

# ENDOFIT *Taxus sumatrana* (Miquel) de Laubenfels DAN POTENSINYADALAM MEMPRODUKSI SENYAWA BIOAKTIF SEBAGAI SUMBER ANTIOKSIDAN<sup>1</sup> [Endophytes of *Taxus sumatrana* (Miquel) de Laubenfels and Its Potential on Producing Bioactive Compound as Antioxidant Agent]

Harmastini Sukiman

Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI

Jin Raya Jakarta-Bogor Km 46 Cibinong 16911

email: harmastini@yahoo.com

## ABSTRACT

*Taxus sumatrana* (Miquel) de Laubenfels is known as an endanger forest tree species grown at Kerinci National Park in Jambi, Indonesia. This plant was known potential on producing taxol. Taxol is a bioactive compound, could be used as antibacterial agent and recently confirmed to cure cancer cells. For the first time in 1960, Arthur Barclay found the taxol compound from *Taxus* sp. (pacific yew). However to isolate the bioactive compound, huge amount of tree biomass is needed. Research on endophytes microbes which are isolated from inner tissue of *Taxus* sp. declared that those microbes have potential on producing antioxidant agent for drug discovery. Isolation and conservation of endophytes and selecting its potential is promising the novel of finding new drug that may be effective for treating the newly developing diseases in human. Fifteen isolates of *Taxus* endophytes have been successfully studied on their ability on producing antioxidant. The results showed that endophytes fungus isolates TsC-17, isolated from *Taxus sumatrana* grown in Cibodas Botanical Gardens-LIPI, could produce extracellular bioactive compound which performed activity of suppressing free radical, is significantly better compared to intracellular bioactive compound even though it is not as high as in vitamin C. The activity of suppressing free radical resulted from bioactive compound of endophyte fungus isolates TsC-17 was 20% for intracellular bioactive compound, while it was 60% for extracellular bioactive compound and 90% for vitamin C.

Kata kunci/ keywords: *Taxus sumatrana*, endofit/endophytes, taxol

## PENDAHULUAN

Gaya hidup modern dapat meningkatkan resiko timbulnya berbagai penyakit misalnya kebiasaan merokok, konsumsi minuman beralkohol yang berlebihan dan asupan makanan berlemak. Kondisi lingkungan yang semakin buruk karena berbagai polusi udara, juga dapat mengakibatkan terbentuknya radikal bebas yang beresiko bagi kesehatan manusia. Di dalam tubuh, radikal bebas akan menyebabkan timbulnya reaksi berantai yang dapat merusak makromolekul pembentuk sel, sehingga sel menjadi rusak, mati atau bermutasi. Hal ini merupakan salah satu penyebab berbagai penyakit degeneratif, seperti kanker dan penuaan dini sel. Proses reaksi berantai tersebut sebenarnya dapat dihambat oleh zat antioksidan yang bersifat menetralkan radikal bebas. Saat ini, antioksidan dari bahan alam banyak diteliti oleh para ahli kimia dan kesehatan karena perannya yang dapat menetralkan dan melawan radikal bebas dan menghambat terjadinya oksidasi pada sel tubuh. Dengan demikian antioksidan alami dapat mengurangi terjadinya kerusakan sel (Winarsih, 2007).

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat memberikan elektron (*electron donors*) kepada

senyawa yang bersifat oksidan (radikal bebas) sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut bisa dihambat. Antioksidan adalah zat yang dapat menetralkan radikal bebas (*free radical scavenger*), sehingga atom-atom molekul yang mempunyai elektron yang tidak berpasangan dapat berpasangan dan menjadi stabil (Strobel, 2004).

Sejauh ini pemanfaatan sumber daya hayati terutama tumbuhan obat dilakukan dengan cara eksplorasi fitokhemis. Kelemahan cara ini, untuk mendapatkan senyawa bioaktif yang akan dijadikan obat diperlukan biomassa tumbuhan yang cukup banyak. Namun dengan ditemukannya mikroba endofitik penghasil metabolit sekunder yang berpotensi, maka penelitian dengan memanfaatkan mikroba endofit mulai banyak dikembangkan.

Mikroba endofit adalah mikroba yang hidup di dalam jaringan tumbuhan dan dalam siklus hidupnya dapat membentuk koloni tanpa membahayakan tumbuhan inangnya (Song, 1998). Mikroba ini hidup bersimbiosis mutualistik dengan tumbuhan inangnya.

Mikroba endofit diisolasi dari jaringan tumbuhan dapat ditumbuhkan pada medium tumbuh

<sup>1</sup>Diterima: 5 Juli 2010 - Disetujui: 04 Agustus 2010

artifisial. Di dalam medium tersebut mikroba endofit akan menghasilkan metabolit yang hampir sama dengan senyawa aktif yang berasal dari tumbuhan inangnya (Strobel et al., 1998).

Indonesia adalah negara yang kaya akan sumber daya alam yang memiliki biodiversitas tumbuhan yang sangat bermanfaat bagi kehidupan dan kesehatan manusia. Dari sekian banyak tumbuhan berpotensi obat, tanaman Kayu Taji, *Taxus sumatrana* (Miquel) de Laubenfels (*Taxaceae*) yang terdapat di Sumatera telah banyak diteliti dalam kemampuannya menghasilkan senyawa taxol yang bersifat anti kanker, cepalomanin, 7-ep/-10-deasetiltaksol, dan 7-epi-10-deasetil cepalomanin (Kitagawa, 1995) (Gambar 1).

