

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT FUNGI ENDOFIT DARI LAMUN
(*Needle seagrass*) MENGGUNAKAN METODE 1, 1 – DIPHENYL – 2 -
PICRYLHYDRAZYL (DPPH)**

Skripsi

Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai gelar Sarjana Farmasi



Oleh :

Nadya Rizky Wulan Sari

33101800055

kepada

PROGRAM STUDI FARMASI FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG

SEMARANG

2023

Skripsi

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT FUNGI ENDOFIT DARI LAMUN
(*Needle seagrass*) MENGGUNAKAN METODE 1, 1 – DIPHENYL – 2 -
PICRYLHYDRAZYL (DPPH)**

Dipersiapkan dan disusun oleh :

Nadya Rizky Wulan Sari

33101800055

Telah dipertahankan didepan Tim Penguji

Pada tanggal 13 Februari 2023

dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Susunan Tim Penguji

Pembimbing I



Rina Wijavanti, M.Sc., Apt

Pembimbing II



Fadzil Latifah, M.Farm., Apt

Anggota Tim Penguji 1



Ika Buana Januarti, M.Sc., Apt

Anggota Tim Penguji II



Azmi Rahmadani, M.Pharm.Sci., Apt

Semarang, 13 Februari 2023

Fakultas Kedokteran

Universitas Islam Sultan Agung

Dekan,



Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN

Yang Bertanda Tangan Di Bawah Ini :

Nama : Nadya Rizky Wulan Sari

NIM : 33101800055

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul :

“ UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT FUNGI ENDOFIT DARI LAMUN (*Needle seagrass*) MENGGUNAKAN METODE 1, 1 – DIPHENYL – 2 - PICRYLHYDRAZYL (DPPH) “

Adalah benar karya saya dan penuh kesadaran bahwa saya tidak melakukan tindakan plagiasi atau mengambil sebagian atau seluruh hasil karya tulis ilmiah orang lain tanpa menyebutkan sumbernya. Apabila dikemudian hari saya terbukti melakukan tindakan plagiat tersebut maka saya siap menerima sanksi apapun termasuk penvabutan gelar sarjana yang telah diberikan.

Semarang, 13 Februari 2023

Yang Menyatakan,



Nadya Rizky Wulan Sari

PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Nadya Rizky Wulan Sari

NIM : 33101800055

Program Studi : Farmasi

Fakultas : Kedokteran

Alamat : Tanjungsari RT. 18 RW. 05, Bentak, Sidoharjo, Sragen, Jawa Tengah

No HP/ Email : 082224048564/ rizkynadya9@gmail.com

Dengan ini menyatakan karya tulis ilmiah berupa skripsi dengan judul:

“ UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT FUNGI ENDOFIT DARI LAMUN (*Needle seagrass*) MENGGUNAKAN METODE 1, 1 – DIPHENYL – 2 - PICRYLHYDRAZYL (DPPH) “

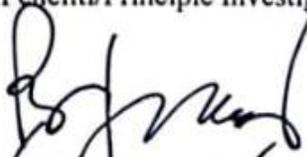
Dan menyetujuinya menjadi milik Universitas Islam Sultan Agung Semarang serta memberikan Hak Bebas Royalti Non Eksklusif untuk disimpan, dialih mediakan, dikelola dalam pangkalan data dan dipublikasikan di internet atau media lain untuk kepentingan akademis selama tetap mencantumkan nama penulis sebagai pemilik hak cipta. Apabila dikemudian terbukti ada pelanggaran Hak Cipta/ Plagiarisme dalam karya ilmiah ini, maka segala bentuk tuntutan hukum yang timbul akan saya tanggung secara pribadi tanpa melibatkan Universitas Islam Sultan Agung.

Mengetahui,

Semarang, 13 Februari 2023

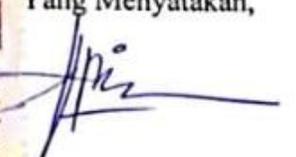
Dosen Peneliti/Principle Investigator

Yang Menyatakan,


Apt. Rina Wijayanti, M.Sc

NIDN : 0618018201




Nadya Rizky Wulan Sari

NIM : 33101800055

PRAKATA

Assalamualaiakum Wr. Wb

Puji Syukur kehadiran Allah SWT atas segala limpahan karunia-nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul **“UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT FUNGI ENDOFIT DARI LAMUN (*Needle seagrass*) MENGGUNAKAN METODE 1,1-DIPHENYL-2-PICRYLHYDRAZYL (DPPH)** “ untuk memenuhi syarat menempuh program Pendidikan Sarjana Farmasi di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Sholawat serta salam tetap tercurahkan kepada Nabi Besar Muhammad SAW beserta keluarga, sahabat, dan para pengikutnya.

Dengan terselesaikannya skripsi ini, terbuka kesempatan bagi penulis untuk menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar – besarnya kepada mereka yang telah membantu tersusunya skripsi ini. Ucapan terimakasih penulis haturkan kepada :

1. Bapak Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, Sp.KF., S.H selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Ibu Rina Wijayanti, M.Sc., Apt selaku Ketua Prodi Farmasi Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Ibu Rina Wijayanti, M.Sc., Apt selaku dosen pembimbing I dan Ibu Fadzil Latifah, M.Farm., Apt selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan

bimbingan dan pengarahan dengan sabar dan penuh pengertian pada penulis dalam menyelesaikan penelitian skripsi ini.

4. Ibu Ika Buana Januarti, M.Sc., Apt selaku penguji I, dan Ibu Azmi Rahmadani, M.Pharm.,Sci., Apt selaku penguji II yang telah memberi masukan dan saran kepada penulis untuk perbaikan skripsi ini.
5. LPPM UNISSULA yang telah mendanai penelitian ini dalam skema penelitian internal tahun 2022.
6. Kedua orang tua tercinta, Bapak Wiyono S.T, Ibu Sri Rejeki, Adek tercinta Refi Dian Fitriani, dan keluarga besar. Terima kasih yang tak terhingga atas doa, semangat, kasih sayang, dan pengorbanan dalam mendampingi. Serta selalu memberi dukungan baik moril maupun materil dan doa yang tak kunjung usai menyertai penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
7. Keluarga besar Formicidae 2018 yang menemani berjuang dari awal sampai akhir hingga dapat menempuh skripsi dan terselesaikannya skripsi ini.
8. Sahabat terdekat Farmasi di Kost Jasmine, Sahabat di Sragen, Asisten Klinik 2018, dan teman dekat saya yang selalu mendoakan, memberi dukungan, motivasi, dan semangat dalam penyusunan skripsi ini.
9. Tim penelitian Fungilon's (Aulia Rahmadhina Putri, Desi Ambarwati, Tasya Marelyya Anindita Putri Pancawati) yang selalu berjuang dan saling mendoakan, memberikan semangat, motivasi dalam terselesaikannya skripsi ini.

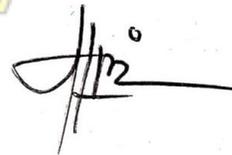
10. Analis Laboratorium Farmasi FK UNISSULA (Kak Ninis dan kak Tria) yang telah membantu persiapan penelitian skripsi ini.
11. Dosen Prodi Farmasi UNISSULA yang telah memberikan ilmu, dukungan, motivasi, dan semangat dalam penyusunan skripsi ini.
12. Serta pihak – pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu persatu, terima kasih atas bantuan dalam penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, karena itu sara dan kritik bersifat membangun dari berbagai pihak sangat penulis harapkan. Akhir kata penulis berharap semoga skripsi ini dapat menjadi bahan informasi yang bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan di bidang farmasi.

Wassalamualaikum Wr. Wb

Semarang, 13 Februari 2023

Penulis



Nadya Rizky Wulan Sari

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	Error! Bookmark not defined.
SURAT PERNYATAAN KEASLIAN.....	Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	Error! Bookmark not defined.
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR SINGKATAN.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR BAGAN.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
INTISARI.....	xvi
BAB I.....	1
PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	4
BAB II.....	5
TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Kajian Teori.....	5

2.1.1 Lamun <i>Halodule uninervis</i>	5
2.2 Isolasi Fungi Endofit	8
2.3 Ekstraksi	9
2.4 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	10
2.5 Antioksidan	11
2.6 Radikal Bebas	12
2.7 Fungi Endofit Lamun (<i>Needle seagrass</i>)	13
2.8 Uji Aktivitas Antioksidan menggunakan DPPH (<i>1,1-difenil-2-pikrilhidrazil</i>) 13	
2.9 Hubungan antara Isolat Fungi Endofit dengan Lamun (<i>Needle seagrass</i>) sebagai Aktivitas Antioksidan	15
2.10 Kerangka Teori	16
2.11 Kerangka Konsep	16
2.12 Hipotesis	16
BAB III.....	17
METODE PENELITIAN	17
3.1 Jenis Penelitian	17
3.2 Variabel dan Definisi Operasional	17
3.2.1 Variabel	17
3.2.2 Definisi Operasional	17
3.3 Populasi dan Sampel Penelitian	18
3.3.1 Populasi penelitian	18
3.3.2 Sampel Penelitian	19
3.4 Instrumen pada Bahan Penelitian	19
3.4.1 Instrumen Penelitian	19
3.4.2 Bahan Penelitian	19
3.5 Prosedur Penelitian	19
3.5.1 Determinasi Tanaman	19
3.5.2 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	20
3.5.3 Uji Aktivitas Antioksidan	20
3.6 Tempat dan Waktu Penelitian	23

3.6.1 Tempat	23
3.6.2 Waktu.....	23
3.7 Analisis Data.....	24
3.8 Alur Penelitian.....	25
BAB IV	26
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	26
4.1 Hasil Penelitian.....	26
4.1.1 Determinasi Tanaman Lamun (<i>Needle seagrass</i>)	26
4.1.2 Hasil Isolasi Fungi Endofit Tanaman Lamun (<i>Needle seagrass</i>)	27
4.1.3 Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	30
4.1.4 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan.....	31
4.1.5 Analisis Statistik Uji Aktivitas Antioksidan.....	34
4.2 Pembahasan	36
4.2.1 Determinasi Tanaman	36
4.2.2 Isolasi Fungi Endofit Tanaman Lamun (<i>Needle seagrass</i>)	36
4.2.3 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	39
4.2.4 Aktivitas Antioksidan Isolat Fungi Endofit Tanaman Lamun (<i>Needle seagrass</i>)	42
BAB V	46
PENUTUP.....	46
5.1 Kesimpulan.....	46
5.2 Saran	46
DAFTAR PUSTAKA	52
LAMPIRAN	54

DAFTAR SINGKATAN

µl	: Mikroliter
µg	: Mikrogram
ANOVA	: Analysis of Variance
°C	: Derajat Celcius
Cm	: Centimeter
DNA	: Deoxyribo Nucleic Acid
DPPH	: 2, 2-Diphenyl-1-Picrylhidrazyl
EtOH	: Etanol
IC ₅₀	: Inhibitory Concentration Of 50%
m	: Meter
MEA	: Malt Extract Agar
MeOH	: Metanol
mg	: Miligram
mL	: Milliliter
mM	: Milimolaritas
PDA	: Potato Dextrosa Agar
PDB	: Potato Dextrose Broth
Ppm	: Part Per Million
UV - Vis	: Ultraviolet Visibel
WHO	: World Health Organization
YMA	: Yeast Malt Agar

DAFTAR TABEL

Tabel 3. 1 Waktu Penelitian	24
Tabel 4. 1 Hasil Karakterisasi Makroskopis Fungi Endofit Lamun (<i>Needle seagrass</i>)	27
Tabel 4. 2 Hasil Karakterisasi Mikroskopis Fungi Endofit Lamun (<i>Needle seagrass</i>)	28
Tabel 4. 3 Aktivitas Antioksidan Vitamin C dan Sampel 1, Sampel 2, dan Sampel 3 Isolat fungi endofit tanaman lamun (<i>Needle seagrass</i>).....	32
Tabel 4. 4 Nilai p pada Uji Normalitas	34
Tabel 4. 5 Uji Homogenitas	34
Tabel 4. 6 Uji <i>Post HOC LSD</i>	35



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Lamun (<i>Needle seagrass</i>)	5
Gambar 2. 2 Reaksi penetralan DPPH	14
Gambar 4. 1 Hasil Karakterisasi Mikroskopis Fungi Endofit Sampel 1 (1), Sampel 2 (2), dan Sampel 3 (3) Perbesaran 40x.....	29
Gambar 4. 2 Isolasi fungi endofit tanaman lamun (<i>Needle seagrass</i>) sampel 1 (1), sampel 2 (2), dan sampel 3 (3).....	30
Gambar 4. 3 Hasil KLT sampel 1(1), sampel 2 (2), dan sampel 3 (3) isolat fungi endofit tanaman lamun (<i>Needle seagrass</i>) dengan eluen Dichlorometana dan metanol 10 : 1, pada sinar UV 366 nm (A), 254 nm (B), dan noda tampak secara kasat mata (C)	31
Gambar 4. 4 Kurva Aktivitas Antioksidan Vitamin C dan Sampel 1, Sampel 2, dan Sampel 3 Isolat fungi endofit tanaman lamun (<i>Needle seagrass</i>).....	33
Gambar 4. 5 Nilai IC50 dari Vitamin C dan Sampel 1, Sampel 2, dan Sampel 3 Isolat fungi endofit tanaman lamun (<i>Needle seagrass</i>)	33

DAFTAR BAGAN

Bagan 2. 1 Kerangka Teori	16
Bagan 2. 2 Kerangka Konsep	16
Bagan 3. 1 Alur Penelitian	25



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Ethical Clearance	54
Lampiran 2 Determinasi Tanaman.....	55
Lampiran 3 Surat Keterangan Penelitian	56
Lampiran 4 Indeks Polaritas Eluen Uji KLT	57
Lampiran 5 Hasil Uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis)	57
Lampiran 6 Perhitungan Pembuatan Larutan Uji Antioksidan	58
Lampiran 7 Hasil Uji DPPH Isolat Fungi Endofit dari Lamun (<i>Needle Seagrass</i>)	62
Lampiran 8 Hasil SPSS Uji Antioksidan	68
Lampiran 9 Dokumentasi Penelitian.....	73



INTISARI

Isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*) diketahui memiliki kandungan senyawa yang dapat digunakan sebagai antioksidan yaitu senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, fenol, steroid, dan terpenoid. Penelitian bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*) menggunakan metode DPPH.

