



Isolasi, Karakterisasi Dan Uji Aktivitas Antioksidan Bakteri Endofit Dari Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Mahdalena Sy. Pakaya¹, Multiani S. Latif², Khofifa Nurul Magfira Maspeke³

^{1,2,3} Jurusan Farmasi, Fakultas Olahraga Dan Kesehatan, Universitas Negeri Gorontalo,
Jl. Jenderal Sudirman No. 06 Kota Gorontalo 96128, Indonesia

* Penulis Korespondensi. Email: multianilatif02@ung.ac.id

ABSTRACT

Antioxidants are compounds that can inhibit oxidation reactions. Antioxidant compounds are required as counteragents to stop free radicals. A free radical is a group of highly reactive chemical substances because it has one or more unpaired electrons. Antioxidants can be produced from endophytic bacteria that symbiotically live in plants and contain antioxidant activities due to genetic exchange and long evolutionary relationships. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) flowers are commonly known for containing bioactive compounds with high anthocyanin content. Therefore, this research aims to identify the stems of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) flowers and characterize them, and then to determine whether the isolation of endophytic bacteria in the stems of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) flowers contains antioxidant activity. This research utilizes an experimental method conducted in the Pharmaceutical Microbiology Laboratory and Analytical Chemistry Laboratory by using the direct planting technique for microbe isolation, macroscopic and microscopic morphological observations for characterization, and the DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) technique for antioxidant testing. The microbe isolation result obtained 1 isolation of endophytic bacteria, and the qualitative antioxidant activity test result showed that the isolation did not contain antioxidant activity.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa* ; Endophytic bacteria ; Bacteria Bolate ; Antioxidant.

Received:
2024-06-21

Accepted:
2024-07-30

Online:
2024-07-30

ABSTRAK

Senyawa antioksidan diperlukan sebagai penangkal untuk menghentikan radikal bebas. Radikal bebas adalah sekelompok zat kimia yang sangat reaktif karena memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Antioksidan dapat dihasilkan dari bakteri endofit yang bersimbiosis pada tumbuhan yang juga memiliki aktivitas antioksidan karena adanya pertukaran genetik dan hubungan evolusi yang panjang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) diketahui mengandung senyawa bioaktif dengan kadar antosianin yang tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) terdapat bakteri endofit, mengkarakterisasi dan untuk mengetahui isolat bakteri endofit pada Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) mempunyai aktivitas antioksidan. Penelitian ini menggunakan metode eksperimental yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi dan Laboratorium Kimia Analisis dengan menggunakan teknik tanam langsung untuk isolasi mikroba, pengamatan morfologi secara makroskopis dan mikroskopis untuk karakterisasi, dan teknik DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) untuk pengujian antioksidan. Hasil isolasi didapatkan 1 isolat bakteri endofit dan hasil uji kualitatif aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa isolat tersebut tidak mengandung aktivitas antioksidan.

Kata Kunci: Asam Retinoat; Kosmetik; Krim; Spektrofotometri UV-Vis; Gorontalo

Diterima:
21-06-2024

Disetujui:
30-07-2024

Online:
30-07-2024

1. Pendahuluan

Di Indonesia masyarakat masih banyak yang memanfaatkan pengobatan tradisional. Termasuk penggunaan obat yang berasal dari bagian-bagian tanaman

seperti akar, batang, daun, biji, bunga atau buah. Hal ini karena adanya kandungan metabolit sekunder yang memiliki aktivitas biologis sehingga mempunyai potensi dapat dikembangkan sebagai bahan baku obat salah satunya adalah bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.). Potensi tanaman obat merupakan sumber daya hayati yang sangat besar untuk dikembangkan sebagai bahan baku dari obat herbal yang berbasis pada tanaman obat. Pencarian sumber senyawa bioaktif terus menerus dilakukan seiring dengan makin banyak penyakit baru yang bermunculan. Beberapa tahun terakhir ini penggalian sumber daya mikroba di dalam jaringan tanaman mulai banyak mendapat perhatian yang dikenal dengan bakteri endofit.