Taxol dan derivatnya merupakan senyawa antikanker pertama yang dihasilkan oleh mikroba endophytes. Pada awal tahun 1990, penelitian tentang isolasi mikroba endofit dari tanaman yew belum berhasil, namun beberapa tahun kemudian penemuan isolat endofit penghasil taxol yakni *Taximyces andreanae* ditemukan di *Taxus brevifolia* (Strobel et al., 1993) walaupun spesies jamur endofit yang sering ditemukan di dalam tanaman yew adalah *Pestalotiopsis* spp. (Strobel, 2002a; Strobel, 2002b; Lie et al., 1996, Strobel et al., 1996). Peneliti lain yang juga mengisolasi endofit penghasil taxol melaporkan bahwa taxol dapat dihasilkan oleh jamur *Tubercularia* sp., *Sporormia minima* dan *Trichoterium* sp. (Shen et al., 2003) yang diisolasi dari *Taxus mairei* (*chinese yew*). Beberapa

senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh mikroba endofitik adalah taxol, cryptocin, cryptocandin, jesterone, oocydin pseudomycin dan asam ambuic (Strobel, 2002a).

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari potensi mikroba endofit asal tanaman *Taxus sumatrana* (Miquel) de Laubenfels, dalam menghasilkan senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai antioksidan.

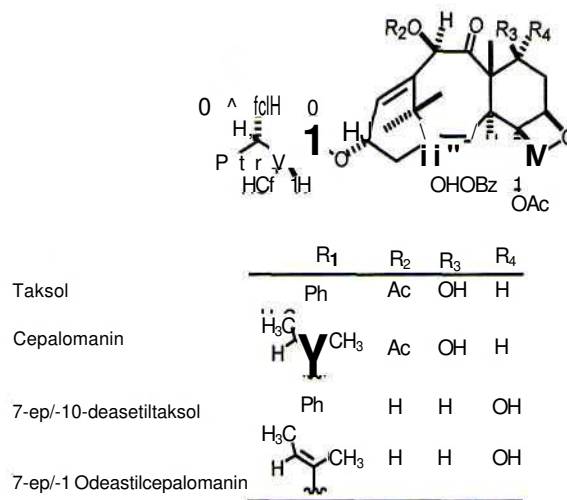
## BAHANDANMETODE

### Mikroorganisme

Penelitian ini menggunakan 15 isolat kapang endofit dari tanaman *Taxus sumatrana* (Miquel) de Laubenfels, yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Cibinong. Ke-15 isolat kapang tersebut diisolasi dari tanaman *Taxus sumatrana* yang ditanam di daerah Cibodas.

Isolasi mikroba endofit dilakukan dengan metode tanam langsung (*direct seed*), yaitu dengan menempelkan belahan ranting atau cabang tanaman yang telah disterilisasi permukaan di atas medium selektif. Medium yang telah berisi potongan batang tumbuhan kemudian diinkubasi pada suhu 30°C dan mikroba endofit yang muncul dari bagian tengah batang yang kemudian dipisahkan untuk selanjutnya dimurnikan (Tanaka et al., 1999).

Masing-masing isolat kapang endofit koleksi yang sudah murni diremajakan dengan cara



Gambar 1. Struktur senyawa taxol dan isomer-isomernya

menumbuhkan pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*).

#### **Produksi biomasa sel kapang endofit**

Produksi biomasa kapang endofit dilakukan dengan cara menumbuhkan kapang tersebut pada media PDB (*Potato Dextrose Broth*). Spora kapang murni dari agar miring diberi sedikit air steril kemudian larutan yang sudah mengandung spora kapang diinokulasikan ke dalam media PDB dan selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar dengan pengocokkan pada kecepatan 120 rpm selama 14 hari. Biomasa kapang dipanen dengan penyaringan kertas saring dan kemudian filtrat diekstraksi dengan etil asetat. Sementara itu biomasa kapangnya dikeringkan dalam oven pada suhu 60-70°C dan selanjutnya juga diekstraksi dengan etil asetat. Hasil ekstrak dipekatkan menggunakan evaporator kemudian ditimbang.

#### **Identifikasi kandungan senyawa dengan KLT**

Identifikasi senyawa dilakukan sebagai tahap awal untuk mengetahui apakah isolat tersebut mengandung senyawa kimia. Fase etil asetat dari biomasa dan filtrat yang telah diuapkan ditotolkan pada fase diam silikagel GF<sub>254</sub>. Fase gerak yang digunakan adalah «-heksan : etil asetat (2:1) dan kloroform : metanol (5:1). Bercak yang timbul pada lempeng KLT diamati pada sinar UV pada panjang gelombang (X) 254 nm dan 365 nm, kemudian disemprot dengan serum sulfat 1 % dan dipanaskan dalam oven pada suhu 110°C selama 5 menit. Bercak yang diperoleh dibandingkan dengan bercak blanko, yaitu ekstrak PDB dengan etil asetat tanpa kapang. Bercak isolat yang memiliki R<sub>f</sub> yang berbeda dengan blanko dipilih untuk diteliti lebih lanjut.

#### **Produksi biomasa sel kapang endofit untuk pengujian aktivitas antioksidan**

Produksi biomasa sel kapang endofit untuk keperluan pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan menginokulasi 1 liter media PDB dengan suspensi biomasa kapang endofit yang berumur 7 hari dengan cara membuat suspensi kapang disiapkan dengan cara menambahkan sejumlah air steril ke dalam isolat murni dalam agar miring PDA dan selanjutnya sebanyak 4 ml diinokulasikan ke dalam 1 liter PDB.

Media yang telah diinokulasi dengan suspensi kapang kemudian diinkubasi dengan kecepatan 120 rpm di atas shaker selama 14 hari pada suhu 20-25°C.

Hasil fermentasi kapang selanjutnya diekstraksi setelah terlebih dahulu diukur pH-nya dengan etil asetat (1:1) sebanyak 3 kali menggunakan corong pisah, lalu didiamkan hingga terpisah fase etil asetat dan fase air. Fase etil asetat dikumpulkan dan diuapkan hingga diperoleh ekstrak kering.

