

Isolasi Fungi Endofit Batang Bajakah (*Uncaria nervosa* Elmer) dan Pengujian Toksisitas dengan Metode BSLT

Isolation of Endophytic Fungi from Bajakah Stems (*Uncaria nervosa* Elmer) and Toxicity Testing by BSLT Method

Umi Khusnul Khotimah, M. Arifuddin, Fika Aryati, Islamudin Ahmad*

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

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

Abstrak

Bajakah (*Uncaria nervosa* Elmer) merupakan salah satu tumbuhan yang banyak tumbuh di Kalimantan Timur dan sulit dibudidayakan. Secara empiris, batang Bajakah dimanfaatkan oleh masyarakat pedalaman, khususnya masyarakat suku Dayak untuk pengobatan berbagai penyakit dengan cara meminum air rebusan, sehingga menyebabkan batang Bajakah di eksploitasi. Fungi endofit merupakan mikroba endofit yang hidup di jaringan tumbuhan secara asimtomatis dan dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder dengan berbagai aktivitas biologis salah satunya antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi fungi endofit batang Bajakah dan uji toksisitas dengan metode BSLT terhadap larva udang *Artemia salina* sebagai skrining awal untuk mengetahui potensi fungi endofit sebagai penghasil kandidat senyawa obat. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh 2 isolat fungi endofit batang Bajakah. Hasil uji toksisitas ekstrak isolat UN 3B diperoleh nilai LC₅₀ sebesar 21,4 ppm, sedangkan ekstrak isolat UN 4B sebesar 28,2 ppm. Pada masing-masing ekstrak bersifat sitotoksik karena dapat menyebabkan kematian 50% hewan uji pada konsentrasi <1000 ppm.

Kata Kunci: Bajakah, fungi endofit, uji sitotoksik, BSLT

Abstract

Bajakah (*Uncaria nervosa* Elmer) is one of the plants that grows a lot in East Kalimantan and difficult to cultivate. Empirically, Bajakah stems are used by rural communities, especially the Dayak people for the treatment of various diseases by drinking boiled water, causing Bajakah stems to be exploited. Endophytic fungi are endophytic microbes that live in plant tissues asymptotically and can produce

secondary metabolites with various biological activities, one of which is anticancer. This study aims to isolate the endophytic fungi of the Bajakah stem and test the toxicity using the BSLT method on *Artemia salina* shrimp larvae as an initial screening to determine the potential of endophytic fungi as a producer of candidate drug compounds. Based on the results of the study, 2 isolates of the endophytic fungi of the Bajakah stem were obtained. The results of the toxicity test of the UN 3B isolate extract obtained an LC₅₀ value of 21.4 ppm, while the UN 4B isolate extract was 28.2 ppm. Each extract is cytotoxic because it can cause the death of 50% of test animals at concentrations <1000 ppm.

Keywords: Bajakah, endophytic fungi, cytotoxic test, BSLT

Received: 31 March 2023

Accepted: 09 September 2023

DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v5iSE-1.2053>



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

How to Cite:

Khotimah, U.K., Arifuddin, M., Aryati, F., Ahmad, I., 2023. Isolasi Fungi Endofit Batang Bajakah (*Uncaria nervosa* Elmer) dan Pengujian Toksisitas dengan Metode BSLT. *J. Sains Kes.*, 5(SE-1). 40-45.
DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v5iSE-1.2054>

1 Pendahuluan

Indonesia merupakan salah satu negara yang kaya akan keanekaragaman hayati baik flora maupun fauna, terutama keragaman flora berupa tumbuhan obat-obatan. Salah satu keanekaragaman hayati yang berpotensi sebagai kandidat obat ialah bajakah. Tumbuhan ini digunakan untuk mengobati berbagai penyakit kanker [1]. Terdapat 19 spesies dari genus *Uncaria* ditemukan sebagai obat tradisional yang penting di Cina, Malaysia, Filipina, Afrika dan Amerika Tenggara dan lain-lain, digunakan untuk pengobatan asma, rematik, hiperpireksia, hipertensi dan sakit kepala. Lebih dari 200 senyawa telah diisolasi dari *Uncaria*, termasuk alkaloid indol, triterpen, flavonoid, fenol, fenil propanoid, dan lain-lain [2].

