

**Bioaktivitas Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Endofit Batang Bajakah
(*Uncaria nervosa* Elmer.)**

**Bioactivity of Ethyl Acetate Extract from Fermentation of the Endophytic Stem
of Bajakah (*Uncaria nervosa* Elmer.)**

Khoirunnisa¹, Novianty Indjar Gama¹, M. Arifuddin¹, Rolan Rusli^{1,2,*}

¹Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Kefarmasian “Farmaka Tropis”,
Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman, Samarinda, Kalimantan Timur, Indonesia

²Kelompok Bidang Ilmu Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman, Samarinda, Indonesia

*Email Korespondensi: rolan@farmasi.unmul.ac.id

Abstrak

Uncaria nervosa Elmer. atau biasa dikenal dengan Bajakah merupakan tanaman endemik Kalimantan yang dipercaya dapat mengobati kanker. Pemanfaatan mikroorganisme fungi endofit menjadi upaya dalam menjaga keberlangsungan tumbuhan yang memiliki kemampuan transfer genetik dari tanaman inangnya. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui jumlah rendemen, mendapatkan jenis metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etil asetat, dan mengetahui toksisitas isolat fungi endofit berdasarkan nilai LC_{50} terhadap larva *Artemia salina*. Metode yang digunakan adalah isolasi fungi endofit, ekstraksi fungi endofit, uji fitokimia dengan KLT dan pengujian sitotoksik dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan hewan uji dari larva *Artemia salina*. Jumlah rendemen isolat G1A1 dan isolat G1A3 masing-masing sebesar 0,0084% dan 0,0078%. Hasil skrining fitokimia isolat G1A1 adalah tanin ($R_f = 0,55$) dan triterpenoid ($R_f = 0,6$). Pada isolat G1A3 mengandung triterpenoid ($R_f = 0,5$) dan flavonoid ($R_f = 0,9$). Nilai LC_{50} isolat G1A1 sebesar 512,86 ppm dan pada isolat G1A3 sebesar 660,7 ppm yang berpotensi sebagai sitotoksik.

Kata Kunci: fungi endofit, KLT, BSLT

Abstract

Uncaria nervosa Elmer. or commonly known as Bajakah is a plant endemic to Kalimantan which is believed to treat cancer. Utilization of endophytic fungal microorganisms is an effort to maintain the sustainability of plants that have the ability to transfer genetics from their host plants. The aims of this study were to determine the amount of yield, to obtain the types of secondary metabolites contained

in the ethyl acetate extract, and to determine the toxicity of endophytic fungi isolates based on LC_{50} values for *Artemia salina* larvae. The methods used were isolation of endophytic fungi, endophytic fungi extraction, phytochemical tests using TLC and cytotoxic testing using the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method using *Artemia salina* larvae as test animals. The total yield of isolate G1A1 and isolate G1A3 were 0.0084% and 0.0078%, respectively. The results of the phytochemical screening of isolate G1A1 were tannins ($R_f = 0.55$) and triterpenoids ($R_f = 0.6$). Isolate G1A3 contains triterpenoids ($R_f = 0.5$) and flavonoids ($R_f = 0.9$). The LC_{50} value of isolate G1A1 was 512.86 ppm and isolate G1A3 was 660.7 ppm which has the potential to be cytotoxic.

Keywords: endophytic fungi, TLC, BSLT

Received: 31 March 2023

Accepted: 09 September 2023

DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v5iSE-1.2054>



Copyright (c) 2023, Jurnal Sains dan Kesehatan (J. Sains Kes.). Published by Faculty of Pharmacy, University of Mulawarman, Samarinda, Indonesia. This is an Open Access article under the CC-BY-NC License.

How to Cite:

Khoirunnisa, K., Gama, N.I., Arifuddin, M., Rusli, R., 2023. Bioaktivitas Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Endofit Batang Bajakah (*Uncaria nervosa* Elmer.). *J. Sains Kes.*, 5(SE-1). 46-51. DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v5iSE-1.2054>

1 Pendahuluan

Genus *Uncaria* merupakan jenis tumbuhan yang hidup merambat yang dapat ditemukan di daerah hutan tropis dan subtropis seluruh dunia. Tumbuhan jenis ini merupakan jenis liana yang menjalar dan diselimuti rambut lebat berwarna merah kecoklatan dan memiliki bunga dengan bentuk berupa tabung panjang dengan cuping yang pendek [1],[2]. *Uncaria nervosa* merupakan tumbuhan herbal yang tersebar di daerah Kalimantan. Masyarakat pada umumnya memanfaatkan tumbuhan ini sebagai obat karena dipercaya dapat menyembuhkan luka, demam, hipertensi, bahkan kanker. Tumbuhan ini dilaporkan mengandung senyawa metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, terpenoid, dan fenolik dan mempunyai bioaktivitas sebagai antikanker, dalam pengujian toksisitasnya didapatkan nilai LC_{50} sebesar 1,76 ppm dan 2,66 ppm dengan metode BSLT [3].

