

**UJI ANTIOKSIDAN JAMUR ENDOFITIK BJS-3 YANG BERASOSIASI
DENGAN BIJI SAMBILOTO (*Andrographis paniculata*) MENGGUNAKAN
METODE DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhirazil) PADA MEDIA
PERTUMBUHAN KACANG HIJAU**

Rani Yusnita¹, Wandu Oktria¹, Mauline Adia Silvani¹, Riga Riga¹

¹Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas
Negeri Padang

*email korespondensi : rigakimia@fmipa.unp.ac.id

ABSTRAK

Sambiloto (*Andrographis paniculata*) adalah salah satu tanaman yang tergolong dalam famili *Acanthaceae*. *A. paniculata* dilaporkan mengandung metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antioksidan dan efektif dalam menetralkan radikal bebas. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis uji skrining fitokimia dan menguji aktivitas antioksidan (IC_{50}) jamur endofitik BJS-3 yang berkolonisasi dalam biji sambiloto. Uji analisis fitokimia mengindikasikan ekstrak etil asetat (EtOAc) jamur endofitik BJS-3 positif mengandung senyawa alkaloid, steroid, terpenoid, dan fenolik. Hasil uji antioksidan yang diperoleh menunjukkan adanya kemampuan aktivitas antioksidan tinggi dengan nilai $IC_{50} = 70,82$ ppm. Menariknya, aktivitas antioksidan jamur BJS-3 pada media pertumbuhan kacang hijau pertama kali dilakukan pada penelitian ini.

Kata kunci: *Andrographis panikulata*, aktivitas antioksidan, fitokimia, jamur endofitik

ABSTRACT

Sambiloto (Andrographis paniculata) is a plant belonging to the Acanthaceae family. A. paniculata is reported to produce secondary metabolites which have antioxidant activity and are effective in neutralizing free radicals. The aim of this research was to analyze phytochemical tests by testing the antioxidant activity (IC_{50}) of the endophytic fungus BJS-3 which colonizes with seeds of A. Paniculata. The phytochemical analysis test indicated that the ethyl acetate (EtOAc) extract of the endophytic fungus BJS-3 was positive for containing alkaloids, steroids, terpenoids and phenolic compounds. The antioxidant test results obtained showed the ability of high antioxidant activity with IC_{50} value = 70.82 ppm. Interestingly, the antioxidant activity of BJS-3 mushrooms in green bean growth media was first carried out in this study.

Keywords: *Andrographis panikulata*, antioxidant activity, phytochemistry
endhophytic fung

Pendahuluan

Antioksidan adalah senyawa yang menghambat oksidasi dari senyawa lain dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang reaktif. Antioksidan dapat

memberikan atom hidrogen pada radikal bebas, sehingga senyawa radikal bebas memiliki kemampuan yang stabil (Katrin and A bendra, 2020). Antioksidan mempunyai kemampuan menjaga tubuh dari kerusakan akibat senyawa oksigen yang reaktif, termasuk penyakit degeneratif seperti diabetes, keratitis, penyakit radang usus, impetigo, jantung dan denuasion (Liza kartika, 2020). Tidak terdapatnya cadangan antioksidan yang ditemukan dalam tubuh manusia, dengan jumlah yang cukup besar, menyebabkan terjadinya paparan radikal bebas berlebih sehingga diperlukan asupan antioksidan. Tergantung pada sumbernya, antioksidan dapat ditemukan dalam bentuk sintetik (buatan) dan alami (Wijayakusuma, H. 2006). Antioksidan sintetik merupakan jenis antioksidan yang dihasilkan melalui reaksi kimia. Namun, tidak sedikit di antaranya berpotensi memberikan dampak negatif karena bersifat karsinogenik yang dapat mengganggu kesehatan. Antioksidan alami umumnya berperilaku normal jika berasal dari bahan alga seperti bakteri atau mikroorganisme yang tidak mengandung komponen kimia, sehingga tidak menimbulkan bahaya bagi tubuh (Khiralla, 2015). Salah satu tanaman yang dilaporkan teridentifikasi mengandung aktivitas antioksidan adalah tanaman Sambiloto (*Andrographis panikulata*) (D. Tristantini, 2021).