Saat ini sedang berkembang usaha memanfaatkan bakteri endofit yaitu bakteri yang hidup dalam jaringan tanaman sebagai agen penendali hayati. Bakteri endofit dapat menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif yang sangat potensial untuk dikembangkan menjadi obat. Bakteri endofit yang diisolasi dari jaringan tanaman dapat ditumbuhkan di medium tumbuh artifisial. Bakteri endofit di dalam medium tersebut akan menghasilkan metabolit yang hampir sama dengan senyawa aktif yang berasal dari tanaman inangnya. Pemanfaatan penggunaan bakteri endofit sebagai sumber senyawa bioaktif yaitu lebih efisien karena dapat mengurangi pengambilan metabolit sekunder secara langsung pada tanaman yang membutuhkan biomassa dalam jumlah yang sangat banyak. Bakteri endofit ini sangat menguntungkan karena pembiakannya dapat dilakukan dalam jumlah besar tanpa memerlukan lahan yang luas dan siklus hidup bakteri endofit lebih singkat daripada tumbuhan inangnya. Salah satu senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan bakteri endofit berfungsi sebagai agen biokontrol tanaman yaitu antioksidan.

Senyawa antioksidan diperlukan sebagai penangkal untuk menghentikan radikal bebas. Radikal bebas adalah sekelompok zat kimia yang sangat reaktif karena memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas akan bereaksi dengan molekul disekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron dan untuk mencapai kestabilan. Reaksi ini akan berlangsung terus menerus dalam tubuh dan bila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, penuaan dini, katarak serta penyakit degeneratif lainnya. Seiring perkembangan zaman, penelitian dalam jumlah besar telah dilakukan untuk mempelajari potensi antioksidan pada tanaman.

Antioksidan dapat dihasilkan dari bakteri endofit yang bersimbiosis pada tumbuhan yang juga memiliki aktivitas antioksidan karena adanya pertukaran genetik dan hubungan evolusi yang panjang. Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) diketahui mengandung senyawa bioaktif dengan kadar antosianin yang tinggi. Antosianin termasuk golongan senyawa flavonoid yang dapat berperan sebagai antioksidan alami, mampu menghambat radikal bebas serta dapat mencegah terjadinya degeneratif sel dan penyakit lain.

Pendekatan yang digunakan dalam pemilihan tumbuhan adalah kandungan senyawa yang dimiliki oleh tumbuhan tersebut (terdapat kandungan antosianin) dan pendekatan etnobotani (umumnya digunakan sebagai antioksidan alami dalam

pengobatan tradisional). Selain itu pemilihan dilakukan karena penelitian tentang bakteri endofit pada tanaman Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) belum banyak dilakukan dan hanya terbatas dalam isolasi dan karakterisasi bakteri endofitik yang berpotensi dalam mengendalikan penyakit pada tumbuhan, sedangkan isolasi senyawa dan uji aktivitas antioksidannya belum banyak dilakukan.

Tanaman Bunga Rosella dimungkinkan memiliki bakteri endofit yang berpotensi menghasilkan antioksidan. Maka berdasarkan uraian di atas peneliti tertarik melakukan penelitian ilmiah tentang Isolasi, Karakterisasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Bakteri Endofit dari Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.).

2. Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental di Laboratorium Mikrobiologi dan di Laboratorium Kimia Farmasi, Jurusan Farmasi, Fakultas Olahraga dan Kesehatan, Universitas Negeri Gorontalo, untuk mengetahui mengisolasi bakteri endofit dan dilakukan uji aktivitas antioksidan bakteri endofit dari Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.).

Alat dan Bahan

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah autoklaf, alat evaporator, batang pengaduk, cawan petri, corong, corong pisah, erlenmeyer, gelas kimia, gelas ukur, labu ukur, lampu bunsen, lemari pendingin, mikroskop (Euromex), neraca analitik (Kern®), oven (Memmert®), pinset, pisau steril, shaker incubator (Scilogex), tabung reaksi, tabung sentrifugasi.

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah aluminium foil (total warp), alkohol 96 %, aquadestilata, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), etanol 70%, iodine, kertas HVS bekas, kapas (husada), kristal violet, korek api, label, plastic warp, pelarut etil asetat, pelarut methanol, pelarut n-heksan, larutan natrium hipoklorit 5 %, media NA (*Nutrien Agar*), media NB (*Nutrien Broth*), nistatin, safranin, sampel Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.).

