



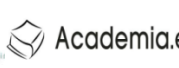
## AKTIVITAS ANTIOKSIDAN METABOLIT SEKUNDER BAKTERI ENDOFIT AKAR TANAMAN

*Moringa oleifera* L (Kelor) .

Zeta Kuntari<sup>1</sup>, Sumpono<sup>2</sup>, Nurhamidah<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup> Program Studi Pendidikan Kimia, Jurusan PMIPA FKIP, Universitas  
Bengkulu

e-mail : zetakuntari96@gmail.com



### Abstract

**[ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SECONDARY METABOLITE FROM ENDOFIT BACTERIA OF *Moringa oleifera* L (KELOR) ROOTS]** The purpose of this research was aims to isolate and measure the ability of antioxidant activity from secondary metabolites produced by endophytic bacteria that grow in the live tissue root of *Moringa oleifera* L. (kelor). Endophytic bacteria were purified and cultured using a solid *Murashige-skoog* (MS) medium for 3 days at room temperature. Secondary metabolites were obtained by centrifugation process at a rate of 3000 rpm for 20 minutes. The bacterial fermentation process using *Nutrient Broth* (NB) medium for 72 hours with a shaker speed at 170 rpm . The suspension supernatant was extracted with a maceration method using 86% ethyl acetate, followed by vacuum rotary evaporator concentration at 40 ° C. The extract antioxidant activity test was performed using the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method using a UV-Vis spectrophotometer at 517 nm wavelength and ascorbic acid as standard. The result of DPPH test showed that the antioxidant activity of ethyl acetate extract of endophytic bacterial from root of *M. oleifera* L root has IC<sub>50</sub> value at 315, 396 ppm. Based on these results, it can be concluded that the secondary metabolite extract of endophytic bacterial from *M. oleifera* L root classified as weak antioxidant (IC<sub>50</sub>> 250 ppm).

**Keywords :** Antioxidant, endophytic bacteria, *Moringa oleifera* L. Kelor.

### Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengukur kemampuan aktivitas anti oksidan dari metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri endofit yang tumbuh di dalam jaringan hidup akar *Moringa oleifera* L.(kelor). Bakteri endofit dimurnikan dan dibiakkan menggunakan medium padat *Murashige-skoog* (MS) selama 3 hari pada suhu ruang. Metabolit sekunder didapatkan melalui proses sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit.dari suspensi hasil proses fermentasi bakteri menggunakan medium *Nutrient Broth* (NB) selama 72 jam dengan kecepatan shaker 170 rpm. Supernatan yang didapatkan selanjutnya diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etil asetat 86 % , , dilanjutkan pemekatan dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40 °C . Uji aktivitas antioksidan ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm dan asam askorbat sebagai standar. Hasil uji DPPH menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat bakteri endofit akar *M. oleifera* L memiliki nilai IC<sub>50</sub> sebesar 315, 396 ppm. Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa ekstrak metabolit sekunder bakteri endofit akar *M. oleifera* L tergolong antioksidan lemah (IC<sub>50</sub> > 250 ppm).

**Kata kunci :** Antioksidan, bakteri endofit, *Moringa oleifera* L. Kelor.

### PENDAHULUAN

Di Indonesia masyarakat masih banyak yang menggantungkan diri pada pengobatan tradisional, termasuk penggunaan obat yang berasal dari bagian tanaman [1] seperti akar, daun, bunga, buah atau biji [2]. Hal ini karena adanya kandungan metabolit sekunder yang memiliki aktivitas biologis sehingga mempunyai potensi dapat dikembangkan sebagai bahan baku obat [3], salah satunya adalah tanaman *Moringa oleifera* L.(Kelor) yang berasal dari daerah pegunungan Himalaya bagian selatan barat laut India. Pada umumnya *M. oleifera* L. ditanam untuk dimanfaatkan akar-

nya, daun, buah, dan bunga, baik sebagai obat-obatan dan kosmetik , pewarna dan pakan ternak dalam bentuk serbuk, teh, tepung, kapsul, minyak, *facial scrub*, *body wash*, dan sebagainya, serta diketahui mengandung lebih dari 40 antioksidan, dan 539 senyawa yang mampu mencegah lebih dari 300 penyakit. [4].

Saat ini sedang berkembang usaha memanfaatkan bakteri endofit yaitu bakteri yang hidup di dalam jaringan tanaman (*xylem dan floem*), akar, daun, buah dan batang sebagai agen pengendali hayati. Bakteri ini tidak membahayakan inangnya, bahkan bersimbiosis secara mutualisme mendapatkan nutrisi dari hasil metabolisme tanaman dan

juga dapat memproteksi tanaman dalam melawan serangan dan mikroba patogen [5].