Tumbuhan Bajakah dimanfaatkan oleh masyarakat suku Dayak di Kalimantan Tengah secara turun-temurun digunakan untuk mengobati kanker, obat sakit perut biasa, diare,

maupun disentri dengan cara meminum air rebusan batang Bajakah [3]. Berdasarkan penelitian terhadap tumbuhan genus *Uncaria* memiliki aktivitas biologis, seperti: sebagai penurun tekanan darah, anti kejang, antiaritmia, sedatif, antidepresan, antitrombotik, respons terkait SSP, dan antioksidan [4]. Oleh karena itu, sangat penting untuk mengidentifikasi jenis Bajakah yang dimiliki oleh Indonesia dengan kemampuan aktivitasnya yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku obat.

Di Kalimantan Timur, terdapat berbagai jenis tumbuhan Bajakah yang masih belum diketahui kandungan senyawa metabolitnya [5]. Walaupun demikian, masyarakat sekitar mempercayai bahwa Bajakah merupakan tumbuhan berkhasiat dan dapat dijadikan sebagai obat kanker, sehingga saat ini masyarakat mengeksploitasi tumbuhan Bajakah secara terus-menerus dan diperjualbelikan dengan harga jual yang relatif tinggi. Oleh karena itu, untuk menghindari eksploitasi

Bajakah yang dapat menjadi ancaman lingkungan, perlu dilakukan pendekatan produksi senyawa dengan pemanfaatan fungi endofit yang dapat memproduksi senyawa metabolit sekunder yang sama dengan inangnya.

Fungi endofit termasuk ke dalam mikroba endofit yang dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder sesuai dengan inangnya. Mikroba endofit pada tanaman tinggi dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder akibat adanya transfer genetik. Mikroba endofit hidup pada jaringan tanaman dengan periode tertentu dan membentuk koloni tanpa membahayakan inangnya. Pemanfaatan keberadaan fungi endofit yang ada di dalam jaringan tumbuhan dapat memproduksi senyawa yang sama persis dengan inangnya dinilai lebih murah, ekonomis, dan cepat [6]. Dengan demikian, penelitian ini perlu dilakukan untuk memproduksi senyawa metabolit sekunder dengan pemanfaatan fungi endofit yang berasosiasi dengan tumbuhan Bajakah sebagai kandidat senyawa antikanker.

2 Metode Penelitian

2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu autoklaf, batang pengaduk, botol kaca, bunsen, cawan petri, chamber, erlenmeyer, gelas ukur, *hot plate*, *Laminar Air Flow* (LAF), oven, pisau bedah, pipet tetes, pipet ukur, propipet, pinset, *rotary evaporator*, sendok tanduk, *shaker*, spatel besi, spuit 10 mL, timbangan analitik, dan toples.

2.2 Bahan

Bahan yang diteliti adalah ekstrak isolat fungi endofit batang Bajakah (*Uncaria nervosa* Elmer), bahan lainnya yaitu air laut bebas protozoa, *aluminium foil*, aquadest, benang godam, larva udang *Artemia salina*, etanol 70%, etil asetat, n-heksan, kertas saring, medium *Potato Dextrose Agar* (PDA), medium *Potato Dextrose Broth* (PDB), metanol, NaOCl 5,25%, *plastic wrap*, dan streptomisin.

2.3 Prosedur

Pengambilan sampel batang Bajakah dilakukan di Kota Bontang, Kalimantan Timur,

Indonesia. Sampel batang Bajakah diambil dalam bentuk potongan batang dengan ukuran 20 cm dan diameternya ± 10 cm. Determinasi tumbuhan Bajakah dilakukan di Laboratorium Dendrologi Fakultas Kehutanan, Universitas Mulawarman, Kalimantan Timur.

Sterilisasi sampel uji dengan prinsip sterilisasi permukaan dengan suatu desinfektan. Sampel Bajakah dicuci dengan air mengalir hingga bersih dan kering, selanjutnya sampel direndam dalam alkohol 70% selama 1 menit, kemudian direndam lagi dalam NaOCl 5,25% selama 3 menit, dan dibilas dengan *aquadest* steril. Sampel yang telah disterilisasi permukaannya dikeringkan dengan tisu steril dan dipotong secara horizontal sampel dengan ukuran $\pm 1 \times 1$ cm dikerjakan secara aseptis di dalam LAF [7].

Isolasi fungi endofit dilakukan dengan teknik *direct seed planting*. Sampel yang telah disterilisasi permukaan, disayat menggunakan pisau bedah yang telah direndam dengan alkohol dan difiksasi. Sayatan sampel diambil menggunakan pinset steril dan ditempelkan ke dalam media PDA yang telah ditambahkan antibiotik streptomisin. Sebanyak ± 10 -15 mL media PDA dimasukkan ke dalam 3 cawan petri, diletakkan 3-4 potongan sampel pada satu cawan petri dan diinkubasi selama 2-5 hari pada suhu ruang 25°C. Dilakukan pengamatan tampak koloni fungi yang tumbuh [8].

