbuhan inang

Kultivasi dan ekstraksi metabolit sekunder

Isolat fungi endofit yang diperoleh diinokulasikan sebanyak 1 ose ke dalam botol kultivasi ukuran 1 liter yang berisikan 300 mL medium *Potato dextrose Broth* (PDB), diinkubasi pada suhu ruang (27 °C) selama ± 2 minggu. Setelah terjadi perubahan warna pada medium yang mengindikasikan telah diproduksinya metabolit sekunder selanjutnya kultur medium difraksinasi cair-cair (partisi) dengan pelarut etil asetat. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator*, sehingga didapatkan ekstrak kental etil asetat.

Pengukuran biomassa fungi endofitik

Biomasa fungi yang telah dipisahkan dari medium kultivasi selanjutnya ditimbang berat basah dan berat keringnya. Berat kering didapat dengan cara fungi diletakan di atas kertas saring lalu di oven dengan suhu 60° C selama ± 24 jam kemudian didinginkan di desikator lalu ditimbang. Pengeringan dilakukan berulang sampai didapat berat biomassa fungi yang konstan.

Ekstraksi metabolit sekunder dari fungi endofit yang berpotensi sebagai antioksidan

Setiap isolat fungi endofit dikultur dalam 300 mL medium cair PDB dan diinkubasi dalam kondisi statik selama lebih kurang 2 minggu atau hingga medium berubah menjadi pekat dan perubahan warna tidak terjadi lagi. Selanjutnya dilakukan penyaringan untuk memisahkan antara biomassa fungi dan mediumnya. Fungi yang dipisahkan dari medium kemudian dilakukan pengeringan di oven untuk memperoleh berat kering. Medium diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat dengan cara dikocok hingga terbentuk dua lapisan dan lapisan atas dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental (Jamal *et al.*, 2008).

Uji aktivitas antioksidan Ekstrak Etil Asetat dengan metode DPPH

Larutan DPPH 0,05 mM yang terdiri dari DPPH yang dilarutkan dalam methanol disiapkan. Larutan induk dibuat dengan melarutkan sampel dalam dimetil sulfoksida (DMSO) dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Variasi konsentrasi sampel dibuat dengan pengenceran larutan induk menjadi 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, dan 0 µg/mL. Sebanyak 0,2 mL dari berbagai konsentrasi larutan sampel ditambahkan 3,8 mL larutan DPPH 0,05 mM. Campuran larutan dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit di tempat gelap. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ maks 517 nm. Untuk kontrol positif digunakan antioksidan standar (asam askorbat) dengan perlakuan yang sama seperti sampel. Persen Inhibisi sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase inhibisi serapan DPPH. Persen Inhibisi yang diperoleh dari setiap konsentrasi sampel, kemudian ditentukan IC_{50} (*Inhibition Concentration-50*). Data diolah menggunakan analisa regresi linier probit antara log konsentrasi larutan uji (x) dengan persentase Inhibisi (y) sehingga diperoleh IC_{50} . Setelah diperoleh IC_{50} dari setiap sampel, kemudian dilakukan perbandingan antara IC_{50} setiap sampel dengan IC_{50} asam askorbat sebagai kontrol positif dari antioksidan. Bila IC_{50} dari sampel ada yang di atas IC_{50} kontrol positif yang digunakan, berarti metabolit sekunder yang dihasilkan dari fungi endofit memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi (Molyneux, 2004 dan Wahdaningsih *et al.*, 2011).

Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak fungi endofit yang memiliki aktivitas antibakteri yang tinggi kemudian dilakukan analisis KLT. Analisis kromatografi lapis tipis menggunakan plat *silica gel* 60 dan pelarut etil asetat dan n-heksan dengan perbandingan eluen yang digunakan (etil asetat : n-heksan) yaitu 1:4, 3:2, 2:3, dan 4:1. Bercak yang terbentuk dilihat dengan menggunakan

sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm, dan ditentukan nilai *Rf* dari bercak senyawa yang terbentuk (Jamal *et al.*, 2008).

Karakterisasi dan identifikasi fungi endofitik secara fenotipik dan secara molekuler

Isolat fungi endofit yang mempunyai aktivitas antibakteri tinggi dari hasil seleksi selanjutnya diidentifikasi berdasarkan karakter fenotipik dan genotipik. Karakterisasi fenotipik meliputi morfologi makroskopis dan mikroskopis, sifat fisiologi dan biokimia. Hasil karakterisasi fenotipik jamur dibandingkan dengan karakter fungi pada Domsch *et al.* (1980), Pitt & Hocking (1994) dan Samson *et al.* (2004).

Identifikasi lebih lanjut dilakukan secara molekuler (karakter genotipik) dengan menganalisis urutan DNA ribosom daerah ITS untuk jamur yang kemudian dibandingkan dengan data urutan DNA genus jamur yang sesuai yang telah diketahui. Identifikasi berdasarkan data molekuler ditentukan dari perbandingan nilai similaritas dan perbedaan nukleotida dalam urutan fragmen DNA masing-masing isolat jamur terpilih dengan strain acuan. Hasil identifikasi filogenetik dibandingkan dengan data morfologi makroskopis dan mikroskopis masing-masing isolat jamur. Tahapan identifikasi secara molekuler (karakter genotipik) meliputi :

1. Ekstraksi DNA Fungi

Pelet fungi diekstraksi masing-masing menggunakan kit ekstraksi DNA fungi. DNA yang diperoleh disimpan pada suhu 4°C selama semalam (*overnight*) agar larut sempurna dalam bufer TE 1x dan selanjutnya disimpan di suhu -20°C untuk penyimpanan jangka waktu lama. Kemurnian dan konsentrasi DNA dilakukan secara kuantitatif dan kualitatif. Penghitungan secara kuantitatif ditentukan dengan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm, kemudian dihitung rasio absorbansinya. Uji kualitas DNA dilakukan dengan metode elektroforesis menggunakan gel agarosa dengan konsentrasi 0,8%. Kualitas DNA baik apabila pita DNA nampak jelas, tebal, hanya ada satu pita dan tidak ada bayangan di bawah pita (*smear*) dan dibandingkan dengan marker (Sambrook *et al.*, 1989).