Bakteri endofit masuk ke dalam jaringan tanaman umumnya melalui akar, sehingga akar akan memiliki populasi yang paling tinggi dibandingkan dengan bagian lainnya [6]. Bakteri endofit memiliki kemampuan untuk memproduksi senyawa metabolit sekunder diduga akibat transfer genetik (*genetic recombination*) dari tanaman inangnya ke dalam bakteri endofit yang memiliki aktivitas biologis yang serupa dengan metabolit sekunder yang diproduksi inangnya. [7].

Pemanfaatan bakteri endofit ini sangat menguntungkan karena siklus hidup mikroba yang lebih singkat dibandingkan siklus hidup tumbuhan inangnya, sehingga dapat menghemat waktu produksi dalam skala besar tanpa menggunakan lahan yang luas, sebagaimana inangnya yang memerlukan waktu yang lebih lama untuk dipanen [8]. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri endofit yang tumbuh di dalam jaringan hidup akar dari tanaman *Moringa oleifera* L. (Kelor) dan mengukur besarnya aktivitas anti oksidan dari metabolit sekunder yang dihasilkan

## METODE PENELITIAN

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain : *Laminar air flow*, mikropipet, blender, pinset, gunting, pisau, *vortex*, sentrifus, autoklaf, cawan petri, neraca analitik, *magnetic stirrer*, labu Erlenmeyer, *shaker*, gelas ukur, labu ukur, hot plate, tabung reaksi, *beaker glass*, bunsen, pipet tetes, corong pisah, kuvet, spektrofotometer, vial, *vacuum rotary evaporator*, corong kaca, cawan prselin, plastic pembungkus, aluminium foil, lemari asam, dan kaca arloji.

Bahan-bahan yang digunakan adalah : Akar kelor yang masih segar, air bersih, alkohol 70%, Natrium hipoklorit (NaOCl) 5,25%, aquades, etil asetat, NB Nutrient Broth (NB), Murashige-skoog (MS), 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH), Asam askorbat, metanol p.a, kloroform, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N, HCl pekat, bubuk magnesium, FeCl<sub>3</sub>, NH<sub>3</sub>, HgCl<sub>2</sub> padatan, NaOH, I<sub>2</sub> padatan, KI padatan, asam asetat glacial, anhidrida asetat, NaCl 10%.

Sampel tanaman *M.oleifera* L yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari daerah Sungai Hitam Kel. Beringin Raya, Bengkulu. Bagian tanaman yang diambil adalah ujung akar yang sehat dengan panjang  $\pm 10$  cm.

Akar Kelor dicuci di bawah air mengalir se-

lama 10 menit. Setelah itu disterilisasi permukaan dalam *Laminar Air Flow* (LAF), agar akar menjadi steril dan terhindar dari mikroba kontaminan. Akar tersebut dimasukan ke dalam alkohol 70% selama 1 menit, lalu dipindahkan ke dalam larutan NaOCl 5,25% selama 5 menit dan kemudian dimasukkan dalam alkohol 70% selama 30 detik [9]. Selanjutnya dibilas dengan aquades steril selama 1 menit sebanyak 2 kali, dan diletakkan di atas kertas saring steril selama 2 menit. Dilanjutkan dengan memotong akar tersebut menggunakan gunting steril dengan ukuran  $\pm 2$  cm.

Penanaman akar *M. oleifera* L dilakukan di medium MS yang bertujuan untuk mengkultur jaringan sel akar agar tetap bertahan hidup di luar inangnya. Masing-masing bagian akar diletakkan di atas medium MS dengan bekas potongan menempel pada medium padat. Inkubasi selama 3 hari pada suhu ruang. Selanjutnya dilakukan fermentasi yang bertujuan untuk produksi metabolit sekunder yang dihasilkan dari aktivitas sel bakteri endofit dengan menggunakan medium NB dalam labu erlenmeyer. Akar kelor berikut bakteri endofit yang tumbuh di sekitar akar kelor pada medium MS diambil satu ose dan dimasukkan ke dalam medium NB, kemudian diinkubasi pada suhu 27 °C selama 72 jam (3 hari) dengan kecepatan shaker 170 rpm agar di dapatkan suspensi bakteri endofit [10].

Suspensi tersebut kemudian dipisahkan menggunakan sentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit, Supernatan selanjutnya diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut organik etil asetat 86%, yang selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40 °C untuk menghilangkan pelarutnya sampai didapat ekstrak kental.