Prosedur Penelitian

Pengambilan Sampel

Sampel uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) yang diperoleh dari Desa Ikhwan, Kecamatan Dumoga Barat, Kabupaten Bolaang Mongondow, Provinsi Sulawesi Utara.

Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat disterilisasi menggunakan oven selama 1 jam. Bahan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, jarum ose dan pinset dipijarkan dengan lampu bunsen.

Isolasi Bakteri Endofit Dari batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Direndam sampel yang sudah dipotong dalam etanol 70% selama 30 detik, dilanjutkan dengan direndam sampel dalam larutan natrium hipoklorit 5% selama 1 menit. Setelah itu kembali direndam sampel dalam etanol 70% selama 30 detik dan dibilas dengan aquadest selama 3 menit. Sampel kemudian dikeringkan di atas tisu steril [1].

Diambil sampel yang telah dikeringkan, menggunakan pinset dan ditanamkan 4 potong sampel dengan cara meletakkan pada posisi tertelungkup ke dalam cawan

petri yang berisi media NA (*Nutrient Agar*) yang sudah ditambahkan dengan nistatin. Semua proses dilakukan di dalam enkas, kemudian diinkubasi pada suhu 25°C-28°C selama 24 jam dan diamati pertumbuhan bakteri [9].

Pemurnian Bakteri Endofit Dari Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Bakteri endofit yang telah tumbuh dipindahkan ke dalam cawan petri yang berisi media NA (*Nutrient Agar*) yang sudah ditambahkan nistatin, dan diambil menggunakan jarum ose. Semua dilakukan secara aseptis yaitu di dalam enkas. Kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 24-48 jam.

Karakterisasi Bakteri Endofit Dari Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Pengamatan karakterisasi dilakukan secara makroskopik, berupa bentuk koloni, warna dan permukaan, sedangkan mikroskopiknya meliputi bentuk sel dengan pewarnaan gram digunakan untuk pengamatan mikroskopis. Prosedur pewarnaan gram di mulai dari menyiapkan kaca objek steril. Diambil isolat bakteri endofit menggunakan jarum ose bulat yang sudah aseptis dan dicampurkan dengan aquades pada gelas objek. Kemudian preparat difiksasi secara berurutan dengan kristal violet selama 1 menit, dibilas dengan aquades. Ditetaskan dengan iodine selama 1 menit, dibilas dengan aquades. Kemudian ditetaskan dengan alkohol 95%, selama 30 detik dibilas dengan aquades. Kemudian ditetaskan dengan safranin selama 1 menit dan dibilas dengan aquades. Kemudian preparat yang telah jadi dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop, apabila bakteri tersebut berwarna ungu maka dikategorikan gram positif dan apabila bakteri tersebut berwarna merah maka dikategorikan gram negative.

Uji Bebas Pelarut

Uji Bebas Metanol

Sebelum diuji antioksidan, dilakukan uji bebas pelarut salah satunya uji bebas pelarut methanol untuk meyakinkan bahwa ekstrak tersebut telah bebas dari methanol. Dilakukan dengan menambahkan 1 tetes larutan asam sulfat pekat. Kemudian tambahkan 1 tetes larutan KMnO_4 pekat diamkan 10 menit. Tambahkan tetes demi tetes larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ pekat sampai warna permanganat (coklat) hilang.

Uji Bebas Etil Asetat

Uji bebas etil asetat dilakukan dengan menggunakan pereaksi NaOH, asam asetat dan H_2SO_4 . Caranya dengan mengambil 2 tetes ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian menambahkan 2 mL NaOH, 2 mL asam asetat dan 2 mL H_2SO_4 . Kemudian mengamati perubahan bau yaitu jika tidak berbau etil asetat maka ekstrak sudah terbebas dari etil asetat dan jika masih maka perlu diuapkan kembali

Uji Bebas N-Heksan

Uji bebas n-heksan dilakukan dengan cara 2 tetes ekstrak dimasukkan ke dalam tabung lalu dibakar. Kemudian diamati api dan asap yang terbentuk yaitu jika tidak menghasilkan api dan asap maka ekstrak sudah terbebas dari n-heksana dan jika menghasilkan api dan asap maka ekstrak perlu diuapkan Kembali.