Sambiloto (*Andrographis panikulata*) adalah jenis dari tanaman yang tergolong dalam kelompok *Acanthaceae* yang ditemukan di beragam daerah Indonesia. *A. paniculata* mempunyai kemampuan dalam pengobatan tradisional untuk memperkuat daya tahan tubuh dan meningkatkan kerja sistem imun pada tubuh yang dapat mengobati gejala flu, menghambat pertumbuhan sel kanker, menurunkan tekanan darah dan kadar gula darah (Silvani dkk., 2023). Selain itu, sambiloto juga berpotensi sebagai komponen antibakteri dan antioksidan (Wardatilah, 2023). Penelitian sebelumnya melaporkan *A. paniculata* berpotensi menghasilkan senyawa aktif yaitu alkaloid, flavonoid, saponin, alkaloid dan tannin (Aminin dkk., 2020). Senyawa-senyawa tersebut mampu menetralkan radikal bebas yang efektif dalam aktivitas antioksidan dan sebagai inang yang baik bagi jamur endofitik (Silalahi, 2020).

Jamur endofitik adalah jamur yang hidup dalam berbagai jaringan tanaman dengan membentuk koloni dalam jaringan tanaman dan tidak membahayakan tanaman inangnya. Hubungan jamur endofitik dengan inangnya saling menguntungkan, dengan tubuh dan strukturnya berbeda sehingga membantu tanaman bertahan dari permukaan luar (V. A. Al Khairi, 2021). Jamur endofitik dapat memberikan efek positif dalam pertumbuhan sel inang sehingga menghasilkan metabolit sekunder dalam waktu yang singkat. Jamur endofitik memiliki metabolit sekunder yang dilaporkan mempunyai senyawa bioaktivitas antara lain alkaloid, terpenoid, fenolik, dan sebagainya (Riga, R. 2023).

Penelitian mengenai aktivitas antioksidan jamur endofitik BJS-3 dari biji sambiloto pada media pertumbuhan kacang hijau belum dilakukan. Untuk itu, pada penelitian ini dilakukan analisis fitokimia dengan peran kacang hijau mengkaji aktivitas antioksidan dari jamur endofitik BJS-3 yang diisolasi dari biji sambiloto pada kacang hijau.

Metode Penelitian

A. Alat

Peralatan yang digunakan adalah spektrofotometri sinar tampak (uv-vis), aluminium foil, neraca analitik, *culture tube*, pipet ukur, pipet tetes, pump, labu

ukur, corong, rak tabung reaksi, tusuk sate, botol vial, tissue.

B. Bahan

Bahan pada riset ini adalah biji sambiloto (*Andrographis paniculata*), kacang hijau (*Vigna radiata L*) metanol p.a, alkohol 70%, NaOCl 3,5% air suling, Potato Dextrose Agar (PDA), etil asetat, H₂SO₄ 2N, HCl p.a, FeCl₃ 1%, asam asetat glasial, asam asetat anhidrat, NaOCl₃ 3,5%, logam Mg, DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhirazil), amoniakloroform, reagen dragendorf, mayer, dan wagner.

C. Metode

Sterilisasi dan Inokulasi

Biji sambiloto dicuci menggunakan air untuk membuang kotoran pada permukaan biji. Biji sambiloto selanjutnya disterilkan menggunakan alkohol 70% (45 detik) dan NaOCl 3,5% (30 detik) kemudian dilakukan pembilasan menggunakan akuades untuk mensterilkan permukaan biji. Medi PDA padat dijadikan kontrol negatif dengan menempelkan biji yang sudah disterilkan. Proses inokulasi juga dilakukan menggunakan media PDA padat dengan memindahkan biji yang sudah steril kedalamnya. Media padat yang sudah diinokulasi biji tadi diinkubasi pada suhu 20°C. Selama 5 hari. Jamur endofitik yang tumbuh di subkultur ke media PDA lain untuk mendapatkan isolat Tunggal (Mauline dkk., 2023).

Kultivasi dan Ekstraksi Jamur Endofitik BJS-3

Isolat murni jamur endofitik BJS-3 yang berukuran 1 x 1 cm diletakkan di atas media kacang hijau, selanjutnya diinkubasi pada suhu 28°C, dan dibiarkan sampai tiga minggu. Jamur endofitik dipanen setelah mencapai waktu optimum dan diekstraksi menggunakan 75 mL EtOAc, dilakukan maserasi sebanyak 3 x 24 jam selanjutnya disaring, kemudian diuapkan sehingga dihasilkan ekstrak pekat EtOAc.

