

Isolasi dan Identifikasi Senyawa Hasil Fermentasi Kapang Endofit Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack)

RATNA DJAMIL^{1*}, TITI PARWATI², NANI KHOMENI¹

¹Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila
Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan, 12640

²Pusat Penelitian Bioteknologi - LIPI, Jl. Raya Bogor Km. 46, Cibinong 16911

Diterima 27 Juni 2004, Disetujui 2 Agustus 2004

Abstract: Endophytic fungi of Pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) were inoculated to synthetic medium and incubated for 28 days. The fumated medium then were extracted with chloroform. The antioxidant activities by 1,1-diphenyl 2-picrylhydrazyl (DPPH) methods showed that isolated compound has scavenging effect at IC_{50} 285.7 ppm. Identification by interpretation of infra red spectra showed that the isolated compound was a terpenoid.

Key words: endophytic fungi, *Eurycoma longifolia*, antioxidant, DPPH, terpenoid

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki kekayaan dengan berbagai jenis tanaman yang berkhasiat sebagai obat. Dari sekian banyak tanaman obat yang ada diantaranya adalah pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack.) yang termasuk famili Simaroubaceae dan banyak tumbuh di Kalimantan. Pasak bumi sudah lama dikenal oleh penduduk dan biasanya digunakan dalam pemakaian obat-obatan tradisional sebagai antimalaria, juga diketahui memiliki aktivitas antioksidan^(1,2,3).

Antioksidan adalah suatu senyawa yang dapat menetralkan dan melawan bahan toksik (radikal bebas) dan menghambat terjadinya oksidasi pada sel sehingga mengurangi terjadinya kerusakan sel. Radikal bebas adalah atom atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital luarnya. Hal ini mengakibatkan tidak stabilnya atom atau molekul tersebut. Agar menjadi stabil, radikal memerlukan elektron yang berasal dari pasangan elektron molekul di sekitarnya, sehingga terjadi perpindahan elektron dari molekul donor ke molekul radikal untuk menjadikan radikal tersebut stabil. Akibat reaksi tersebut, molekul donor menjadi radikal baru yang tidak stabil dan memerlukan elektron dari molekul disekitarnya untuk menjadi lebih stabil. Demikian

seterusnya, terjadi reaksi berantai perpindahan elektron-elektron⁽⁴⁾.

Pasak bumi yang mulai langka keberadaannya di alam akan mengalami pengurangan apabila terus menerus dieksploitasi tanpa diimbangi dengan peremajaan. Oleh karena itu, dicari alternatif lain yang lebih mudah sekaligus mempertahankan kelestariannya di alam dengan menggunakan mikroba endofitik. Mikroba endofitik adalah mikroba yang sebagian atau seluruh hidup berada dalam jaringan tanaman inang, mikroba endofitik ini hidup secara internal dalam jaringan hidupnya secara simbiosis mutualistik⁽⁵⁾.

Pada penelitian ini dilakukan inokulasi salah satu kapang endofit dari ranting pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack.) dengan nomor kode kelos 108 dan diinokulasikan ke dalam dua jenis medium yaitu GYP (*glucose yeast pepton*) dan PDB (*potatoe dextrose broth*). Hasil inokulasi kemudian diekstraksi dengan kloroform. Kemudian inokulat dimurnikan dan diidentifikasi.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Kapang endofit Kelos 108 hasil isolasi dari ranting tanaman pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) koleksi Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong. Bahan kimia berupa kloroform, natrium klorida. Media GYP dan PDB dengan komposisi GYP: 5 g *yeast extract*, 5 g pepton, 10 g gliserol, 10 g glukosa, 5 g natrium klorida, dilarutkan

* Penulis korespondensi, Hp. 08128170958,
e-mail: ratnadj_ffup@yahoo.com

dalam 1 l air dan PDB: 2,9g PDB dilarutkan dalam 1 l air.

METODE. Kapang endofit Kelos 108 diinokulasikan kedalam 2 jenis media yaitu GYP dan PDB, lalu difermentasi selama 28 hari pada *orbital shaker*. Pengambilan biomassa, penimbangan dan pengukuran pH media dilakukan pada hari ke-0, -7, -14, -21, dan -28. Biomassa kemudian diekstraksi dengan kloroform dan setiap ekstrak yang diperoleh ditimbang. Selanjutnya dilakukan kromatografi lapis tipis untuk identifikasi senyawa kandungan ekstrak. Ekstrak kloroform tersebut kemudian difraksinasi dengan kromatografi kolom. Pada fraksi yang diperoleh dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Fraksi tersebut kemudian dianalisis dengan spektrofotometri ultraviolet dan spektrofotometri inframerah.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian diketahui bahwa isolat kapang endofit kelos 108 tidak tumbuh pada media PDB. Hal ini mungkin dikarenakan komposisi media tersebut kurang cocok sebagai media tumbuh. Untuk penelitian selanjutnya digunakan media GYP sebagai media karena pada media ini kapang endofit tumbuh dengan baik.