#### **Uji aktivitas antioksidan**

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode peredaman radikal bebas dengan reagen DPPH (1,1 -difenil-2-pikrilhidrazil). Pembuatan larutan 1 mM DPPH ditimbang secara seksama lebih kurang 39,5 mg DPPH (BM 394,2), kemudian dilarutkan dalam 100,0 mL metanol proanalisis, dikocok sampai homogen dan ditempatkan dalam botol gelap. Lima mg ekstrak sampel ditimbang secara seksama dan dilarutkan dalam 5 mL metanol (1000 bpj), kemudian dipipet 125 µl, 250 µl, 625 µl, 1250 µl, 2000 µl ke dalam labu tentukur 5 mL. Tiap labu tentukur ditambahkan 1 mL larutan DPPH 1 mM dan metanol sampai 5 mL kemudian dihomogenkan. Hasilnya diperoleh larutan dengan konsentrasi masing-masing 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm. Segera inkubasikan selama 30 menit pada suhu 37°C. Serapan larutan diukur pada panjang gelombang 515 nm. Sebagai kontrol digunakan vitamin C.

#### **Pembuatan kurva pertumbuhan kapang**

Kurva pertumbuhan kapang dibutuhkan untuk mengetahui umur kapang yang optimal dalam menghasilkan senyawa bioaktif. Sebanyak 2 mL suspensi spora isolat kapang terpilih diinokulasikan ke dalam 100 mL media PDB dan diinkubasi pada suhu 25°C dengan pengocokkan pada kecepatan 120 rpm selama 20 hari. Setiap 4 hari sekali dilakukan pengambilan sampel untuk mengetahui pertumbuhan isolat kapang tersebut. Hasil fermentasi kapang kemudian disaring dengan kertas saring dan dikeringkan dalam oven pada suhu 60-70°C, kemudian biomasa kapang ditimbang bobotnya untuk selanjutnya dibuat kurva pertumbuhan antara waktu sampling dan bobot biomasanya.

**HASIL**

**Karakteristik morfologi isolat kapang endofit tanaman *Taxus sumatrana***

Pengamatan isolat kapang endofit meliputi diameter dan permukaan koloni, terbentuknya zona pertumbuhan, terbentuknya spora/konidia, warna miselium, perubahan yang terjadi pada media dan terdapatnya hifa-hifa baik steril maupun fertil.

Karakteristik morfologi kapang endofit yang diisolasi dari tanaman *Taxus sumatrana* dapat dilihat pada Tabel 1.

**Seleksi kapang endofit yang menghasilkan senyawa bioaktif yang bersifat antioksidan**

**Fermentasi kapang endofit**

Pemanenan biomasa kapang dilakukan pada hari ke-14 setelah proses fermentasi. Pada hari ke-14 senyawa metabolit sekunder yang dieksresikan ke media tumbuh (ekstraseluler) ataupun yang disimpan di dalam jaringan tubuh (intraseluler) diperkirakan telah memproduksi kedua metabolit sekunder ini dapat dipanen dengan cara penyaringan hasil fermentasi, kemudian filtrat (ekstraseluler) dan biomasa (intraseluler) diekstraksi dengan pelarut etilasetat. Hasil penimbangan ekstrak dari filtrat dan biomassa hasil bioproduksi kapang endofit *Taxus sumatrana* dapat dilihat pada Tabel 2.

Dari 15 isolat kapang koleksi Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI yang difermentasikan terlihat bahwa isolat TsC-17, TsC-18 dan TsC-29 merupakan isolat

yang cukup tinggi menghasilkan biomasa kapang yaitu 0,0112, 0,0194 dan 0,0173 gram. Kapang endofit asL tanaman *Taxus* ini kemudian dianalisis dengan KLT dan uji aktifitas antioksidan dengan metode penangkapan radikal bebas menggunakan pereaksi DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazn).

**Analisis kromatografi lapis tipis (KLT) untuk semurn etilasetat hasil bioproduksi endofit *Taxus sumatrana***

Hasil analisis KLT menunjukkan bahwa sistem pelarut w-hexsan: etilasetat (2:1) adalah sistem eluen yang lebih baik dibandingkan dengan pelarut kloroform:metanol(5:1). Hasil pemisahan senyawa aktif dengan n-hexsan : etil asetat menunjukkan adanya bercak (spot) yang jelas dan terpisah dari beberapa senyawa kimia. Hasil KLT dengan menggunakan kedua jenis campuran eluen tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.

**Uji aktivitas antioksidan dengan metode penangkapan radikal bebas menggunakan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)**


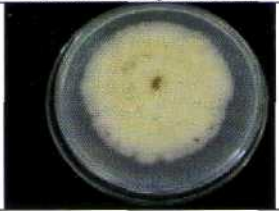






Hasil uji antioksidan terhadap semua ekstrak (filtrat maupun biomasa) menunjukkan bahwa hampir semua ekstrak filtrat mempunyai daya aktivitas meredam radikal bebas lebih besar dari ekstrak biomasa, kecuali untuk ekstrak biomasa dari TsC-10, TsC-12 dan TsC-28. Sedangkan secara keseluruhan, hampir semua ekstrak mempunyai daya aktivitas meredam radikal bebas di bawah 50%, kecuali hasil bioproduksi endofit TsC-17 sebesar 61,353%. Sehingga selanjutnya fermentasi skala besar hanya dilakukan untuk isolat mikroba endofit TsC-17 untuk memperoleh IC<sub>50</sub>, kurva

**Tabel 1.** Karakteristik morfologi kapang endofit dari *Taxus sumatrana*

No	Kode Isolat	Permukaan Bagian Atas	Permukaan Bagian Bawah
1	TsC2		
		Diameter: 83 Konidia/Spora : tidak ada Wama miselium: putih Permukaan Miselium : menyebar, agak terkonsentrasi di bagian tengah	Wama Miselium : bagian tengah kekuningan, bagian pinggir putih Permukaan Miselium : menyebar Perubahan Media : tidak ada