1. Amplifikasi Daerah 16s rDNA dan *Internal Transcribed Spacer* (ITS) untuk Sequencing

Amplifikasi daerah 16s rDNA bakteri (setelah dilakukan Rep-PCR) dan ITS dilakukan dengan menggunakan satu pasang primer 27F-1492R. Amplifikasi daerah ITS jamur dilakukan menggunakan satu pasang primer ITS1-ITS4 (Tabel 1). Premix PCR untuk amplifikasi dibuat dengan komposisi sesuai dengan kit *Ready To Go* (Amersham

Pharmasia) dengan volume total adalah 25 μ L. Amplifikasi dilakukan dalam mesin PCR (*Biorad T100 Thermal Cycler*) dengan program pada Tabel 2. Tabung yang berisi *product* PCR disimpan pada suhu -20°C untuk dianalisis melalui elektroforesis dan selanjutnya diurutkan sekuennya.

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk amplifikasi DNA

No.	DNA	Primer	Urutan primer	Referensi
1	Fungi	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White <i>et al.</i> , 1990
2		ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	White <i>et al.</i> , 1990

Tabel 2. Kondisi reaksi PCR untuk amplifikasi daerah ITS rDNA

Reaksi	Amplifikasi daerah ITS rDNA		
	Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	Waktu	Siklus
Prendenaturasi	94	5 menit	1x
Denaturasi	94	50 detik	30x
<i>Annealing</i>	54	50 detik	
Elongasi	72	50 detik	
Post-elongasi	72	10 menit	1x

Produk amplifikasi DNA dipisahkan menggunakan elektroforesis pada 1,5% gel agarose dalam bufer TBE 1x pada *voltage* konstan 90 volt selama 45 menit. Produk DNA hasil *running PCR* sebanyak 5 μ L dimasukkan ke dalam sumuran gel agarose 1,5%. DNA *Marker* ukuran 100-3000 bp digunakan sebagai penanda ukuran produk PCR DNA dan dimasukkan sebanyak 6 μ L. Visualisasi fragmen DNA hasil PCR dilakukan menggunakan transilluminator sinar ultra violet dengan *Cyber safe* sebagai pewarna fragmen DNA.

3. Pemurnian dan *Sequencing* Hasil Amplifikasi

Produk fragmen DNA hasil PCR disiapkan untuk proses pemurnian dan selanjutnya diurutkan basa N nya. Produk hasil PCR masing-masing isolat dimasukkan dalam tube 0,2 mL sebanyak 40 μ L. Masing-masing primer dimasukkan ke dalam tube 0,2 mL lainnya sebanyak 10 μ L pada konsentrasi 10pmol dalam *nuclease-free water*. Sampel dan primer dikemas rapi dan rapat dalam kotak, kemudian disimpan dalam -20°C sebelum dikirim ke 1st BASE Malaysia untuk dimurnikan dan *disequencing*.

4. Analisis Data

Hasil urutan fragmen DNA dianalisis menggunakan program *Chromas Pro*. Homologi urutan fragmen DNA hasil sekuensing dengan data urutan DNA yang telah dilaporkan sebelumnya dicari menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) di situs GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

INDIKATOR CAPAIAN PENELITIAN

No	Jenis Luaran		Indikator Capaian	
			TS**	TS+1
1	Luaran Wajib Berupa Publikasi Ilmiah (salah satu dari)* per tahun penelitian	Jurnal Internasional (minimal terindeks DOAJ atau yang setara)		
		Jurnal Nasional Terakreditasi	Dikirimkan	Dipublikasikan
2	Luaran Tambahan berupa (salah satu dari)	Teknologi Tepat Guna/REkayasa Sosial-ekonomi/Rumusan Kebijakan Publik		
		Produk teknologi tepat guna yang langsung dapat dimanfaatkan oleh masyarakat;		
		Buku/Bahan ajar Dikelompok Bidang Ilmu dan diterbitkan oleh Penerbit Unsri		Draft
		Pengakuan dari <i>peers</i> -nya sebagai narasumber di bidangnya		
		Terbangun jejaring kerja sama antar peneliti dan antar lembaga		
3	Luaran Tambahan berupa HKI	Paten		
		Paten Sederhana		
		Hak Cipta		
		RAhasia Dagang		
		Merek Dagang		
		Desain Produk Industri		
		Indikasi Geografis		
		PERlindungan Varietas Tanaman		
Perlindungan Topografi Sirkuit terpadu				

* Diisi Draft/Dikirimkan/atau Dipublikasikan

** TS = Tahun Sekarang

BAB VI. PEMBIAYAAN

Biaya yang diusulkan disajikan pada Tabel.3.

Tabel 3. Biaya penelitian

No.	Uraian	Biaya yang Diusulkan (Rp)
1	Honor teknisi/pencacah/pembantu peneliti	12.800.000
2	Bahan/Perangkat Penunjang	33.650.000
3	Perjalanan	10.450.000
4	Pengolahan data, Laporan, Publikasi dalam jurnal, Menghadiri seminar, Pendaftaran HKI dll.	14.600.000
	Jumlah Total	71.500.000

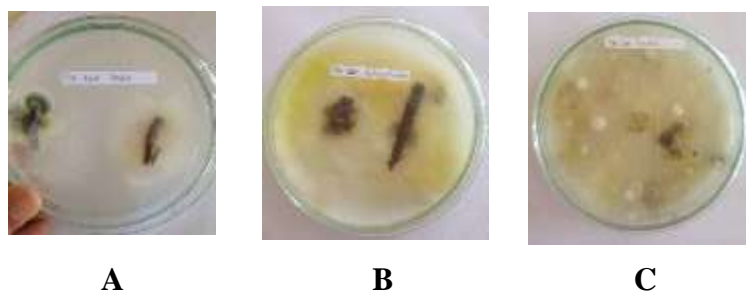
Keterangan : Rincian beserta justifikasi biaya penelitian disajikan pada Lampiran 1.

BAB VII. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil isolasi dan pemurnian fungi endofitik tumbuhan kardia

Berdasarkan hasil isolasi fungi endofit yang telah dilakukan, pada tumbuhan kardia (*Bellucia pentamera* Naudin) diperoleh 9 isolat fungi endofit yang berhasil diisolasi dan dimurnikan. Menurut Kumala *et al.* (2007), menyatakan bahwa koloni yang memiliki bentuk yang berbeda dengan bentuk koloni yang lainnya dapat dikatakan sebagai isolat koloni yang berbeda. Dua isolat fungi berasal dari bagian batang (BKJ1 dan BKJ3), dan tujuh isolat fungi berasal dari daun (DKJ1, DKJ2, DKJ3, DKJ3a, DKJ3b, DKJ3c, dan DKJ4) (Tabel 1.).

