

Isolasi bakteri endofit dari daun sirsak dan uji aktivitas antioksidan metabolit sekundernya

Purbowatiningrum, Nies Suci Mulyani, Idi Auliya Rahman, Ismiyanto, Ngadiwiyan, dan Nor Basid Adiwibowo Prasetya
Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Jl. Prof Soedarto SH No. 1 50271, Kampus Tembalang, Kota Semarang
email: purbowatining@live.undip.ac.id

Abstrak: Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi senyawa metabolit sekunder bakteri endofit dari daun sirsak (*Annona muricata*) dan menguji aktivitasnya sebagai antioksidan. Metode isolasi bakteri endofit dilakukan dengan sterilisasi sampel daun sirsak dengan metode perendaman dalam kalsium hipoklorit 5,25% dan alkohol 70% kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali pengulangan. Koloni bakteri yang tumbuh dipisahkan menurut kenampakan morfologinya dan ditumbuhkan kembali pada media agar Zobell. Hasil isolat bakteri endofit daun sirsak memiliki bentuk diplobasilus dan termasuk bakteri gram positif. Aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH dan didapatkan IC_{50} sebesar 278,27 ppm pada jam ke-22 dan 611,942 ppm pada jam ke-24. Total fenolik yang didapatkan pada jam ke-22 adalah 79 mg ekvalen asam galat/g sedangkan pada jam ke-24 yaitu 34 mg ekvalen asam galat/g. Metabolit sekunder bakteri endofit daun sirsak menghasilkan metabolit sekunder berupa alkaloid dan terpenoid.

Kata kunci: *Annona muricata*, bakteri endofit, metabolit sekunder, antioksidan, DPPH

Isolation of endophytic bacteria from soursop leaf and secondary antioxidant metabolit activity testing

Abstract: This study aimed to isolate secondary metabolites of endophytic bacteria from soursop (*Annona muricata*) leaves and test their activity as antioxidants. The method of isolating endophytic bacteria was done by sterilizing soursop leaf samples by immersion in 5.25% calcium hypochlorite and 70% alcohol and then rinsing with sterile distilled water three times. The growing bacterial colonies were separated according to morphological appearance and re-grown on Zobell agar media. The endophytic bacteria isolate from soursop leaves had a diplobacillus shape and included gram-positive bacteria. Antioxidant activity was carried out using the DPPH method and obtained IC_{50} of 278.27 ppm at the 22nd hour and 611.942 ppm at the 24th hour. The total phenolic obtained at the 22nd hour was 79 mg gallic acid/g; at the 24th hour, it was 34 mg gallic acid equivalent/g. Secondary metabolites of soursop leaf endophytic bacteria produce secondary metabolites in alkaloids and terpenoids.

Keywords: *Annona muricata*, endophytic bacteria, secondary metabolites, antioxidants, DPPH

How to Cite (APA 7th Style): Purbowatiningrum, Mulyani, N. S., Rahman, I. A., Ismiyanto, Ngadiwiyan, & Prasetya, N. B. A. (2023). Isolasi bakteri endofit dari daun sirsak (*Annona muricata*) dan uji aktivitas antioksidan metabolit sekundernya. *Jurnal Penelitian Saintek*, 28(1), 14-23. <https://doi.org/10.21831/jps.v1i1.57799v1i1.48513>.

PENDAHULUAN

Radikal bebas merupakan senyawa kimia yang memiliki elektron bebas atau elektron tidak berpasangan. Radikal bebas memiliki reaktivitas yang tinggi dan dapat bergabung atau berikatan dengan senyawa lain untuk mencapai kestabilan (Ionita, 2021). Noguchi dan Niki (2019) menyatakan bahwa radikal bebas adalah senyawa kimia yang tidak memiliki pasangan elektron. Pasangan elektron bebas biasanya akan mencari elektron lain untuk berpasangan. Oleh karena itu, radikal bebas biasanya bersifat reaktif dan dapat menyerang molekul lain. Radikal bebas seperti oksigen dan nitrogen yang reaktif diproduksi selama reaksi oksidatif dan dapat merusak komponen sel hingga menyebabkan penyakit seperti kanker, aterosklerosis, stroke, diabetes dan penuaan. Penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas dapat diobati dengan senyawa yang bersifat antioksidan (Sunday & Oyedele, 2017). Antioksidan merupakan senyawa yang dalam konsentrasi rendah dapat mengendalikan atau mencegah penyakit degeneratif pada organisme. Antioksidan dapat menghambat reaksi berantai oksidasi dengan bertindak sebagai donor hidrogen atau akseptor radikal bebas dengan menghasilkan senyawa yang lebih stabil (Munteanu & Apetrei, 2021).