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH yang dibuat dengan konsentrasi 100 ppm dengan pelarut methanol p.a. Kemudian dilakukan pengukuran panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-700 nm. Panjang gelombang maksimum yang didapat digunakan untuk analisis masing-masing sampel.

Pada penelitian ini, digunakan pembanding yakni asam askorbat. Larutan induk dibuat dengan cara melarutkan 10 mg sampel dalam 10 mL methanol p.a sehingga diperoleh konsentrasi larutan induk 1000 ppm. Variasi konsentrasi sampel pembanding asam askorbat yaitu dibuat dengan 3, 6, 9, 12, dan 15 ppm. Sedangkan variasi

sampel ekstrak metabolit sekunder bakteri endofit yaitu 50, 100, 150, 200 dan 250 ppm. Sebanyak 1 mL larutan sampel berbagai konsentrasi ditambahkan dengan 2 mL metanol p.a, kemudian ditam-bah larutan DPPH 100 ppm 1 mL. setelah itu dikocok dengan vortex hingga homogen. Lalu diinkubasi di tempat gelap pada suhu ruang selama 30 menit.

Absorbansi masing-masing variasi sampel diukur pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan. Kemampuan inhibisi radikal DPPH ditentukan dari nilai absorbansi. Besarnya konsentrasi ekstrak larutan uji untuk meredam 50% aktivitas radikal bebas ditentukan dengan nilai  $IC_{50}$  yang dihitung melalui persentase penghambatan absorbansi larutan ekstrak dengan menggunakan persamaan yang diperoleh dari kurva regresi linear.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

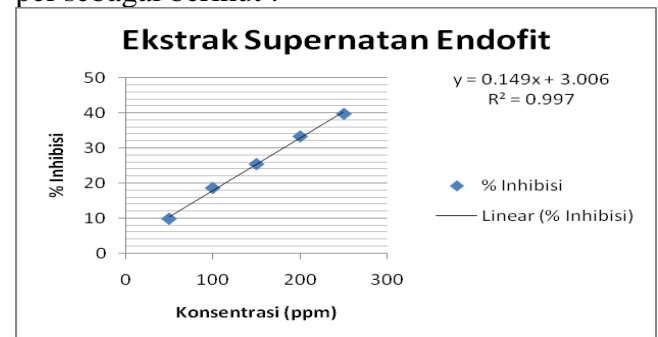
Penelitian dilakukan pada bulan Februari sampai Mei 2017 di laboratorium Hama dan Penyakit Tanaman (HPT) Fakultas Pertanian, Laboratorium Riset Fakultas Kedokteran, Laboratorium *Basic Science* Fakultas MIPA, Laboratorium Pembelajaran Kimia Fakultas KIP Universitas Bengkulu.

Sampel tanaman *M.oleifera* L yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari daerah Sungai Hitam Kel. Beringin Raya, Bengkulu. Bagian tanaman yang diambil adalah ujung akar yang sehat dengan panjang  $\pm 10$  cm.

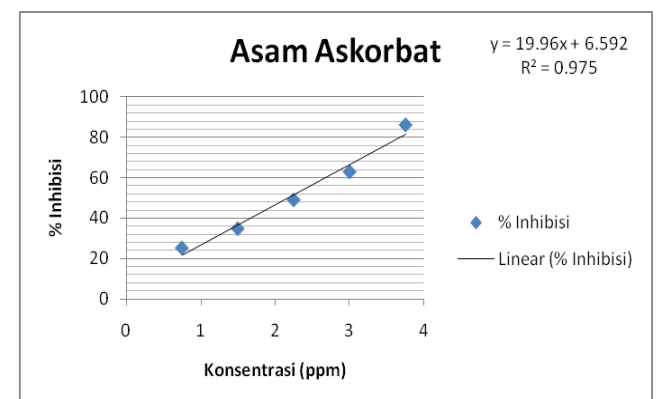
Hasil penanaman akar *M. oleifera* L pada medium MS adalah tumbuhnya bakteri endofit pada jaringan akar dimana hasil dari sterilisasi dapat dikatakan berhasil bila tidak terdapat mikroba kontaminan di permukaan medium MS tersebut setelah 3 hari inkubasi. Proses fermentasi menghasilkan suspensi pada media NB, berupa metabolit sekunder bakteri pada fase stasioner dan bukan pada fase logaritmik. Pada saat fase stasioner yaitu ketika jumlah sel bakteri konstan artinya jumlah bakteri yang mati sama dengan jumlah bakteri yang tumbuh [11], ketika nutrisi untuk bakteri pada medium mulai habis sehingga terjadi kompetisi antar bakteri dan menghasilkan metabolit sekunder untuk mempertahankan diri yang juga bermanfaat untuk tanaman inangnya [12]. Setelah 72 jam proses fermentasi, terjadi perubahan warna media NB dari awal coklat terang menjadi coklat kekuningan keruh yang