Hasil isolasi fungi endofitik tumbuhan kardia disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil isolasi fungi endofit dari akar, batang, dan daun pada medium PDA
A. Dari akar B. Dari batang C. Dari daun

Tabel 1. Hasil Isolasi dan Pemurnian Fungi Endofit Tumbuhan Kardia (*Bellucia pentamera* Naudin)

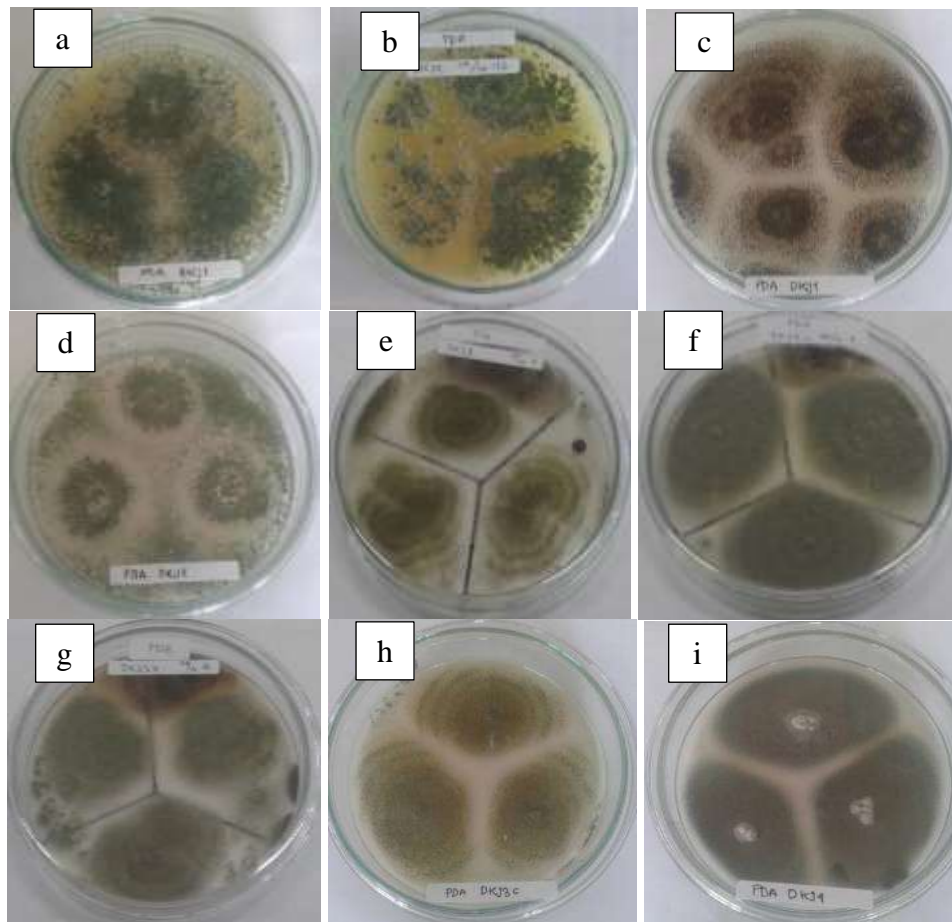
No.	Asal Sampel	Kode Isolat Fungi
1.	Batang	BKJ1, BKJ3
2.	Daun	DKJ1, DKJ2, DKJ3, DKJ3a, DKJ3b, DKJ3c, DKJ4

Isolat fungi endofit lebih banyak diperoleh dari bagian daun dibandingkan pada bagian batang, hal ini dikarenakan struktur permukaan bagian batang berbeda dengan daun yang menyebabkan fungi lebih mudah dalam menembus jaringan tumbuhan. Seperti yang dikatakan oleh Kumala (2014) bahwa fungi endofit banyak diperoleh dari bagian daun tumbuhan, hal ini dikarenakan pada bagian daun tumbuhan memiliki struktur permukaan yang luas dan jaringan kutikula yang tipis. Hal tersebut yang dapat membantu fungi dalam masuk dan menembus ke dalam jaringan tumbuhan, sedangkan fungi yang terdapat pada bagian batang menurut Sitanggang (2013) bahwa fungi endofit dapat ditemukan pada

bagian batang dikarenakan terdapat jaringan pengangkut yakni xylem dan floem yang memiliki kandungan nutrisi yang dibutuhkan oleh fungi endofit.

B. Hasil Pemurnian isolat fungi endofitik

Hasil pemurnian fungi endofit dari tumbuhan kardia diperoleh sebanyak 9 (sembilan) isolate disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil Pemurnian Fungi Endofit Tumbuhan Kardia (*Bellucia pentamera* Naudin).

Keterangan:

- a. Isolat BKJ1 b. IsolatBKJ3, c. Isolat DKJ1, d. Isolat DKJ2, e. Isolat DKJ3,
f. Isolat DJK3a, g. Isolat DKJ3b, h. Isolat DKJ3c, i. Isolat DKJ4

C. Biomassa fungi endofit dan ekstrak etil asetat tumbuhan Kardia (*Bellucia pentamera* Naudin)

Fungi yang tumbuh dikultivasi selama 21 hari pada medium cair. Selama 21 hari tersebut fungi diharapkan mampu memanfaatkan nutrisi pada medium dan menggunakannya untuk

menghasilkan suatu energi yang dibutuhkan fungi tersebut untuk kelangsungan hidup dan menghasilkan metabolit sekunder. Selama masa kultivasi tersebut, akan membentuk biomassa fungi dan metabolit sekunder. Semakin lama masa kultivasi maka, akan semakin banyak biomassa dan metabolit sekunder yang diperoleh. Menurut Gandjar (2014), menyatakan bahwa pertumbuhan fungi pada suatu medium adalah proses fermentasi yang merupakan kemampuan dari fungi dalam mengurai komponen-komponen kompleks yang ada pada medium menjadi komponen sederhana yang dapat diserap sel dan digunakan untuk sintesis berbagai bagian sel untuk energi kegiatannya maupun untuk pembentukan metabolit sekunder.