Penelitian ini merupakan studi eksperimental dengan desain post – test only control group design. Isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*) didapat dengan cara dikultur ke media agar padat yaitu media PDAC, media beras, dan media MEA. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode *Diphenylpicrylhydrazyl* (DPPH) dengan konsentrasi 1000 ppm yang dibuat lima seri konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm dengan menganalisis antioksidan melalui IC_{50} . Pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometri UV - Vis. Analisis menggunakan *One Way Anova* yang dilanjutkan dengan *LSD*.

Hasil Penelitian menunjukkan terdapat perbedaan bermkna antara masing – masing kelompok. Kelompok sampel 1, sampel 2, dan sampel 3 memiliki aktivitas antioksidan dengan kategori kuat dengan nilai IC_{50} berturut – turut sebesar 90,15 $\mu\text{g/mL}$, 88,28 $\mu\text{g/mL}$, dan 81,31 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan vitamin C sebagai kontrol positif memiliki aktivitas antioksidan kategori sangat kuat sebesar 41,96 $\mu\text{g/mL}$. Penelitian ini memperlihatkan bahwa Isolat fungi endofit dari tanaman lamun (*Needle seagrass*) berpotensi sebagai antioksidan alami.

Kata kunci : Isolat fungi endofit , Lamun (*Needle seagrass*), Antioksidan, DPPH, IC_{50} .

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perilaku hidup masyarakat yang dapat menimbulkan dampak buruk pada pola hidup yang kurang sehat, misalnya pengonsumsi makanan instant, minuman alkohol dan merokok. Sehingga terbentuknya radikal bebas ditubuh manusia dan menimbulkan berbagai jenis penyakit, misalnya kanker (Leibo et al., 2017). Terdapat bukti bahwa radikal bebas memiliki sama dengan lebih dari atau sama dengan satu elektron bebas, *unstable*, dan mampu menarik elektron molekul lain dalam tubuh sehingga berpotensi terjadi kerusakan pada biomolekul dengan cara merusak integritas lipid, DNA dan protein yang mengarah pada kenaikan stres oksidatif misal penyakit kanker (Arnanda & Nuwarda, 2019).

Prevalensi kanker di Indonesia naik dari 1,4% berubah menjadi 1,8% (Permanasari et al., 2021). WHO menyatakan 9,6 juta orang di dunia meninggal karena kanker pada tahun 2018. Dari pernyataan tersebut, 30-50% bisa dilakukan pencegahan agar terhindar dari penyakit kanker (Lasari Hadrianti, Momen Amalia, 2018).

Radikal bebas dapat dihambat dengan senyawa antioksidan. Terdapat beberapa produk dapat digunakan sebagai sumber potensial obat yang mengandung antioksidan. Dengan ditemukan senyawa baru dengan struktural

yang beragam, unik, memiliki berat molekul rendah, dan dapat menjadi peluang produk alami bioaktif dari fungi yang berasal dari tanaman (Safwan et al., 2022). Antioksidan dapat ditemukan secara alami pada tanaman dan fungi diantaranya yang berasal dari isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*) (Jeyapragash et al., 2016).

Pengisolasian senyawa bioaktif dari tanaman dibutuhkan biomassa yang banyak. Cara yang mudah agar mendapatkan senyawa bioaktif tersebut yaitu penggunaan fungi endofit. Fungi endofit adalah mikroorganisme simbiotik yang hidupnya berada di jaringan tanaman dan tidak memberikan efek negatif pada tanaman inangnya. Pada penelitian Febrian Illahi & Karina (2021) menunjukkan bahwa pada lamun (*Needle seagrass*) adanya senyawa yang dapat digunakan untuk antioksidan yaitu senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, fenol, steroid, dan terpenoid. Pada hasil penelitian aktivitas antioksidan ekstrak lamun *Enhalus acoroides* memiliki nilai IC_{50} 38,008 $\mu\text{g/mL}$ dan termasuk kategori kuat (Sami Fitriyanti J, Nur syamsu, Sapra amriani, 2020).

Mikroba yang menghasilkan senyawa bioaktif salah satunya yaitu fungi endofit yaitu jamur yang pertumbuhannya mengkolonisasi pada jaringan tanaman (inang) seperti di bagian batang, akar dan daun. Fungi endofit mampu membentuk senyawa - senyawa bioaktif dan metabolit sekunder yang identik dengan inangnya. Kemungkinan dikarenakan fungi endofit mengalami transfer genetik dari inang yang berevolusi. Dimungkinkan untuk mengembangkan kemampuan fungi endofit

dalam mengubah senyawa bioaktif menjadi obat herbal. Dikarenakan fungi endofit adalah mikroorganisme yang mudah dibudidayakan, mempunyai siklus hidup pendek dan mampu menghasilkan senyawa bioaktif pada jumlah besar dengan metode fermentasi (Hasiani et al, 2015).

Berdasarkan latar belakang, penelitian ini dilakukan untuk membuktikan aktivitas antioksidan isolat fungi endofit yang terisolasi dari lamun (*Needle seagrass*). Untuk membuktikan aktivitas antioksidan digunakan metode DPPH. Metode DPPH mempunyai kelebihan dimana metode analisis yang memiliki sifat cepat, sederhana, mudah dan sensitifitas tinggi pada sampel yang konsentrasinya kecil (Wulansari, 2018).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka dapat dibuat rumusan masalah penelitian sebagai berikut:

1. Apakah isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*) memiliki aktivitas sebagai antioksidan dengan metode DPPH?
2. Berapa IC_{50} pada isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*)?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini untuk mengetahui apakah isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*) memiliki aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini untuk mengetahui IC_{50} pada isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*).

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah terkait aktivitas isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*) memiliki aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.

1.4.2 Manfaat Praktis

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan penelitian uji in vitro untuk menggali terkait potensi dari isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*) dengan konsentrasi 1000 ppm pada aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kajian Teori

2.1.1 Lamun *Halodule uninervis*

2.1.1.1 Lamun (*Needle seagrass*) *Halodule uninervis*

Gambar Lamun (*Needle seagrass*) *Halodule uninervis* tersaji pada Gambar 2.1. berikut:



Gambar 2. 1 *Lamun (Needle seagrass) (Ravilla et al., 2020)*

Padang lamun adalah ekosistem laut dangkal yang dominan dengan vegetasi lamun. Ekosistem padang lamun mempunyai peran sebagai ekologi kawasan pesisir, dikarenakan sebagai tempat tinggal biota laut

seperti tempat mencari makan (feeding ground) bagi ikan, dugong, echinodermata, penyu hijau dan gastropoda. Manfaat lainnya yaitu sebagai penahan untuk ekosistem terumbu karang dari ancaman sedimentasi dari daratan (Poedjirahajoe Erny, Mahayani Ni putu Diana, Boy R S, 2013).

Penurunan luas kawasan dan degradasi ekosistem lamun di Indonesia diimbangi dengan banyaknya pembalikan di permukaan air dikarenakan adanya kebijakan yang bertujuan untuk peningkatan ekonomi. Aktivitas industri dan manusia memberikan dampak pada ekosistem padang lamun. Misalnya, dilakukan pemanenan dan pembersihan padang lamun yang bertujuan tertentu, pencemaran minyak, limbah masuk atau sedimen dari daratan, baling – baling perahu atau pemasangan jangkar kapal yang dapat merusak padang lamun. Dampak adanya perubahan iklim, terjadi kepunahan atau menghilangnya padang lamun misalnya di muara sungai dan perairan dangkal. Disebabkan oleh suhu yang meningkat dapat mempengaruhi penyebaran dan proses reproduksi lamun (Poedjirahajoe Erny, Mahayani Ni putu Diana, Boy R S, 2013).

Agar tidak terjadi kepunahan, maka lamun diisolasi untuk didapatkan fungi endofit yang bisa memperoleh senyawa - senyawa bioaktif dan metabolit sekunder yang identic dengan inangnya (Hasiani et al., 2015).

2.1.1.2 Lamun (*Needle seagrass*)

Divisi	: Magnoliophyta
Sub division	: Spermathophyta
Classis	: Liliopsida
Sub Classis	: Alismatidae
Ordo	: Najadales
Familia	: Cymodoceaceae
Genus	: Halodule
Species	: <i>Halodule uninervis</i>

(Meisarani & Ramadhania, 2016)

2.1.1.3 Morfologi lamun (*Needle seagrass*) *Halodule uninervis*

Halodule uninervis memiliki daun yang panjang dan sempit sering membentuk padang rumput yang luas dengan memanjangkan rimpangnya. *Halodule uninervis* adalah lamun tipis seperti jarum, tanaman penurun abadi yang tumbuh hingga 2 - 4,5 cm dengan batang tegak dan kurus. Sekitar 2-4 daun muncul bergantian pada batang tegak pendek. Daun memiliki pelepah daun kokoh yang lebih persisten dengan panjang sekitar 1 - 3,5 cm, yang memanjang, terlipat, biurikulat dan ligulata. Helaian daunnya sempit-linier, lat tumbuh lurus dengan panjang 6 - 15cm dan lebar 0,25 – 5 mm. Puncak daun bergigi 3 dengan pelepah menonjol berwarna hijau tua. Daun mengandung tiga urat paralel yang berbeda. Memiliki akar yang sangat tipis pada rimpang sekitar 1-6 akar dan batang tegak pendek

pada setiap buku. Ini memiliki akar serabut, yang memanjang dengan rimpang dan membentuk padang rumput yang luas. Merupakan tumbuhan dioecious yang memiliki bagian bawah jantan dan betina terpisah sebagai bagian reproduksi. Bunganya kecil dan tumbuh di pangkal pelepah daun; bawah jantan ditanggung pada tangkai pendek dan tertutup dalam daun. Memiliki kepala sari merah kecil. Bagian bawahnya soliter dan terminal, terkubur dalam sedimen muncul hanya untuk waktu yang singkat (Ravilla et al., 2020).

2.1.1.4 Kandungan Kimia lamun (*Needle seagrass*) *Halodule uninervis*

Lavon, tanin terkondensasi, asam fenolat, asam fenolat sulfat dan lignin. turunan fenol dan fenilpropanoid seperti asam pcoumaric, asam caffeic, asam p-hidroksibenzoat dan asam vanilat (Ravilla et al., 2020).

2.1.1.5 Khasiat lamun (*Needle seagrass*) *Halodule uninervis*

Halodule uninervis menunjukkan aktivitas biologis yaitu sebagai antioksidan dan antibakteri (Ravilla et al., 2020).