menunjukkan bahwa terdapat aktivitas sel bakteri endofit yang memanfaatkan nutrisi pada medium tersebut. Untuk memisahkan supernatan dan biomassa sel bakteri endofit dilakukan dengan sentrifugasi, kemudian supernatan diekstrak dengan pelarut etil asetat 86%, dilanjutkan dengan pemekatan sehingga didapatlah ekstrak kental sebanyak 11 mL untuk dilakukan pengujian lebih lanjut.

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode peredaman DPPH . Panjang gelombang maksimum diperoleh 517 nm. Pembanding yang digunakan yakni asam askorbat. Variasi konsentrasi sampel diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum. Sehingga diperoleh kurva regresi linear masing-masing sampel sebagai berikut :



Gambar 1. Kurva konsentrasi vs % inhibisi



Gambar 2. Kurva konsentrasi vs % inhibisi

Dari kurva regresi linier pada gambar 1 , dapat terlihat bahwa bila semakin besar konsentrasi maka nilai % inhibisi semakin meningkat yang berarti jumlah kandungan metabolit sekunder yang berperan sebagai antioksidan semakin tinggi pula [13]. Hal ini terlihat dari adanya perubahan warna DPPH dari ungu menjadi kuning, yang menunjukkan adanya reduksi radikal DPPH menjadi bentuk yang lebih stabil yaitu DPPH-H [14]. Besarnya nilai dari % inhibisi tersebut digunakan untuk menghitung nilai  $IC_{50}$  sebagai

parameter utama dalam menentukan aktivitas antioksidan. [15]

Persamaan regresi linear hubungan antara konsentrasi ekstrak etil asetat metabolit sekunder bakteri endofit akar *M. oleifera* L. diperoleh  $y = 0,149x + 3,006$ , dan untuk . pembanding asam askorbat  $y = 19,96x + 6,592$ . Dari hasil persamaan regresi linear yang diperoleh dapat ditentukan harga  $IC_{50}$ , yaitu 2,175 ppm untuk Asam Askorbat dan 315,396 ppm untuk metabolit sekunder bakteri endofit. Dari Nilai  $IC_{50}$  untuk metabolit sekunder bakteri endofit akar

*M. oleifera* L. tergolong antioksidan lemah karena nilai  $IC_{50}$ nya  $> 250$  ppm. [16] Aktivitas antioksidan yang lemah ini antara lain disebabkan karena senyawa aktif yang terekstrak bukanlah merupakan senyawa murni antioksidan, dan diduga masih mengandung senyawa lainnya yang bertindak bukan sebagai antioksidan. [17] Untuk asam askorbat termasuk antioksidan kuat karena memiliki nilai  $IC_{50} < 10$  ppm yakni sebesar 2,175 ppm dibandingkan dengan komponen lain yang diujikan.

## KESIMPULAN

Dari hasil penelitian telah berhasil diperoleh isolat bakteri endofit yang bersimbiosis dengan akar *M. oleifera* L. Aktivitas antioksidan metabolit sekunder hasil produksi dari bakteri endofit memberikan hasil nilai  $IC_{50}$  sebesar 315,396 ppm, yang menunjukkan bahwa ekstrak metabolit sekunder bakteri endofit akar *M. oleifera* L. tergolong antioksidan lemah.