Tabel 2. Volume medium, biomassa fungi, dan berat ekstrak etil asetat tumbuhan *Kardia (Bellucia pentamera* Naudin)

Isolat	Volume Medium Setelah ± 30 hari (mL)	Biomassa Fungi (g)	Berat Ekstrak (g)	Persentase Ekstrak (%) Terhadap Biomassa Fungi
BKJ1	215	1,36	0,06	4,4
BKJ3	250	1,43	0,08	5,6
DKJ1	275	2,28	0,16	7,0
DKJ2	260	1,79	0,17	9,5
DKJ3	265	1,28	0,14	10,9
DKJ3a	265	1,74	0,13	7,5
DKJ3b	270	1,68	0,14	8,3
DKJ3c	270	1,05	0,24	22,9
DKJ4	270	1,92	0,1	5,2

D. Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak metabolit sekunder fungi endofit tumbuhan *kardia*

Nilai IC_{50} ekstrak metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antioksidan yang dibandingkan dengan standar asam askorbat disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. IC_{50} Ekstrak Metabolit Sekunder Fungi Endofit dibandingkan dengan Asam Askorbat (Standar)

No.	Ekstrak Isolat Fungi Endofit	$IC_{50}(\mu\text{g/mL})$
1	BKJ1	479
2	BKJ3	1604
3	DKJ1	464
4	DKJ2	481
5	DKJ3	448

6	DKJ3a	143
7	DKJ3b	862
8	DKJ3c	116
9	DKJ4	154
10	As.Askorbat	24

E. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Senyawa Metabolit dalam Ekstrak

Ekstrak metabolit sekunder isolat fungi endofit yang memiliki aktivitas antioksidan yakni DKJ3a, DKJ3c dan DKJ4 dilakukan analisis kromatografi lapis tipis (Gambar 1).



Gambar 3. Hasil KLT dengan eluen n- heksan : etil asetat (4 : 1) divisualisasi dibawah UV 366 nm.

Keterangan: 1. Pola noda senyawa

2. Plat KLT

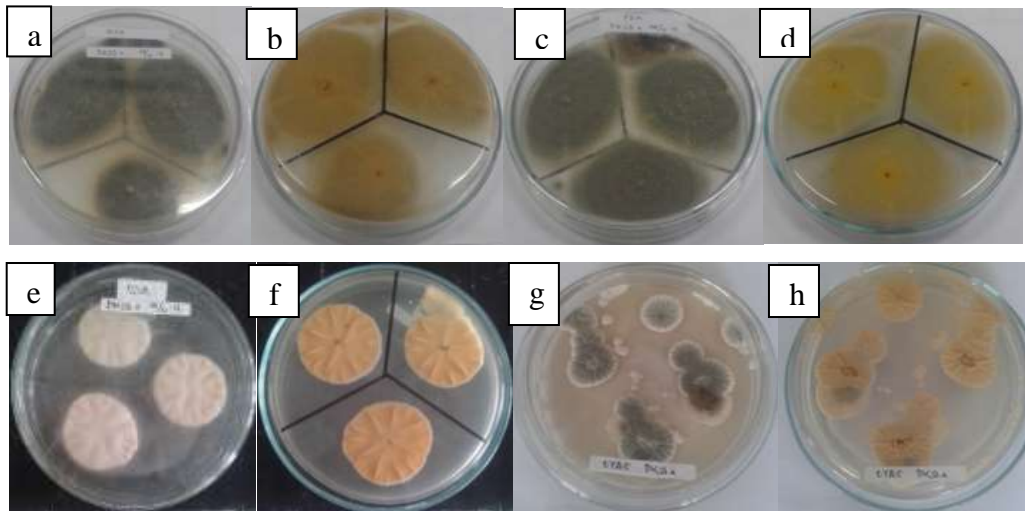
3. Nomor ekstrak senyawa (1. DKJ3a, 2. DKJ3c, 3. DKJ4)

Tabel 5. Rf Ekstrak Etil Asetat Metabolit Sekunder Fungi Endofit Tumbuhan Kardia (*Bellucia pentamera* Naudin) dengan Larutan Pengembang (Eluen) N-heksan:Etil Asetat 4:1.

Isolat	Jumlah Noda	Harga Rf
DKJ3a	5	0,38
		0,62
		0,77
		0,80
		0,95
DKJ3c	5	0,32
		0,66
		0,77
		0,80
		0,95
DKJ4	3	0,31
		0,80
		0,83

F. Hasil karakterisasi isolat fungi endofitik penghasil antioksidan




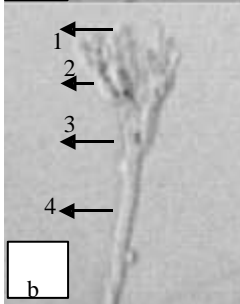
Hasil karakterisasi isolate fungi penghasil antioksidan yaitu isolate DKJ3a, DKJ3c, dan DKJ4 disajikan pada Gambar 3-6 dan Tabel 4-6



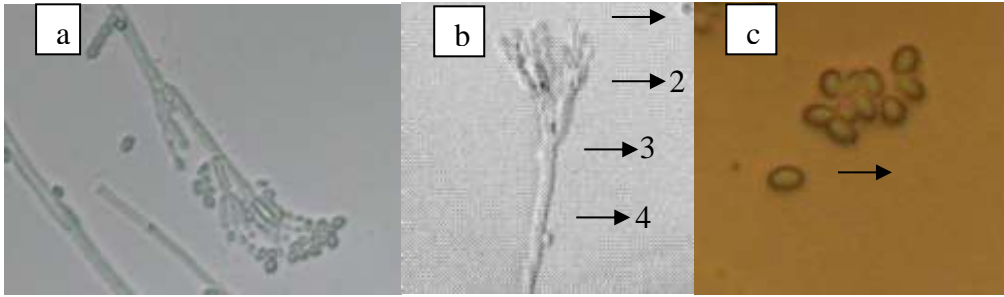
Gambar 3. Karakter makroskopis koloni isolat fungi endofit DKJ3a.

- a. Permukaan atas koloni. b. Sebalik koloni pada medium MEA,
 c. Permukaan atas koloni. d. Sebalik koloni pada medium PDA,
 e. Permukaan atas koloni. f. Sebalik koloni pada medium CDA,
 g. Permukaan atas koloni. h. Sebalik koloni pada medium CYAS.