2.2 Isolasi Fungi Endofit

Jenis - jenis media isolasi dengan inokulasi yaitu ada PDA (Potato Dextrose Agar), MEA (Malt Extract Agar), PDB (Potato Dextrose Broth), dan YMA (Yeast Malt Agar) atau media alami misalnya media yang menggunakan beras direbus dan media ekstrak buah cherry yang memiliki kandungan nutrisi berbeda dapat

diberfungsi untuk produksi metabolit sekunder. Kisaran suhu untuk pertumbuhan dari jamur yang baik yaitu 25°C. (Triastuti, 2020)

Fase pertumbuhan yang berbeda. Ketika sel diinokulasi ke dalam media kultur segar, mereka awalnya memasuki fase lag. Selama fase lag, sel menyesuaikan diri dengan media segar dengan mensintesis protein yang mempersiapkan sel untuk pertumbuhan. Fase ini panjangnya bervariasi, tergantung pada keadaan pertumbuhan sel yang diinokulasi, dan seluruh populasi kultur terdiri dari inokulum. Ketika sel-sel telah menyesuaikan diri dengan lingkungan baru, mereka mulai bertambah jumlahnya melalui pertumbuhan eksponensial. Selama fase eksponensial ini, pertumbuhan yang cepat menghasilkan penurunan yang cepat dalam proporsi populasi yang diinokulasi awal. Mengikuti pertumbuhan eksponensial, laju pertumbuhan menurun dan akhirnya populasi memasuki fase stasioner. Pada fase stasioner, sel tidak membelah atau membelah pada kecepatan yang sama saat mereka mati, sehingga mempertahankan jumlah populasi yang stabil. Pada akhirnya, populasi memasuki “fase kematian” di mana jumlah populasi berkurang (Kragh et al., 2018).

2.3 Ekstraksi

Ekstraksi adalah terjadinya zat aktif yang berpisah dari suatu padatan atau cairan dengan dibantu pelarut. Terdapat faktor yang mempengaruhi nilai koefisien perpindahan massa seperti kecepatan pencampuran, ukuran partikel, suhu dan sifat fisik padatan (Prayudo et al., 2015). Metode ekstraksi maserasi dilakukan dengan

cara bahan direndam menggunakan pelarut yang sesuai dengan bahan aktif yang akan diekstrak dengan atau tanpa pemanasan (Chairunnisa et al., 2019).

2.4 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Isolat yang didapat diuji kemurnian dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dua dimensi dengan menggunakan eluen. Jika isolat menghasilkan pola noda tunggal, maka dapat dikatakan isolat sudah murni (Podungge et al., 2017). KLT memiliki prinsip kerja yaitu adsorpsi, desorpsi, dan elusi. Dikatakan adsorpsi apabila larutan sampel dilakukan penotolan ke fase diam (plat KLT) dengan pipa kapiler, komponen - komponen yang ada di sampel akan teradsorpsi didalam fase diam. Dikatakan desorpsi apabila adanya peristiwa komponen yang teradsorpsi difase diam adanya pendesakan oleh fase geraknya (eluen), adanya persaingan diantara eluen dan komponen untuk adanya ikatan dengan fase diamnya. Elusi dapat diartikan peristiwa ketika komponen ikut terbawa oleh eluen. KLT mampu mengidentifikasi senyawa di dalam suatu campuran secara kualitatif, yaitu dengan dibandingkannya antara Rf baku pembanding dengan Rf sampel. KLT memiliki teknik analisis yang sederhana, biaya yang dikeluarkan lebih sedikit, mudah dilakukan, dan membutuhkan cuplikan sampel yang sedikit untuk analisisnya (Husa & Mita, 2020).

Isolat senyawa aktif dapat dilihat profilnya dari KLT menggunakan plat aluminium gel F₂₅₄ dengan fase diamnya silika gel dan fase geraknya diklorometana: metanol melalui perbandingan tertentu untuk dipisahkan dan diuji

senyawa – senyawa yang ada pada isolat dalam bentuk spot-spot terpisah. KLT menggunakan plat kaca dengan luas $2\text{ cm} \times 10\text{ cm}$ yang sudah dilakukan pengaktifan dengan cara dipanaskan selama sepuluh menit pada suhu 105°C (Wahdaningsih et al., 2015)

Fase diam berperan penting sebagai adsorben dalam penyerapan pelarut. Sedangkan, fase gerak berupa pelarut yang ditentukan dengan coba-coba berdasarkan dengan polaritas pelarut. Kemampuan ini disebut kekuatan elusi, dan urutan kekuatan elusi untuk pelarut yaitu air > metanol > etanol > aseton > etil asetat > kloroform > dietil eter > metilen diklorida > benzena > toluena > karbon tetraklorida > heksan > petroleum eter (Atun, 2014).

2.5 Antioksidan

Senyawa yang mampu menangkap radikal bebas yaitu antioksidan. Apabila nilai IC_{50} semakin rendah maka aktivitas antioksidannya menjadi semakin tinggi. Aktivitas antioksidan biasanya diekstrak dengan pelarut metanol, etanol, air, etil asetat, eter, dan butanol (Rahmi, 2017).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, ada 3 kelompok mekanisme aksi antioksidan terhadap radikal bebas, Rahmi (2017) yaitu:

a. Antioksidan primer

Pada antioksidan primer terjadi ketika atom hidrogen disumbangkan ke senyawa radikal, sehingga radikal antioksidan menjadi stabil. Misalnya, radikal

superoksida diubah oleh superoksida terbentuk molekul kemudian diubah menjadi produk yang stabil.

b. Antioksidan Sekunder

Antioksidan sekunder juga disebut system pertahanan preventif. Mekanisme radikal bebas baru terbentuk dengan terputusnya reaksi berantai dan pengikatan radikal bebas serta tercegahnya proliferasi senyawa radikal. Misalnya seperti vitamin A (betakaroten), vitamin C, vitamin E, kemudian senyawa fitokimia.

c. Antioksidan tersier

Pada antioksidan tersier mekanisme biomolekuler sangat berperan, contohnya rusaknya sel dan jaringan dikarenakan radikal bebas sehingga dapat diperbaiki.

2.6 Radikal Bebas

Radikal bebas yaitu atom atau molekul yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan sehingga mampu menarik elektron dari senyawa lain kemudian membentuk radikal bebas seperti dapat merusak makromolekul penyusun sel, misalnya: karbohidrat lemak, Deoxyribo Nucleic Acid (DNA), protein. Maka dari itu terjadi kerusakan sel dan menjadikan munculnya berbagai jenis penyakit misalnya penyakit kanker (Leibo et al., 2017).

Faktor yang dapat menghasilkan radikal bebas yaitu debu, asap, polusi, pola hidup yang kurang sehat, dan terbiasa mengonsumsi makanan cepat saji. Radikal bebas dapat dihambat dengan adanya senyawa antioksidan. Radikal bebas baru

ditubuh dapat dinetralkan, diturunkan, dan dihambat dengan aktivitas antioksidan dengan cara pendonor electron, sehingga elektron bebas pada radikal bebas membentuk pasangan serta terhentinya kerusakan tubuh (Arnanda & Nuwarda, 2019).

2.7 Fungi Endofit Lamun (*Needle seagrass*)

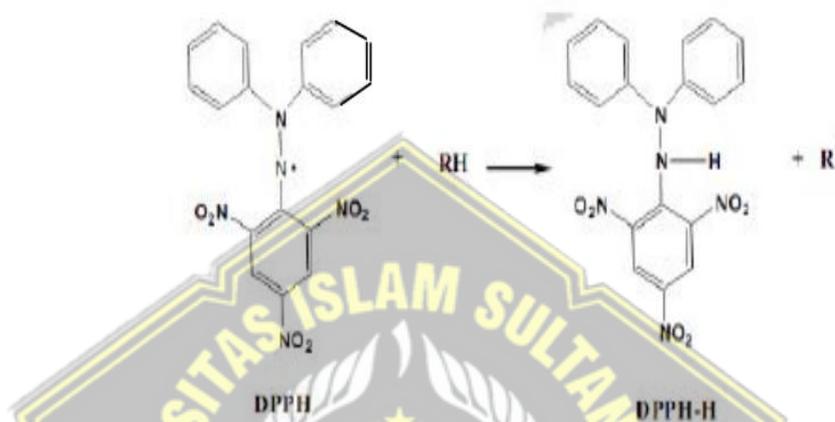
Endofit didefinisikan sebagai mikroorganisme yang menghabiskan setidaknya setengah dari siklus hidupnya menghuni tanaman inangnya tanpa melakukan kerusakan nyata pada inangnya. Diduga fungi endofit mengalami koevolusi melalui transfer genetik dari inangnya. Sehingga fungi endofit mampu membuat senyawa bioaktif dan metabolit sekunder identik dengan inangnya. Sebagai obat tradisional, lamun (*Needle seagrass*) *Halodule uninervis* menunjukkan aktivitas antioksidan, maka dari itu dilakukan isolasi untuk fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*) (Ravilla et al., 2020).

2.8 Uji Aktivitas Antioksidan menggunakan DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazyl*)

Berdasarkan teori DPPH, metode ini memiliki prinsip donor atom hidrogen (H+) dari zat yang diuji terhadap radikal DPPH tersebut yang diubah ke senyawa non radikal *diphenylpicrylhydrazine* dibuktikan adanya warna yang berubah, semula warna ungu berubah ke warna kuning (Rahmawati et al., 2016).

Uji aktivitas antioksidan tanaman dapat diketahui dengan metoda radikal bebas DPPH. Bertujuan memberikan efek IC₅₀ dilihat dari parameter konsentrasi ekuivalen. DPPH memberikan serapan kuat apabila adanya elektron yang tidak

berpasangan, dan absorbansi akan turun jika elektron berubah menjadi berpasangan. Warna larutan DPPH disemula ungu berubah menjadi warna kuning jika adanya senyawa antioksidan (Rahmi, 2017).



Gambar 2. 2 Reaksi penetralan DPPH (Rahmi, 2017)

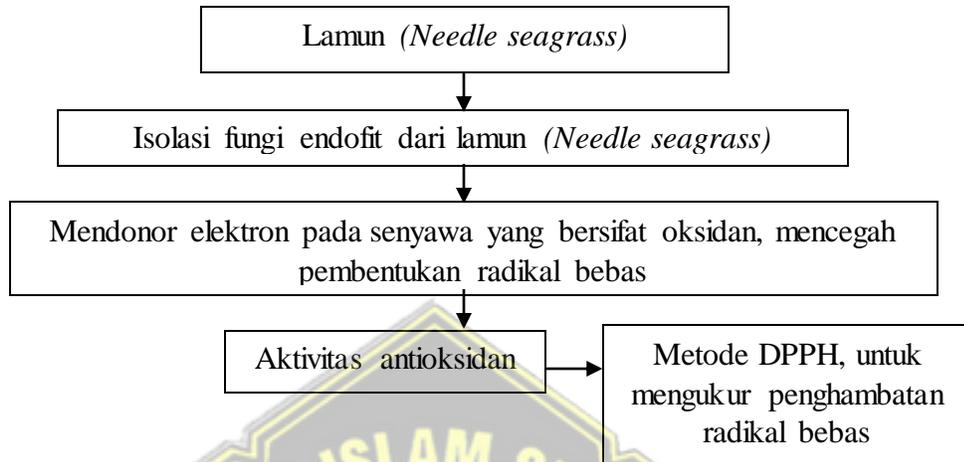
DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazyl*) diartikan sebagai senyawa radikal bersifat stabil, sehingga sebagai reagen untuk uji aktivitas antioksidan dengan dilarutkan pada pelarut metanol, dapat stabil dalam waktu yang lama apabila disimpan dikondisi yang baik dan kering. Metode *scavenger* radikal bebas DPPH mengalami reduksi dari senyawa radikal bebas akibat adanya antioksidan pada waktu larutan DPPH yang warna ungu bereaksi dengan senyawa antioksidan sebagai donor elektron, yang menjadikan warna ungu pada larutan pudar dan berubah warna kuning yang bersumber dari gugus pikrilnya. Besarnya daya peredaman dapat diketahui dengan spektrofotometri *UV-Vis*, yang memiliki prinsip pengukuran besarnya absorbansi dilihat dari warna larutan DPPH berubah dengan panjang gelombang (λ) maksimum (Constanty & Tukiran, 2021).

2.9 Hubungan antara Isolat Fungi Endofit dengan Lamun (*Needle seagrass*) sebagai Aktivitas Antioksidan

Pada lamun (*Needle seagrass*) terdapat senyawa utama yang dapat digunakan sebagai antioksidan yaitu senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, steroid, fenol, dan terpenoid (Febrian Illahi & Karina, 2021). Dimana pada senyawa tersebut mengandung hidrokarbon monoterpen dan terpenoid fenolik yang digunakan sebagai senyawa kimia utama penghasil aktivitas antioksidan terkuat. Senyawa fenolik dapat menghambat radikal bebas dengan cara atom hidrogen ditransfer dari gugus hidroksilnya. Pada mekanisme reaksi senyawa fenolik dengan radikal peroksil ($\text{ROO}\cdot$) terlibat transfer kation hidrogen antara fenol ke radikal, sehingga terbentuk keadaan transisi ikatan H-O dengan satu elektron (Parwata, 2016).

Diduga fungi endofit terjadi koevolusi transfer genetik dari inangnya. Sehingga fungi endofit mampu membentuk senyawa bioaktif dan metabolit sekunder yang sama dengan inangnya. Pada penelitian Sami Fitriyanti J, et al (2020) menjelaskan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak lamun *Enhalus acoroides* dengan konsentrasi 1000 ppm memiliki keefektifan sebagai antioksidan dengan didapatkan nilai IC_{50} 38,008 $\mu\text{g/mL}$ dan termasuk kategori kuat. Maka dari itu dilakukan isolasi untuk fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*) yang dapat digunakan sebagai antioksidan. (Febrian Illahi & Karina, 2021).