Fungi endofit merupakan mikroorganisme yang ada di dalam jaringan tumbuhan dan memiliki kemampuan dalam memproduksi senyawa bioaktif karena mengalami koevolusi transfer genetik dari tanaman inangnya. Fungi endofit dalam dewasa ini sedang populer karena kelebihan yang dimilikinya seperti kultur mudah tumbuh, memiliki siklus hidup yang pendek, dan penghasil senyawa bioaktif dengan jumlah besar [4]. Sehingga, fungi endofit dapat memproduksi senyawa bioaktif secara masif dalam jumlah besar sama seperti inangnya dalam waktu singkat tanpa harus menggunakan lahan. Hal ini, berdampak baik dalam konservasi lingkungan [5].

2 Metode Penelitian

2.1 Bahan

Bahan yang diteliti adalah isolat fungi endofit batang bajakah (*Uncaria nervosa*

Elmer.), medium *Potato Dextrose Agar* (PDA), medium *Potato Dextrose Broth* (PDB), *methylene blue*, aquades, etil asetat sebagai pelarut dalam proses fermentasi, pereaksi *dragendorff*, AlCl_3 , *Liebermann Burchard*, FeCl_3 , Plat KLT, air laut, kertas saring, telur *Artemia salina*, dan ragi.

2.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah cawan petri, gelas ukur, erlenmeyer, gelas kimia, penggaris, toples, botol fermentasi, corong pisah, sendok tanduk, batang pengaduk, *object glass*, *cover glass*, bunsen, timbangan analitik, *hot plate*, autoklaf, *Laminar Air Flow*, *rotary evaporator*, *rotary shaker* dan lampu UV 264 nm serta 366 nm.

2.3 Isolasi Fungi Endofit

Pengambilan sampel dilakukan di Bontang, Kalimantan Timur. Batang segar kemudian disterilisasi dengan desinfektan. Eksplan dicuci dengan air bersih kemudian dikeringkan. Eksplan kemudian direndam dengan alkohol 70% selama 1 menit, larutan NaOCl 5,25% selama 3 menit, dan dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali. Sampel yang telah steril dipotong $\pm 1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ dan diletakkan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang telah ditambahkan streptomisin dan diinkubasi selama 7-14 hari pada suhu ruang [6]. Fungi yang telah tumbuh kemudian dimurnikan dengan menginokulasi koloni fungi yang berbeda ke media PDA baru hingga diperoleh koloni fungi yang murni. Kemudian didapatkan 2 isolat fungi murni dalam kode isolat G1 pada pemurnian pertama dan kode A1 dan A3 pada pemurnian selanjutnya. Sehingga isolat fungi yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat fungi dengan kode isolat G1A1 dan G1A3.

2.4 Ekstraksi Fungi Endofit

Isolasi fungi endofit dari batang bajakah dilakukan dengan cara isolat fungi endofit difermentasi dengan media PDB (*Potato Dextrose Broth*). Isolat fungi endofit diinokulasi ke dalam 150 mL medium PDB kemudian, di *shaker* pada suhu ruang dengan kecepatan 150 rpm selama 14 hari dengan *rotary shaker*. Hasil fermentasi kemudian dipisahkan dengan kertas saring untuk memisahkan biomassa fungi dan medium PDB. Hasil pemisahan yang telah didapat difraksinasi cair-cair menggunakan pelarut etil asetat dengan perbandingan kultur :

pelarut = 1:1 sebanyak 3 kali. Selanjutnya fraksi etil asetat yang telah didapatkan kemudian dipisahkan dengan *rotary evaporator*. Perhitungan bobot ekstrak didapatkan dari selisih antara berat jar berisi ekstrak dan berat jar kosong [7].

2.5 Uji Fitokimia

Ekstrak yang didapatkan kemudian diambil sedikit lalu dilarutkan dengan pelarut etil asetat di dalam vial, kemudian ditotol pada plat KLT dan dielusi dengan eluen Kloroform:Etil Asetat (2:8) untuk ekstrak G1A1 dan eluen Kloroform:Etil Asetat (2:1) untuk ekstrak G1A3. Selanjutnya diamati bercak noda yang tampak dibawah lampu UV 254 nm dan 366 nm serta diseprot dengan pereaksi *dragendorff*, AlCl_3 , *Liebermann Burchard*, dan FeCl_3 .