Keterangan : T: *Taxus*  
s : *sumatrana*  
C: Cibodas

lanjutan **Tabel 1.** Karakteristik morfologi kapang endofit dari *Taxus sumatrana*

No	Kode Isolat	Permukaan Bagian Atas	Permukaan Bagian Bawah
2	TsC3		
		Diameter : 74 Konidia/Spora : tidak ada Wama miselium : putih Permukaan Miselium : sedikit menebal, menyebar rata	Wama Miselium : putih kekuningan Permukaan Miselium : menyebar <b>Perubahan Media</b> : tidak ada
3	TsC5		
		Diameter: 71 Konidia/Spora : tidak ada Wama miselium : putih tipis Permukaan Miselium : agak kasar menyebar	Wama Miselium : bagian tengah ada wama coklat sedikit, putih Permukaan Miselium : menyebar Perubahan Media : tidak ada
4	TsC6		
		Diameter: 80 Konidia/Spora : tidak ada Wama miselium : putih Permukaan Miselium : rata menyebar	Wama Miselium : putih kekuningan Permukaan Miselium : rata menyebar Perubahan Media : tidak ada
5	TsC7		
		<b>Diameter:</b> 68 Konidia/Spora : tidak ada Wama miselium : putih Permukaan Miselium : menyebar tetapi tidak rata, memiliki pola tertentu	Wama <b>Miselium</b> : bagian tengah sedikit jingga, putih ada bintik hitam Permukaan Miselium : menyebar dengan pola tertentu Perubahan Media : tidak ada

pertumbuhannya dan identifikasi senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan isolat tersebut.

Data yang menunjukkan hasil uji aktivitas antioksidan pada isolat-isolat kapangendofit *Taxus sumatrana* terdapat pada Tabel 3.









Dari hasil skrining tersebut diperoleh bahwa

pada kapang TsC-17 dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang memiliki daya peredam radikal bebas paling besar dibanding isolat-isolat kapang lainnya.

#### **Kurva pertumbuhan kapang endofit TsC-17**

Kurva pertumbuhan dilakukan untuk

lanjutan Tabel 1. Karakteristik morfologi kapang endofit dari *Taxus sumatrana*








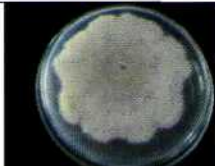




No	Kode Isolat	Permukaan Bagian Atas	Permukaan Bagian Bawah
6	TsC8		
		Diameter: 69 Konidia/Spora : tidak ada Wama miselium : putih Permukaan Miselium : tidak rata, menyebar	Wama Miselium : bagian sebelum tengah membentuk garis jingga, putih Permukaan Miselium : rata, menyebar Perubahan Media : tidak ada
7	TsC 10		
		Diameter: 74 Konidia/Spora : tidak ada Wama miselium : putih Permukaan Miselium : kasar, tidak rata, menyebar	Wama Miselium : bagian yang tua coklat jingga, pinggir putih Permukaan Miselium : rata, pinggir tidak teratur Perubahan Media : tidak ada
8	TsC 12		
		Diameter: 71 Konidia/Spora: tidak ada Warna miselium : putih, ada sedikit hijau Permukaan Miselium : tidak rata, menyebar	Wama Miselium : membentuk garis tumbuh coklat, hijau putih bagian pinggir Permukaan Miselium : rata menyebar Perubahan Media : tidak ada
9	TsC 13		
		Diameter: 78 Konidia/Spora : tidak ada Wama miselium : putih hijau Permukaan Miselium : ada penebalan, menyebar	Wama Miselium : bagian tengah kuning muda, pinggir putih Permukaan Miselium : rata menyebar Perubahan Media : tidak ada

mengetahui waktu optimum yang diperlukan untuk menghasilkan senyawa bioaktif kapang endofit TsC-17. Hasil pengamatan data kurva pertumbuhan isolat TsC-17 selama 20 hari ditunjukkan pada Tabel 4 dan Gambar 5.

Fase pertumbuhan kapang ditentukan oleh waktu pertumbuhannya. Hari ke-0 sampai hari ke-4 kapang TsC-17 mengalami fase adaptasi (fase lag),

kapang beradaptasi dengan lingkungan tumbuhnya. Setelah mampu beradaptasi dengan lingkungannya, kapang akan mulai tumbuh. Kapang mengalami fase pertumbuhan (fase log) dari hari ke-4 sampai hari ke-12, pada fase ini terlihat adanya peningkatan jumlah sel. Setelah hari ke-12 sampai hari ke-14 kurva pertumbuhan menunjukkan bahwa kapang mulai memasuki fase stasioner. Pada fase ini sel tidak

lanjutan **Tabel 1.** Karakteristik morfologi kapang endofit dari *Taxus sumatrana*