Pengujian Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Pekat EtOAc Jamur Endofitik

a) Pembuatan Larutan Induk 100 ppm

Ekstrak pekat EtOAc dari Endofitik BJS-3 ditimbang sebanyak 2,5 mg, dan dilarutkan dengan 25 mL metanol. Selanjutnya dilakukan pengenceran terhadap larutan induk dalam konsentrasi yang berbeda yaitu 50 hingga 90 ppm. Selanjutnya larutan diinkubasi dengan suhu 27°C dalam waktu 30 menit.

b) Pembuatan Larutan DPPH 50 ppm

Padatan DPPH ditimbang 2,5 mg dilarutkan pada 50 mL metanol untuk membuat larutan dari DPPH pada konsentrasi 50 ppm. Selanjutnya, pipet 1mL larutan DPPH 50 ppm dan ditambahkan 2 mL metanol sebagai kontrol.

c) Pengukuran Absorbansi Sampel

Larutan sampel diinkubasi dalam inkubator dengan waktu 30 menit dalam suhu kamar selanjutnya diuji menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. Pengukuran dilakukan dengan Spektrofotometri UV-Vis dalam panjang gelombang 517 nm.

d) Uji Aktivitas Antioksidan (IC₅₀)

Metode yang digunakan dalam pengujian antioksidan adalah metode DPPH,

yang melibatkan observasi reaksi sampel dengan warna yang berubah, setelah direaksikan dengan DPPH. Larutan sampel akan mengalami reaksi dengan berubahnya warna sampel dari ungu menjadi kuning terang. Selanjutnya absorbansi dari sampel diukur pada alat spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 517 nm.. Data pengukuran kemudian dianalisis menggunakan persamaan regresi yang diperoleh hingga mendapatkan nilai IC₅₀ (Oktria dkk., 2023).

Skrining Fitokimia Ekstrak Pekat EtOAc Steroid

Ekstrak EtOAc 0,5 mL ditambahkan 0,5 mL larutan etanol etanoat, 0,5 mL kloroform serta 1-2 tetes asam sulfat pekat. Uji positif steroid tersebut ditandai dengan berubahnya warna menjadi hijau gelap (Mauline dkk., 2023).

Terpenoid

Ekstrak EtOAc sebanyak 0,5 mL ditambahkan pelarut kloroform 0,5 mL, dan larutan asam sulfat pekat 0,5 mL. Uji positif terpenoid ditandai dengan berubahnya warna menjadi coklat kemerahan (Mauline dkk., 2023).

Fenolik

Analisis senyawa fenolik dilakukan dengan memasukkan 3 tetes natrium klorida (III) (FeCl₃) 1% ke dalam ekstrak etil asetat dari jamur endofit BJS-3. Uji positif fenolik ditandai dengan berubahnya warna biru kehitaman (Mauline dkk., 2023).

Alkaloid

Pada uji alkaloid digunakan secara berurutan dengan tiga reagen dalam tabung reaksi diantaranya, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, dan pereaksi Dragendorff. Uji positif alkaloid untuk masing-masing reagen ditunjukkan adanya endapan putih, endapan jingga, dan endapan coklat (Mauline dkk., 2023).

Hasil dan Pembahasan

1. Kultivasi dan Ekstraksi Jamur Endofitik BJS-3

Jamur endofitik BJS-3 yang diisolasi dari biji sambiloto kacang hijau dikultivasi dengan erlenmeyer yang berisi media kacang hijau selanjutnya diinkubasi dengan suhu 28°C sampai tiga minggu. Media kacang hijau yang digunakan sebagai media petumbuhan karena dapat memenuhi nutrisi yang dibutuhkan oleh jamur endofitik. Nutrisi yang terdapat dalam media kacang hijau yaitu karbohidrat, serat, protein, vitamin dan mineral yang tinggi, sehingga jamur endofitik dapat memanfaatkan media kacang hijau sebagai sumber energi (fadhilah, 2024). Fermentasi jamur

endofitik dipanen setelah mencapai waktu optimal dan dilanjutkan proses maserasi yang dilakukan sebanyak 3 × 24 jam dengan pelarut EtOAc sehingga diperoleh ekstrak pekat EtOA. Metode ini digunakan agar tidak terjadinya kerusakan senyawa aktif yang berpotensi memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Jamur endofitik diekstraksi menggunakan pelarut EtOAc yang merupakan pelarut semipolar. Tujuan pemilihan pelarut semipolar adalah untuk menarik lebih banyak senyawa aktif karena larutan yang memiliki senyawa semipolar dapat menarik senyawa polar, semipolar dan senyawa nonpolar. Selain itu, pelarut EtOAc cocok

untuk ekstraksi karena mudah diserap dan memiliki toksisitas rendah (Amelia & Riga, 2023).