2.10 Kerangka Teori



Bagan 2. 1 Kerangka Teori

2.11 Kerangka Konsep



Bagan 2. 2 Kerangka Konsep

2.12 Hipotesis

Isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*) memiliki aktivitas sebagai antioksidan dengan metode DPPH.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian studi eksperimental laboratorium dengan desain *post – test only control group design*.

3.2 Variabel dan Definisi Operasional

3.2.1 Variabel

3.2.1.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*).

3.2.1.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas sebagai antioksidan.

3.2.2 Definisi Operasional

3.2.2.1 Isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*)

Isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*) adalah hasil kultur isolasi daun sehat lamun (*Needle seagrass*) yang diperoleh dari daerah Pantai Nipah, Dusun Nipah, Desa Malaka, Kecamatan Pemenang, Kabupaten Lombok Utara. Dimana Desa Malaka berada pada pertengahan intertidal hingga kedalaman 20 m, tumbuh di laguna sublittoral didepan

terumbu karang antara 0 – 3 m (Ravilla et al., 2020). Untuk mendapatkan senyawa antioksidan, lamun (*Needle seagrass*) diisolasi dengan cara dikultur ke media padat, dilakukan uji kemurnian dan fermentasi yang kemudian didapatkan isolat fungi endofit dan diuji aktivitas senyawa antioksidan dengan metode DPPH (Hasiani et al., 2015). Skala yang dipergunakan dalam penelitian ini yaitu rasio.

3.2.2.2 Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan adalah senyawa yang mampu menangkap radikal bebas, yang diukur dengan metode DPPH (2, 2-Difenil-1-Pikrilhidrazil) direaksikan dengan senyawa antioksidan yang berada di sampel. Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan nilai persen inhibisi dan nilai IC_{50} . Absorbansi dapat diukur dengan Spektrofotometer *UV-Vis* yang menggunakan panjang gelombang serapan maksimum DPPH konsentrasi larutan sampel 1000 ppm dilakukan pengenceran 20, 40, 60, 80, 100 ppm (Hasanah et al., 2017). Skala yang dipergunakan dalam penelitian ini yaitu skala rasio.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi penelitian

Populasi penelitian ini adalah isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*) yang telah dibuat dengan konsentrasi 1000 ppm.

3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*) dalam konsentrasi 1000 ppm yang dibuat lima seri konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm.

3.4 Instrumen pada Bahan Penelitian

3.4.1 Instrumen Penelitian

Instrumen yang digunakan pada penelitian ini meliputi instrumen atau peralatan yang digunakan pada penelitian ini meliputi spektrofotometri *UV-Vis*, timbangan elektrik analitik dan milligram, alat-alat gelas (*Pyrex*), mikropipet, corong, oven, vortex mixer, mikroskop, aluminium foil.

3.4.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi dari lamun (*Needle seagrass*), isolat fungi endofit, metanol (MeOH), aquadest, serbuk DPPH, vitamin C, dan diklorometana.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan dengan pengamatan morfologi tanaman melalui kunci determinasi yang berisi ciri – ciri khas takson tumbuhan. Identifikasi dan determinasi ini dilakukan di Laboratorium Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Mataram.

3.5.2 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi metabolit sekunder pada dilakukan dengan cara KLT dengan eluen atau fase geraknya diklorometana: metanol perbandingan 10:1 dalam 15 mL. Fase diamnya silica gel F₂₅₄ luas 2 x 10 cm yang sudah diaktifkan dioven pada suhu 105°C selama 30 menit. Ekstrak sampel 1, sampel 2, dan sampel 3 masing - masing ditimbang 50 mg dilarutkan dengan etil asetat pada labu ukur masing- masing 5 mL (Yuda et al., 2017). Dilakukan penotolan isolat volume 1 µL sebanyak lima kali dengan mikropipet 1 µL, jarak 0,5 cm dari bagian bawah dan 0,3 dibagian atas. Setiap penotolan, bercak dibiarkan sampai kering, selanjutnya dilakukan elusi dengan eluen yang sudah dijenuhkan di dalam chamber. Jarak elusinya sekitar 9,2 cm, jika sudah sesuai dengan yang diinginkan maka dihentikan elusi. Kemudian lempeng KLT diangin-anginkan sampai kering. Selanjutnya noda diamati pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Akan terlihat senyawa aktif radikal bebas dengan adanya noda warna kuning keputihan yang latar belakangnya ungu (Wahdaningsih et al., 2015).

3.5.3 Uji Aktivitas Antioksidan

3.5.3.1 Pembuatan larutan vitamin C sebagai kontrol positif

Dilakukan penimbangan 10 mg vitamin C kemudian larutkan dengan metanol p.a pada labu ukur hingga 10 mL sampai tanda batas, kemudian akan diperoleh nilai konsentrasi larutan 1000 ppm. Lakukan pengenceran

dari larutan vitamin C menjadi larutan dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 ppm dengan memipet setiap larutan induk 0,025; 0,050; 0,075; 0,1; 0,125; dan 0,15 ml menggunakan mikropipet atau dengan cara memipet sebanyak 25, 50, 75, 100, 125, 150 μL larutan induk vitamin C, dilakukan penambahan 1 mL larutan DPPH 0,1 mM dan metanol p.a ke labu takar 5 mL sampai tanda batas (Nuraeni & Sembiring, 2018).

3.5.3.2 Pembuatan larutan DPPH 0,1 mM

Dilakukan penimbangan serbuk DPPH 9,8 mg dilarutkan pada labu ukur 250 mL add metanol p.a sampai tanda batas. Kemudian diperoleh konsentrasi DPPH 0,1 mM. Selanjutnya sebelum disimpan di lemari es, agar terhindar dari cahaya labu ukur dilapisi dengan alumunium foil (Hasanah et al., 2017).

3.5.3.3 Pengukuran panjang gelombang serapan maksimum larutan DPPH

Larutan DPPH 0,1 mM sebanyak 2 mL dituang ke dalam tabung reaksi, selanjutnya dilakukan penambahan dengan larutan metanol p.a 2 mL dan dibungkus alumunium foil, divortex sampai homogen, lalu dimasukkan ke dalam kuvet. Setelah itu diukur dengan spektrofotometri *UV-Vis* pada panjang gelombang maksimum 400 – 600 nm (Salim, 2018).

3.5.3.4 Penentuan *operating time* larutan DPPH

Penentuan *operating time* pada larutan DPPH 0,1 mM dengan direaksikan 50 μL antara baku pembanding vitamin C yang ditambah 4,0

mL larutan DPPH 0,1 mM, divortex selama 1 menit agar homogen. Kemudian dilakukan pengecekan absorbansi pada menit ke 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, dan 60 pada λ maksimal yang telah didapat (Hasanah et al., 2017).

3.5.3.5 Pembuatan larutan isolat

Sampel yang digunakan adalah isolat fungi endofit dari daun lamun (*Needle seagrass*), isolat dibuat dalam konsentrasi 1000 ppm sebagai larutan induk dengan melakukan penimbangan 10 mg isolat diletakkan ke labu ukur 10 mL dan dilakukan pengenceran menggunakan metanol untuk isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*) sampai tanda batas, kemudian digojok agar homogen. Selanjutnya, buat larutan seri tiap sampel dibuat dalam konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100 ppm dengan cara memipet setiap larutan induk 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL, ditambah metanol p.a hingga tanda batas. Kemudian, sampel pada masing-masing konsentrasi dilakukan pengambilan sebanyak 1 mL serta dilakukan penambahan larutan DPPH 0,1 mM yaitu 3 ml dimasukkan ke tabung reaksi, dilakukan vortex selama 20 detik setelah itu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 25-27 °C dan dilakukan replikasi pembacaan spektrofotometri sebanyak 3 kali (Hasanah et al., 2017).

3.5.3.6 Penentuan Aktivitas Antioksidan (IC_{50} Sampel)

Sampel diukur absorbansinya pada λ 539 nm dengan spektrofotometer, kemudian absorbansi dari sampel larutan DPPH 0,1 mM dibandingkan

dengan kontrol. Blanko menggunakan metanol p.a. Absorbansi adalah rasio intensitas cahaya yang terserap terhadap intensitas cahaya datang. Nilai absorbansi tergantung pada konsentrasi zat yang ada didalamnya, semakin besar kuantitas zat yang ada didalam sampel, maka akan semakin besar terserapnya molekul cahaya pada panjang gelombang tertentu, mengakibatkan nilai absorbansi berbanding lurus dengan konsentrasi zat sampel (Gusnedi, 2013). Persentase penghambatan dihitung dengan persamaan berikut:

$$\text{Persen inhibisi} = \left(1 - \frac{\text{abs sampel}}{\text{abs kontrol}}\right) \times 100 \%$$

Pengujian untuk menentukan kemampuan inhibitor yang diperlukan untuk mencakup IC₅₀ nilai yang mewakili konsentrasi minyak esensial yang menyebabkan penghambatan 50%. Konsentrasi inhibitor yang dibutuhkan untuk menghambat 50% diperoleh dengan ekstrapolasi persen indeks antioksidan versus kurva konsentrasi. (Pujiarti et al., 2017)

3.6 Tempat dan Waktu Penelitian

3.6.1 Tempat

Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium FK UNISSULA, dan Laboratorium Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Mataram.

3.6.2 Waktu

Waktu dilaksanakan penelitian:

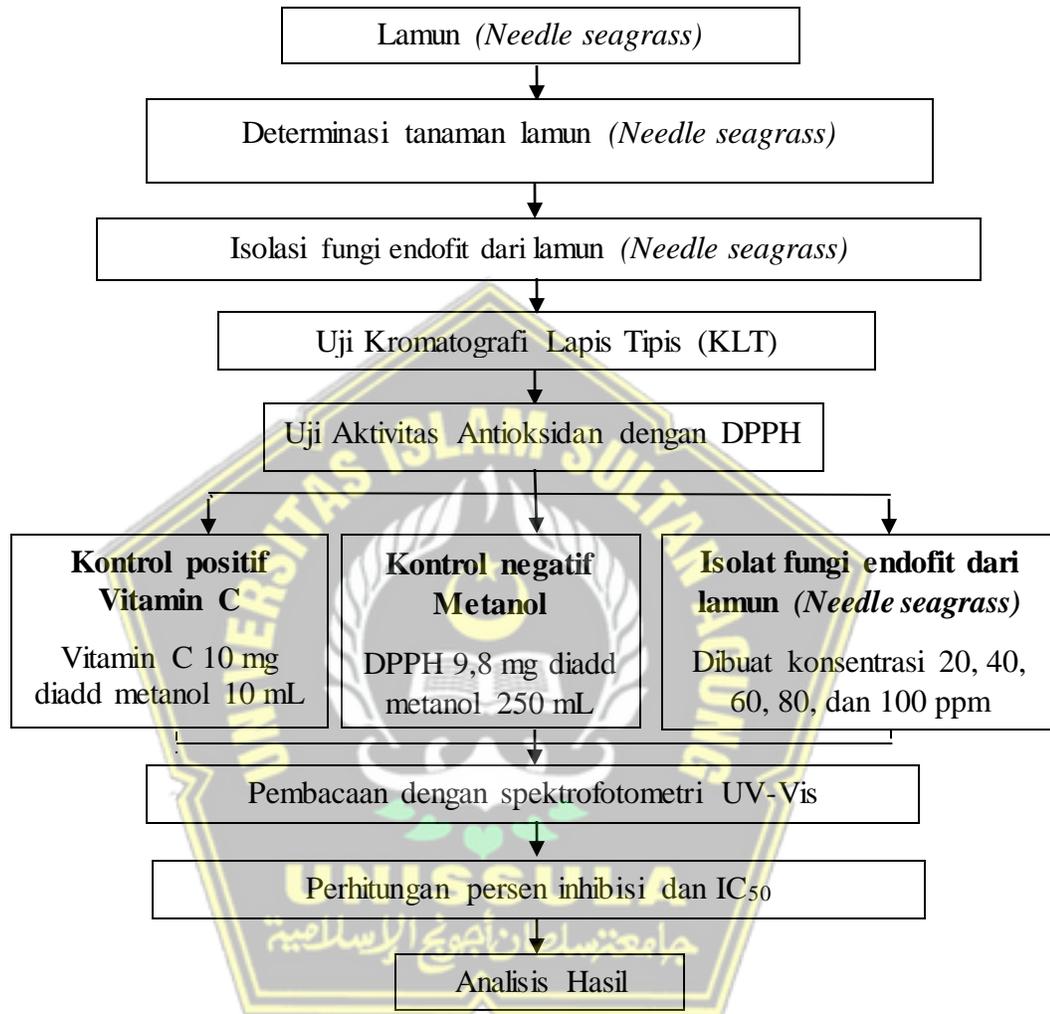
Tabel 3. 1 Waktu Penelitian

No	Jenis Kegiatan	Waktu						
		3 2022	4 2022	5 2022	6 2022	7-12 2021	7-11 2022	1 2023
1.	Penyiapan sampel & pembuatan proposal							
2.	Determinasi tanaman							
3.	Isolasi							
4.	Uji KLT fungi endofit							
5.	Pengujian aktivitas antioksidan							
6.	Analisis Data							
7.	Penyusunan naskah							

3.7 Analisis Data

Data yang didapat dilakukan uji normalitas dan homogenitas menggunakan *shapiro wilk* dan *levene test* dengan tingkat kepercayaan $p \geq 0,05$. Jika hasil normal dan homogen dilakukan uji parametrik *One way anova* dengan tingkat kepercayaan $p \geq 0,05$. Hasil memiliki perbedaan bermakna sehingga dilanjutkan dengan menggunakan *post hoc LSD*.

