

ISSN : 0215-0824
e-ISSN : 2527-4414

BULETIN PENELITIAN
TANAMAN REMPAH DAN OBAT
Bulletin of Research on Spice and Medicinal Crops

Akreditasi KEMENRISTEKDIKTI No. 30/E/KPT/2018

Volume 31, Nomor 1, Mei 2020



Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Agency for Agricultural Research and Development
PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERKEBUNAN
Indonesian Center for Estate Crops Research and Development
Bogor, Indonesia

Bul. Littro	Vol. 31	No. 1	hlm. 1-58	Bogor, Mei 2020	ISSN 0215-0824 e-ISSN : 2527-4414
-------------	---------	-------	-----------	--------------------	--------------------------------------

ISSN : 0215-0824

e-ISSN : 2527-4414

BULETIN PENELITIAN
TANAMAN REMPAH DAN OBAT
Bulletin of Research on Spice and Medicinal Crops

Akreditasi KEMENRISTEKDIKTI No. 30/E/KPT/2018

Volume 31, Nomor 1, Mei 2020

Penanggung Jawab

Kepala
Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian

Dewan Redaksi

Ketua merangkap Anggota
Dr. Oti Rostiana, M.Sc (Pemuliaan dan Genetika
Tanaman)

Anggota

Prof. Dr. Supriadi (Fitopatologi)
Dr. Ir. Ireng Darwati (Fisiologi)
Dr. Ir. Dono Wahyuno (Fitopatologi)
Ir. Ekwasita Rini Pribadi (Sosial Ekonomi)
Dr. Siswanto (Entomologi)
Dr. Gusmaini, M.Si (Fisiologi)

Redaksi Pelaksana

Dra. Nur Maslahah, M.Si.
Hera Nurhayati, SP.
Eko Hamidi
Efiana, S.Mn
Rismayani, SP., M.Sc.
Galih Perkasa, A.Md.
Tini Nurcahaya, S.Kom (IT Support)

Alamat

Jalan Tentara Pelajar No. 3 Cimanggu, Bogor 16111

Telp. (0251) 8321879 - Fax. (0251) 8327010

E-mail : buletintro@gmail.com

Website : <http://balittro.litbang.pertanian.go.id>

URL : <http://ejurnal.litbang.pertanian.go.id/index.php/bultro>

Sumber Dana

DIPA Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
TA. 2020

ISSN : 0215-0824

e-ISSN : 2527-4414

BULETIN PENELITIAN TANAMAN REMPAH DAN OBAT

terbit dua nomor setiap volume dalam satu tahun (Mei dan Desember) memuat karya tulis ilmiah hasil penelitian tentang tanaman rempah dan obat yang belum pernah dipublikasikan