Antioksidan dibagi menjadi 2 jenis, yaitu sintetis dan alami. Antioksidan sintetis dibuat dan disintesis oleh manusia, sedangkan antioksidan alami banyak ditemukan pada tanaman. Penggunaan antioksidan sintetis dibatasi penggunaannya karena bersifat karsinogenik (Pratiwi & Wardaniati, 2019). Saat ini banyak pencarian mengenai bioaktif alami yang tidak hanya meningkatkan kesehatan pada tubuh tetapi juga untuk melindungi tubuh dari radikal bebas yang dapat mengganggu mekanisme pertahanan tubuh. Senyawa alami pada tanaman ada yang menunjukkan sifat antioksidan alami dan mampu menangani radikal bebas (Michalak, 2022). Salah satu tanaman yang dapat dijadikan sebagai antioksidan alami adalah daun sirsak (*Annona muricata*). Beberapa penelitian membuktikan bahwa ekstrak etanol daun sirsak memiliki beberapa kandungan diantaranya alkaloid, steroid, saponin, dan flavonoid (Putri, Widyarti, & Jatmiko, 2022).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mempelajari potensi tanaman sirsak. Rasyadi, Rahim, dan Devita (2022) melaporkan bahwa aktivitas ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L.*) memiliki nilai IC_{50} sebesar 50,28 $\mu\text{g/mL}$ termasuk kategori kuat. Penelitian Asbanu Wijayati, dan Kusumo (2019) menemukan bahwa ekstrak etil asetat dan ekstrak metanol daun sirsak memiliki aktivitas antioksidan terhadap DPPH dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar 56,894 dan 24,895 ppm. Ekstrak etanol daun sirsak mengandung metabolit sekunder berupa saponin, steroid, flavonoid, alkaloid, fenol dan memiliki potensi sedang sebagai agen antioksidan dengan nilai IC_{50} 141, 127 g/mL (Hasmila, Natsir, & Soekamto, 2019).

Endofit adalah mikroba yang menghuni jaringan internal tanaman tanpa merugikan tanaman inang. Mikroba endofit memiliki banyak manfaat untuk tanaman, di antaranya membawa nutrisi dari tanah ke tanaman, meningkatkan ketahanan penyakit pada tanaman secara alami sehingga mengurangi penggunaan bahan kimia pertanian, menekan perkembangan spesies tanaman pesaing, dan masih banyak lagi (White *et al.*, 2019). Mikroba endofit hasil isolasi dari tanaman dapat menghasilkan metabolit sekunder yang mirip dengan tanaman aslinya atau bahkan dalam jumlah relatif tinggi (Rahmawati *et al.*, 2019).

Pada penelitian ini, dilakukan isolasi bakteri endofit yang bersimbiosis dengan daun sirsak, pengukuran data aktivitas antioksidan dengan metode peredaman DPPH, menghitung total fenol dan data kualitatif penapisan fitokimia senyawa metabolit sekunder hasil produksi bakteri endofit tersebut.

METODE

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini, di antaranya daun sirsak (*Annona muricata*) diperoleh di daerah Tembalang, Semarang, Jawa Tengah. Adapula bahan yang lain di antaranya yeast; pepton; agar; alkohol 70%; kalsium hipoklorit 5,25%; kristal violet; larutan iodin; etanol; safranin; akuades; asam galat; reagen *Folin-Ciocalteu*; Na₂CO₃; asam klorida; serbuk Mg; amil alkohol; ferri klorida 1%; natrium hidroksida; eter; asam asetat anhidrat; asam sulfat pekat; metanol; amonia; kloroform; akuades; pereaksi dragendorff; dan pereaksi mayer; 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH); asam askorbat; dan methanol. Adapun alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, di antaranya spektrofotometer UV-Vis, *freeze dryer*, inkubator, *shaker*, *vortex*, *laminar air flow*, mikroskop, *sentrifuge*, neraca analitik, *autoclave*, dan alat-alat gelas laboratorium.