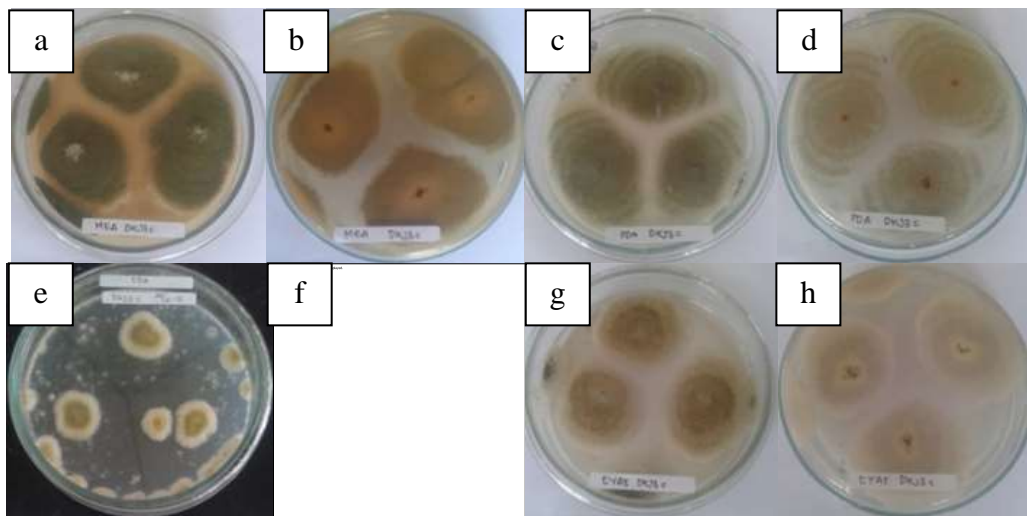
Tabel 4. Karakter Makroskopis dan Mikroskopis Isolat Fungi DKJ3a

Makroskopis		Mikroskopis	
Warna Koloni	Warna sebalik koloni	Gambar	Karakter
		 	<p>a. Warna koloni: kehijauan kadang putih</p> <p>b. Konidiofor : bercabang, <i>monovercillate</i>, berwarna kehijauan, Tidak terdapat metula, Permukaan halus</p> <p>c. Fialid: Tumbuh diatas konidiofor, berbentuk labu (flask-shaped)</p> <p>d. Konidia : berwarna hijau, berbentuk elips</p> <p>Keterangan: a. Metode HSC b. Preparat basah 1. Konidia 2. Fialid 3. Cabang Konidiofor 4. Konidiofor (<i>Stipes</i>)</p>

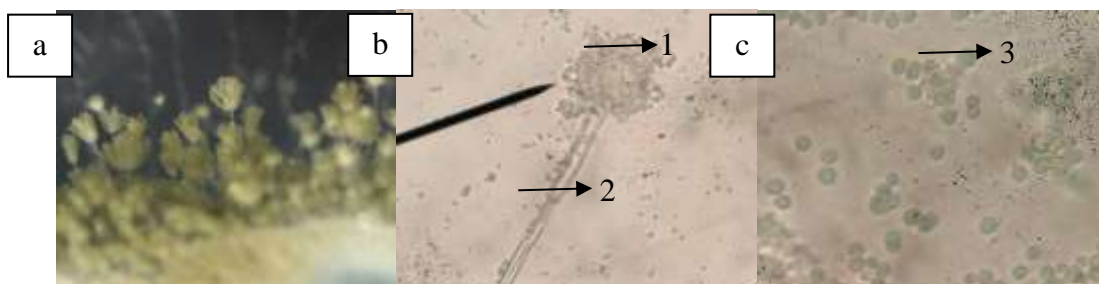
Spesies : *Penicillium sp*



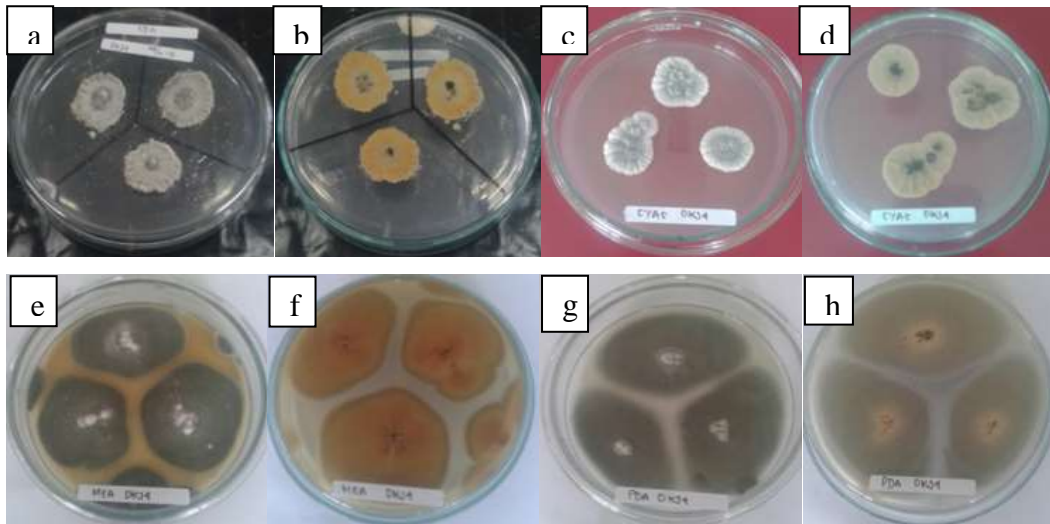
Gambar 4. Karakter Mikroskopis Fungi Endofit Isolat DKJ3a
 (a) Pengamatan mikroskopis HSC.
 (b dan c) Pengamatan mikroskopis preparat basah.
 Keterangan: 1. Konidia 3. Cabang konidiofor
 2. Fialid 4. Konidiofor



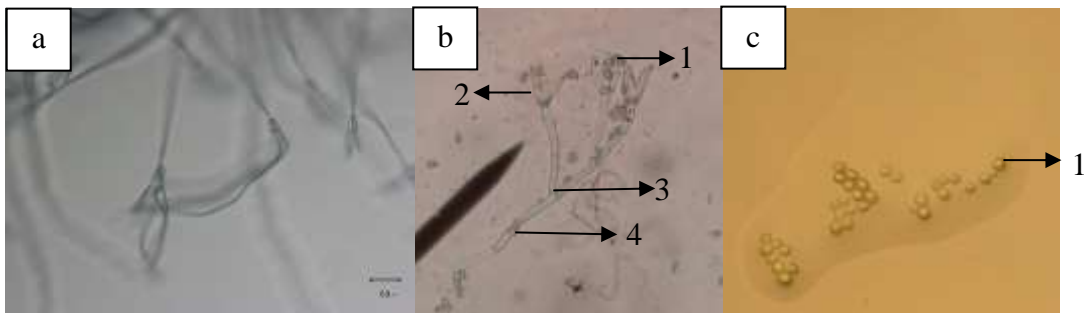
Gambar 5. Koloni isolat fungi endofit DKJ3c.
 a. Permukaan atas koloni. b. Sebalik koloni pada medium MEA,
 c. Permukaan atas koloni. d. Sebalik koloni pada medium PDA,
 e. Permukaan atas koloni. f. Sebalik koloni pada medium CDA,
 g. Permukaan atas koloni h. Sebalik koloni pada medium CYAS.