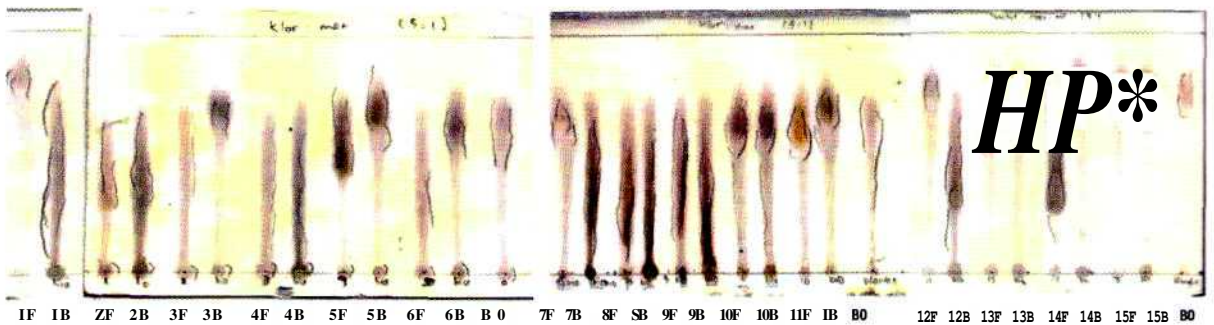
No	Kode Isolat	Permukaan Bagian Atas	Permukaan Bagian Bawah
10	TsC 15		
		Diameter: 62 Konidia/Spora : tidak ada Waraa miselium : hijau muda, putih Permukaan Miselium : tidak rata	Wama Miselium : hijau hitam Permukaan Miselium : rata, memiliki pola pertumbuhan Perubahan Media : tidak ada
11	TsC 17		
		Diameter: 76 Konidia/Spora : tidak ada Warna miselium : putih, coklat-hijau Permukaan Miselium : sedikit bergelombang	Warna Miselium : putih-kuning Permukaan Miselium : rata, ada pola pertumbuhan Perubahan Media : tidak ada
12	TsC 18		
		Diameter: 88 Konidia/Spora : tidak ada Warna miselium : putih Permukaan Miselium : rata	Warna Miselium : putih Permukaan Miselium : rata Perubahan Media : tidak ada
13	TsC 27		
		Diameter: 82 Konidia/Spora : tidak ada Warna miselium : putih Permukaan Miselium : hamper rata	Warna Miselium : putih kekuningan Permukaan Miselium : rata, ada pola pertumbuhan Perubahan Media : tidak ada
14	TsC 28		
		Diameter: 57 Konidia/Spora : tidak ada Warna miselium : putih hijau Permukaan Miselium : tidak rata	Wama Miselium : hitam hijau Permukaan Miselium : rata Perubahan Media : tidak ada
No	Kode Isolat	Permukaan Bagian Atas	Permukaan Bagian Bawah
15	TsC 29		
		Diameter : 71 Konidia/Spora : tidak ada Wama miselium : putih Permukaan Miselium : rata	Waraa Miselium : putih jingga Permukaan Miselium : rata Perubahan Media : tidak ada

**Tabel 2.** Hasil penimbangan ekstrak dari filtrat (ekstraseluler) dan biomassa (intraseluler) hasil bioproduksi kapang endofit *Taxus sumatrana*

No	Kode Isolat	Filtrat/ Biomassa	Berat (mg)
1	TsC2	F	0,0052
		B	0,0062
2	TsC3	F	0,0025
		B	0,0105
3	TsC5	F	0,0010
		B	0,0679
4	TsC6	F	0,0073
		B	0,0582
5	TsC7	F	0,0077
		B	0,0436
6	TsC8	F	0,0101
		B	0,0403
7	TsC10	F	0,0061
		B	0,0358
8	TsC 12	F	0,0109
		B	0,0367
9	TsC 13	F	0,0021
		B	0,0047
10	TsC 15	F	0,0024
		B	0,0120

No	Kode Isolat	Filtrat/ Biomassa	Berat (g)
11	TsC 17	F	0,0033
		B	0,0112
12	TsC 18	F	0,0058
		B	0,0194
13	TsC 27	F	0,0072
		B	0,0057
14	TsC 28	F	0,0063
		B	0,0029
15	TsC 29	F	0,0059
		B	0,0173

Keterangan: T : *Taxus* s : *sumatrana* C : Cibodas  
 F : Filtrat  
 B : Biomassa

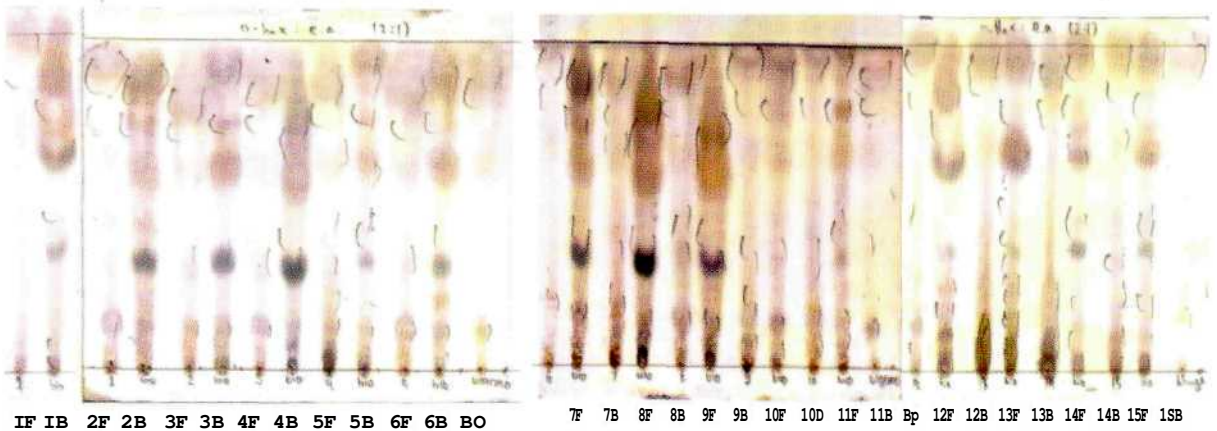


**Gambar 2.** Kromatogram KLT senyawa kimia hasil bioproduksi kapang endofit *Taxus sumatrana* (kloroform-metanol = 5:1)

Keterangan :  
 Lempeng : silika gel F<sub>254</sub>  
 Penyemprot : Serium sulfat 10%  
 Eluen : A. n-heksan : etilasetat = 2 : 1  
 B. kloroform : metanol = 5 : 1  
 : Filtrat; B = Biomassa  
 ( : spot terlihat pada UV 366 nm  
 ) : spot terlihat pada UV 254 nm  
 Gambar 3 : Hasil KLT dengan eluen kloroform : metanol = 5 : 1  
 Gambar 4 : Hasil KLT dengan eluen n-heksan : etilasetat = 2 : 1