Isolasi bakteri endofit dilakukan dengan sterilisasi sampel daun sirsak dengan metode perendaman dalam kalsium hipoklorit 5,25% dan alkohol 70% kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali pengulangan. Daun tersebut diberi goresan atau luka sehingga jaringan kulit daun terbuka kemudian ditempelkan ke media agar *Zobell* dalam cawan petri dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh dipisahkan menurut kenampakan morfologinya dan ditumbuhkan kembali pada media agar *Zobell*.

Karakterisasi bakteri dilakukan dengan pengamatan morfologi bakteri dilakukan dengan metode pewarnaan gram (Cappucino & Sherman, 1992). Isolat bakteri dari media cair dioleskan pada kaca preparat dan dilewatkan ke atas bunsen hingga kering, kemudian ditetaskan pewarna kristal violet, lugol iodin, alkohol aseton dan safranin. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x untuk menunjukkan bentuk dan warna pada dinding sel bakteri. Bakteri gram positif berwarna ungu sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah.

Pembuatan Kurva Pertumbuhan dilakukan dengan menginokulasi bakteri sebanyak 1 ose dalam 10 mL media cair *Zobell* dan diinkubasi *shaker* pada suhu kamar selama 24 jam sebagai *starter*. Dua mililiter *starter* ditanam pada 18 mL media cair *Zobell* dan diinkubasi *shaker* pada suhu kamar selama 24 jam sebagai *starter* kedua. Sebanyak 20 mL *starter* kedua ditanam pada 180 mL media cair *Zobell*. Absorbansi media cair diukur sebagai jam ke-0 dan setiap 2 jam selanjutnya dengan mengambil 4 mL kultur bakteri. Kultur bakteri disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Residu ditambahkan akuades 5 mL dan dilakukan *vortex* hingga homogen. Kekeruhan ditentukan dengan mengukur absorbansinya pada panjang gelombang 620 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Pengamatan yang dilakukan selama 32 jam menghasilkan data nilai absorbansi sebagai sumbu y dan waktu pengamatan sebagai sumbu x sehingga kurva pertumbuhan dapat ditentukan. Kurva pertumbuhan tersebut menunjukkan fase pertumbuhan bakteri. Waktu optimum produksi metabolit sekunder dari bakteri adalah pada akhir fase stasioner menuju fase kematian (Pratiwi, 2015).

Produksi Metabolit Sekunder dilakukan dengan menginokulasikan 1 ose bakteri dalam 10 mL media cair *Zobell* dan diinkubasi *shaker* pada suhu kamar selama 24 jam sebagai *starter*. Sebanyak 10 mL *starter* ditanam pada 90 mL media cair *Zobell* dan diinkubasi *shaker* pada suhu kamar selama 24 jam sebagai *starter* kedua. Sebanyak 100 mL *starter* kedua ditanam pada 900 mL media cair *Zobell* dan diinkubasi *shaker* pada suhu kamar sampai jam ke-22 fase akhir stasioner dan jam ke-24 fase kematian. Kultur yang diperoleh kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Supernatan dari kultur tersebut dipekatkan menggunakan

freeze dryer. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan metanol berasam (HCl 1%) selama 3 x 24 jam.

Aktivitas antioksidan ditentukan berdasarkan metode DPPH. Larutan induk dibuat dengan cara melarutkan 2 mg senyawa 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) dalam 50 mL metanol. Sebanyak 4 mL larutan DPPH ditambahkan dengan 1 mL ekstrak metabolit dalam berbagai konsentrasi, kemudian didiamkan selama 30 menit dalam tempat gelap. Analisis dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dilakukan pada panjang gelombang maksimum (517,0 nm). Kemampuan merendam radikal DPPH (inhibisi) ditentukan dari nilai serapan yang dihasilkan dengan persamaan (1).