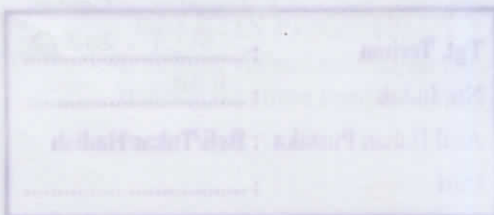
21/7/2020

- Prof. Dr. Ir. Agus Kardinan, M.Sc (*Entomologi-Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Indonesia*), (h-index : 6)
- Prof. Dr. Ir. Deciyanto Soetopo (*Entomology-Indonesia Center for Estate Crops Research and Development, Indonesia*), (h-index : 6)
- Dr. Devi Rusmin (*Seed Technologist-Indonesian Spices and Medicinal Crops Research Institute, Indonesia*), (H-Index : 8)
- Dr. Dodin Koswanudin (*Epidemiologist-Indonesian Center For Biotechnology and Genetic Resources Research and Development, Indonesia*), (H-Index : 2)
- Prof. Dr. Dwinardi Apriyanto (*Ilmu Hama-University Bengkulu, Indonesia*), (Scopus ID : 6507231035)
- Prof. Dr. Ir. Dyah Iswantini (*Biokimia-Institut Pertanian Bogor, Indonesia*), (ID Scopus : 6505944957)
- Dr. Dyah Manohara (*Phytopathology-Indonesian Spice and Medicinal Crops Research Institute, Indonesia*), (Scholar Google H-index : 12; i10-index: 18).
- Dr. Endah Retno Palupi (*Biology Reproductive Plant-Bogor Agricultural University, Indonesian*), (ID Scopus : 6506616270)
- Dr. Ir. Eny Widajati, MS, (*Seed Technology*), (h-index: 5), *Bogor Agricultural University, Indonesia*
- Dr. Edi Santoso, SP., MSi (*Ekofisiologi-Departemen Agronomi dan Hortikultura, Faperta IPB, Indonesia*)
- Prof. Dr. Ir. Elna Karmawati (*Entomologi-Center for Estate Crops Research and Development, Indonesia*, (Scopus ID : 26531334600)
- Dr. Hagus Tarno, Agr.Sc (*Entomologi-Universitas Brawijaya, Indonesia*), (Scopus ID : 36163526900; h-index : 2)
- Dr. I Ketut Ardana, (*Agricultural Economy - Indonesian Center for Estate Crops Research and Development, Indonesian*), (h-index: 3)
- Dr. Ir. I Made Samudera (*Entomologi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Biotek-*
- nologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian*)
- Prof. Dr. Ir. I Wayan Laba (*Entomologi-Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Indonesia*), (h-index : 6)
- Dr. Ifa Manzila, M.Si (*Epidemiologist-Indonesian Center for Biotechnology and Genetic Resources Research and Development, Indonesia*), (ID Scopus : 55552513600)
- Dr. Ir. Irdika Mansur, M.For.Sc. (*Silviculture-Southeast Asian Regional Centre for Tropical Biology*), (ID Scopus : 6603222376)
- Dr. Irmanida Batubara, M.Si. (*Natural Product Chemistry-Center of Tropical Biofarmaka Bogor Agriculture Institute, Indonesia*), (Scopus Id : 26031903000)
- Dr. Ir. Ladiyani Retno Widowati, MSc, (*Indonesian Center for Biotechnology and Genetic Resources Research and Development, Indonesia*)
- Dr. Lisnawita (*Fitopatologi-Universitas Sumatera Utara, Indonesia*), (Scopus ID: 55780066800)
- Dr. Ir. Muhamad Yunus, M.Si (*Plant Breeding-Indonesian Center for Biotechnology and Genetic Resources Research and Development, Indonesia*)
- Prof. Dr. Nanik Setyowati (*Budidaya Tanaman-Universitas Bengkulu, Indonesia*), (ID Scopus : 57189367022)
- Dr. Neni Rostini (*Pemulia Tanaman-Universitas Padjadjaran Bandung, Indonesia*), (h-index : 5)
- Dr. Ir. Nurliani Bermawie (*Pemuliaan-Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Indonesia*), (Scopus ID ; 55993158700; h-index : 1)
- Dr. Ratu Safitri, MS (*Mikrobiologi-Universitas Padjadjaran Bandung, Indonesia*), (ID Scopus : 6506729561)
- Dr. rer. nat. Chaidir (*Agency for the Assessment and Application of Technology, Indonesia*)
- Prof. Dr. Ir. Risfaheri, M.Si (*Teknologi Pascapanen-Indonesian Center for*

Tgl. Terima : 21-7-2020
 No. Induk : 1179
 Asal Bahan Pustaka : Beli/Tukar/Hadiah
 Dari :

Agricultural Postharvest Research and Development, Indonesia)

- Dr. Rita Noveriza (*Virologi - Indonesian Spices and Medicinal Crops Research Institute, Indonesian*), (ID Scopus : 55734904600)
- Prof. Dr. Ir. Rosihan Rosman, MS (*Ekofisiologi-Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Indonesia*)
- Dr. Ir. Siswanto, M.Phil, (*Entomologi-Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan, Indonesia, Indonesia*)
- Dr. Sri Yuliani (*Teknologi pascapanen-Indonesian Center for Agricultural Postharvest Research and Development, Indonesia*), (Scopus ID : 9844293200 / h-Index : 6)
- Prof. Ir. Totok Agung Dwi Haryanto, M.P, Ph.D (*Plant Breeding-University of Jenderal Soedirman, Indonesia*), (Scopus ID : 6506751630)
- Ir. Usman Daras, M.Agr.Sc (*Budidaya Tanaman-Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Indonesia*), (Scopus ID : 56429655600; h-index : 2)
- Dr. Yudiwanti (*Pemulia Tanaman-Institut Pertanian Bogor, Indonesia*), (h-index : 2)
- Dr. Yulin Lestari (*Kimia-Institut Pertanian Bogor, Indonesia*), (ID Scopus : 35107494200)
- Dr. Yuyu Suryasari (*Biologi Molekuler-Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi-LIPI, Indonesia*), (Scopus ID : 6503885123)
- Dr. Ir. Widodo, M.S (*Mikology - Bogor Agricultural University, Indonesian*), (ID Scopus : 56502046800)



ISSN : 0215-0824
e-ISSN : 2527-4414

BULETIN PENELITIAN
TANAMAN REMPAH DAN OBAT
Bulletin of Research on Spice and Medicinal Crops
Akreditasi KEMENRISTEKDIKTI No. 30/E/KPT/2018