2.6 Uji Toksisitas

Uji toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dilakukan penetasan telur *A. salina* dengan menambahkan air laut yang telah disaring, diberi penerangan dan diaerasi selama 48 jam. Kemudian disiapkan larutan uji berupa ekstrak etil asetat batang bajakah dan ditambahkan 2 tetes DMSO agar larutan uji dapat terlarut. Kemudian larutan uji dibuat konsentrasi 10, 20, 40, 80, 160 ppm sebanyak 10 mL untuk 5 replikasi tiap konsentrasi. Telur yang telah menetas dipindahkan kedalam vial sebanyak 10 ekor kemudian diberi larutan uji sebanyak 2 mL kedalam masing-masing vial uji. Larutan lalu dibiarkan selama 24 jam, diamati dan dihitung jumlah larva mati dari tiap vial uji, selanjutnya dianalisa dengan menggunakan analisis probit menggunakan regresi linear untuk menentukan nilai LC_{50} .

3 Hasil dan Pembahasan

3.1 Rendemen

Isolat fungi endofit yang telah difermentasi kemudian dipisahkan antara biomassa dengan medium PDB dengan kertas saring. Hasil rendemen didapatkan dari perbandingan berat akhir (berat ekstrak yang didapat) dengan berat awal (berat biomassa yang digunakan) dikalikan 100% [7]. Hasil rendemen ekstrak fungi endofit dihasilkan melalui fraksinasi cair-cair dengan perbandingan kultur : pelarut = 1:1 diulangi sebanyak 3 kali pengulangan kemudian

dipekatkan dengan *rotary evaporator* didapatkan berat ekstrak G1A1 sebesar 0,2946 gram dari total berat 3495,5 gram biomassa dan medium PDB didapatkan rendemen sebesar 0,0084%. Ekstrak G1A3 sebesar 0,2702 gram dari total berat 3451,8 gram biomassa dan medium PDB didapatkan rendemen sebesar 0,0078%.

3.2 Skrining Fitokimia

Berdasarkan uji fitokimia yang telah dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) didapatkan hasil senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam masing-masing isolat yang dapat dilihat dari hasil positif setelah dielusi dan disemprotkan pereaksi identifikasi senyawa.

Pereaksi *dragendorff* digunakan pada uji alkaloid dimana hasil positif pada plat KLT setelah disemprot reagen tampak bercak atau noda yang berwarna coklat-jingga [8]. Hasil KLT yang didapat pada sampel uji tidak tampak noda setelah disemprotkan reagen. Sehingga sampel uji diduga tidak memiliki kandungan alkaloid.

Pereaksi $FeCl_3$ digunakan untuk uji polifenol atau tanin dimana hasil positif menghasilkan warna hijau kehitaman atau keabu-abuan. Hal ini terjadi karena terbentuknya senyawa kompleks Fe^{3+} - tanin/polifenol. Salah satu ciri senyawa polifenol adalah memiliki cincin aromatis yang mengandung satu atau dua gugus hidroksil [8]. Pada plat KLT hasil sampel uji ekstrak etil asetat isolat G1A1 menunjukkan perubahan warna keabuan setelah disemprotkan reagen dengan nilai R_f 0,55. Adanya perubahan warna pada plat

sampel uji ekstrak etil asetat isolat G1A1 diduga mengandung senyawa tanin. Sedangkan pada plat KLT hasil sampel uji ekstrak etil asetat isolat G1A3 tidak teridentifikasi perubahan warna setelah disemprotkan reagen, hal ini diduga sampel uji ekstrak etil asetat tidak mengandung senyawa jenis ini.

Pereaksi *Liebermann-Burchard* digunakan untuk mengidentifikasi senyawa steroid dan triterpenoid dimana hasil positif menunjukkan warna biru kehijauan untuk senyawa steroid dan warna kecoklatan atau violet untuk senyawa triterpenoid [9]. Hasil pada plat KLT sampel uji ekstrak etil asetat isolat G1A1 maupun ekstrak etil asetat isolat G1A3 positif menunjukkan warna violet pada plat KLT setelah disemprot reagen dengan nilai R_f masing-masing sebesar 0,6 dan 0,5. Adanya perubahan warna pada plat diduga sampel uji ekstrak etil asetat isolat G1A1 dan G1A3 mengandung triterpenoid.