Fungi yang telah tumbuh pada permukaan eksplan diinokulasikan ke dalam media PDA baru (subkultur) hingga diperoleh koloni fungi yang murni. Pengamatan dilakukan setelah diinkubasi selama 2-5 hari pada suhu ruang 25°C, jika masih ditemukan pertumbuhan koloni yang berbeda, maka dipisahkan kembali hingga diperoleh isolat murni. Isolat fungi endofit murni dipotong dari cawan petri sebesar 2×2 cm menggunakan pisau bedah steril kemudian ditumbuhkan pada media PDB steril yang digoyangkan menggunakan alat *shaker* selama 14 hari pada suhu 25°C untuk pembenihan [9].

Ekstraksi dilakukan pada masing-masing fungi endofit yang tumbuh dan media PDB yang digunakan saat pembenihan. Media PDB dan miselium fungi endofit dipisahkan menggunakan kertas saring. Miselium diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan etil asetat. Medium yang telah dipisahkan diekstraksi cair-cair menggunakan etil asetat

secara berulang kali hingga diperoleh pelarut etil asetat bening. Etil asetat dari media dan miselium dicampurkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Ekstrak yang telah dipekatkan disimpan untuk diuji aktivitasnya. Bobot ekstrak diperoleh dari selisih antara bobot botol berisi ekstrak dan bobot botol kosong [9].

Telur udang *Artemia salina* Leach diambil secukupnya kemudian dimasukkan ke dalam wadah penetasan yang berisi air laut sebanyak 1 liter, diberi lampu pijar selama 24 jam pada suhu ruang (25°C) yang dilengkapi dengan aerator. Setelah larva berumur 48 jam dari waktu penetasan dimasukkan 10 ekor ke dalam setiap botol vial, kemudian ditambahkan ekstrak dengan 5 seri konsentrasi dan didiamkan selama 1×24 jam serta diberi makan ragi dan cahaya [10]. Hasil pengujian sitotoksik dihitung dengan menghitung larva yang mati pada penampakan mikroskop dengan menggunakan persamaan 1.

$$\% \text{ Kematian} = \frac{\text{Jumlah larva mati}}{\text{Jumlah larva total awal}} \quad (\text{Persamaan 1})$$

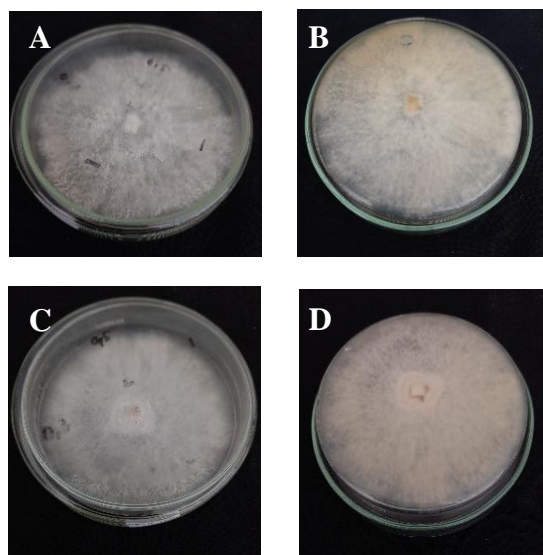
Selanjutnya, ditentukan nilai probit berdasarkan tabel probit sebelum ditentukan persamaan regresi linear. Hasil akhir berupa konsentrasi LC₅₀.

3 Hasil dan Pembahasan

Hasil identifikasi tumbuhan menunjukkan bahwa sampel yang digunakan adalah Bajakah (*Uncaria nervosa* Elmer) yang berasal dari famili Rubiaceae. Sampel Batang yang telah diambil, dilakukan sterilisasi permukaan secara bertingkat sebelum dilakukan isolasi yang bertujuan untuk membunuh mikroba epifit atau mikroba yang menempel dibagian permukaan jaringan tumbuhan, sehingga koloni yang tumbuh pada permukaan medium merupakan koloni mikroba endofit, dan memperkecil adanya kontaminasi pada proses isolasi.