3.8 Alur Penelitian



Bagan 3. 1 Alur Penelitian

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

4.1.1 Determinasi Tanaman Lamun (*Needle seagrass*)

Determinasi tanaman lamun (*Needle seagrass*) dilakukan di Laboratorium Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Mataram. Diperoleh hasil determinasi tanaman sebagai berikut, tertuang pada lampiran 2.



Diviso : Magnoliophyta
Sub division : Spermathophyta
Classis : Liliopsida
Sub Classis : Alismatidae
Ordo : Najadales
Familia : Cymodoceaceae
Genus : Halodule
Species : *Halodule uninervis*

Hasil determinasi tersebut menunjukkan bahwa tanaman lamun (*Needle seagrass*) yang digunakan dalam penelitian ini merupakan spesies *Halodule uninervis*.

4.1.2 Hasil Isolasi Fungi Endofit Tanaman Lamun (*Needle seagrass*)

Isolat fungi endofit lamun (*Needle seagrass*) didapatkan dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Bp. Safwan, M.Sc Ph.D dari Universitas Muhammadiyah Mataram yang laporan penelitiannya belum dipublikasikan. Isolat fungi endofit tersebut diperoleh dari tanaman lamun (*Needle seagrass*) *Halodule uninervis* yang diperoleh dari daerah Pantai Nipah, Dusun Nipah, Desa Malaka, Kecamatan Pemenang, Kabupaten Lombok Utara. Penelitian tersebut menghasilkan tiga fungi endofit dari tanaman lamun (*Needle seagrass*).

Hasil karakterisasi isolasi fungi endofit tanaman lamun (*Needle seagrass*) secara makroskopis dan mikroskopis tersaji pada tabel 4.1 dan tabel 4.2 berikut ini :

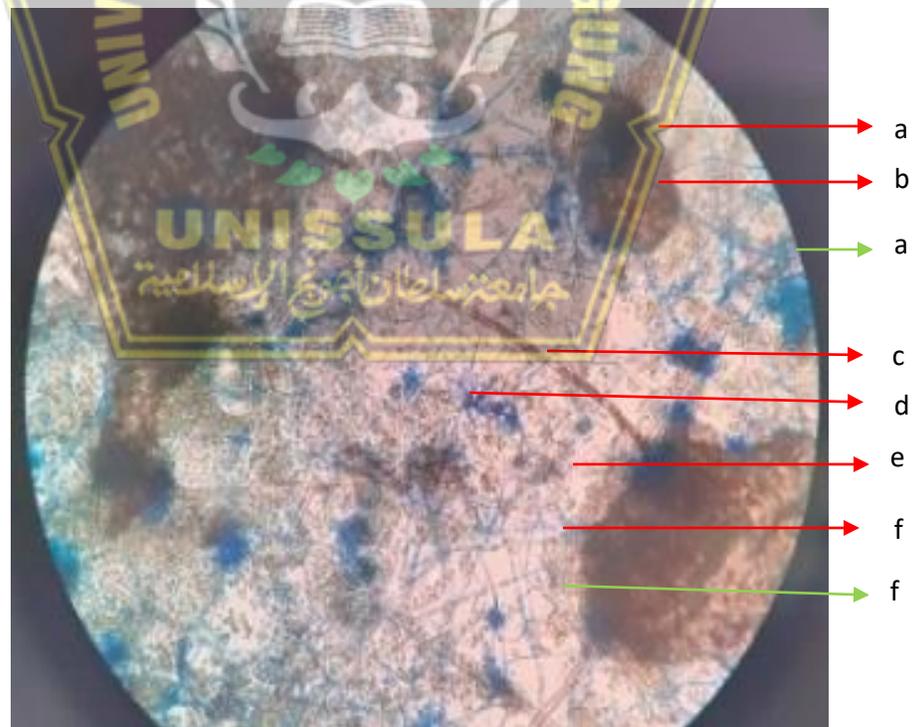
Tabel 4. 1 Hasil Karakterisasi Makroskopis Fungi Endofit Lamun (*Needle seagrass*)

	Sampel 1	Sampel 2	Sampel 3
Warna permukaan	Putih pasir	Putih pasir	Putih (light ivory)
Warna sebalik koloni	Putih kekuningan (cream)	Putih (Chamonix)	Putih (Excellent whit)
Tekstur koloni	Kapas	Beludru/datar	Beludru/datar
Zonasi	Tidak ada	Ada	Ada
Pertumbuhan	Cepat	Moderat hingga cepat	Moderat hingga cepat
Tetes eksudat	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
Garis radial	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada

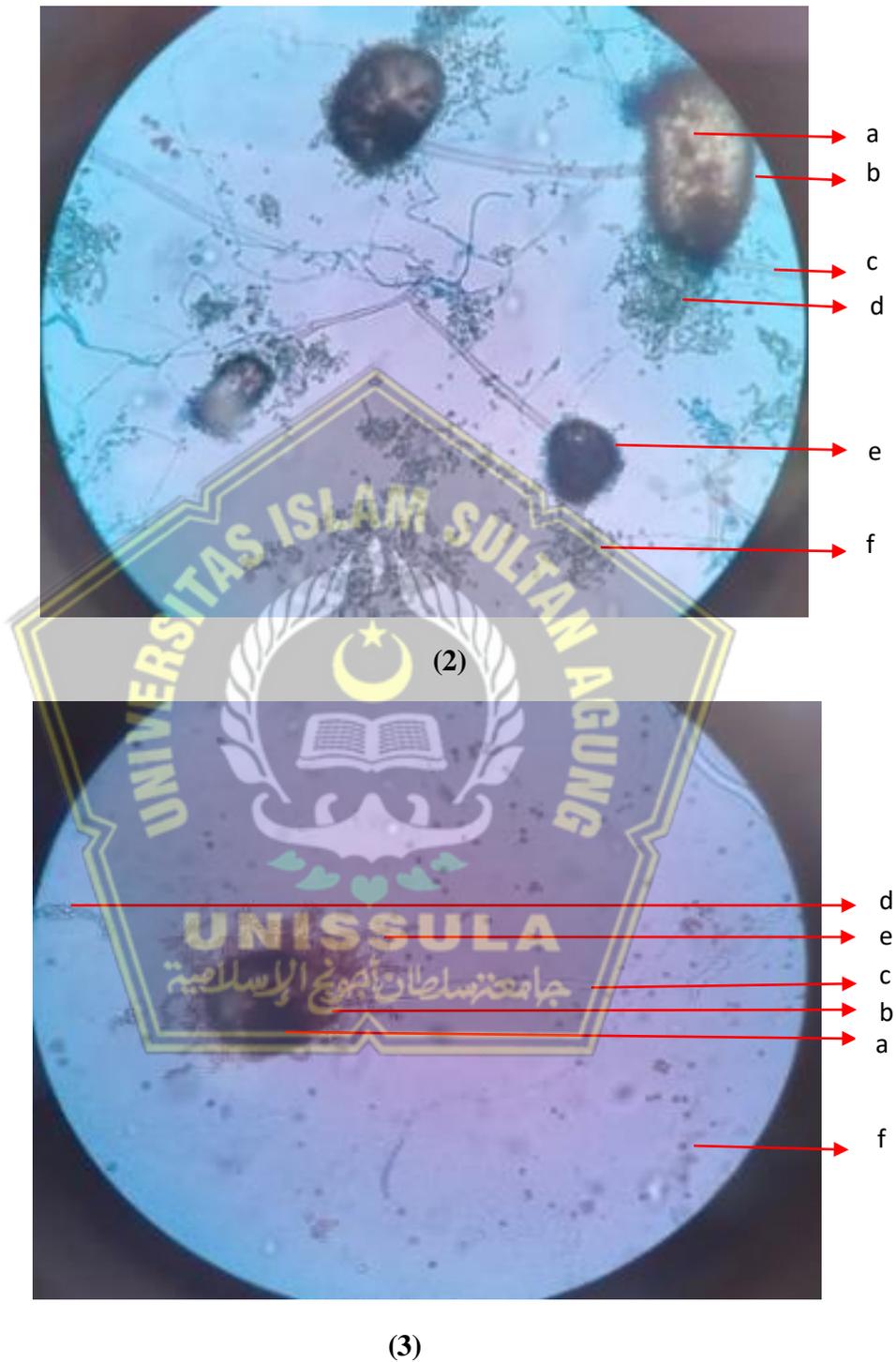
**Tabel 4. 2 Hasil Karakterisasi Mikroskopis Fungi Endofit Lamun
(*Needle seagrass*)**

	Sampel 1	Sampel 2	Sampel 3
Warna konidia	Hitam dan Biru	Hitam	Hitam
Bentuk konidia	Bulat tdk beraturan	Bulat telur	Bulat telur
Hifa	Bersekat (Septat) Multinukleat	Bersekat (Septat) Multinukleat	Bersekat (Septat) Uninukleat
Misellium	Ada	Ada	Ada
Spora	Ada	Ada	Ada
Warna Koloni	Hitam dan biru	Biru kehitaman	Abu – abu

Hasil gambar karakterisasi isolasi fungi endofit tanaman lamun (*Needle seagrass*) secara mikroskopik tersaji pada gambar 4.1 berikut ini:



(1)



Gambar 4. 1 Hasil Karakterisasi Mikroskopis Fungi Endofit Sampel 1 (1), Sampel 2 (2), dan Sampel 3 (3) Perbesaran 40x

Keterangan :

- a = Warna konidia
- b = Bentuk konidia
- c = Hifa
- d = Misellium
- e = Spora
- f = Warna koloni

Fungi jenis a	→
Fungi jenis b	→

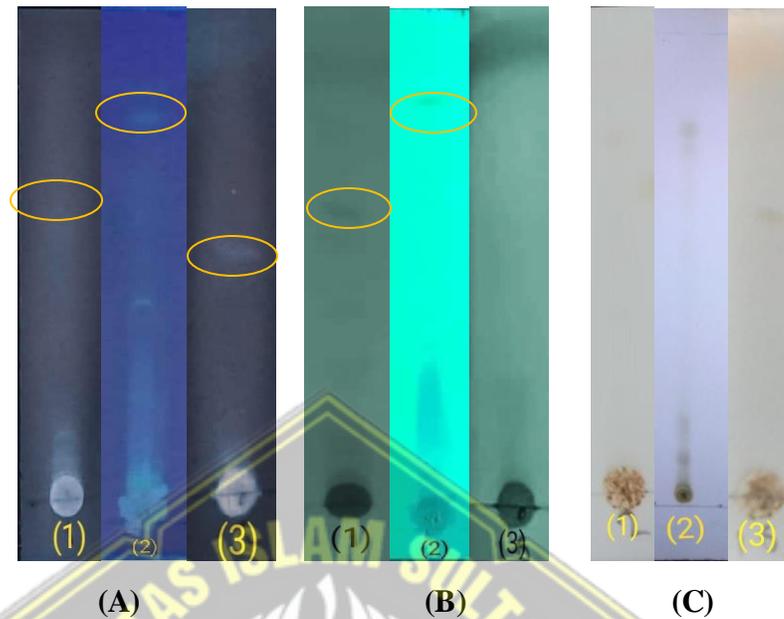
Hasil gambar isolasi fungi endofit tanaman lamun (*Needle seagrass*) secara makroskopik tersaji pada gambar 4.2 berikut ini:



Gambar 4.2 Isolasi fungi endofit tanaman lamun (*Needle seagrass*) sampel 1 (1), sampel 2 (2), dan sampel 3 (3)

4.1.3 Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Dilakukan uji KLT, pada hasil uji KLT isolat fungi endofit tanaman lamun (*Needle seagrass*) menunjukkan nilai Rf pada sampel 1 yaitu 0,57, nilai Rf sampel 2 yaitu 0,76, dan nilai Rf sampel 3 yaitu 0,54 (Lampiran 7). Hasil uji KLT tersaji pada gambar 4.3 berikut ini:



Gambar 4.3 Hasil KLT sampel 1(1), sampel 2 (2), dan sampel 3 (3) isolat fungi endofit tanaman lamun (*Needle seagrass*) dengan eluen Dichlorometana dan metanol 10 : 1, pada sinar UV 366 nm (A), 254 nm (B), dan noda tampak secara kasat mata (C)

4.1.4 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan

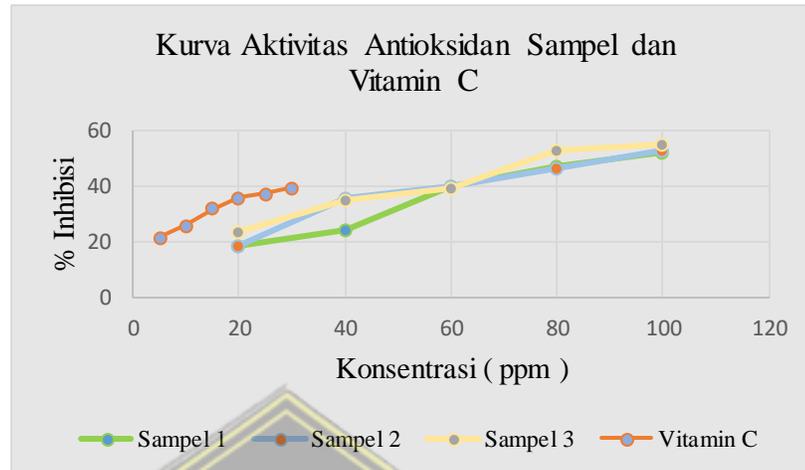
Uji aktivitas antioksidan dilakukan pada sampel 1, sampel 2, sampel 3 isolat fungi endofit tanaman lamun (*Needle seagrass*) untuk mengetahui isolat paling aktif. Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH dan aktivitas antioksidan dinyatakan dengan nilai IC_{50} . Pada penelitian ini menggunakan vitamin C sebagai kontrol positif. Hasil aktivitas antioksidan dari vitamin C dan sampel 1, sampel 2, sampel 3 isolat fungi endofit tanaman lamun (*Needle seagrass*) tersaji pada tabel 4.3, kurva aktivitas aktivitas antioksidan dari vitamin C dan sampel 1, sampel 2, sampel 3 isolat fungi endofit tanaman lamun (*Needle seagrass*) tersaji pada gambar 4.4 dan

gambar nilai IC₅₀ dari Vitamin C dan sampel 1, sampel 2, sampel 3 isolat fungi endofit tanaman lamun (*Needle seagrass*) tersaji pada gambar 4.6.

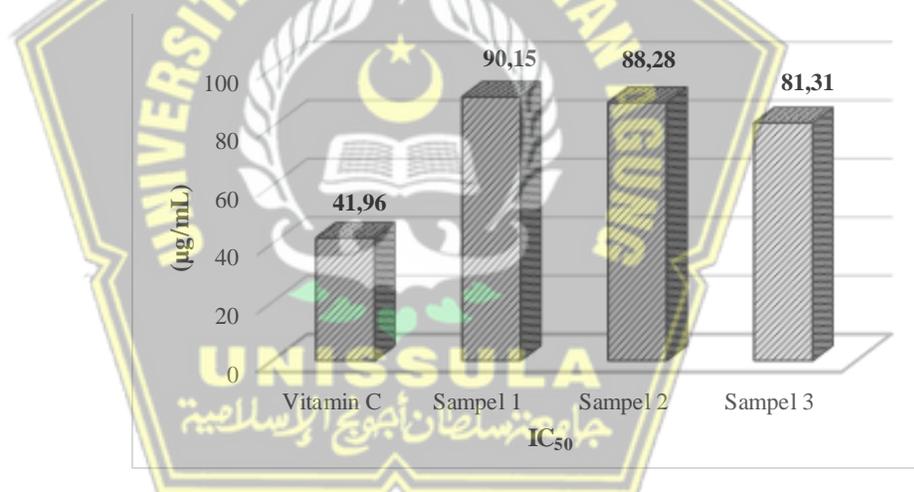
Tabel 4.3 Aktivitas Antioksidan Vitamin C dan Sampel 1, Sampel 2, dan Sampel 3 Isolat fungi endofit tanaman lamun (*Needle seagrass*)

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Rerata Abs	% Inhibisi	Persamaan regresi	IC ₅₀ (µg/mL)
Vitamin C	5	0.4778	21.83	y = 0.7316x + 19.295 r = 0.9563	41,96
	10	0.4532	25.86		
	15	0.4162	31.91		
	20	0.3918	35.90		
	25	0.3830	37.34		
	30	0.3683	39.75		
Sampel 1	20	0.4973	18.64	y = 0.4493x + 9.493 r = 0.9821	90,15
	40	0.4621	24.49		
	60	0.3682	39.76		
	80	0.3216	47.39		
	100	0.2929	52.08		
Sampel 2	20	0.4965	18.77	y = 0.3958x + 15.057 r = 0.9654	88,28
	40	0.3927	35.75		
	60	0.3669	39.98		
	80	0.3263	46.62		
	100	0.2878	52.92		
Sampel 3	20	0.4664	23.7	y = 0.4078x + 16.841 r = 0.9825	81,31
	40	0.3981	34.87		
	60	0.3691	39.62		
	80	0.2879	52.9		
	100	0.2722	55.47		

Absorbansi kontrol negatif = 0.6112



Gambar 4.4 Kurva Aktivitas Antioksidan Vitamin C dan Sampel 1, Sampel 2, dan Sampel 3 Isolat fungi endofit tanaman lamun (*Needle seagrass*)



Gambar 4.5 Nilai IC₅₀ dari Vitamin C dan Sampel 1, Sampel 2, dan Sampel 3 Isolat fungi endofit tanaman lamun (*Needle seagrass*)

Dari data tabel 4.3, dibuat grafik hubungan antara konsentrasi sampel serta pembanding Vitamin C dengan presentase aktivitas antioksidan (Gambar 4.4 serta 4.5). Dari gambar 4.4 serta 4.5 diketahui bahwa penelitian ini berbanding lurus yaitu dengan kenaikan konsentrasi sampel maka terjadi kenaikan aktivitas antioksidan.

4.1.5 Analisis Statistik Uji Aktivitas Antioksidan

Hasil Penelitian ini dilakukan uji analisis statistik, data yang diperoleh diuji normalitas menggunakan *shapiro wilk* dan diuji homogenitasnya menggunakan *Levene Test*. Nilai P pada uji normalitas tersaji pada tabel 4.5.

Tabel 4. 4 Nilai p pada Uji Normalitas

Uji Shapiro- Wilk

Kelompok		Nilai p	Keterangan
IC ₅₀	I	0,685	Terdistribusi normal
	II	0,787	Terdistribusi normal
	III	0,691	Terdistribusi normal
	IV	0,119	Terdistribusi normal
	V	0,797	Terdistribusi normal

Tabel 4. 5 Uji Homogenitas

Levene Test

Kelompok		Nilai p	Keterangan
IC ₅₀	I	0,091	Homogen
	II	0,227	Homogen
	III	0,317	Homogen
	IV	0,096	Homogen

Keterangan:

- I = Sampel 1
- II = Sampel 2
- III = Sampel 3
- IV = Kontrol Positif Vitamin C
- V = Kontrol Negatif DPPH

Tabel 4. 6 Uji Post HOC LSD

Uji <i>Post Hoc</i> LSD	Nilai p	Keterangan
Sampel 1 vs sampel 2*	0,007	Signifikan
Sampel 1 vs sampel 3*	0,000	Signifikan
Sampel 1 vs kontrol positif vitamin C*	0,000	Signifikan
Sampel 1 vs kontrol negatif DPPH*	0,000	Signifikan
Sampel 2 vs sampel 1*	0,007	Signifikan
Sampel 2 vs sampel 3*	0,000	Signifikan
Sampel 2 vs kontrol positif vitamin C*	0,000	Signifikan
Sampel 2 vs kontrol negatif DPPH*	0,000	Signifikan
Sampel 3 vs sampel 1*	0,000	Signifikan
Sampel 3 vs sampel 2*	0,000	Signifikan
Sampel 3 vs kontrol positif vitamin C*	0,000	Signifikan
Sampel 3 vs kontrol negatif DPPH*	0,000	Signifikan
Kontrol positif vitamin C vs sampel 1*	0,000	Signifikan
Kontrol positif vitamin C vs sampel 2*	0,000	Signifikan
Kontrol positif vitamin C vs sampel 3*	0,000	Signifikan
Kontrol positif vitamin C vs kontrol negatif DPPH*	0,000	Signifikan
Kontrol negatif DPPH vs sampel 1*	0,000	Signifikan
Kontrol negatif DPPH vs sampel 2*	0,000	Signifikan
Kontrol negatif DPPH C vs sampel 3*	0,000	Signifikan
Kontrol negatif DPPH vs kontrol positif vitamin C*	0,000	Signifikan

Dari data diatas dapat dinyatakan bahwa semua kelompok memiliki data yang terdistribusi normal ($p \geq 0,05$), kemudian dilakukan uji homogenitas. Hasil uji homogenitas menggunakan uji *Levene- Test* menunjukkan hasil yang homogen ($p \geq 0,05$), sehingga syarat parametrik *One Way Anova* terpenuhi. Hasil *One Way Anova* diperoleh signifikansi 0,000 sehingga dilanjutkan uji *Post Hoc LSD*, diperoleh hasil yang signifikan ($p \leq 0,05$). Analisis statistik diperoleh hasil secara keseluruhan tersaji pada lampiran 10. Terdapat perbedaan nilai IC_{50} pada sampel 1, sampel 2, sampel

3 isolat fungi endofit tanaman lamun (*Needle seagrass*), vitamin C sebagai kontrol positif, dan DPPH sebagai kontrol negatif.

4.2 Pembahasan

4.2.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman berguna untuk mengetahui dan memastikan kembali hasil taksonomi serta spesies tanaman yang akan dipergunakan dalam penelitian, sehingga tanaman yang dipergunakan sesuai dengan sampel penelitian yang dimaksud dan menghindari terjadinya kesalahan dalam penelitian. Tanaman lamun (*Needle seagrass*) yang dipergunakan dalam penelitian ini diambil dari daerah Pantai Nipah, Dusun Nipah, Desa Malaka, Kecamatan Pemenang, Kabupaten Lombok Utara. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Mataram. Hasil determinasi menunjukkan bahwa benar tanaman lamun (*Needle seagrass*) berasal dari family *Cymodoceaceae* dengan spesies *Halodule uninervis*.

4.2.2 Isolasi Fungi Endofit Tanaman Lamun (*Needle seagrass*)

Isolat fungi endofit dari hasil tumbuhan inang mampu mendapatkan perbedaan spesies dan variasi jumlah isolatnya. Kehadiran spesies endofit berhubungan dengan kondisi mikrohabitat tanaman inang dimana fungi endofit hidup pada tempat yang sama (Hasiani et al., 2015). Namun penelitian ini memiliki keterbatasan diantaranya jauhnya jarak tempuh dari

Mataram ke Semarang. Dalam hal ini tidak memungkinkan sampel tanaman dikirimkan dalam bentuk segar. Selain itu, jauhnya jarak tempuh Universitas Muhammadiyah Mataram dengan Universitas Islam Sultan Agung menyebabkan peneliti tidak memungkinkan untuk hadir secara langsung di lokasi penelitian. Sehingga keterbatasan tersebut diatasi dengan isolasi fungi endofit dilakukan di Universitas Muhammadiyah Mataram, dan untuk uji aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Farmasi FK UNISSULA sebagai bentuk implementasi kerjasama penelitian antara Universitas Muhammadiyah Mataram dengan Universitas Islam Sultan Agung.