Gambar 6. Morfologi Mikroskopis Fungi Endofit Isolat DKJ3c.
 a. Pengamatan mikroskopis HSC,
 b. Pengamatan mikroskopis preparat basah,
 c. Pengamatan mikroskopis preparat basah spora isolat fungi DKJ3c.
 Keterangan: 1. Kepala Konidia
 2. Stipe
 3. Kondia



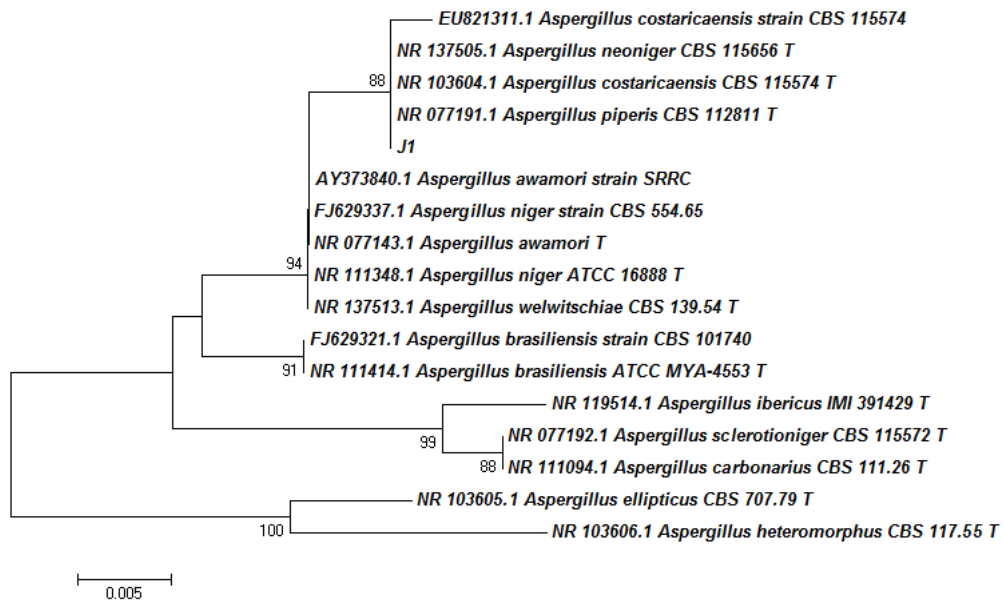
Gambar 7. Morfologi makroskopis koloni isolat fungi endofit DKJ4. (a.Permukaan atas koloni. b. Sebalik koloni) pada medium CDA, (c.Permukaan atas koloni. d.Sebalik koloni) pada medium CYAS, (e.Permukaan atas koloni. f. Sebalik koloni) pada medium MEA, (g.Permukaan atas koloni. h. Sebalik koloni) pada medium PDA.



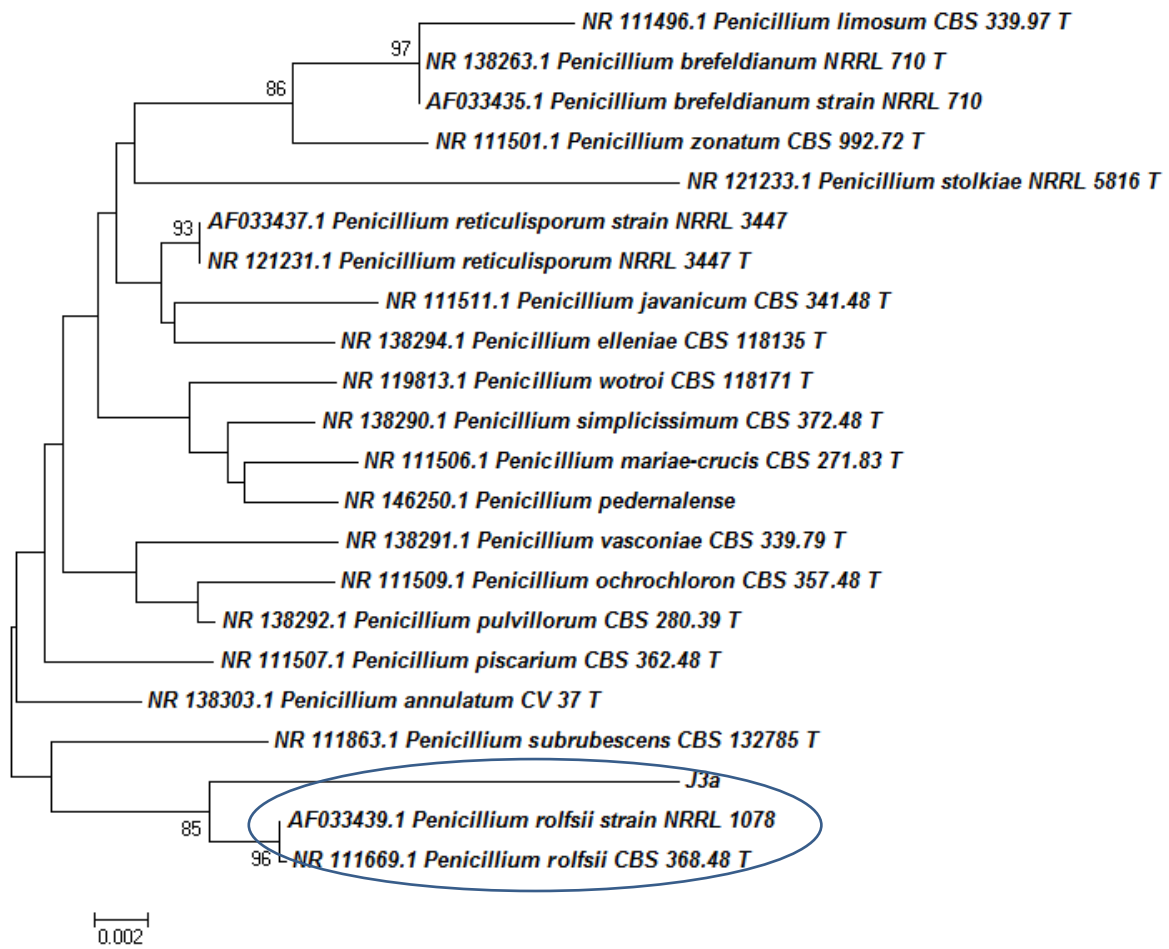
Gambar 8. Karakter mikroskopis fungi endofit Isolat DKJ4. (a) Pengamatan mikroskopis HSC isolat fungi endofit DKJ4, (b) Fungi endofit DKJ4 pada preparat basah, (c) Spora fungi endofit DKJ4 pada preparat basah.