## SARAN

Diperlukan upaya lain ekstraksi dan pemurnian melalui kromatografi hasil fermentasi bakteri endofit dengan menggunakan pelarut atau campuran pelarut lain sehingga metabolit sekunder yang didapatkan lebih murni.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Amir, H, B.G. Murcitra, Uji Microtetrazolium (MTT) Ekstrak Metanol Daun *Phaleriamacrocarpa* (Scheff.) Boerl Terhadap Sel Kanker Payudara MCF<sub>7</sub>, Alotrop, 2017: 1 (1) : 27-32
- [2] Andriani, Y, M.N.Ramli, Desi Fitria Syamsumir, Murni .Nur Islamiah . Kassim, J.Jaafar, J N.A. Aziz, Leni Marlina, N.S. Musa, Habsah Mohamad, Phytochemical Analysis, Antioxidant, Antibacterial and Cytotoxicity Properties Of Keys and Cores Parts Of *Pandanus Tectorius* Fruits , *Arabian Journal of Chemistry*. 2015; <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.003>
- [3] Andriani,Y Habsah Mohamad, Murni .Nur.Islamiah Kassim, N.D.Rosnan, Desi Fitria Syamsumir, J. Saidin, Tengku.Sifizul.Tengku. Muhammad, Herman-syah Amir, Evaluation on *Hydnophytum formicarum* Tuber from Setiu Wetland (Malaysia) and Muara Rupit (Indonesia) for Antibacterial and Antioxidant activities, and anti-cancer Potency against MCF-7 and HeLa Cells, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2017 : 7 (9): 30 -37.
- [4] Anwar, F, Latif, S, Asraf, M, Gilani, A,H. *Moringa oleifera*: A food Plant with Multiple Medicinal Uses, *Phytother*. 2007.: Res 21: 17-25
- [5] Pranoto, Eko, Gilang Fauzi, Hingdri. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit Pada Tanaman Teh (*Camelia sinensis*(L)O. Kuntze) Produktif dan Belum Menghasilkan Klon GMB 7 Dataran Tinggi, *Biospecies*. 2014: 7(1): 1-7
- [6] Nursanty, R, dan Suhartono.Isolasi Karakterisasi dan Uji Antimikroba Bakteri Endofit Asal Tumbuhan Johar (*Cassia siamea* Lamk) Jurnal Ilmiah Pendidikan Biologi, *Biologi Edukasi*. 2012: 4(1): 7-10
- [7] Tan RX, Zou WX. Endophytes: A Rich Source of Functional Metabolites, the royal society of chemistry. *Nat Prod*. 2001. Rep. 18: 448 459
- [8] Radji,Maksum.2005.Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 2005: 2(3): 113-126.
- [9] Radji, M, Sumiati, A.,Rachmayani, R., Elya B. Isolation of fungal endophytes from *Garcinia mangostana* and their antibacterial activity. *African Journal of Biotechnology*. 2011: 10(1): 103-107.
- [10] Kumala,Shirly, Shanny,F,dan Wahyu-di, P. Uji Aktivitas Antimikroba Meta-bolit Bioaktif Mikroba Endofitik Tana-man Trengguli (*Cassia fistula* L.). *J Farmasi Indonesia*. 2006:3(2):97– 102.
- [11] Pratiwi, Sylvia T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta : Erlangga
- [12] Strobel, G.A. dan Daisy, B. Biorespecting

- for Microbial Endophytes and Their Natural Products, *Microbial Molecular Biology Review*. 2003: 67 : 491-502.
- [13] Mohamad H , Andriani , Y., Bakar , K., CC Siang CC, Syamsumir, D.F., Alias, A., and Radzi, S.A.M., Effect of drying method on anti-microbial, anti-oxidant activities and isolation of bioactive compounds from *Peperomia pellucida* (L) Hbk, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2015: 7 (8): 578-584.
- [14] Prakash, A., F. Rigelhof dan E. Miller. 2001. Antioxidant Activity. Medallion Laboratorie: *Analytical Progress*., 2001: 19 (2): 1-4.
- [15] Andriani Y, Muhammad, T.S.T. Mohamad , H., Saidin, J., Syamsumir, D.F. Chew GS and Wahid, M.E.A., *Phaleria macrocarpa* Boerl. (*Thymelaeaceae*) Leaves Increase SR-BI Expression and Reduce Cholesterol Levels in Rats Fed a High Cholesterol Diet , *Molecules* , 2015: 20: 4410-4429.
- [16] Jun, M. H. Y., J, Fong.X., Wan, C.S., Yang, C.T., Ho. 2003. Comparison of antioxidant activities of isoflavones from kudzu root (*Pueraria labata* O). *Journal food science Institute of technologist*. 68: 2117-2122.
- [17] Andriani Y, Wahid, M.E.A., Muhammad T.S.T. ,and Mohamad , H., Antibacterial, Radical – Scavenging Activities And Cytotoxicity Properties Of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl leaves In HEPG2 Cell Lines *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*, 2011: 2, (7): 1700-1706.

Penulisan Sitasi Artikel ini ialah

Kuntari, Z, Sumpono, Nurhamidah, Aktivitas Antioksidan Metabolit Sekunder Bakteri Endofit Akar Tanaman *Moringa oleifera* L. (Kelor). *Alotrop*. 2017:1(2):80-84