Pengujian Aktivitas Antioksidan Bakteri Endofit Dari Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Uji Kualitatif Antioksidan

- a. Pembuatan Larutan DPPH 0,4 mM

Serbuk DPPH 15,7 mg dilarutkan dalam metanol kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL, volumenya dicukupkan dengan metanol p.a sampai tanda batas (DPPH 0.4 mM) [7].

- b. Uji Aktivitas Antioksidan

Sebanyak 1 mL larutan sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 4 mL larutan DPPH 0,4 mM sedikit demi sedikit dan amati perubahan warnanya. Adanya antioksidan ditandai dengan perubahan warna larutan dari ungu menjadi kuning [8].

Uji Kuantitatif Antioksidan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis

Pembuatan Larutan DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) 0,4 mM

Serbuk DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) sebanyak 3,95 mg dilarutkan dengan pelarut organik metanol p.a sebanyak 100 mL kemudian dituangkan pada gelas kimia yang berukuran 150 mL, dan dicukupkan volumenya sampai tanda batas [5].

Pembuatan Larutan Blanko

Larutan DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) 0,4 mM sejumlah 1 mL dituangkan ke dalam vial, kemudian dituangkan pelarut metanol pro analisis sampai tanda batas 5 mL, dishaker menggunakan vortex sampai tercampur rata, kemudian diinkubasi selama 30 dalam ruangan gelap (Komala, 2015).

Pembuatan larutan hasil fraksi (n-heksan, etil asetat dan metanol dan supernatan murni) metabolit sekunder bakteri endofit dari Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

- 1). Pembuatan larutan induk konsentrasi 2000 ppm

Hasil ekstraksi dari fraksi (n-heksan, etil asetat dan metanol) dan supernatan hasil metabolit sekunder bakteri endofit dari Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) ditimbang masing-masing ekstrak 2 mg, ditambahkan pelarut methanol pro analisis lalu dituang ke dalam gelas kimia 10 ml, cukupkan dengan metanol pro analisis hingga tanda batas yang ditentukan.

- 2). Pembuatan larutan uji dengan seri konsentrasi 5, 10, 25, 50, dan 100 (ppm)

Larutan induk hasil ekstraksi dari fraksi (n-heksan, etil asetat, dan metanol) metabolit sekunder bakteri endofit dari kulit kentang (*Solanum tuberosum*) masing-masing dipipet 50, 100, 250, 500, 1000 (μ L), dimasukkan ke dalam vial 10 mL, volume dicukupkan dengan metanol sampai tanda batas.

- 3). Pengukuran serapan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Larutan uji ekstrak metabolit sekunder bakteri endofit Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dari masing-masing fraksi, diambil dari masing-masing konsentrasi diambil sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam vial, ditambahkan larutan DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) 0,4 mM semapai tanda batas 5 mL, dishaker dengan vortex hingga tercampur rata, semua materi analisis di inkubasi dalam ruang gelap selama 30 menit. Selanjutnya, serapan diukur pada panjang gelombang 517 nm.

3. Hasil dan Pembahasan Bakteri Endofit yang Diperoleh

Pada metode isolasi ini, didapatkan yakni hanya 1 isolat bakteri endofit dari Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dengan diberi kode (BR), dimana tumbuh pada media *Nutrient Agar* (NA).

Tabel 1. Hasil Isolasi Bakteri Endofit dari Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Sampel Tanaman Bunga Rosella (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	Media Pertumbuhan Mikroba	
	NA	PDA
Daun	-	-
Batang	+	-
Akar	-	-

Ket:

- (+) = Adanya pertumbuhan bakteri endofit
- (-) = Tidak adanya pertumbuhan bakteri endofit

Pada penelitian ini, dilakukan isolasi bakteri endofit dari Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) menggunakan metode tanam langsung pada media buatan yang padat yaitu *Nutrient Agar* (NA). Pada penelitian ini menggunakan Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.), karena batang dan ranting Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) diduga memiliki antioksidan yaitu glikosida, antosianin. Hal ini sesuai dengan penelitian [6], yang mengatakan bahwa Antosianin yang merupakan pembentuk utama warna merah pada Rosella memiliki sifat sebagai antioksidan pada bunga Rosella warna merah tidak saja terdapat pada bunganya, tapi juga terdapat pada batang dan rantingnya, sehingga ekstrak warna merah dapat dilakukan pada kelopak bunga dan batangnya.