Pereaksi $AlCl_3$ digunakan untuk menentukan kandungan senyawa flavonoid dimana hasil positif ditunjukkan dengan tampak noda berwarna kuning dibawah lampu UV 254 nm. Hal ini bertujuan agar noda yang dihasilkan akan lebih tampak [8]. Hasil pada plat KLT sampel uji ekstrak etil asetat isolat G1A3 menunjukkan noda warna kuning setelah disemprot reagen dan disinari dibawah lampu UV 254 nm dengan nilai R_f sebesar 0,9. Sedangkan sampel uji ekstrak etil asetat isolat G1A1 tidak menunjukkan noda warna kuning setelah disemprot reagen dan disinari dibawah lampu UV 254 nm. Sehingga ekstrak etil asetat isolat G1A3 diduga mengandung flavonoid.

Tabel 1. Hasil Fitokimia Sampel Uji Ekstrak Etil Asetat Isolat G1A1 dan G1A3

| Pereaksi | Fitokimia | Warna yang dihasilkan | Sampel Uji Ekstrak Etil Asetat | | Nilai R_f | |
|----------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------|-------------|------|
| | | | G1A1 | G1A3 | G1A1 | G1A3 |
| <i>Dragendorff</i> | Alkaloid | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| $FeCl_3$ | Polifenol/tanin | Keabu-abuan | (+) | (-) | 0,55 | (-) |
| <i>Liebermann-Burchard</i> | Steroid dan triterpenoid | Violet | (+) | (+) | 0,6 | 0,5 |
| $AlCl_3$ | Flavonoid | Kuning dibawah lampu UV 256 nm | (-) | (+) | (-) | 0,9 |

Keterangan: (+) senyawa terdeteksi, (-) senyawa tidak terdeteksi

Tabel 2. Nilai LC₅₀ ekstrak etil asetat dari fungi endofit batang bajakah (*U. nervosa*)

| Isolat | Konsentrasi (ppm) | Log ₁₀ Konsentrasi | Total Larva | Total Larva Mati | % Mortalitas | Nilai Probit | Regresi Linear | LC ₅₀ (ppm) |
|--------|-------------------|-------------------------------|-------------|------------------|--------------|--------------|------------------------|------------------------|
| G1A1 | 10 | 1 | 50 | 5 | 10 | 3,72 | $y = 1,0598x - 2,8801$ | 512,86 |
| | 20 | 1,301 | 50 | 14 | 28 | 4,42 | | |
| | 40 | 1,602 | 50 | 20 | 40 | 4,75 | | |
| | 80 | 1,903 | 50 | 24 | 48 | 4,95 | | |
| | 160 | 2,204 | 50 | 26 | 52 | 5,05 | | |
| G1A3 | 10 | 1 | 50 | 9 | 18 | 4,08 | $y = 1,0166x - 2,8633$ | 660,7 |
| | 20 | 1,301 | 50 | 9 | 18 | 4,08 | | |
| | 40 | 1,602 | 50 | 12 | 24 | 4,20 | | |
| | 80 | 1,903 | 50 | 23 | 46 | 4,90 | | |
| | 160 | 2,204 | 50 | 29 | 58 | 5,20 | | |

3.3 Uji Bioaktivitas dengan Metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test)

Pengujian bioaktivitas pada penelitian ini dilakukan dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) menggunakan hewan uji berupa larva *A. salina*. Metode ini menjadi metode awal untuk mengetahui potensi aktivitas dari ekstrak atau senyawa murni. Hewan uji dalam penelitian ini adalah *A. salina* karena hewan uji ini sensitif terhadap perubahan kondisi lingkungan. Bahkan bahan kimia yang ada di lingkungan. Selain mudah dilakukan, murah dan sederhana, metode ini tidak memerlukan sampel uji yang banyak, namun hasil yang diperoleh cukup akurat [3],[8]. Pengujian ini bertujuan untuk melihat toksisitas ekstrak etil asetat dari fungi endofit batang bajakah dalam mematikan larva *A. salina* yang telah diberi perlakuan dengan konsentrasi 10, 20, 40, 80, dan 160 ppm. Hasil uji toksisitas disajikan pada tabel 2.

Berdasarkan nilai toksisitas, dikategorikan toksik apabila suatu ekstrak tumbuhan memiliki nilai LC₅₀ < 1000 mg/L. Nilai LC₅₀ adalah nilai yang menunjukkan suatu ekstrak dapat membunuh setengah populasi hewan uji dalam rentang waktu tertentu. LC₅₀ bertujuan untuk menghitung tingkat kematian *A. salina* karena sensitifitas respon tubuhnya terhadap lingkungan dan cemaran serta memiliki organ pencernaan yang sederhana. Kematian *A. salina* membuktikan bahwa ekstrak uji memiliki senyawa metabolit sekunder yang bersifat toksik. Sehingga ketika tertelan oleh *A. salina* akan menimbulkan efek *antifeedant* yang menyebabkan kerusakan metabolisme dalam tubuh larva. Akibatnya, *A. salina* tidak bisa memakan makanannya dan terjadi kematian [8],[10].