Media PDA digunakan sebagai media regenerasi

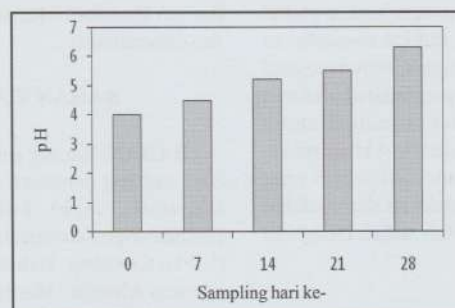
untuk meremajakan sel-sel kapang yang sudah tumbuh disimpan sebagai stok atau digunakan sebagai inokulan pada medium cair. Kapang yang tumbuh pada media PDA memiliki karakteristik warna putih rata, hifa tebal dengan bagian bawah berwarna kecoklatan.

Media GYP digunakan sebagai media kultur untuk pemberian nutrisi dan media pertumbuhan bagi kapang endofit kelos 108. Secara umum terlihat bahwa isolat membentuk bulatan putih yang makin lama makin besar dan karena kondisi berubah menjadi kehitaman. Medium cair tetap jernih walaupun warnanya makin lama makin tua. Warna medium yang makin tua menunjukkan adanya perubahan komposisi dalam medium (Tabel 1). Kemungkinan karena dihasilkannya metabolit sekunder oleh mikroba yang kemudian dilepaskan ke dalam medium.

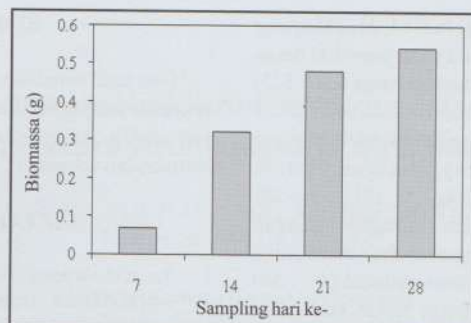
Pengukuran pH yang dilakukan pada media GYP sebelum diekstraksi berguna untuk mengetahui keasaman atau kebasahan media. Tidak seperti kapang umumnya yang menyukai medium bersuasana asam untuk pertumbuhannya kapang endofit kelos 108 cenderung memperlihatkan kenaikan pH dari asam ke agak netral (Gambar 1). Kemungkinan peningkatan pH ini akibat adanya metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroba atau sebab lain. Maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengingat potensinya dalam penyediaan sumber bahan obat alternatif.

Tabel 1. Karakteristik isolat kapang endofit kelos 108 dalam media GYP

| Hari | Karakteristik |
|------|---|
| 7 | Media jernih berwarna coklat muda dan kapang mempunyai bentuk bulat, putih, ukuran kecil, sedikit |
| 14 | Media jernih ,berwarna coklat muda dan kapang mempunyai bentuk bulat, putih seperti agar, ukuran sedang. |
| 21 | Media jernih, berwarna kuning kecoklatan dan kapang mempunyai bentuk bulat, putih kehitaman, ukuran sedang, banyak. |
| 28 | Media jernih, berwarna kuning kecoklatan dan kapang mempunyai bentuk bulat, warna hitam, ukuran besar, banyak sekali. |



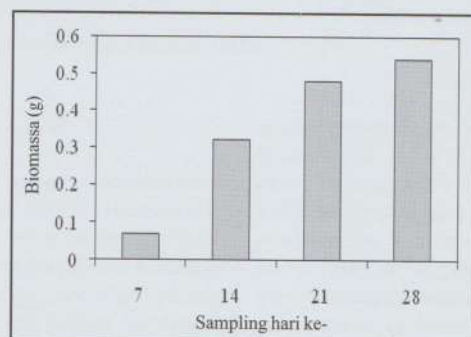
Gambar 2. Hubungan antara pH media dan waktu pengukuran.



Gambar 2. Hubungan antara bobot biomassa isolat dan waktu pengukuran.