Gambar 1. Hasil isolasi bakteri endofit dari Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Bakteri endofit memperoleh sumber nutrisi yang berasal dari tanaman inangnya, akan tetapi saat bagian dalam sampel ditanamkan pada media NA, maka bakteri endofit ikut pindah ke media yang baru, proses ini disebut dengan isolasi.

Proses isolasi terlebih dahulu yang harus diperhatikan adalah sterilisasi permukaan sampel. Hal ini bertujuan untuk menghilangkan bakteri kontaminan yang terdapat pada sampel sehingga bakteri yang diisolasi hanya merupakan bakteri endofit dari batang Rosella. Sampel Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) yang sudah disterilisasi ditanam langsung pada media NA secara aseptis. Sebelumnya sampel dipotong dengan ukuran 1 x 1 cm² menggunakan pisau steril, bagian yang ditanam

yaitu posisi bekas potongan yang ditempelkan ke permukaan media sehingga bakteri yang hidup dalam jaringan tanaman mendapatkan nutrisi dari media NA. Sebelum sampel ditanam ke media, ditambahkan nistatin pada media NA agar mengoptimalkan hasil isolasi yaitu menekan atau menghambat pertumbuhan bakteri lain dan fungi sehingga yang tumbuh adalah bakteri endofit.

Pemurnian Bakteri Endofit

Bakteri endofit yang sudah mengalami pertumbuhan dan muncul di permukaan media NA, kemudian akan dilakukan pemurnian secara aseptis dengan cara memindahkan tiap satu koloni pada media Nutrient Agar (NA) yang baru sehingga mendapatkan isolat bakteri endofit yang murni.



Gambar 2. Hasil pemurnian isolat (BR) bakteri endofit dari Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Pada pemurnian bakteri endofit, didapatkan 1 isolat tunggal yang diberi kode BR. Isolat yang diperoleh, diambil sebanyak 1 ose kemudian akan dipindahkan ke media baru pada tabung reaksi steril dan dibiarkan padat dengan posisi yang dimiringkan sebagai *stock kultur* dan kultur kerja. *Stock kultur* bakteri endofit batang Rosella disimpan di dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C yang akan di uji aktivitas antioksidan. Hal ini karena suhu berpengaruh terhadap proses metabolisme sel sehingga penyimpanan pada suhu tersebut mampu memperlambat pertumbuhan dari bakteri. Sedangkan untuk kultur kerja dilanjutkan pada tahap identifikasi dan karakterisasi bakteri endofit secara makroskopis dan mikroskopis.

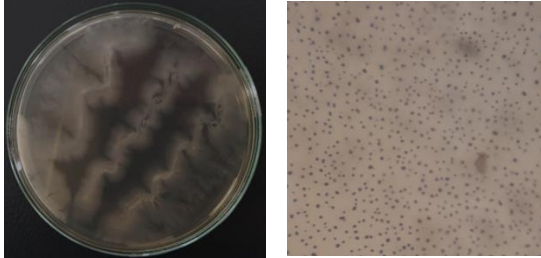
Karakterisasi Bakteri Endofit

Menurut [3], identifikasi dan karakterisasi makroskopik bakteri meliputi berupa bentuk koloni, warna, dan permukaan. Secara mikroskopis, identifikasi dan karakterisasi dilakukan dengan metode pewarnaan gram untuk mengetahui jenis gram bakteri dan bentuk bakteri secara mikroskopis.