2. Skrining Fitokimia

Tabel 1 Hasil Uji Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak BJS-3

Golongan senyawa		Hasil Uji
Steroid		+
Terpenoid		+
Fenolik		+
Alkaloid	Mayer	+
	Dragendorf	+
	Wagner	+

Ket: +++ : Uji positif dari senyawa steroid, terpenoid, fenolik dan alkaloid.

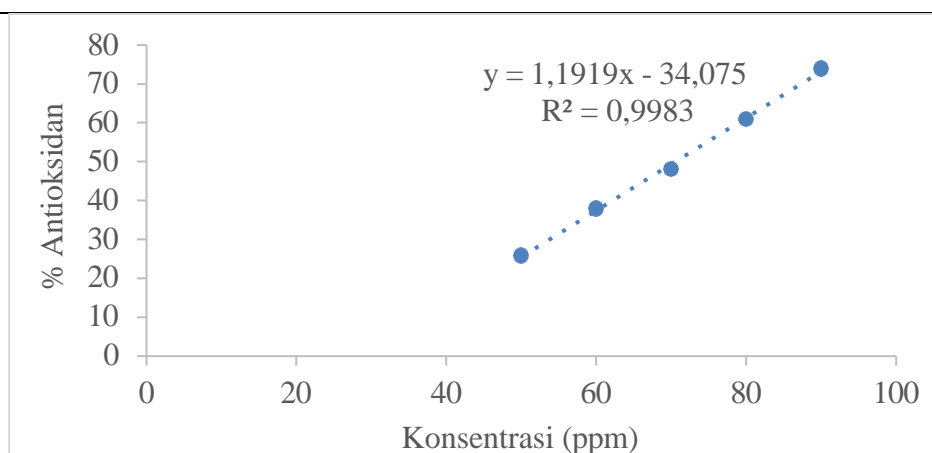
Analisa fitokimia yang dilakukan pada ekstrak jamur endofitik BJS-3 yaitu menunjukkan hasil positif alkaloid, steroid, terpenoid, dan fenolik yang ditandai dengan perubahan warna (Astuti, 2020). Uji terpenoid dari ekstrak jamur endofitik BJS-3 menghasilkan warna merah kecoklatan, yang menunjukkan adanya golongan terpenoid. Uji steroid menimbulkan warna hijau gelap yang menandakan adanya steroid. Dalam uji fenolik ekstraksi BJS-3 ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi merah. Untuk uji positif alkaloid untuk masing-masing reagen diindikasikan terdapat endapan putih pada Mayer, Wagner terdapat endapan jingga, dan endapan coklat dari pereaksi Dragendorf.

3. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Pekat EtOAc Jamur Endofit BJS-3

Aktivitas antioksidan jamur endofitik ekstrak pekat EtOAc ini diuji menggunakan metode DPPH. Metode DPPH adalah metode yang mudah dilakukan dengan tidak memerlukan jumlah sampel yang besar (Riga dkk., 2023). Hasil uji antioksidan dapat diamati dari Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrakjamur endofit BJS-3

Absorbansi Kontrol	Konsentrasi	Absorban	%Antioksidan
0,040	50 ppm	0,032	25,84
0,040	60 ppm	0,029	37,93
0,040	70 ppm	0,027	48,15
0,040	80 ppm	0,025	60,94
0,040	90 ppm	0,023	73,93



Gambar 1. Kurva antioksidan dari ekstrak jamur endofitik BJS-3

Aktivitas IC_{50} didefinisikan sebagai ekstrak jamur endofitik BJS-3 ditentukan menggunakan nilai IC_{50} . Nilai konsentrasi pada sampel dengan menghambat 50% senyawa radikal bebas dengan metode DPPH tersebut. Analisis dari data kurva antioksidan yang terlihat dari gambar 1 dihasilkan persamaan dengan nilai $y = 1,1919x - 34,075$. Nilai IC_{50} dihitung dengan menggantikan nilai y dengan 50, sehingga diperoleh nilai IC_{50} pada ekstrak jamur BJS-3 adalah 70,82 ppm.