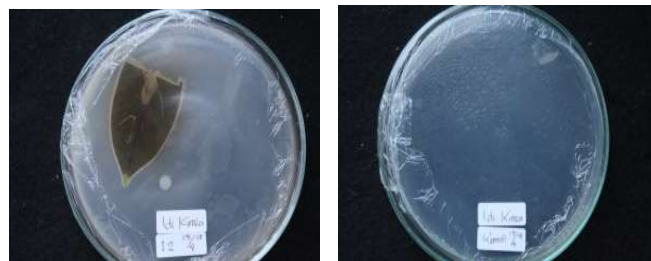
$$\% \text{ Inhibisi} = \left(\frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{larutan uji}}}{A_{\text{kontrol}}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

Nilai IC_{50} merupakan harga yang diperoleh dengan cara memasukkan 50% untuk nilai y pada masing-masing persamaan yang diperoleh untuk masing-masing sampel uji. Uji total fenol dilakukan dengan menggunakan reagen Folin-Ciocalteu berdasarkan metode oleh Lim dan Quah (2007). Ekstrak hasil maserasi sebanyak 0,2 mL ditambahkan dengan akuades 15,8 mL dan reagen Folin-Ciocalteu 1 mL; kocok dan didiamkan selama 8 menit. Tahap setelah pendiaman, sebanyak 3 mL larutan Na_2CO_3 20 % ditambahkan dalam larutan, kemudian dikocok kembali hingga homogen dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Masing-masing larutan kemudian ditentukan absorbansi pada panjang gelombang 763,5 nm dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Kandungan fenolat total dihitung dengan memasukkan harga absorbansi yang diperoleh ke dalam persamaan regresi linier, dinyatakan sebagai jumlah mg asam galat ekuivalen tiap g ekstrak. Penapisan Fitokimia dilakukan untuk menguji keberadaan senyawa metabolit sekunder golongan alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, kuinon, steroid/terpenoid.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gambar 1 menunjukkan media kontrol negatif yang berasal dari bilasan akuades tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri sedangkan pada media yang ditanami daun sirsak dengan goresan mulai ditumbuhi isolat bakteri berwarna putih kekuningan di sekitar daun pada hari ketiga. Hal tersebut menandakan bahwa sterilisasi permukaan sampel telah berhasil, serta menguatkan dugaan bahwa isolat bakteri yang tumbuh pada penelitian ini merupakan bakteri endofit asal daun sirsak. Karakterisasi Bakteri. Diperoleh satu isolat bakteri endofit yang bersimbiosis dengan daun sirsak dengan karakter yang disajikan pada Tabel 1.

Gambar 1. Hasil isolasi bakteri (kanan) kontrol (kiri)

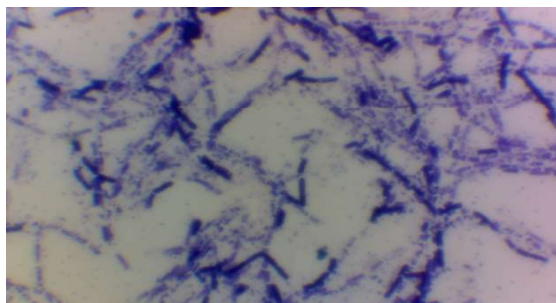


Tabel 1
Karakter isolat bakteri

Karakter	Keterangan
Warna	Putih kekuningan
Bentuk koloni	Bulat
Bentuk tepi	Halus
Bentuk elevasi	Cembung
Bentuk sel	Diplobasillus
Gram	Positif