<b>1F</b>	TsC-2 filtrat	6F	TsC-8 filtrat	11F	TsC-17 filtrat
<b>1B</b>	TsC-2 biomassa	6B	TsC-8 biomassa	11B	TsC-17 biomassa
<b>2F</b>	TsC-3 filtrat	7F	TsC-10 filtrat	12F	TsC-18 filtrat
<b>2B</b>	TsC-3 biomassa	7B	TsC-10 biomassa	12B	TsC-18 biomassa
3F	TsC-5 filtrat	8F	TsC-12 filtrat	13F	TsC-27 filtrat
3B	TsC-5 biomassa	8B	TsC-12 biomassa	13B	TsC-27 biomassa
4F	TsC-6 filtrat	9F	TsC-13 filtrat	14F	TsC-28 filtrat
4B	TsC-6 biomassa	9B	TsC-13 biomassa	14B	TsC-28 biomassa
5F	TsC-7 filtrat	10F	TsC-15 filtrat	15F	TsC-29 filtrat
5B	TsC-7 biomassa	10B	TsC-15 biomassa	15B	TsC-29 biomassa





**Gambar 3.** Kromatogram KLT senyawa kimia hasil bioproduksi kapang endofit *Taxus sumatrana* («-heksan-etilasetat = 2:1)

Keterangan :  
 Lempeng : silika gel F<sub>254</sub>  
 Penyemprot : Serum sulfat 10%  
 Eluen : A. n-heksan : etilasetat = 2 : 1  
 B. kloroform : metanol = 5 : 1  
 : Filtrat; B = Biomassa  
 £ : spot terlihat pada UV 366 nm  
 ) : spot terlihat pada UV 254 nm  
 Gambar 3 : Hasil KLT dengan eluen kloroform : metanol = 5 : 1  
 Gambar 4 : Hasil KLT dengan eluen n-heksan : etilasetat = 2 : 1

1F	TsC-2 filtrat	6F	TsC-8 filtrat	11F	TsC-17 filtrat
1B	TsC-2 biomassa	6B	TsC-8 biomassa	11B	TsC-17 biomassa
2F	TsC-3 filtrat	7F	TsC-10 filtrat	12F	TsC-18 filtrat
2B	TsC-3 biomassa	7B	TsC-10 biomassa	12B	TsC-18 biomassa
3F	TsC-5 filtrat	8F	TsC-12 filtrat	13F	TsC-27 filtrat
3B	TsC-5 biomassa	8B	TsC-12 biomassa	13B	TsC-27 biomassa
4F	TsC-6 filtrat	9F	TsC-13 filtrat	14F	TsC-28 filtrat
4B	TsC-6 biomassa	9B	TsC-13 biomassa	14B	TsC-28 biomassa
5F	TsC-7 filtrat	10F	TsC-15 filtrat	15F	TsC-29 filtrat
5B	TsC-7 biomassa	10B	TsC-15 biomassa	15B	TsC-29 biomassa

memperbanyak diri lagi, laju pembiakan berkurang dan akan terbentuk spora karena menyusutnya nutrisi dalam media. Fase ini diasumsikan akan terjadi sekresi senyawa bioaktif keluar sel (ekstraselular) sementara senyawa aktif yang intraselular akan tetap berada didalam sel tersebut.

**Uji antioksidan dengan metode peredaman radikal bebas menggunakan DPPH hasil bioproduksi TsC-17**

Ekstrak dari filtrat dan biomasa isolat kapang endofit TsC-17 diuji aktivitas antioksidannya dan dibandingkan dengan vitamin C. Adapun metode yang dipakai adalah metode peredaman radikal bebas menggunakan reagen DPPH. Hasil uji aktivitas antioksidan dari vitamin C dan tiap fraksi dari isolat kapang TsC-17 dapat dilihat pada Gambar 6.

Pada uji aktivitas antioksi dan isolat kapang TsC-17 terlihat bahwa senyawa bioaktif yang diekskresikan

(ekstraselular) oleh kapang isolat menunjukkan aktivitas peredaman radikal bebas yang lebih baik dibandingkan dengan senyawa bioaktif yang tidak diekskresikan (intraselular), walaupun demikian hasil senyawa bioaktif tersebut tidak memiliki aktivitas lebih baik dari vitamin C.

**PEMBAHASAN**

Kapang endofit yang diisolasi dari tanaman *Taxus sumatrana* menunjukkan jenis koloni yang berbeda-beda. Pertumbuhan dalam media PDA memberikan karakter-karakter khusus sehingga bisa merupakan karakter spesifik bagi jenis kapang tersebut. Isolat TsC-17 mempunyai karakter koloni dengan pinggiran yang bergelombang, spora berwarna putih kuning dan setelah agak tua akan berwarna hijau kecoklatan. Produksi senyawa aktif ekstraselular tidak menyebabkan perubahan warna media.

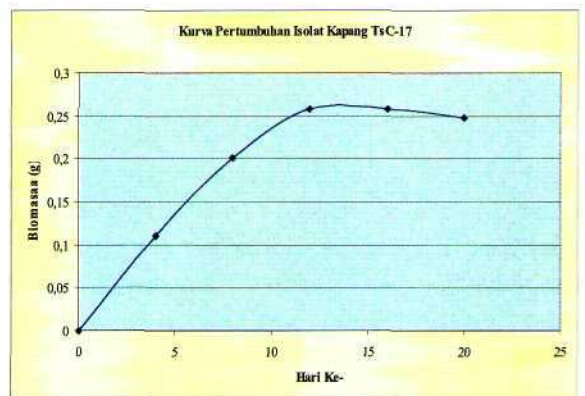
**Tabel 3.** Hasil uji aktivitas peredaman radikal bebas untuk semua ekstrak hasil bioproduksi kapang endofit *Taxus sumatrana*