Pada jamur endofitik BJS-3 memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Hasil percobaan yang dilakukan pada sifat antioksidan ini adalah nilai IC_{50} dari jamur endofitik BJS-3, terdapat fakta bahwa tidak adanya metabolit sekunder pada media kacang hijau yang kosong dan tidak ada control negatif. Aktivitas antioksidan dari ekstrak jamur endofitik BJS-3 ini berkaitan dengan kandungan metabolit sekunder yang terdapat didalamnya.

Keberadaan metabolit sekunder dalam ekstrak jamur BJS-3 menjadi faktor yang penting dalam aktivitas antioksidan. Mekanisme untuk uji alkaloid memberikan adanya aktivitas farmakologis atau biologis dari suatu tanaman dengan memberikan satu atom H pada radikal bebas sehingga alkaloid berfungsi sebagai antioksidan primer (Ameli Suyanti dkk., 2019). Lebih lanjut, mekanisme steroid dan terpenoid adalah dengan mendonorkan pasangan elektron yang menyebabkan terjadinya ikatan kovalen yang kuat (Nisa dkk., 2024). Uji positif fenolik ini memiliki energi dalam mendonorkan atom H sehingga terjadi reaksi netralisir pada radikal bebas dan reaksi oksidasi pada pemutusan radikal berantai yang terjadi.

Semakin banyak gugus $-OH$ yang terdapat dalam senyawa fenolik, maka akan semakin kuat aktivitas antioksidan yang diperoleh (Yulia Mega, 2024).

Fenolik merupakan suatu senyawa metabolit sekunder yang mempunyai aktivitas antioksidan cukup tinggi. Cincin fenolik yang memiliki gugus hidroksi mampu memberikan atom H sehingga terjadi reduksi radikal bebas dari DPPH dalam keadaan konstan. Adanya peningkatan pada jumlah gugus OH dalam senyawa fenolik yang meningkatkan aktivitas antioksidan. Senyawa fenolik juga dapat bertindak sebagai antioksidan untuk mengurangi radikal bebas dengan memutus rantai dan terjadi perubahan produk yang konstan (Agustin dkk., 2024).

Kesimpulan

Uji dari fitokimia yang dilakukan mengindikasikan bahwa ekstrak EtOAc pekat dari jamur BJS-3 positif mengandung alkaloid, steroid, terpenoid dan fenolik. Analisis terhadap aktivitas antioksidan dari ekstrak jamur BJS-3 yang diisolasi dari biji sambiloto mengindikasikan ekstrak memiliki aktivitas antioksidan tinggi, dengan nilai IC_{50} sebesar 70,82 ppm.

Ucapan Terima Kasih (Jika Ada)

Penulis sangat berterimakasih kepada Allah SWT yang telah memberikan karunianya dalam mengerjakan penelitian ini dan tak luput juga kepada semua pihak yang telah membantu dan memberikan masukan sehingga dapat menyelesaikan penelitian dengan baik.