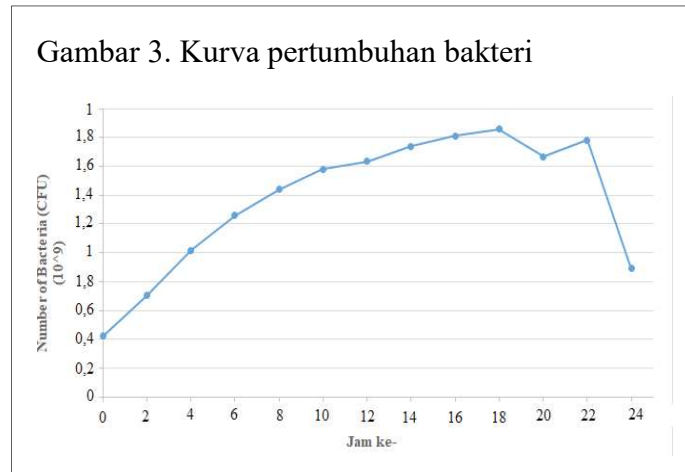
Pengamatan mikroskopik isolat bakteri endofit daun sirsak menunjukkan bahwa isolat bakteri I termasuk golongan bakteri gram positif. Sifat bakteri gram positif ditandai dengan terbentuknya warna ungu pada dinding sel bakteri setelah perlakuan dengan reagen pewarnaan (Gambar 2). Bakteri gram positif dapat mempertahankan pewarna utama yaitu kistal violet karena dinding selnya memiliki peptidoglikan yang tebal sehingga tidak luntur ketika dibilas dengan etanol (Wulandari & Purwaningsih, 2019).

Gambar 2. Hasil pewarnaan gram



Kurva pertumbuhan dibutuhkan untuk mengetahui fase hidup bakteri. Umumnya pertumbuhan bakteri terbagi menjadi 4 fase, yaitu lag (fase adaptasi), log (fase eksponensial), stasioner (fase tetap), dan kematian (Wahyuningsih dan Zulaika 2018). Gambar 3 menunjukkan bahwa bakteri endofit melewati beberapa tahapan fase pertumbuhan, yaitu fase log, fase stasioner dan fase kematian. Fase lag dalam penelitian ini tidak terjadi. Hal ini disebabkan oleh nutrisi dan kondisi lingkungan baru hampir sama dengan sebelumnya. Fase log yaitu fase perbanyakan. Pada fase ini penambahan jumlah bakteri berlangsung lebih cepat dari pada jumlah bakteri yang mati. Fase log berlangsung dari jam ke- 0 sampai jam ke-18. Fase stasioner merupakan fase saat penambahan jumlah bakteri tidak jauh berbeda dengan jumlah bakteri yang mati, sehingga kurva menunjukkan garis yang cenderung horizontal. Fase ini berlangsung dari jam ke- 18 sampai jam ke-22. Fase kematian merupakan fase saat penambahan jumlah bakteri lebih sedikit dari jumlah bakteri yang mati karena habisnya sumber nutrisi. Fase kematian dimulai dari jam ke-22 hingga jam ke-24.

Berdasarkan kurva tersebut produksi metabolit sekunder bakteri endofit dilakukan pada fase akhir stasioner di jam ke-22 dan fase kematian di jam ke-24. Metabolit sekunder dihasilkan oleh bakteri saat bakteri mengalami fase stress tertentu. Salah satunya adalah ketika nutrisi



bakteri mulai habis sehingga terjadi kompetisi antar bakteri untuk mendapatkan nutrisi yang ada. Dalam perebutan nutrisi itu bakteri menghasilkan metabolit sekunder yang digunakan untuk mempertahankan diri. Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri juga bermanfaat untuk tanaman inangnya (Strobel dan Daisy, 2003). Berat ekstrak metabolit sekunder yang didapat adalah sebesar 2,58 gram dari total volume 1 liter supernatan.

Metode peredaman DPPH adalah salah satu metode umum pengujian aktivitas antioksidan. Senyawa DPPH bersifat stabil dalam larutan metanol, unsur nitrogen ditengah radikal bebasnya akan memberikan warna ungu pada larutan. Penambahan antioksidan akan mereduksi DPPH sehingga tampak perubahan warna ungu pekat menjadi kuning akibat terjadinya resonansi struktur DPPH (Kikuzaki & Nakatani, 1993).

Aktivitas antioksidan yang ditunjukkan dengan nilai IC_{50} merupakan nilai konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas pada DPPH. Kemampuan aktifitas antioksidan ditentukan dengan nilai IC_{50} yang diperoleh. Jika $IC_{50} < 50$ ppm maka tergolong sangat kuat, $50 < IC_{50} < 100$ ppm tergolong kuat, $100 < IC_{50} < 150$ ppm tergolong sedang, $150 < IC_{50} < 200$ tergolong lemah, dan $IC_{50} > 200$ ppm tergolong sangat lemah (Siyanti, Fitriani, & Narsa, 2019).