No	Kode Isolat	Absorban	Rerata	Absorban Blangko	Inhibisi (%)
1.	TsC 2 F	1,9563	1,9599	2,0238	3,1567
		1,9478			
		1,9756			
	B	1,9425	1,9733		2,4761
		1,9899			
		1,9875			
2.	TsC 3 F	1,7895	1,7972	2,1205	15,2464
		1,8059			
		1,7962			
	B	1,8509	1,8543		12,5536
		1,8496			
		1,8624			
3.	TsC 5 F	1,9829	1,9845	2,1813	9,0221
		1,9852			
		1,9855			
	B	2,0639	2,0637		5,3913
		2,0635			
		2,0637			
4.	TsC 6 F	1,8660	1,8688	2,1813	14,3263
		1,8690			
		1,8714			
	B	1,9937	1,9985		8,3803
		2,0049			
		1,9970			
5.	TsC 7 F	2,0683	2,072	2,1813	3,985
		2,0784			
		2,0764			
	B	2,0811	2,087		3,290
		2,0892			
		2,0922			
6.	TsC 8 F	2,0537	2,0599	2,1813	5,5654
		2,0614			
		2,0647			
	B	2,0627	2,0716		5,0291
		2,0659			
		2,0861			
7.	TsC 10 F	2,1044	2,1108	2,1813	2,2320
		2,1140			
		2,1141			
	B	2,0749	2,0871		4,3185
		2,0935			
		2,0929			
8.	TsC 12 F	2,1301	2,1262	2,1813	2,5260
		2,1295			
		2,1189			
	B	1,5825	1,5865		27,2681
		1,5892			
		1,5877			
9.	TsC 13 F	1,3681	1,3717	2,1205	35,3124
		1,3729			
		1,3740			
	B	1,5938	1,6071		24,2113
		1,6338			
		1,5937			
10.	TsC 15 F	1,7400	1,7469	2,1205	17,6185
		1,7490			
		1,7516			
	B	1,9864	2,0312		4,2113
		2,0452			
		2,0621			

No	Kode Isolat	Absorban	Rerata	Absorban Blangko	Inhibisi (%)
11.	TsC 17 F	0,8465	0,8347	2,1205	M.Ld.Viri
		0,8412			
		0,8153			
	B	1,5899	1,6796		20,7923
		1,6987			
		1,7502			
12.	TsC 18 F	1,9899	1,9249	2,0238	4,8915
		1,9017			
		1,8831			
	B	1,9573	1,9472		3,7832
		1,9461			
		1,9382			
13.	TsC 27 F	1,3486	1,3521	2,0238	34,7268
		1,3530			
		1,3547			
	B	1,7267	1,7355		14,2455
		1,7372			
		1,7425			
14.	TsC 28 F	1,9756	1,9875	2,0238	1,7937
		1,9955			
		1,9914			
	B	1,9358	1,9715		2,5842
		1,9869			
		1,9917			
15.	TsC 29 F	1,9246	1,9146	2,0238	5,3958
		1,9096			
		1,9096			
	B	1,9617	1,9723		2,5447
		1,9753			
		1,9799			

**Tabel 4.** Hasil penimbangan bobot massa isolat kapang TsC-17 selama 20 hari

No.	Hari ke-	pH	Bobot Biomassa (g)
1.	0	4,66	0,0000
2.	4	4,61	0,1103
3.	8	4,51	0,2019
4.	12	4,42	0,2587
5.	16	4,40	0,2580
6.	20	5,53	0,2483



**Gambar 4.** Kurva pertumbuhan isolat kapang TsC-17

**Tabel 5.** Hasil uji aktivitas peredaman radikal bebas dari Vitamin C

No	Konsentrasi (ppm)	Absorban	Rerata	Persen hambatan (%)	IC <sub>50</sub> (ppm)
1	3	1,8362	1,8638	11,9146	8,2848
		1,8644			
		1,8908			
2	6	1,4149	1,4204	32,8702	
		1,4221			
		1,4241			
3	9	0,9729	0,9740	53,9676	
		0,9741			
		0,9750			
4	12	0,4013	0,4027	80,9679	
		0,4027			
		0,4042			
5	15	0,0829	0,0830	96,0773	
		0,0830			
		0,0831			
Blanko	Blanko	2,1139	2,1159		
		2,1201			
		2,1138			

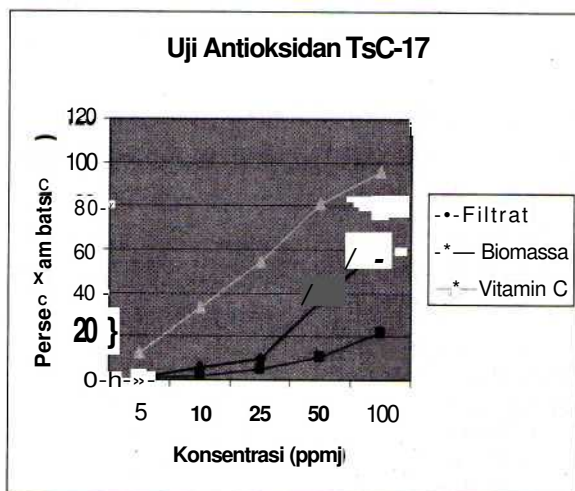
**Tabel 6.** Hasil uji aktivitas peredaman radikal bebas dari Filtrat kapang TsC-17

No	Konsentrasi (ppm)	Absorban	Rerata	Persen Hambatan (%)	IC <sub>50</sub> (ppm)
1	5	2,1011	2,1029	0,6144%	79,7506
		2,1019			
		2,1057			
2	10	2,0031	2,0033	5,3216%	
		2,0075			
		1,9993			
3	25	1,8712	1,9175	9,3766%	
		1,8901			
		1,9912			
4	50	1,3421	1,3414	36,6038%	
		1,3455			
		1,3365			
5	100	0,8124	0,8184	61,3214%	
		0,8129			
		0,8301			
Blanko	Blanko	2,1139	2,1159		
		2,1201			
		2,1138			