Daftar Pustaka

- Al Khairi, V. A., Etika, S. B., Ulfah, M., Riga, R., info, A., Sciences, N., & Padang, U. N., (2020) *A Study of the antibacterial activity of endophytic fungus that colonize with the twig of Andro grapis paniculata*, Eksata, 21(o2), 137-144.
- Amelia, S.. & Riga, R (2023). *Uji aktivitas antioksidan jamur As-1 yang diisolasi dari akar sambiloto (Andrographis paniculata) dengan metode DPPH (2, 2,-Difenil-1-pikrilhidrazil)*. Parapemik: jurnal ilmiah farmasi, 12(3), 273-280.
- Amelia S., Nurul Fitriani., Angga. (2019). *Uji Aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit alpukat persea americana MILI.) terhadap peredaman DPPH*. Jurnal proceeding of mulawarman pharmaceuticals conferences
- Amini, A. L. N., Cahyanti, N., Sari, A., Mulyani, N. & Cahyono, B. 2020. *Antioxidant and antimicrobial screening of endophytic fungi culture filtrate from purwoceng (pimpinella alpina molk) Leaf*. J. Kim. Sains dan Apl. 23, 319-324.
- Agustin, 2024. *Analisis kadar total fenol pada minyak dan sari buah merah (pandanus conoideus)*. Jurnal crystal publikasi penelitian kimia dan terapan.
- Astuti, R. A., Ranthe, H. & Kursia, S. *Isolasi, skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan fungi endofitik tangkai daun muebei (morus alba L)*.
- D.Tristantini, A. Ismawati, B. Tegar pradana, and J. Gabriel jonathan, 2021. *prosiding seminar nasionnal teknik kimmia kejuangan. Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH pada daun tanjung (Mimuspapos elengi L)*.
- Fadhilah. 2024 *Penilaian Organoleptik dan Estimasi Kandungan Gizi Bola Susu Pewarnaan Bayam (Amaranthus spp) dengan Penambahan Tepung Kacang*

Hijau (*Vigna radiata* L) sebagai Snack Sehat untuk Pencegahan Kekurangan Energi Kronis Pada Remaja Putri. Diss. Politeknik Kesehatan Tasikmalaya

Katrin and A bendra *Aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun keijibeling (strobilanthes crisper L., Blume) dan daun sambiloto (Andrographis paniculata Burm., f. nesi) dan kombinasinya* 2021.

Khiralla, A. et. al. 2015 *A pilot study of antioxidant potential of endophytic fungi from some sudane medicinal plants*. Asian Pac. J. Trop. Med. 8, 701-704.

Liza kartika,(2020). "Aktivitas antioksidan tanamangenus artocarpus" Pro. Mul.Pharm, Conf journal.

MA Silvani, Riga, R., DM Agustini, 2023. *Aktivitas Antioksidan Jamur Endofitik BS-1 yang Diisolasi dari Bunga Sambiloto Menggunakan Beras Putih sebagai Media Pertumbuhan: Antioxidant Activity of Endophytic Fungus BS-1 Isolated from Sambiloto Flowers Using White Rice as Growth Media*. Jurnal Sains dan Kesehatan. 5, 149-156

Nisa., Nadia Khairun., Eva., *Potensi aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun sungkai*. Jurnal atomik

Oktria. W., Riga, R., Ikshan, M. H., & Agustin, D. M (2023). *Uji antioksidan fungi endofitik BS-1 yang berasosiasi pada bunga sambiloto (Andrographis paniculata) dengan beras merah sebagai media pertumbuhan*. Jurnal Zarah, 11(1), 18-24

Riga, R., N Happyana., EH Hakim, 2023. *Secondary metabolites from Colletotrichum gloeosporioides isolated from Artocarpus heterophyllus and evaluation of their cytotoxic and antibacterial activities*. Natural Product Research. 1-7

Riga, R., MA Silvani., W Oktria., E Nasra., D Kurniawati 2023, *Jamur Endofitik BJS-3 Asosiasi Sambiloto (Andrographis paniculata) : Skirining Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan : Endophytic Fungal BJS-3 Associated Sambiloto (Andrographis paniculata): Screening phytochemistry and Antioxidant Activity*. Jurnal Sains dan Kesehatan. 5, 695-700

Silalahi, M. 2020. Sambiroto (*Andrographis paniculata*) dan Bioaktivitasnya. BEST J. (Biology Educ. Sains Technol. 3, 76–84.

Silvani, M A., Riga, R., & Agustin, D. M. (2023). *Aktivitas antioksidan jamur endofitik BS-1 yang diisolasi dari bunga sambiloto menggunakan beras putih sebagai media pertumbuhan antioxidant*. Jurnal sains dan kesehatan, 5(2), 149-156.

- Wardatillah, R. (2023). *Isolasi Uji fitokimia dan aktivitas antibakteri dari jamur endofitik yang berasosiasi dengan daun dewa (Gynura segetum)*. Universitas Negeri Padang.
- Wijayakusuma, H. (2006). *Atasi Kanker dengan Tanaman Obat pada tumbuhan*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Yulia, Mega. *Pengaruh Perbedaan suhu pengeringan terhadap aktivitas antioksidan daun jarak (jatropha curcas L)*. Sitawa: jurnal farmasi sains dan obat tradisional.
-