Tabel 2. Karakteristik Morfologi Makroskopik Bakteri Endofit Pada Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Kode Isolat	Warna Koloni	Bentuk Koloni	Tepian Koloni	Elevasi Koloni
BR	Putih Kekuningan	Tidak Beraturan	Berbenang	Datar

Tabel 3. Karakteristik Morfologi Mikroskopik Bakteri Endofit Pada Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Kode Isolat	Gram	Bentuk
		
		(a) (b)

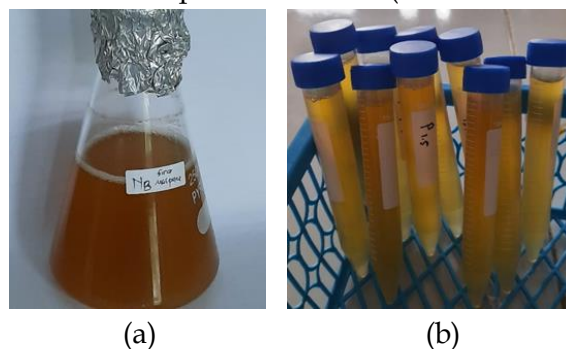
Gambar 3. Hasil uji karakterisasi bakteri endofit isolat (BR) dari Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.), (a) secara makroskopik, (b) secara mikroskopik (Perbesaran 100x)

Pada Pada hasil identifikasi dan karakterisasi bakteri endofit secara makroskopik ini, didapatkan isolat bakteri (BR) mempunyai warna putih kekuningan, berbentuk tidak beraturan, memiliki tepian berbenang dan elevasinya datar. Sedangkan pada hasil identifikasi dan karakterisasi bakteri endofit secara mikroskopik ini, didapatkan isolat bakteri (BR) termasuk dalam bakteri gram negatif (+) dan berbentuk *Coccus*. Dapat dilihat pada tabel (2), (3) dan gambar 3.

Terjadinya perubahan warna pada proses pewarnaan gram karena perbedaan struktur dinding sel dari kelompok bakteri itu sendiri sehingga dapat menyebabkan terjadinya perbedaan reaksi permeabilitas zat pewarna. Bakteri gram positif menolak dekolorisasi dan mempertahankan kompleks warna primer yang tampak berwarna ungu sedangkan bakteri gram negatif didekolorisasi oleh pelarut organik dan menyerap pewarna sekunder sehingga tampak berwarna merah.

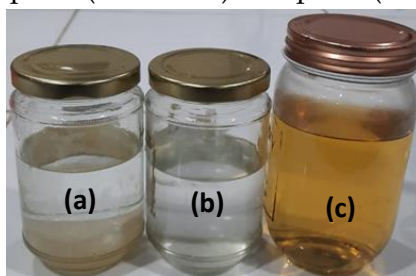
Produksi Supernatan Untuk Analisis Uji Aktivitas Antioksidan

Tahap produksi supernatan bertujuan untuk mendapatkan supernatan murni yang selanjutnya akan diekstraksi secara bertingkat yang diharapkan memiliki aktivitas antioksidan. Produksi supernatant diinkubasi kultur bakteri endofit dalam shaker inkubator selama 7 hari dilakukan pada media NB (*Nutrient Both*).



Gambar 4. (a) Hasil produksi supernatant, (b) sentrifugasi isolat (BR) bakteri endofit dari Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Pada proses fermentasi disentrifugasi hasil supernatan pada kecepatan 6000 rpm selama 1 jam dengan tujuan untuk memisahkan sel bakteri dan supernatan. Supernatan yang diperoleh dari hasil sentrifugasi merupakan ekstrak kasar metabolit sekunder. Hasil ini kemudian diekstraksi menggunakan metode partisi cair-cair dengan menggunakan pelarut secara bertingkat dengan dimulai menggunakan pelarut non polar (N-heksan), semi polar (Etil asetat) dan polar (Metanol).




Gambar 5. Hasil partisi cair-cair secara bertingkat, (a) N-Heksan, (b) Etil Asetat, (c) metanol, isolat (BR) bakteri endofit dari Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)


Selanjutnya hasil partisi cai-cair dilakukan pemekatan dengan menggunakan metode freeze drying. Pada hasil evaporasi diperoleh massa ekstrak dari masing-masing pelarut isolat (BR) yaitu sebesar 20 mg (N-Heksan); 26 mg (Etil asetat) dan 35 mg (Metanol).

Hasil Uji Bebas Pelarut

Pengujian bebas pelarut dengan menggunakan ekstrak n-heksan, etil asetat dan methanol bertujuan untuk mengetahui apakah ekstrak masih mengandung pelarut atau tidak yang dibuktikan dengan mengamati perubahan yang terjadi setelah dilakukan perlakuan.