Faktor yang dikendalikan agar tidak adanya kontaminan di media kultur seperti waktu sterilisasi alat, pH media, suhu media, dan penambahan kloramfenikol pada media kultur waktu yang dibutuhkan untuk sterilisasi daun yaitu 60 – 120 detik, dikarenakan jika waktu sterilisasi daun terlalu singkat maka daun yang akan dikultur tidak bersih tetapi jika terlalu lama EtOH dapat membunuh fungi yang berada di dalam jaringan (Kjer et al., 2010). Media yang mudah ditumbuhi yaitu PDA yang memiliki pH 4,5 sampai 5,5 dikarenakan dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang hidup di lingkungan pH 7 dan suhu optimum 25 – 30 °C, oleh karena itu dikultur pada media padat atau cair dengan suhu 20 - 25 °C (Jamilatun et al., 2020). Penambahan kloramfenikol bertujuan untuk penghambatan pertumbuhan bakteri endofit atau bakteri yang mengontaminasi (Hasiani et al., 2015)

Hasil isolat fungi endofit dilakukan karakterisasi dengan diamati dengan makroskopis dan mikroskopis di mana mempunyai perbedaan karakteristik. Morfologi fungi endofit secara makroskopis meliputi warna permukaan, tekstur koloni, warna sebalik koloni, zonasi, pertumbuhan, tetes eksudat, dan garis radial, sedangkan secara mikroskopis meliputi hifa dan jenis spora (Pakaya, 2022). Pada sampel 1, sampel 2, dan sampel 3 dilakukan karakterisasi dengan pengamatan secara makroskopis didapatkan hasil yang tersaji pada tabel 4.1, dimana warna permukaan dilihat dari warna disekitaran fungi pada media kultur, warna sebalik koloni dilihat dari warna permukaan koloni dilihat dari reverse side isolat fungi endofit yang tumbuh di media kultur, tekstur koloni dilihat dari koloni yang tumbuh memiliki terkstur seperti kapas pada sampel 1, beludru / datar pada sampel 2 dan sampel 3, zonasi yaitu area pertumbuhan isolat fungi endofit, pertumbuhan dapat diartikan seberapa lama isolat fungi endofit tumbuh pada media kultur, dikatakan koloni pertumbuhan lambat sampai moderat apabila fungi berdiameter 2-3 cm dalam 7 hari inkubasi, pertumbuhan koloni cepat yaitu memiliki diameter koloni 6-8 cm pada inkubasi 7 hari, apabila pertumbuhan moderat sampai cepat memiliki diameter 2-6 cm setelah inkubasi 7 hari. Tetes eksudat diartikan sebagai titik – titik cairan yang dapat dilihat pada permukaan koloni, garis radial diartikan sebagai garis yang tampak seperti jari – jari koloninya (Hidayat, 2021). Kemudian pada pengamatan secara mikroskopis didapatkan hasil yang tersaji pada tabel 4.2 dan gambar 4.1

diperoleh warna konidia pada sampel 1 hitam dan biru dan sampel 2 dan sampel 3 berwarna hitam, bentuk konida pada sampel 1 bulat tidak beraturan, sampel 2 dan sampel 3 berbentuk bulat telur, hifa pada sampel 1 dan sampel 2 bersekat (septat) multinukleat dan pada sampel 3 bersekat (septat), ditemukan spora pada tiap individu sampel, ditemukan misellium pada sampel 1 dan sampel 2 sedangkan pada sampel 3 tidak ditemukan, dan warna koloni pada sampel 1 yaitu hitam dan biru, sampel 2 biru kehitaman, dan sampel 3 abu - abu. Hal ini membuktikan bahwa pada kultur sampel 1, sampel 2 dan sampel 3 ketika dikarakterisasi secara makroskopis terlihat morfologinya dan secara mikroskopis ditemukan warna dan bentuk konidia, hifa, misellium, spora, dan warna koloni.

4.2.3 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*) dilakukan uji KLT dengan dua dimensi untuk mendapatkan senyawa murni yang ditandai dengan terlihatnya spot tunggal pada plat yang diuji (Info, 2019). Dengan setiap ekstrak sampel 1, sampel 2, dan sampel 3 ditimbang 50 mg dilarutkan dengan etil asetat pada labu ukur masing- masing 5 ml (Yuda et al., 2017). Adanya dua fase dalam KLT yaitu fase normal dan fase terbalik. Dimana fase normal menggunakan fase diam yang bersifat polar/ larut dan fase geraknya memiliki sifat non polar/ tidak larut, pada fase terbalik menggunakan fase diam non polar/ tidak larut. Pada penelitian ini

menggunakan fase normal (Oktaviantari et al., 2019). Pada penelitian ini menggunakan Plat Silica gel F₂₅₄ karena mempunyai sifat relatif polar, memiliki gipsium yang digunakan untuk pengikat, dan indikator fluoresen yang bisa berfluoresensi. Silika gel terdapat gugus hidroksil yang mampu berikatan dan akhirnya dapat menyerap dan mengikat sampel pada permukaan (Husa & Mita, 2020). Fase diam yang digunakan dalam KLT adalah silika gel 60 F₂₅₄. 254 merupakan panjang gelombang sinar UV yang dapat diserapnya. Hasilnya diamati dengan lampu UV panjang gelombang 254 nm. Eluen menggunakan diklorometana: metanol (10: 1). Fase gerak dipilih dikarenakan kemampuan metanol untuk meningkatkan polaritas diklorometana sehingga sistem eluen terbentuk serta mampu memisahkan komponen kimia (Peni et al., 2020). Diklorometana sebagai eluen non polar. Eluen dikatakan baik apabila eluen mampu memisahkan banyak senyawa serta memiliki noda yang terlihat jelas (Rompas, R.A, 2013). Lempeng Silica Gel F₂₅₄ berukuran 2 cm x 10 cm diaktifkan pada suhu 105 °C selama 30 menit. Aktivasi lempeng berguna untuk pengaktifan gugus silanol dan siloksan di lempeng. Sampel diuji dengan ditotolkan sebanyak 5 µL. Plat dimasukkan pada chamber yang sebelumnya sudah dilakukan penjenuhan. Plat elusi, senyawa yang akan dipisahkan dibawa fase gerak dan bergerak melalui fase diam dikarenakan pengaruh gaya berat (Husa & Mita, 2020). Plat dianginkan kurang lebih 10 menit. Agar fase gerak yang tersisa di plat mengalami penguapan. Amati hasil elusi di bawah sinar UV 254 nm dan 366

nm. Pada sinar UV panjang gelombang 254 nm silica gel dapat berfluoresensi dengan baik karena adanya gugus kromofor pada noda akan menunjukkan adanya noda berwarna gelap. Pada panjang gelombang 366 nm gugus kromofor dihasilkan bercak yang berfluoresensi (Husa & Mita, 2020). Riset didapat satu noda tunggal membuktikan adanya senyawa murni. Pita yang dihasilkan tidak lurus, akan tetapi bergelombang. Dimungkinkan oleh pengaruh ukuran sampel, fase gerak, sifat analit, dan kontaminan. Plat KLT pada sinar UV 366 nm di tepi plat tidak terdapat pita yang berwarna. Hal ini dimungkinkan tidak optimumnya proses pemanasan (Dewi, N.L.A., 2018). Hasil dari pita yang diperoleh pada sampel 1 adanya spot berwarna kuning keoranye menunjukkan adanya alkaloid yang memiliki nilai R_f 0,57. Dimana nilai tersebut masuk ke rentang R_f alkaloid yaitu 0,07 – 0,62 (Wullur & Schadu, 2013). Pada sampel 2 terlihat adanya spot hijau maka sampel menunjukkan adanya kandungan tannin dengan nilai R_f diperoleh 0,76. Dimana nilai tersebut masuk kedalam rentang R_f tanin yaitu 0,07 – 0,77 (Julaeha et al., 2022). Pada sampel 3, adanya spot berwarna kuning kehijauan menunjukkan adanya kandungan flavonoid, dengan nilai R_f 0,54. Dimana nilai tersebut masuk kedalam rentang flavonoid yaitu 0,2 – 0,75 (Susiloningrum & Indrawati, 2020).

4.2.4 Aktivitas Antioksidan Isolat Fungi Endofit Tanaman Lamun (*Needle seagrass*)

Uji aktivitas antioksidan pada penelitian ini yaitu isolat fungi endofit tanaman lamun (*Needle seagrass*) dibagi menjadi 3 yaitu sampel 1, sampel 2, dan sampel 3. Vitamin C control positif dan DPPH sebagai control negatif. Uji aktivitas antioksidan dengan sampel diencerkan terlebih dahulu. Dalam pembacaan spektrofotometer dilakukan pengenceran agar sampel tidak begitu pekat (Oktaviantari et al., 2019). Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode kuantitatif menggunakan DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) yang dapat memberikan efek IC_{50} dilihat dari parameter konsentrasi ekuivalen. DPPH memberikan serapan kuat apabila adanya elektron yang tidak berpasangan, dan absorbansi akan turun jika elektron berubah menjadi berpasangan (Rahmi, 2017). Uji aktivitas antioksidan pada metode ini dilihat dari warna ungu pudar diakibatkan terjadi reduksi DPPH karena antioksidan-nya. Intensitas pudarnya warna ungu dilakukan pengukuran spektrofotometer Uv-Vis (Sami & Rahimah, 2015). Pengukuran panjang gelombang didapatkan panjang gelombang maksimum yaitu pada 539 nm. Pengukuran panjang gelombang untuk mengetahui serapan optimum dari larutan sampel dari larutan sampel baku (Oktaviantari et al., 2019).

Vitamin C digunakan sebagai kontrol positif pada uji aktivitas antioksidan, sehingga dapat diketahui kuatnya potensi antioksidan pada

sampel apabila dibandingkan dengan vitamin C (Priscylio & Anwar, 2019). Dimana tingginya aktivitas antioksidan vitamin C dikarenakan terdapat 2 gugus hidroksil/ -OH sehingga lebih mudah terjadinya pendonoran hydrogen/ H. Letaknya di atom C2 serta C3 (Anton et al., 2021). Beberapa konsentrasi larutan vitamin C yaitu 5, 10, 15, 20, 25 ppm, dan 30 ppm dengan dilakukan pemipetan 25, 50, 75, 100, 125, 150 μ l larutan selanjutnya dilakukan penambahan 1 ml larutan DPPH 0,1 mM dan metanol p.a di labu ukur 5 ml. Tujuan dari pembuatan kadar yang bervariasi ini yaitu menggambarkan aktivitas antioksidan pada senyawa uji (Nuraeni & Sembiring, 2018).

Setiap konsentrasi diberikan larutan DPPH 0,1 mM sebagai radikal bebas. Setelah itu divortex, dan diinkubasi selama 30 menit. Dimana inkubasi digunakan untuk optimalisasi aktivitas DPPH dengan isolat yang diuji (Fauziah et al., 2021). Sampel dilakukan 3 kali replikasi pada setiap konsentrasi agar mendapatkan absorbansi dan mengoptimalkan terjadi kesalahan dalam analisa sampel. Metode penangkal radikal bebas DPPH mengalami reduksi dari senyawa radikal bebas akibat adanya antioksidan pada waktu larutan DPPH yang warna ungu bereaksi dengan senyawa antioksidan sebagai donor elektron, yang menjadikan warna ungu pada larutan pudar dan berubah warna kuning yang bersumber dari gugus pikrilnya (Anton et al., 2021).

Apabila menggunakan konsentrasi sampel semakin besar, maka nilai absorbansinya akan semakin kecil dan berbanding terbalik dengan nilai persen inhibisi yang didapatkan semakin besar. Presentase inhibisi akan semakin besar seiring dengan bertambahnya konsentrasi sampel. Persen inhibisi dapat menyatakan kemampuan dari suatu ekstrak dalam menghambat aktivitas radikal yang dihubungkan dengan konsentrasi ekstrak (Anggarani & Amalia, 2022).

Hasil pengukuran vitamin C didapat persamaan regresi linier $y = 0,7316x + 19,295$ dengan nilai koefisien korelasi 0,9563. Sedangkan untuk sampel 1 didapat persamaan $y = 0,4493x + 9,493$ dengan nilai koefisien korelasi 0,9821, pada sampel 2 didapat persamaan $y = 0,3958x + 15,057$ dengan nilai koefisien korelasi 0,9654 dan sampel 3 didapat persamaan $y = 0,4078x + 16,841$ dengan nilai koefisien korelasi 0,9825. Di mana linearitas sebagai tolak ukur baik tidaknya kurva kalibrasi yang menjembatani diantara respon (Y) serta konsentrasi (X). Nilai r jika mendekati 1 dinyatakan adanya persamaan regresi dikatakan linear (Wardi et al., 2019).

Pada hasil yang vitamin C sebagai kontrol positif diperoleh nilai IC_{50} 41,96 $\mu\text{g/mL}$, membuktikan bahwa vitamin C mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat kuat dikarenakan mempunyai nilai IC_{50} kurang dari 50 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan sampel 1, sampel 2 dan sampel 3 diperoleh nilai IC_{50} masing – masing yaitu 90,15 $\mu\text{g/mL}$, 88,28 $\mu\text{g/mL}$, 81,31 $\mu\text{g/mL}$ di mana hasil tersebut membuktikan bahwa sampel 1, sampel 2, dan sampel 3

mempunyai aktivitas antioksidan kuat karena mempunyai nilai IC_{50} diantara 50 - 100 $\mu\text{g/mL}$. Jika IC_{50} sampel bernilai sama atau mendekati nilai IC_{50} kontrol positif maka dapat dinyatakan sampel memiliki potensi menjadi antioksidan alternatif dengan kategori sangat kuat (Priscylio & Anwar, 2019).