**Tabel 7.** Hasil uji aktivitas peredaman radikal bebas dari biomassa kapang TsC-17

No	Konsentrasi (ppm)	Absorban	Rerata	Persn hambatan (%)	IC <sub>50</sub>
1	5	2,1087	2,1073	0,4065%	227,3848
		2,1083			
		2,1049			
2	10	2,0804	2,0797	1,7109%	
		2,0798			
		2,0789			
3	25	2,0187	2,0199	4,5371%	
		2,0198			
		2,0213			
4	50	1,8935	1,8914	10,6101%	
		1,8893			
		1,8915			
5	100	1,6578	1,6593	21,5794%	
		1,6608			
		1,6593			
Blanko	Blanko	2,1139	2,1159		
		2,1201			
		2,1138			

**Uji Antioksidan TsC-17**



**Gambar 5.** Kurva hasil uji aktivitas peredaman radikal bebas dari isolat kapang TsC-17

Untuk melihat adanya produksi senyawa bioaktif, metoda khromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metoda yang cukup efisien untuk diterapkan. Selain itu pemilihan pelarut yang cocok juga sangat menentukan hasil yang optimal. Walaupun metode KLT ini mempunyai tingkat pemisahan yang rendah, tetapi dapat digunakan sebagai uji pendahuluan dalam mengidentifikasi senyawa kimia dan pemilihan sistem pelarut untuk analisa kromatografi kolom atau kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).

Uji aktifitas meredam radikal bebas menunjukkan bahwa kapang TsC-17 mampu menghasilkan senyawa antioksidan hingga lebih dari 61.35 %. Sementara kapang-kapang yang lain masih dibawah 50%.

Kapang endofit TsC-17 mampu menghasilkan senyawa antioksidan cukup signifikan yakni pada konsentrasi 100 ppm, persen hambatan 21.5794 % dengan nilai IC<sub>50</sub> 227.3848 ppm sementara vitamin C pada 100 ppm persen hambatannya adalah 61.3214 % dengan nilai IC<sub>50</sub> 79.7506.

#### KESIMPULAN

Kapang endofitik yang diisolasi dari tanaman *Taxus sumatrana* mempunyai potensi dalam menghasilkan berbagai senyawa bioaktif yang bersifat antioksidan dan antimikroba. Sehingga dapat disimpulkan bahwa endofit yang diisolasi dari tanaman *Taxus* dapat dikembangkan sebagai sumber obat baru.

Senyawa bioaktif yang dieksresikan ekstraselular dari kapang endofitik TsC-17 memiliki aktivitas sedang dalam uji aktivitas antioksidan metode peredaman radikal bebas dengan menggunakan reagen DPPH walaupun masih lebih rendah dibandingkan dengan kemampuan vitamin C.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih khususnya kami sampaikan kepada Dr Partomuan Simanjuntak atas bantuannya dalam memberikan bimbingan dan konsultasi dalam Bidang Analisis Biokimia. Terimakasih juga kami sampaikan kepada Vito S Simanjuntak atas asistensinya. Akhirnya ucapan terima kasih kami tujukan kepada rekan-rekan di Laboratorium Mikrobiologi Tanah, Sylvia Lekatompessy, Tiwit Widowati, Lisye Nürjanah, Nuriyanah dan Bustanusalam yang telah membantu selama kegiatan penelitian ini berlangsung.

#### DAFTAR PUSTAKA

Kitagawa I, Mahmud, T Kobayashi, M Roemantyo and H Shibuya. 1995. Taxol and its related taxoids from the needles of *Taxus sumatrana*. *Chemical Pharmacy Bulletin* 43(2), 365-367.

- Lampe JW. 1999. Health effects of vegetables and fruit: Assessing mechanism of action in human experimental studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70(Suppl), 475S-490S.
- Phongpaichit S, J Nikom, Rungjindamai, J Sakayaroj, TN Hutadilok, V Rukachaisirikul and K Kirtikara. 2007. Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants. *Immunology and Medical Microbiology* 51(3), 517-525.
- Shen Y, YL Pan, KL Lo, SS Wang, YT Chang, LT Wang and YC Lin. 2003. New taxane diterpenoids from Taiwanese *Taxus sumatrana*. *Chemical Pharmacy Bulletin* 7, 867-869.
- Song Y. 1998. Isolation and cultivation of endophytic fungi. *Asian Network on Microbial Researcher*, 255-258.
- Strobel G, and D Long. 1998. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. *Asni News* 63(5), 263.
- Strobel GA, A Stierle, D Stierle and WM Hess. 1993. Taxol formation in yew - *Taxus*. *Plant Science* 92, 1-2.
- Strobel GA. 2002a. Microbial Gift from Rain forest. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24, 14-20.
- Strobel GA. 2002b. Rain Forest Endophytes and Bioactive Product. *Critical Review in Biotechnology* 22(4), 315-333.
- Strobel GA and B Daisy. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Review* 67(4), 491-502.
- Srobel GA, X Yang, J Sears, R Kramer, RS Sidhu, WM Hess. 1996. Taxol from *Pestalotiopsis micropora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology* ;142, 435-440.
- Strobel GA, B Daisy, U Castillo, J Harper. 2004. Natural Product from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Product.*, 67,257-268.
- Tanaka M, H Sukiman, M Takebayashi, K Saito, MS Prana, TK Prana, and F Tomita. 1999. Isolation of Endophytes from plants in Southeast Asia and Japan, and their identification by 18SrRNA gene. In: Annual report of ICBiotech 1999, in press.
- Winarsi H. 2007. Antioksidan alami dan radikal bebas. Yogyakarta: Penerbit Kanisius; Hal 11-7, 49, 77-81.