Keterangan: 1. Konidia
2. Fialid
3. Cabang konidiofor
4. Konidiofor

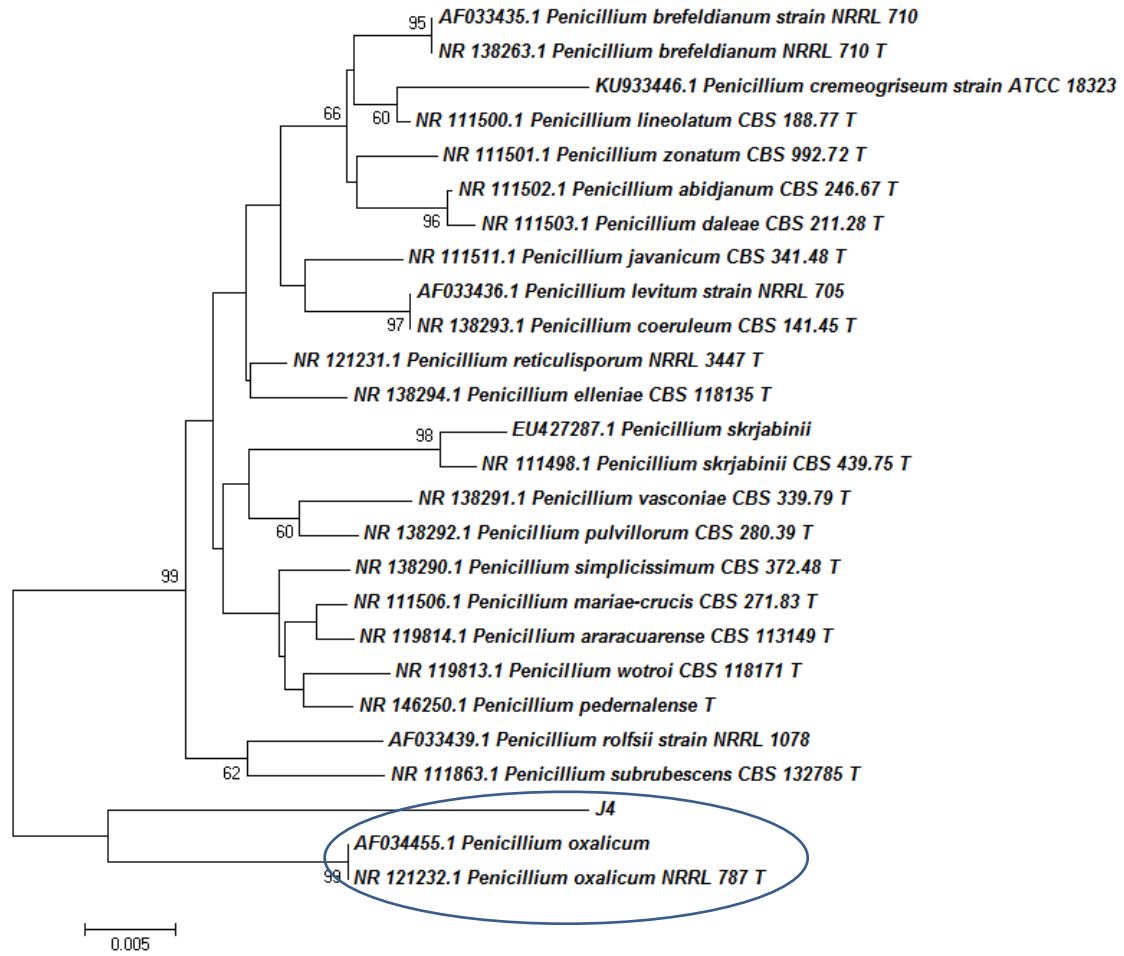
Hasil identifikasi molekuler



Gambar 9. Pohon filogenetik fungi endofitik isolate DKJ1



Gambar 10. Pohon filogenetik fungi endofitik isolat DKJ3a



Gambar 11. Pohon filogenetik fungi endofitik isolate DKJ4

BAB IX. KESIMPULAN

1. Diperoleh 9 isolat fungi endofit dari tumbuhan Kardia (*Bellucia pentamera* Naudin) yang terdiri atas 2 isolat dari batang dan 7 isolat dari daun. Tiga dari sembilan ekstrak isolat yang aktif berpotensi sebagai antioksidan yakni ekstrak isolat DKJ3a, DKJ3c dan DKJ4.
2. Nilai IC_{50} ekstrak isolat yang aktif berpotensi sebagai antioksidan yakni DKJ3c yang memiliki $IC_{50} = 116 \mu\text{g/mL}$, kemudian berikutnya ekstrak isolat DKJ3a = $143 \mu\text{g/mL}$ dan DKJ4 = $154 \mu\text{g/mL}$.
3. Isolat fungi endofit DKJ3a teridentifikasi sebagai *Penicillium rolfsii* dan DKJ4 termasuk kedalam jenis *Penicillium oxalicum* sedangkan isolat fungi endofit DKJ3c merupakan *Aspergillus fumigatus* group.