Tabel 5. Hasil Uji bebas Pelarut Metanol, Etil Asetat dan N-Heksan Pada Ekstrak Hasil Supernatan Bakteri Endofit dari Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Identifikasi	Pereaksi	Hasil	Keterangan
Bebas N-Heksan	- Dibakar ekstraknya	(-) Negatif	Tidak menghasilkan api dan asap
Bebas Etil Asetat	- 2 mL NaOH - 2 mL Asam Asetat - 2 mL H ₂ SO ₄	 (-) Negatif	Tidak ada bau eteil asetat
Bebas Metanol	- 1 tetes larutan asam sulfat pekat		Tidak ada warna permangat

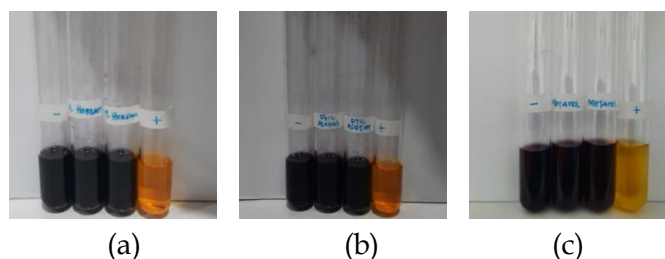
	<ul style="list-style-type: none"> - 1 tetes larutan KMnO_4 didiamkan 10 menit - Tetes demi tetes larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 	 <p>(-) Negatif</p>	(coklat)
--	--	---	----------

Pada uji bebas pelarut diperoleh hasilnya yaitu ekstrak metanol tidak terdapat warna permanganat (Coklat). Hal ini sesuai dengan penelitian [4], menyatakan bahwa hasil dari bebas pelarut metanol yaitu tidak ada warna permanganat (Coklat), hasil ekstrak etil asetat yang diperoleh yaitu tidak adanya tercium bau ester, hal ini menandakan bahwa ekstrak sampel benar-benar bebas dari pelarut etil asetat. Sedangkan hasil ekstrak n-heksan yang diperoleh yaitu tidak menghasilkan api dan asap setelah dibakar di atas api bunsen, hal ini menandakan bahwa ekstrak sampel benar-benar bebas dari pelarut n-heksan. Menurut [10], ekstrak dikatakan bebas dari pelarut etil asetat dan n-heksan apabila tidak berbau ester dan tidak menghasilkan api dan asap.

Analisis Kualitatif Aktivitas Antioksidan

Uji kualitatif aktivitas antioksidan dalam penelitian ini dilakukan dengan metode DPPH. Metode DPPH merupakan suatu metode untuk menentukan aktivitas antioksidan dalam sampel dengan melihat kemampuannya dalam menangkal radikal bebas senyawa 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. Menurut [2], Pada metode DPPH terjadi interaksi antioksidan dengan DPPH secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH dan akan menetralkan radikal bebas dari DPPH. Hal ini ditandai dengan perubahan warna dari ungu menjadi kuning (senyawa radikal bebas tereduksi oleh adanya antioksidan).

Aktivitas antioksidan ekstrak n-heksan, etil asetat dan methanol dari supernatan bakteri endofit pada Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dilakukan dengan cara mereaksikan 1 mL ekstrak sampel dengan 4 mL larutan DPPH. Hal yang sama dilakukan pada control Vit. C.



Gambar 6. Hasil Analisis Kualitatif Aktivitas Antioksidan, (a) N-Heksan, (b) Etil Asetat, (c) metanol, isolat (BR) bakteri endofit dari Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Hasil uji aktivitas antioksidan secara kualitatif ekstrak n-heksan, etil asetat dan methanol dari supernatan isolate bakteri endofit pada Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) menunjukkan bahwa pada ekstrak n-heksan, etil asetat dan methanol dari

supernatan bakteri endofit batang Rosella tidak memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Hal ini ditunjukkan dari tidak adanya perubahan warna larutan DPPH dari ungu ke kuning yang menandakan jika berubah warna menjadi kuning berarti memiliki aktifitas antioksidan. Radikal DPPH yang sebelumnya berwarna akan kehilangan warnanya jika ada antioksidan, karena antioksidan akan menyumbang elektronnya kepada radikal DPPH, sehingga radikal yang sebelumnya tidak stabil (akibat adanya electron yang tidak berpasangan) menjadi stabil (elektron pada radikal bebas menjadi berpasangan karena mendapat sumbangan elektron dari antioksidan).