Tabel 2. Hasil uji aktivitas antioksidan menggunakan DPPH pada fraksi ke-3 dibandingkan dengan vitamin C sebagai kontrol positif

| | Konsentrasi (ppm) | Absorban | | Peredaman (%) | IC ₅₀ (ppm) |
|----------|-------------------|----------|--------|---------------|------------------------|
| | | Sampel | Blanko | | |
| VIT C | 4 | 0,1165 | | 38,65 | 5,6 |
| | 6 | 0,0885 | | 53,39 | |
| | 8 | 0,0622 | 0,1899 | 67,25 | |
| | 10 | 0,0498 | | 73,77 | |
| Fraksi 3 | 10 | 0,187 | | 1,52 | 285,7 |
| | 25 | 0,1807 | | 4,87 | |
| | 50 | 0,1731 | 0,1899 | 8,87 | |
| | 100 | 0,1524 | | 19,75 | |



Gambar 2. Hubungan antara bobot ekstrak kloroform dari biomassa isolat dan waktu pengukuran.

Penimbangan biomassa diperlukan untuk mengetahui pertumbuhan kapang endofit selama waktu inkubasi 28 hari dalam media GYP. Peningkatan berat biomassa kapang terlihat mengikuti pola pertumbuhan normal. Pada hari ke 21 sampai hari ke 28 kurva berat biomassa mulai terlihat mendatar. Hal ini menunjukkan bahwa pada hari ke 21 mikroba telah mencapai fase stasioner pertumbuhannya, sementara hari sebelumnya masih menjalani fase log (periode pertumbuhan yang cepat) (Gambar 2).

Ekstrak kloroform dari (biomassa) diperoleh dengan menyaring kapang dalam medium fermentasi

dengan corong Buchner yang sudah dilapisi kertas saring, kertas saring dikeringkan dan ditimbang setelah itu kertas saring dipotong kecil lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Potongan kertas saring berisi biomassa kapang diekstraksi dengan kloroform sebanyak 3 kali. ekstrak yang diperoleh dikumpulkan dan diuapkan hingga kering, lalu ditimbang. Ekstrak yang diperoleh tampaknya makin lama makin meningkat jumlahnya seiring lamanya waktu fermentasi (Gambar 3).

Hasil pengujian ekstrak kloroform (biomassa) dari hasil fermentasi selama 28 hari diidentifikasi dengan menggunakan KLT. Berdasarkan hasil

analisis, diketahui bahwa pada hari 14, 21, 28 kapang endofit menghasilkan senyawa yang memiliki harga Rf (0,550, 0,550, 0,550) mendekati harga Rf (0,525) baku pembandingan eurikomanon.

Fraksinasi ini dilakukan pada ekstrak kloroform dari (biomassa) hasil penggabungan ekstrak kloroform (biomassa) hari ke-14, -21, dan -28. Pemisahan ekstrak kloroform (biomassa) dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam silika gel 60 dan fase gerak kloroform-metanol (4:1) dan memberikan 3 fraksi dan hanya fraksi ke-3 yang menunjukkan pemisahan yang baik dengan hanya memberikan satu bercak. Dari fraksi ke-3 dilakukan identifikasi senyawa dengan pereaksi KLT. Berdasarkan hasil analisis didapat bahwa fraksi ke-3 memberikan hasil positif (berwarna biru) terhadap pereaksi semprot Liebermann Burchard sebagai penanda. Senyawa yang dihasilkan adalah senyawa terpenoid. Hasil analisa fraksi ke-3 memberikan informasi bahwa fraksi ke-3 tersebut memberikan serapan pada bilangan gelombang 1714,60 : 1743,5 cm^{-1} yang karakteristik untuk karbonil. Hasil uji pendahuluan secara KLT dengan menggunakan pereaksi DPPH menunjukkan hasil positif (bercak berwarna kuning pucat). Setelah itu dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan DPPH dan vitamin C sebagai kontrol positif.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa senyawa yang dihasilkan oleh kapang endofit kelas 108 adalah terpenoid dan memiliki daya aktivitas antioksidan sebesar IC_{50} 285,7 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

1. Tongkat Ali/pasak bumi powder-4 oz.bulk *Eurycoma longifolia* Jack (1halaman). diambil dari [http://www/herbalremedies.com/tongkat ali bulk.html](http://www/herbalremedies.com/tongkat%20ali%20bulk.html). diakses 10 Juni, 2004.
2. Note Boom Hp. Flora malesiana. Penerbit: Malaysia; 1962. hal. 193-226.
3. Rifai MA. Data-data botani pasak bumi [laporan penelitian]. Bogor: Herbarium Bogoriense; 1975. hal. 79-83.
4. Windono T, Soediman S, Yudawati U, Ermawati E, Srielita E. Uji peredaman radikal bebas terhadap 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil dari ekstrak kulit buah dan biji anggur (*Vitis vinera* L.) Probolinggo Biru dan Bali. *Artocarpus*. 2001;1:38-39..
5. Landecker EM. Fundamentals of the fungi. 4th ed. United States of America: Prentice Hall International Inc; 1996. p. 501-04.