DAFTAR PUSTAKA

- Backer, C A., dan Bakhuizen, V D B. 1963. Flora of Java (Spermatophytes Only) Vol. 1. Netherlands: N.V.P. Noordhoff- Groningen. xxxiii + 648 hlm.
- Bobrowski K. 2005. Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine: Contribution of Radiation Chemistry. *Nukleonik*. 50(3): 67-76.
- Domsch, K,H., W, Gams & T,H, Anderson, 1980, Compendium of Soil Fungi, Academic Press, London.
- Elfita, Muharni, Munawar, dan Rizki. 2012b. Isolation of antioxidant compound from endophytic fungi *Acremonium* sp from the twigs of Kandis Gajah. *Makara Journal of Science* 16 (1) : 46-50.
- Enriquez, G.L, L.S.Saniel, R.R.Matias, G.I.Garibay. 1995. Laboratory Manual in General Microbiology. University of The Philippines Press.
- Giorgio, P. (2000). Flavonoid and Antioxidant. *Natural Product J*, 63(7), 1035-1043
- Huang WY, Cai YZ, Hyde KD, Corke H, Sun M (2007) Endophytic fungi from Nerium oleander L. (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity. *World J Microbiol Biotechnol* 23:1253–1263
- Jamal, Y., Muhamad, I, Atit, K., dan Andria A. 2008. Diversitas dan Profil Metabolit Sekunder Jamur Endofit yang Diisolasi dari Tumbuhan Gambir (*Uncaria gambir*) Serta Aktivitas Biologisnya Sebagai Antibakteri. *Berita Biologi*, 9(1): 149-154.
- Kaul, S., Gupta, S., Ahmed, M., and M.K.Dhar. 2012. Endophytic fungi from medicinal plants : a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochem Rev* DOI 10.1007/s11101-012-9260-6.
- Kumala, S. 2014. Mikroba Endofit: Pemanfaatan Mikroba Endofit dalam Bidang Farmasi. Jakarta: PT. ISFI Penerbitan. v + 105 hlm
- Liu X, Dong M, Chen X, Jiang M, Lv X, Yan G (2007) Antioxidant activity and phenolics of an endophytic Xylaria sp. from Ginkgo biloba. *Food Chem* 105:554–584
- Marxen, K., Vanselow, K.H., Lippemeier, S., & Hansen, U.P. (2007). Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extract of some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurement. *Sensors J.*, 7(10), 2080-2095. Minami, H., Kinoshita, M., Fukuyama, Y.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakar. *J. Sci. Technol.* 26920:1-9
- Munawar dan Elfita, 2007. Penelusuran aktivitas antibakteri kulit akar tumbuhan Medang seluang (*Litsea spatulata*) terhadap bakteri uji *Escheria coli* dan *Shigella dysenteriae*. *Biosfera*, 24(1): 31-37.
- Nagda, V, Gajbhiye, A, and D.Kumar. 2017. Isolation and characterization of endophytic fungi from *Calotropis procera* for their antioxidant activity. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 10(3) : 254-258.
- Noverita, Fitria, D, dan E.Sinaga. 2009. Isolasi dan uji aktivitas antibakteri jamur endofit dari daun dan rimpang *Zingiber ottensii* Val. *Jurnal Farmasi Indonesia* 4(4) : 171-174.
- Pitt, J, I, & A,D, Hocking, 1994, Fungi and Food Spoilage, Springer, New York.
- Radji, M. 2005. Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian* Vol.II,No.3:113-126.
- Sambrook, J, Fritsch E, F, & Maniatis T, 1989. Molecular Cloning : a Laboratory Manual 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

- Samson, R, A, Hoekstra E,S, & Prisyvad J,C, 2004. Introduction to Food and Airborne Fungi, Seventh Edition, Centralbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands, 389 p.
- Sashikumar, J.M., Maheshu, V., & Jayadev, R. (2009). In Vitro Antioxidant Activity of Methanolic Extract of Berberia Tinctona Lesch Root and Root Bark. *India Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, 3(2), 53-58.
- Shibuya, H., Augusta, A., Ohashi, K., Maehara, S., dan Simanjuntak, P. 2005. Biooxidation of (+)-Catechin and (-)-Epicatechin into 3,4-Dihydroxy Flavan Derivatives by The Endophytic Fungus *Diaporthe sp.* Isolated from A Tea Plant. *Chem Pharm Bull.* 53(7): 866-867.
- Shinta, S., Toripah, Jemy, A., & Frenly, W. (2014). Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Total Fenolik Ekstrak Daun Kelor (*Moringa Oleifera Lam*). *Pharmacon J.* 3(4).
- Singh, RP., Sharad, S., dan Kapur, S. 2004. Free Radicals and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases Relevance of Dietary Antioxidants. *JACM.* 5(3): 218-25.
- Slik, F. 2009. Plants of Southeast Asia: *Bellucia pentamera* Naudin, Ann. Sci. Nat., Bot. Sér. 3, 16: 105 (1851). (<http://www.asianplant.net>). Diakses pada tanggal 3 November 2016.
- Srikandace, Y., Yatri, H., dan Partomuan, S. 2007. Seleksi Mikroba Endofit Curcuma zedoria dalam Memproduksi Senyawa Kimia Antimikroba. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia.* 5 (2): 77-84.
- Stierle, A.,D.Stierle, G.Strobel, G.Bignami, and P.Grothaus. 1995. Bioactive metabolites of the endophytic fungi of pacific yew *Taxus brevifolia*. Elsevier Scientific Publ.,Ireland.
- Strobel, GA, and B.Daisy (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol.and Mol. Biology Rev* 67(4):491-502.
- Tan, RX and WX.Zou.2001. Endophytes : a rich source of functional metabolites. *Nat Prod.Rep.*18:448-459.
- Tjitrosoepomo, G. 2011. Morfologi Tumbuhan. Yogyakarta: UGM Press. x + 268 hlm.
- Verheij, E. W. M dan R. E. Coronel, 1997. Prosea Sumber Daya Nabati Asia Tenggara 2 Buah-buahan yang dapat dimakan. Terjemahan S. Somaatmadja. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Wahlqvist, M.L. Antioxidant relevance to human health. *Asia Pac J Clin Nutr* 22 (2):171-176.
- Wahdaningsih, S., Setyowati,E.P.,dan S.Wahyuono. 2011. Aktivitas Penangkap Radikal Bebas dari Batang Pakis (*Alsophila glauca* J. Sm). *Majalah Obat Tradisional.* 16(3): 156 – 160.
- Werdhasari, A.2014. Peran antioksidan bagi kesehatan. *Biotek Medisiana Indonesia.* 3(2):59-68
- Winarsi, H. 2007. Antioksidan Alami dan Radikal Bebas Potensi dan Aplikasinya Dalam Kesehatan. Kanisius: Jakarta.
- Widjajanti, H, Munawar, Hanum, L dan E.Nurnawati.2016. Eksplorasi senyawa antibakteri dan antioksidan fungi endofitik tumbuhan obat *Helmintostachys zeylanica* dan *Tristaniopsis merguensis*. Laporan Penelitian Lanjutan Ristoja.
- Yadaf, M, Yadaf, A, and J.P.Yadaf. 2014. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. *Asian Pac J Trop Med* 7S1:S256-S261.
- Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Shan, T., Zhong, L., Liu, X., and Gao, X. 2010. Endophytic Fungi for Producing Bioactive Compounds Originally from Their Host Plants. *Formatex.* 567-576.
- Zhao JT, Fu YJ, Luo M, Zu YG, Wang W, Zhao CJ, and Gu CB. 2012. Endophytic fungi from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Mill] produce antioxidant Cajaninstilbene Acid. *J Agric Food Chem* 60:4314–4319