Hasil uji antioksidan asam askorbat ditunjukkan pada Tabel 2, semakin tinggi konsentrasi asam askorbat maka semakin rendah absorbansinya. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa penghambatan terhadap DPPH meningkat dan kandungan DPPH semakin berkurang sehingga absorbansi menurun. Pada asam askorbat diperoleh nilai IC_{50} sebesar 18,86 yang berarti memiliki kemampuan antioksidan yang tinggi.

Tabel 2

Nilai absorbansi, % inhibisi dan nilai IC_{50} (ppm) asam askorbat

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	IC_{50}
Absorbansi blanko	0,734		
10	0,581	20,84	
15	0,459	37,46	
20	0,334	53,13	18,86
25	0,205	72,07	
30	0,108	85,28	

Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak metabolit sekunder bakteri endofit daun sirsak ditunjukkan pada Tabel 3 dan 4. Pada kedua tabel menunjukkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang digunakan maka semakin kecil absorbansi dan semakin tinggi % inhibisinya. Hal ini menunjukkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin tinggi pula senyawa yang berperan sebagai agen antioksidan. Hal ini menyebabkan tingginya penghambatan terhadap DPPH sehingga absorbansi menurun. Karena kedua ekstrak memiliki nilai $IC_{50} > 200$ ppm maka kemampuan antioksidannya tergolong sangat lemah.

Tabel 3

Nilai absorbansi, % inhibisi dan nilai IC_{50} (ppm) ekstrak metabolit jam ke-22

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	IC_{50}
Absorbansi blanko	0,512		
50	0,427	16,60	
150	0,41	19,72	
250	0,338	33,98	278,27
350	0,134	73,82	
450	0,101	80,27	

Tabel 4

Nilai absorbansi, % inhibisi dan nilai IC_{50} (ppm) ekstrak metabolit jam ke-24

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	IC_{50}
Absorbansi blanko	0,512		
50	0,498	2,74	
150	0,474	7,42	
250	0,443	13,48	611,942
350	0,379	25,98	
450	0,316	38,28	

Hasil perhitungan IC_{50} menunjukkan perbandingan nilai IC_{50} antara asam askorbat dengan kedua ekstrak. Semakin besar aktivitas antioksidan maka semakin kecil nilai IC_{50} (Widyasanti, Rohdiana, & Ekatama, 2016). Nilai IC_{50} asam askorbat lebih besar dari kedua sampel dimungkinkan karena asam askorbat merupakan senyawa tunggal yang memiliki aktivitas antioksidan sangat tinggi sedangkan pada kedua ekstrak masih dalam bentuk kompleks dan gabungan dari berbagai komponen (Siyanti dkk., 2019).

Banyaknya total fenol yang didapat setara dengan mg asam galat pada setiap gram sampelnya (Indra, Nurmalasari, & Kusmiati, 2019). Tabel 5 menunjukkan bahwa total fenol pada ekstrak jam ke-22 sebesar 79 mg asam galat/g ekstrak yang artinya pada setiap gram ekstrak setara dengan 79 mg asam galat/g ekstrak. Jam ke-24 memiliki nilai total fenol sebesar 34 mg asam galat/g ekstrak yang artinya pada setiap gram ekstrak setara dengan 34 mg asam galat. Total fenol ekstrak jam ke-22 lebih besar dari pada jam ke-24. Hal ini sesuai dengan hasil antioksidannya, hubungan antara total fenol dengan nilai IC_{50} adalah semakin besar total fenol maka semakin kecil nilai IC_{50} .