Berdasarkan nilai toksisitas pada Tabel 2 didapatkan nilai LC₅₀ ekstrak etil asetat isolat G1A1 dan isolat G1A3 memiliki nilai 512,86 ppm dan 660,7 ppm secara berturut-turut. Kedua ekstrak ini dapat dikategorikan toksik berdasarkan nilai toksisitas.

4 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa isolat fungi endofit batang bajakah yang berhasil diisolasi sebanyak 2 isolat, isolat G1A1 dan isolat G1A3 dengan rendemen sebesar 0,0084% dan 0,0078%. Kandungan metabolit sekunder dari isolat G1A1 adalah tanin (Rf = 0,55) dan triterpeoid (Rf = 0,6) dan isolat G1A3 adalah triterpenoid (Rf = 0,5) dan flavonoid (0,9). Nilai LC₅₀ isolat G1A1 dan G1A3 adalah sebesar 512,86 ppm dan 660,7 ppm. Berdasarkan nilai LC₅₀ yang didapatkan kedua isolat dapat dikategorikan toksik dan berpotensi sebagai sitotoksik.

5 Pernyataan

5.1 Kontribusi Penulis

Khoirunnisa sebagai peneliti, pengumpulan data pustaka, penyiapan data manuskrip. Rolan Rusli, Novianty Indjar Gama, dan M. Arifuddin sebagai pengarah, pembimbing, serta penyalaras manuskrip.

5.2 Konflik Kepentingan

Tidak ada konflik kepentingan dalam penelitian ini

6 Daftar Pustaka

- [1] Dodo, Sholihah, S. M., & Yuzammi. 2016. *Koleksi Kebun Raya Banua Tumbuhan Berpotensi Obat* (J. R. Winoto (ed.); 1st ed.). LIPI Press.

- [2] Turner, I. M. 2018. A revised conspectus of *Uncaria* (Rubiaceae). *Webbia*, 73(1), 9–21.
- [3] Maulina, S., Pratiwi, D. R., & Erwin. 2019. Skrining Fitokimia dan Bioaktivitas Akar *Uncaria nervosa* Elmer (BAJAKAH). *Jurnal Atomik*, 4(2), 100–102.
- [4] Elviasari, J., Rusli, R., & Ramadhan, A. M. (2016). Identifikasi Metabolit Sekunder Dan Uji Aktivitas Antibakteri Isolat Jamur Endofit Daun Beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less.). *J. Sains Kes.*, 1(5), 214–220. <https://doi.org/10.25026/jsk.v1i5.42>.
- [5] Anam, S., Syamsidi, A., Ambianti, N., Widodo, A., & Zubair, M. S. 2022. Isolasi jamur endofit dari benalu batu (*Begonia Medicinalis*) dan toksisitasnya terhadap *Artemia Salina*. *Jurnal Ilmiah Farmasi (Scientific Journal of Pharmacy)*, 20–30.
- [6] Pakaya, M. S. 2022. Isolasi dan Karakterisasi Jamur Endofit Lamun (*Thalassia hemprichii*) Dari Kawasan Teluk Tomini. *Journal Syifa Sciences and Clinical Research*, 4, 519–524.
- [7] Ramadhani, A., Arifuddin, M., & Rusli, R. 2021. Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Ekstrak Fungi Endofit Akar Kuning (*Arcangelisia flava* L. Merr.). *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences, April 2021*, 135–138.
- [8] Wahyu Ningdyah, A., Hairil Alimuddin, A., & Jayuska, A. 2015. Uji toksisitas dengan metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) Terhadap Hasil Fraksinasi Ekstrak Kulit Buah Tampoi (*Baccaurea macrocarpa*). *JKK*, 4(1), 75–83.
- [9] Olivia Intan Kinam, B., Rusli, R., Cahyo Prabowo, W., & Salam, S. 2021. Skrining Fitokimia dan Profil KLT Ekstrak dan Fraksi dari Daun Berenuk (*Crescentia cujete* L.)serta Uji DPPH. *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences, April 2021*, 135–138.
- [10] Dewi, S. I. M., Ardana, M., & Rijai, L. 2016. Kandungan metabolit sekunder dan uji aktivitas daun pila pila (*Mallotus paniculatus*). *Prosiding Seminar Nasional Kefarmasian Ke-4*, 20–21.