Pada penumbuhan fungi endofit di media PDA selama 2-5 hari pada suhu 25°C diperoleh 2 isolat murni fungi endofit pada batang Bajakah (*Uncaria nervosa* Elmer), yaitu UN 3B dan UN 4B. Penggunaan medium pertumbuhan fungi

secara umum yaitu medium PDA agar tidak terjadi selektivitas dalam pertumbuhan fungi dan harapannya agar fungi yang tumbuh dapat optimal. Penambahan kloramfenikol pada medium PDA bertujuan untuk menghindari pertumbuhan bakteri yang dapat menghambat pertumbuhan jamur.



Gambar 1 Isolat murni fungi endofit dari batang Bajakah (*Uncaria nervosa* Elmer). A = tampak depan isolat UN 3B, B = tampak belakang isolat UN 3B, C = tampak depan isolat UN 4B, D = tampak belakang isolat UN 4B

Isolat fungi endofit selanjutnya diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat. Kemudian hasil ekstraksi dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Hasil rendemen ekstrak fungi endofit batang Bajakah dengan menggunakan metode ekstraksi cair-cair pelarut etil asetat yang telah dipekatkan dengan *rotary evaporator* isolat UN 3B diperoleh 3,136 gram dari 195 gram biomassa dan medium PDB sebanyak 1,6%, sedangkan isolat UN 4B 4,45 gram dari 249,826 gram biomassa dan medium sebesar 1,78%. Etil asetat merupakan pelarut yang baik untuk ekstraksi karena mudah menguap, tidak higroskopis, memiliki toksisitas rendah, dan bersifat semi polar, sehingga diharapkan mampu menarik senyawa yang bersifat polar dan nonpolar [11].

Ekstrak etil asetat yang telah didapat dari masing-masing isolat dilakukan pengujian aktivitas sitotoksik dengan metode BSLT

terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Ekstrak dari sampel akan dilihat toksisitasnya dalam mematikan larva udang yang telah diberi perlakuan dengan konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan

100 ppm. Hasil pengamatan persentase kematian *Artemia salina* setelah 24 jam terlihat dalam Tabel 1 dan Tabel 2.

Tabel 1 Uji BSLT dari ekstrak batang Bajakah (*Uncaria nervosa* Elmer) isolat UN 3B

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Terakumulasi		Mortalitas (%)	Nilai Probit	LC ₅₀ (ppm)
		Mati	Hidup			
Kontrol	-	-	50	-	-	
20	1,3	20	71	22,0	4,75	
40	1,6	54	41	56,8	5,47	
60	1,78	93	25	78,8	5,84	21,43
80	1,9	135	14	90,6	5,92	
100	2	179	6	96,8	5,99	

Tabel 2 Uji BSLT dari ekstrak batang Bajakah (*Uncaria nervosa* Elmer) isolat UN 4B

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Terakumulasi		Mortalitas (%)	Nilai Probit	LC ₅₀
		Mati	Hidup			
Kontrol	-	-	50	-	-	
20	1,3	23	66	25,9	4,90	
40	1,6	56	39	58,9	5,41	
60	1,78	94	22	81,0	5,71	28,184
80	1,9	137	10	93,2	6,08	
100	2	184	3	98,4	6,55	

Berdasarkan nilai persentase kematian pada Tabel 1 dan 2 terlihat bahwa semakin besar nilai konsentrasi ekstrak, maka kematian pada larva udang *Artemia salina* juga semakin besar. Meningkatnya kematian larva udang disebabkan oleh peningkatan konsentrasi dalam ekstrak. Suatu ekstrak menunjukkan toksisitas dalam BSLT jika ekstrak dapat menyebabkan kematian 50% hewan uji pada konsentrasi <1000 pm. Semakin besar nilai LC₅₀ maka semakin kecil toksisitasnya, sebaliknya makin kecil nilai LC₅₀ maka toksisitasnya lebih besar [12]. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan pengaruh yang dihasilkan pada partisi etil asetat mampu menyebabkan kematian 50% *Artemia salina* dengan nilai LC₅₀ sebesar 21,43 ppm dari isolat UN 3B, sedangkan 28,184 ppm dari isolat UN 4B.

4 Kesimpulan

Hasil rendemen ekstrak isolat fungi endofit batang Bajakah (*Uncaria nervosa* Elmer) UN 3B diperoleh sebanyak 3,136 gram, sedangkan ekstrak isolat UN 4B sebanyak 4,45 gram. Berdasarkan hasil pengujian toksisitas dengan metode BSLT diperoleh nilai LC₅₀ pada ekstrak isolat fungi endofit UN 3B yaitu 21,43 ppm,

sedangkan pada isolat UN 4B sebesar 28,184 ppm. Pada masing-masing ekstrak bersifat toksik. Suatu ekstrak menunjukkan aktivitas ketoksikan dalam uji toksisitas jika ekstrak dapat menyebabkan kematian 50% hewan uji pada konsentrasi < 1000 ppm.