Tabel 5

Total fenol ekstrak metabolit sekunder

Ekstrak jam ke-	Total Fenol (mgek asam galat/g ekstrak)
22	79
24	34

Kedua sampel memiliki aktivitas yang sangat lemah dimungkinkan karena senyawa fenol yang terkandung sangatlah sedikit. Senyawa fenol merupakan salah satu senyawa yang berperan sebagai agen antioksidan alami (Dhurhania & Novianto, 2018). Pada umumnya senyawa fenol banyak ditemukan dalam metabolit sekunder golongan flavonoid namun dalam bentuk glikolisisnya (Simanjuntak 2012). Prayoga, Eka, Nocianitri, & Puspawati, 2019 mengatakan Fenol yang terdapat pada tumbuhan biasanya berikatan dengan gula membentuk glikosida yang lebih mudah larut dalam pelarut polar. Kontribusi senyawa fenol dalam suatu ekstrak yang memengaruhi aktifitas antioksidan dapat ditentukan dengan koefisien korelasi Pearson. Nilai koefisien korelasi Pearson antara aktivitas antioksidan dengan kadar total fenol sebesar -1, maka dapat diartikan bahwa ada hubungan (negatif) antara aktivitas antioksidan dengan total fenol. Semakin tinggi aktivitas antioksidan, total fenolnya semakin besar. Nilai koefisien korelasi tersebut masuk kedalam kategori hubungan yang sangat kuat, sehingga dapat dikatakan aktivitas antioksidan pada ekstrak metabolit sekunder daun sirsak dipengaruhi oleh senyawa fenol.

Penapisan fitokimia bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang berpengaruh sebagai antioksidan dalam daun sirsak. Uji yang dilakukan meliputi uji kualitatif keberadaan senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, steroid dan terpenoid dari simplisia daun sirsak maupun metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri endofit daun sirsak. Hasil uji penapisan fitokimia terdapat pada Tabel 6.

Tabel 6

Penapisan fitokimia

Senyawa Fitokimia	Hasil Metabolit Jam ke-		Simplisia Daun sirsak
	22	24	
Alkaloid	+	+	+
Flavonoid	-	-	+
Saponin	-	-	-
Tanin	-	-	+
Kuinon	-	-	-
Terpenoid	+	+	+
Steroid	-	-	-

Isolat bakteri endofit yang bersimbiosis dengan daun sirsak mampu memproduksi senyawa alkaloid dan terpenoid. Senyawa-senyawa tersebut diduga merupakan senyawa yang berpengaruh sebagai antioksidan.

SIMPULAN

Diperoleh satu isolat bakteri endofit yang bersimbiosis dengan daun sirsak. Isolat bakteri yang diperoleh memiliki bentuk diplobacillus dan merupakan bakteri gram positif. Aktivitas

antioksidan menggunakan metode peredaman DPPH dari metabolit sekunder jam ke-22 dan ke-24 ditunjukkan dengan masing-masing nilai IC_{50} sebesar 278,27 ppm dan 611,942 ppm. Diperoleh nilai total fenol sebesar 79 mg/g asam galat/g ekstrak pada ekstrak metabolit jam ke-22 dan 34 mg/g asam galat/g ekstrak pada ekstrak metabolit jam ke-24. Hasil skrining fitokimia pada metabolit sekunder endofit dari daun sirsak adalah alkaloid dan terpenoid.