4. Kesimpulan

Berdasarkan Hasil Penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

Pada Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) terdapat 1 isolat bakteri endofit yaitu isolat (BR). Isolat bakteri endofit yang berhasil diisolasi menunjukkan karakteristik yaitu termasuk kategori bakteri gram positif dengan bentuk *coccus*. Pada uji aktivitas antioksidan secara kualitatif isolate bakteri endofit dari Batang Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) tidak menunjukkan adanya aktivitas sebagai antioksidan ditandai dengan radikal DPPH yang sebelumnya berwarna tidak kehilangan warnanya. Jadi penelitian ini tidak dilanjutkan ke pengujian aktivitas antioksidan secara kuantitatif.

Referensi

- [1] Desriani D et al. *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit dari Tanaman Binahong dan Katepeng China*. J Kesehat Andalas. 2014;3(2):89–93. Agustina Styawan, Hana M, Kusuma W. Analisis Kandungan Asam Retinoat Pada Sediaan Krim Malam Yang Beredar Di Toko X Kota Klaten Dengan Spektrofotometri UV-VIS. MOTORIK Journal Kesehatan, Vol.15.No.1,2020, ISSN Print -1907-218X Online - 2685-1210
- [2] Devitria, R. (2020). *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Ciplukan menggunakan Metode 2,2-Diphenyl 1-Picrylhydrazyl (DPPH)*. Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia, 9(1), hal. 31–36. doi:10.51887/jpfi.v9i1.800. Badan POM RI, 2007. Public Warning/Peringatan Tentang Kosmetik. Mengandung Bahan Berbahaya dan Zat Warna yang Dilarang. BPOM: Jakarta.
- [3] Djamaan, A., A. Anthoni, dan D. Yuni. (2012). *Isolasi bakteri endofit dari tumbuhan Surian yang berpotensi sebagai penghasil antibakteri*. Jurnal Bahan Alam Indonesia, 8(1).
- [4] Kusnadi, K., & Devi, E. T. (2017). *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Ekstrak Daun Seledri (*Apium graveolens* L.) dengan Metode Refluks*. PSEJ (Pancasakti Science Education Journal), 2(1), 56–67.
- [5] Komala, Oom. 2012. *Uji Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Lidah Mertua (*Sansevieria trifasciata* Prain) Terhadap Khamir *Candida albican**. Universitas Pakuan: Bogor.
- [6] Mardiah, Lia Amalia & Agus Sulaeman. 2010. *Ekstraksi Kulit Batang Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) Sebagai Pewarna Merah Alami*. Jurnal Pertanian, Volume 1 Nomor 1
- [7] Qonitah, F., & Ahwan. (2018). *Aktivitas Antioksidan Dan Kandungan Fenolik Total Dari Isolat Polar Fraksi Heksana Ekstrak Etanol Daun Sirih (*Piper Betle* L.)*. Jurnal Farmasetis, 7(2), 42–46.

- [8] Rahmawati, R., Muflihunna, A., dan Sarif, L. M. (2016). *Analisis Aktivitas Antioksidan Produk Sirup Buah mengkudu (Morinda citrifolia L.) Dengan Metode DPPH*. Jurnal Fitofarmaka Indonesia, 2(2), 97-101.
- [9] Sianipar GWS, Sartini S, & Riyanto R, 2020. *Isolasi dan Karakteristik Bakteri Endofit pada Akar Pepaya (Carica papaya L)*. Jurnal Ilmiah Biologi UMA (JIBIOMA), 2(2), 83-92.
- [10] Wulandari, A. (2017). *Pengaruh Perbedaan Pelarut Terhadap Polarisasi Kromatografi Ekstrak Temulawak (Curcuma Xanthorrhiza Roxb)*. Tegal: Politeknik Harapan Bersama.