5 Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kepada Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Kefarmasian "Farmaka Tropis" Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman atas kesempatannya menggunakan fasilitas laboratorium, sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik.

6 Pernyataan

6.1 Kontribusi Penulis

Umi Khusnul Khotimah selaku penulis, Muhammad Arifuddin. selaku dosen pembimbing Program Kreativitas Mahasiswa (PKM), Fika Aryati selaku dosen pembimbing II, dan Islamudin Ahmad selaku dosen pembimbing I.

6.2 Konflik Kepentingan

Tidak ada konflik kepentingan dalam penelitian ini.

7 Daftar Pustaka

- [1] S. Maulina, D. R. Pratiwi, and Erwin, "Skrining Fitokimia dan Bioaktivitas Ekstrak Akar *Uncaria nervosa* Elmer (Bajakah)," *J. At.*, vol. 4, no. 2, pp. 100–102, 2019, [Online]. Available: <http://jurnal.kimia.fmipa.unmul.ac.id/index.php/JA/article/download/902/556>.
- [2] Q. Zhang, J. J. Zhao, J. Xu, F. Feng, and W. Qu, "Medicinal Uses, Phytochemistry and Pharmacology of the Genus *Uncaria*," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 173, pp. 1–33, 2015.
- [3] P. P. Paramita and H. L. Tata, "Phytochemical Compounds Identification of Three Bajakah Species (*Salacia sp.*, *Uncaria acida*, and *Uncaria gambir*) using GC-MS Pyrolysis," *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 762, no. 1, pp. 1–12, 2021, doi: 10.1088/1755-1315/762/1/012043.
- [4] N. Qin *et al.*, "Recent Research Progress of *Uncaria* spp. based on Alkaloids: Phytochemistry, Pharmacology and Structural Chemistry," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 210, p. 112960, 2020, doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112960.
- [5] Fitriani, E. Sampepana, and S. H. Saputra, "Karakteristik Tanaman Akar Bajakah (*Spatholobus littoralis* Hassk) dari Loakulu Kabupaten Kutai Kartanegara," *J. Ris. Teknol. Ind.*, vol. 14, no. 2, pp. 365–376, 2020.
- [6] M. Arifuddin, M. Bone, Iswahyudi, A. Ibrahim, and L. O. Rijai, "Isolasi dan Karakterisasi Fungi Endofit Tanaman Tapak Dara (*Catharanthus roseus*)," *J. Trop. Pharm. Chem.*, vol. 4, no. 1, pp. 22–26, 2017.
- [7] S. H. Ramadhani, Samingan, and Iswadi, "Isolasi dan Identifikasi Jamur Endofit pada Daun Jamblang (*Syzygium cumini* L.)," *J. Ilm. Mhs. Fak. Kegur. dan Ilmu Pendidik. Unsyiah*, vol. 2, no. 2, pp. 77–90, 2017.
- [8] V. V. Hasiani, I. Ahmad, and L. Rijai, "Isolasi Jamur Endofit dan Produksi Metabolit Sekunder Antioksidan dari Daun Pacar (*Lawsonia inermis* L.)," *J. Sains dan Kesehat.*, vol. 1, no. 4, pp. 146–153, 2015, doi: 10.25026/jsk.v1i4.32.
- [9] A. Ramadhani, M. Arifuddin, and R. Rusli, "Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Ekstrak Fungi Endofit Akar Kuning (*Arcangelisia flava* L. Merr.)," *Proc. Mul. Pharm. Conf.*, vol. 1, pp. 21–24, 2021, [Online]. Available: <https://doi.org/10.25026/mpc.v13i1.438%0A1>.
- [10] J. Hasanah, R. Kartika, and P. Simanjuntak, "Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode Peredaman Radikal Bebas dan Sitotoksik dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Akar Bajakah (*Uncaria tomentosa* (Willd ex Schult). DC)," in *Prosiding Seminar Nasional Kimia Berwawasan Lingkungan*, 2020, pp. 50–54.
- [11] R. C. Rowe, P. J. Sheskey, and M. E. Quinn, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Sixth. Washington DC: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009.
- [12] J. L. Carballo, Z. L. Hernández-Inda, P. Pérez, and M. D. García-Grávalos, "A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products," *BMC Biotechnol.*, vol. 2, pp. 1–5, 2002, doi: 10.1186/1472-6570-2-17.