Ucapan Terimakasih

Terimakasih pada program PDUPT 2020 dengan no. kontrak 101-26/UN7.6.1?PP/2020 yang telah membiayai penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Asbanu, Y. W. A., Wijayati, N., & Kusumo, E. (2019). Identifikasi senyawa kimia ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dan uji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH (2, 2-Difenil-1-Pikrilhidrasil). *Indonesian Journal of Chemical Science*, 8(3), 153-160.
- Cappucino, J. G., & Sherman, N. (1992). *Microbiology, a laboratory manual*. The Benjamin/Cummings Publishing Company.
- Dhurhania, C. E., & Novianto, A. (2018). Uji kandungan fenolik total dan pengaruhnya terhadap aktivitas antioksidan dari berbagai bentuk sediaan sarang semut (*Myrmecodia pendens*). *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 5(2).
- Hasmila, I., Natsir, H., & Soekamto, N. H. (2019, Oktober). Phytochemical analysis and antioxidant activity of soursop leaf extract (*Annona muricata* Linn.). *Journal of Physics: Conference Series*, 1341(3), 032027.
- Indra, I., Nurmalasari, N., & Kusmiati, M. (2019). Fenolik total, kandungan flavonoid, dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun mareme (*Glochidion arborescense* Blume.). *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 6(3), 206-212
- Ionita, P. (2021). The chemistry of DPPH free radical and congeners. *Int. J. Mol. Sci.*, 22(4), 1545. <https://doi.org/10.3390/ijms22041545>.
- Kikuzaki, H., & Nakatani, N. (1993). Antioxidant effects of some ginger constituents. *Journal of Food Science*, 58(6), 1407-1410.
- Lim, Y., & Quah, E. P. L. (2007). Antioxidant properties of different cultivars of *Portulaca oleracea*. *Food Chemistry*, 103 (3), 734-740 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.025>.
- Michalak, M. (2022). Plant-derived antioxidants: Significance in sin and the ageing process. *International journal of molecular sciences*, 23(2), 585.
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *Int. J. Mol. Sci.*, 22(7), 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>.
- Noguchi, N., & Niki, E. (2019). Chemistry of active oxygen m, species and antioxidant. Dalam A. M. Papas (Ed.), *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health* (pp.1-20). CRC Press.
- Pratiwi, B. E. (2015). *Isolasi dan skrining fitokimia bakteri endofit dari daun rambutan (Nephelium lappaceum L.) yang berpotensi sebagai antibakteri* (Skripsi tidak diterbitkan). Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah. Jakarta.
- Pratiwi, D., & Wardaniati, I. (2019). Pengaruh variasi perlakuan (segar dan simplisia) rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) terhadap aktivitas antioksidan dan kadar fenol total. *Jurnal Farmasi Higea*, 11(2).

- Prayoga, Eka, D. G., Nocianitri, K. A., & Puspawati, N. Y. (2019). Identification of phytochemical compounds and antioxidant activity of pepe leaves (*Gymnema reticulatum* Br.) crude extract in various solvent types. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*, 8(2), 111-121.
- Putri, D. N., Widyarti, S., & Jatmiko, Y. D. (2022). Increasing antioxidant activity of soursoup (*Annona muricata* L.) and noni (*Morinda citrifolia* L.) leaves fermented by *Lactobacillus plantarum* P1022. *Berkala Penelitian Hayati*, 27(2).
- Rahmawati, S. I., Izzati, F. N., Hapsari, Y., Septiana, E., Rachman, F., Bustanussalam, & Simanjuntak, P. S. I. (2019). Endophytic microbes and antioxidant activities of secondary metabolites from Mangroves *avicennia marina* and *Xylocrapus granatum*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 278(1), 012065.
- Rasyadi, Y., Rahim, F., & Devita, S. (2022). Aktivitas antioksidan handbody lotion ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dengan metode DPPH. *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 11(2).
- Simanjuntak, K. (2012). Peran antioksidan dalam meningkatkan kesehatan. *Bina Widya*, 23(3).
- Siyanti, A., Fitriani, N., & Narsa, A. C. (2019). Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap peredaman. *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*, 10, 72-75.
- Strobel, G. A., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67(4), 491-502. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003>.
- Sunday, R. M., & Oyedele, J. O. 2017. Effect of *Anthocleista vogelii* leaves on free radicals: Antioxidant studies. *Intenational Journal of Advanced Biochemistry Research*, 1(1), 38-42.
- Wahyuningsih, N., & Zulaika, E. (2018). Perbandingan pertumbuhan akteri selulolitik pada media nutrient broth dan carboxy methyl cellulose. *Jurnal Sains Dan Seni ITS*, 7(2), 36-38.
- White, J. F., Kingsley, K. L., Zhang, Q., Verma, R., Obi, N., Dvinskikh, S., Elmore, M. T., Verma, S. K., Gondband, S. K., & Kowalski, K. P. (2019). Review: Endophytic microbes and their potential application in crop management. *Pest Management Science*, 75(10), 2558-2565.
- Widyasanti, A., Rohdiana, D., & Ekatama, N. (2016). Aktivitas antioksidan ekstrak teh putih (*Camellia sinensis*) dengan metode DPPH (2,2 Difenil-1-Pikhrilhidrazil). *EDUFORTECH*, 1(1).
- Wulandari, D., & Purwaningsih, D. (2019). Identifikasi dan karakterisasi bakteri amilolitik pada umbi *Colocasia esculenta* L. secara morfologi, biokimia, dan molekuler. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*, 6(2), 247-258.