Analisis statistik menggunakan uji *One Way Anova* yang dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* agar diketahui kelompok mana yang memiliki perbedaan yang bermakna. Perbedaan bermakna terdapat diantara kelompok I, II, III, dan IV dibandingkan dengan kelompok V (kontrol negatif) $p \leq 0,050$. Hal ini dapat diketahui bahwa seluruh sampel memiliki kativitas antioksidan, karena adanya perbedaan yang signifikan pada kelompok kontrol negatif. Aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh sampel 1, sampel 2, dan sampel 3 dikarenakan adanya aktivitas senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam sampel tersebut.

Analisis statistik menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna diantara sampel 1, sampel 2, dan sampel 3 dengan kontrol positif nilai $p \leq 0,05$. Perbandingan nilai IC_{50} tersebut menunjukkan perbedaan aktivitas antioksidan yang berbeda antara pembanding dengan sampel. Dengan ini terlihat bahwa sampel memiliki aktivitas antioksidan namun kemampuan untuk peredaman radikal bebas masih dibawah kontrol positif. Diketahui jika nilai IC_{50} semakin besar sehingga nilai aktivitas antioksidan akan menjadi

semakin kecil. Senyawa antioksidan dapat dibuktikan baik apabila mempunyai nilai IC_{50} yang semakin kecil. Senyawa antioksidan disebut sangat kuat ketika mempunyai nilai IC_{50} kurang dari 50 $\mu\text{g/mL}$, disebut kuat ketika IC_{50} diantara 50 - 100 $\mu\text{g/mL}$, sedang untuk IC_{50} antara 100 -150 $\mu\text{g/mL}$, dan untuk hasil lemah ketika IC_{50} bernilai diantara 150 - 200 $\mu\text{g/mL}$ (Paryono, 2021).

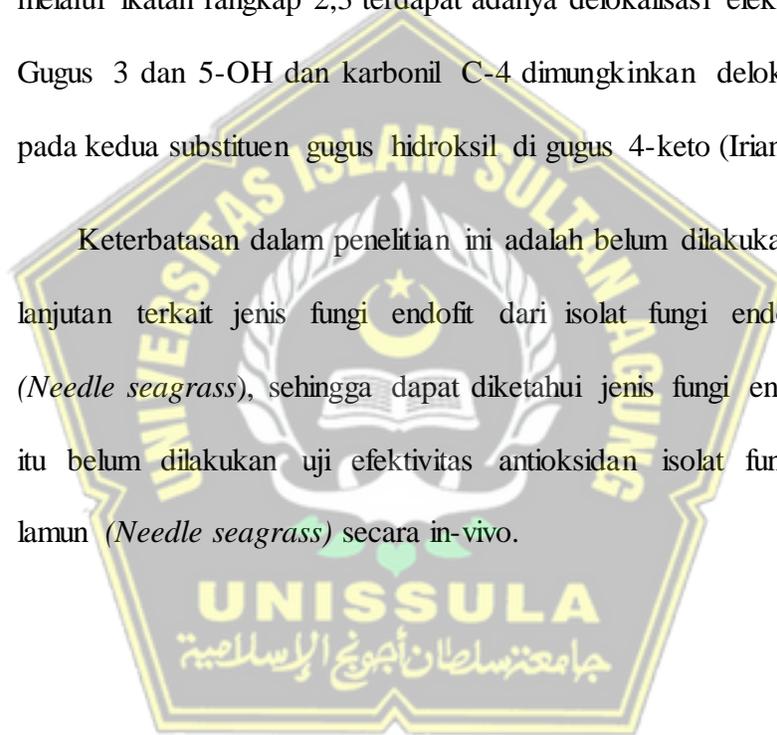
Analisis statistik menunjukkan perbedaan bermakna pada sampel 1, sampel 2, dan sampel 3. Hasil tersebut menunjukkan adanya aktivitas antioksidan pada sampel 1, sampel 2, dan sampel 3 memiliki perbedaan dengan aktivitas antioksidan paling tinggi yaitu sampel 3, disusul dengan sampel 2, dan sampel 1. Hasil uji KLT terlihat spot noda berwarna di mana sampel 1 mengandung senyawa alkaloid, sampel 2 mengandung senyawa tanin, dan sampel 3 memiliki senyawa flavonoid yang dapat digunakan sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan paling tinggi yaitu pada sampel 3 dengan kandungan flavonoid. Hal ini senada dengan hasil penelitian (Liu et al., 2022) dimana flavonoid memiliki derajat hidrosilisasi tertinggi diantara senyawa tanin dan alkaloid. Flavonoid terkadang muncul sebagai aglikon. Senyawa ini mencapai 60% dari total senyawa fenolik diet (Formagio et al., 2014). Flavonoid adalah golongan polifenol yang terluas dan termasuk antioksidan kuat, memiliki setidaknya satu cincin aromatik dan gugus

hidroksil lebih dari satu yang dapat menyumbangkan atom hidrogennya pada radikal bebas (Liu et al., 2022).

Alkaloid memiliki khasiat sebagai antioksidan secara struktural mempunyai atom nitrogen, atom tersebut memiliki elektron bebas yang berpasangan sehingga dapat digunakan sebagai peredaman aktivitas radikal bebas yang ada ditubuh manusia (Hasan et al., 2022). Tanin dapat sebagai antioksidan karena tergolong dari senyawa bioaktif polifenol. Tanin secara struktural memiliki gugus -OH sebagai antioksidan, untuk menghilangkan radikal bebas superoksida (O_2^-), peroksil (ROO^-), hidroksil, singlet oksigen (O_2), hidrogen peroksida (H_2O_2), peroksinitrit ($ONOO^-$), dan oksigen nitrit (NO^-) yang berada ditubuh manusia (Anggraito & et al, 2018). Flavonoid mempunyai dua cincin aromatik (cincin A dan B) dengan penghubung jembatan tiga karbon (cincin C) yang mengandung atom oksigen tertanam, disingkat C6-C3-C6 (Liu et al., 2022). Flavonoid memiliki potensi kelat logamnya dan susunan gugus hidroksil dan karbonil di sekitar molekul, adanya substituen pendonor hidrogen/elektron yang mereduksi radikal bebas, kemampuan mendelokalikasi elektron tak berpasangan yang mengarah pada pembentukan radikal fenoksil stabil (Ieamkheng et al., 2022). Mekanisme flavonoid sebagai penangkap radikal bebas dapat dijelaskan secara struktural yaitu gugus katekol atau ortohidroksi di cincin B, konjugasi cincin B pada karbonil C-4 dengan ikatan rangkap 2,3, dan

gugus 3 dan 5-OH dengan karbonil C-4. Gugus hidroksi yaitu gugus resonansi positif dikarenakan elektron bebas di dalam cincin menghasilkan sifat reduktor yang tinggi. Gugus katekol atau ortohidroksi pada cincin B memiliki stabilitas yang tinggi di radikal sehingga terbentuk dan mempunyai peran pada delokalisasi elektron. Konjugasi cincin B pada karbonil C-4 melalui ikatan rangkap 2,3 terdapat adanya delokalisasi elektron di cincin B. Gugus 3 dan 5-OH dan karbonil C-4 dimungkinkan delokalisasi elektron pada kedua substituen gugus hidroksil di gugus 4-keto (Irianti et al., 2016)

Keterbatasan dalam penelitian ini adalah belum dilakukannya penelitian lanjutan terkait jenis fungi endofit dari isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*), sehingga dapat diketahui jenis fungi endofitnya. Selain itu belum dilakukan uji efektivitas antioksidan isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*) secara in-vivo.



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*) memiliki sebagai aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.
2. IC_{50} dari isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*) sampel 1, sampel 2, dan sampel 3 secara berturut – turut adalah 90,15 $\mu\text{g/mL}$, 88,28 $\mu\text{g/mL}$, dan 81,31 $\mu\text{g/mL}$.

5.2 Saran

1. Perlunya dilakukan riset lanjutan terkait jenis fungi endofit dari isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*) sehingga dapat diketahui jenis fungi endofitnya.
2. Untuk penelitian selanjutnya dapat dilakukan uji efektivitas antioksidan isolat fungi endofit dari lamun (*Needle seagrass*) secara in-vivo.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggarani, M. A., & Amalia, R. (2022). Analisis Kadar Fenolik, Flavonoid Dan Aktivitas Antioksidan Umbi Bawang Bombai (*Allium cepa* L.). *Unesa Journal of Chemistry*, *11*(1), 34–45. <https://doi.org/10.26740/ujc.v11n1.p34-45>
- Anggraito, U., & et al. (2018). *Metabolit Sekunder Tanaman Aplikasi dan Produksi (Anggraito)*.
- Formagio, A. S. N., Volobuff, C. R. F., Santiago, M., Cardoso, C. A. L., Vieira, M. D. C., & Pereira, Z. V. (2014). Evaluation of antioxidant activity, total flavonoids, tannins and phenolic compounds in *Psychotria* leaf extracts. *Antioxidants*, *3*(4), 745–757. <https://doi.org/10.3390/antiox3040745>
- Hasan, H., Ain Thomas, N., Hiola, F., & Ibrahim, A. S. (2022). Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Kulit Batang Matoa (*Pometia pinnata*) Dengan Metode 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Indonesian Journal of Pharmaceutical Education*, *1*(3), 67–73. <https://doi.org/10.37311/ijpe.v2i1.10995>
- Hasiani, V. V., Ahmad, I., & Rijai, L. (2015). Isolasi Jamur Endofit dan Produksi Metabolit Sekunder Antioksidan dari Daun Pacar (*Lawsonia inermis* L.). *Jurnal Sains Dan Kesehatan*, *1*(4), 146–153. <https://doi.org/10.25026/jsk.v1i4.32>
- Hidayat, R. A. (2021). Isolasi dan Karakterisasi Jamur Selulolitik pada Fermetodege : Pakan Fermentasi Berbahan Campuran Eceng Gondok , Bekatul Padi , dan Tongkol Jagung Isolation and Characterization of Cellulolytic Fungi in Fermetodege : Fermented Feed Made from a Mixture of. *Ilmu Peternakan*, *10*(2), 176–187.
- Ieamkheng, S., Santibenchakul, S., & Sooksawat, N. (2022). Potential of *Maranta arundinacea* residues for recycling: Analysis of total phenolic, flavonoid, and tannin contents. *Biodiversitas*, *23*(3), 1204–1210. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230303>
- Irianti, T., Murti, Y. B., Kanistri, D. N., Pratiwi, D. R., Kuswandi, & Kusumaningtya s, R. A. (2016). DPPH Radical Scavenging Activity Of Aqueous Fraction From Ethanolic Extract Of Talok Fruit (*Muntingia calabura* L.). *Traditional Medicine Journal*, *21*(1), 38–47.
- Jamilatun, M., Azzahra, N., & Aminah, A. (2020). Perbandingan Pertumbuhan *Aspergillus fumigatus* pada Media Instan Modifikasi Carrot Sucrose Agar dan Potato Dextrose Agar. *Jurnal Mikologi Indonesia*, *4*(1), 168–174. <https://doi.org/10.46638/jmi.v4i1.69>

- Julaeha, J., Farisma, N., & Jakarta, N. (2022). Fraksinasi Dan Identifikasi Senyawa Tanin Dari Ekstrak Pandan Hutan (*Freycinetia sessiliflora* Rizki). *Journal Borneo*, 2(1), 20–25.
- Kjer, J., Debbab, A., Aly, A. H., & Proksch, P. (2010). Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nature Protocols*, 5(3), 479–490. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.233>
- Liu, Y., Qian, J., Li, J., Xing, M., Grierson, D., Sun, C., Xu, C., Li, X., & Chen, K. (2022). Hydroxylation decoration patterns of flavonoids in horticultural crops: chemistry, bioactivity, and biosynthesis. *Horticulture Research*, 9(January). <https://doi.org/10.1093/hr/uhab068>
- Peni, P., Sasri, R., & Silalahi, I. H. (2020). Synthesis of Metal–Curcumin Complex Compounds ($M = Na^+, Mg^{2+}, Cu^{2+}$). *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*, 23(3), 75–82. <https://doi.org/10.14710/jksa.23.3.75-82>
- Susiloningrum, D., & Indrawati, D. (2020). Penapisan Fitokimia dan Analisis Kadar Flavonoid Total Rimpang Temu Mangga (*Curcuma mangga* Valetton & Zijp.) Dengan Perbedaan Polaritas Pelarut. *Jurnal Keperawatan Dan Kesehatan Masyarakat Cendekia Utama*, 9(2), 126. <https://doi.org/10.31596/jcu.v9i2.593>
- Wullur, A., & Schaduw, J. (2013). Identifikasi alkaloid pada daun sirsak (*Annona muricata* L.). *JIF-Jurnal Ilmiah*, 3(2), 54–56. <https://ejurnal.poltekkes-manado.ac.id/index.php/jif/article/download/278/247/>