Volume 31, Nomor 1, Mei 2020

KATA PENGANTAR

Puji syukur kita panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Kuasa, Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat Volume 31, Nomor 1, untuk tahun 2020 dapat diselesaikan. Buletin ini berisi 6 artikel yang terdiri dari berbagai bidang masalah dan disiplin ilmu pada Tanaman Rempah dan Obat. Artikel pertama Aktivitas Antioksidan Kecibeling, Bakau Merah, dan Katuk pada Metode Ekstraksi dan Rasio Ekstrak yang Berbeda. Artikel kedua adalah DNA *Barcoding* Anggrek Obat *Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar Menggunakan Gen *rbcL* dan *ITS*. Artikel ke tiga menyajikan Efektivitas Senyawa Nonatsiri dari *Curcuma* spp. terhadap Penekanan Penyakit Antraknosa pada Buah Cabai. Artikel keempat In Vitro Activity of Parijoto Fruit Extract (*Medinilla speciosa* B.) For Reducing Blood Glucose. Artikel kelima adalah Efektivitas Ekstrak Etanol Biji Mimba, Mahoni dan Suren terhadap Larva *Tenebrio molitor* Linnaeus (Tenebrionidae: Coleoptera). Artikel keenam adalah Karakterisasi Bakteri dari Perakaran *Nepenthes mirabilis* untuk Pengendalian Hayati *Fusarium oxysporum*.

Kami mengucapkan terima kasih kepada semua penulis yang sudah mengisi Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (*Bul. Littro*) dan kepada semua pihak yang sudah membantu, sehingga *Bul. Littro* dapat diselesaikan tepat pada waktunya. Akhir kata semoga artikel dalam *Bul. Littro* ini bermanfaat, khususnya bagi yang memerlukan.

Ketua Dewan Redaksi

Dr. Oti Rostiana, M.Sc

ISSN : 0215-0824
e-ISSN : 2527-4414

BULETIN PENELITIAN
TANAMAN REMPAH DAN OBAT

Bulletin of Research on Spice and Medicinal Crops

Akreditasi KEMENRISTEKDIKTI No. 30/E/KPT/2018

Volume 31, Nomor 1, Mei 2020

DAFTAR ISI

Aktivitas Antioksidan Kecibeling, Bakau Merah, dan Katuk pada Metode Ekstraksi dan Rasio Ekstrak yang Berbeda	
Lilik Sulastri, Ika Oktavia, dan Partomuan Simanjuntak	1-7
DNA Barcoding Anggrek Obat <i>Dendrobium discolor</i> Lindl. Tanimbar Menggunakan Gen <i>rbcL</i> dan <i>ITS</i>	
Dian Al Ghifari Perwitasari, Siti Rohimah, Tri Ratnasari, Bambang Sugiharto, dan Mukhamad Su'udi	8-20
Efektivitas Senyawa Nonatsiri dari <i>Curcuma</i> spp. terhadap Penekanan Penyakit Antraknosa pada Buah Cabai	
Anella Retna Kumala Sari, Firdaus Auliya Rahmah, dan Syamsuddin Djauhari	21-30
In Vitro Activity of Parijoto Fruit Extract (<i>Medinilla speciosa</i> B.) For Reducing Blood Glucose	
Rissa Laila Vifta, Wilantika, dan Yustisia Dian Advistasari	31-39
Efektivitas Ekstrak Etanol Biji Mimba, Mahoni dan Suren terhadap Larva <i>Tenebrio molitor</i> Linnaeus (Tenebrionidae: Coleoptera)	
Wida Darwiati, Ujang Wawan Darmawan, dan Cheppy Syukur	40-47
Karakterisasi Bakteri dari Perakaran <i>Nepenthes mirabilis</i> untuk Pengendalian Hayati <i>Fusarium oxysporum</i>	
Mardhiana, Muh Adiweni, dan Ankardiansyah Pandu Pradana	48-58

Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Agency for Agricultural Research and Development
PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERKEBUNAN
Indonesian Center for Estate Crops Research and Development
Bogor, Indonesia

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN KECIBELING, BAKAU MERAH, DAN KATUK PADA METODE EKSTRAKSI DAN RASIO EKSTRAK YANG BERBEDA

Antioxidant Activity of Kecibeling, Red Mangrove, and Star Gooseberry at Different Extraction Methods and Extract Ratios

Lilik Sulastr¹⁾, Ika Oktavia¹⁾, dan Partomuan Simanjuntak^{2,3)}

¹⁾ Sekolah Tinggi Teknologi dan Farmasi (STTIF)
Jalan Kumbang No 23 Bogor 16151

²⁾ Pusat Penelitian Kimia LIPI

Kawasan Puspiptek Serpong - Kota Tangerang Selatan 15314, Banten

³⁾ Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila
Jagakarsa Jakarta 12640

INFO ARTIKEL

Article history:

Diterima: 11 April 2019

Direvisi: 19 Desember 2019

Disetujui: 23 Maret 2020

Kata kunci:

Rhizophora *stylosa*;
Sauropus *androgynus*;
Strobilanthes crisper; infusa;
maserasi

Key words:

Rhizophora stylosa; *Sauropus*
androgynus; *Strobilanthes*
crisper; infusion; maceration

ABSTRAK/ABSTRACT

Tumbuhan obat Indonesia, seperti kecibeling (*Strobilanthes crisper* (L.) Blume), bakau merah (*Rhizophora stylosa* Griff.) dan katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) mengandung senyawa aktif yang berperan sebagai antioksidan. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui pengaruh metode ekstraksi (maserasi dan infusa) dan rasio perbandingan ekstrak daun kecibeling dan bakau merah, serta batang katuk, baik secara tunggal maupun kombinasi terhadap aktivitas antioksidan ekstrak. Serbuk simplisia kering berukuran 40 mesh dari daun kecibeling, daun bakau merah, dan batang katuk diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96 % (metode maserasi) dan dengan pelarut air (metode infusa). Ekstrak tunggal atau kombinasi ekstrak tunggal daun kecibeling, daun bakau merah, dan batang katuk (1:1:1; 1:1:2; 1:2:1; dan 2:1:1) diuji aktivitas antioksidannya berdasarkan metode radikal bebas 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Metode maserasi dengan etanol lebih baik dibandingkan dengan metode infusa dengan air. Antioksidan dari ekstrak etanol daun kecibeling menunjukkan aktivitas paling kuat dengan nilai konsentrasi penghambatan (IC₅₀) sebesar 37,65 ppm dibandingkan dengan ekstrak air. Kombinasi ekstrak etanol tunggal dari daun kecibeling, daun bakau merah, dan batang katuk (2:1:1) bersifat sinergis dengan aktivitas antioksidan paling kuat (IC₅₀ = 18,78 ppm), tetapi masih di bawah aktivitas antioksidan vitamin C (IC₅₀ = 4,24 ppm). Ekstrak etanol daun kecibeling secara tunggal atau dikombinasikan dengan ekstrak etanol daun bakau merah dan batang katuk berpotensi dikembangkan sebagai antioksidan.

Indonesian medicinal plants, such as Strobilanthes crisper (L.) Blume (locally known as kecibeling), red mangrove (*Rhizophora stylosa* Griff.) and star gooseberry (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) contain active compounds that act as antioxidants. The study aimed to determine the effect of extraction methods (maceration and infusion) on the antioxidant activity of both single extract and several combination ratios of the extracts mixture of kecibeling leaves, red mangrove leaves and star gooseberry stems. Dried powdered of the samples of a 40 mesh size were extracted using 96 % ethanol solvent (maceration method) and water solvent (infusion method). A single extract

* Alamat Korespondensi : liliksulastr¹⁾28@gmail.com

or a combination of the three-single extracts (1: 1: 1; 1: 1: 2; 1: 2: 1; and 2: 1: 1) were then evaluated for their antioxidant activity based on the free radical method 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). In general, extraction method using ethanol (maceration) was better than water (infusion). Antioxidants activities from ethanol extracts of the kecibeling leaves showed the strongest activity with an inhibitory concentration (IC_{50}) value of 37.65 ppm than the infusion extracts. The combination of a single ethanol extract from the three plants at a ratio of 2: 1: 1 was synergistic, which indicated by its strongest antioxidant activity ($IC_{50} = 18.78$ ppm). However, it still below the antioxidant activity of vitamin C ($IC_{50} = 4, 24$ ppm). Ethanol extract of kecibeling leaves singly or combined with the ethanol extracts of red mangrove leaves and star gooseberry stems can be developed as a potential antioxidant.

PENDAHULUAN

Penyakit degeneratif merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh adanya radikal bebas yang menyerang tubuh secara berlebihan. Salah satu cara melawan serangan radikal bebas adalah dengan menggunakan antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa pereduksi yang dapat mencegah oksidasi suatu molekul menjadi radikal bebas atau menghentikan reaksi berantai radikal bebas agar tidak menjadi liar dan merusak sistem yang bekerja dalam tubuh (Djamil dan Anelia 2009). Antioksidan dapat diperoleh dari bahan alami maupun sintetik. Antioksidan sintetik memiliki beberapa kekurangan yaitu terkait dugaan karsinogenik dan kurang aman jika dikonsumsi secara terus menerus. Oleh karena itu, antioksidan alami dipandang lebih aman karena diperoleh dari ekstrak bahan alami (Xu *et al.* 2017).

Indonesia adalah salah satu negara tropis yang terkenal kaya akan sumber daya alamnya. Keanekaragaman tumbuhan yang ada dapat digali dan dijadikan sebagai bahan baku obat salah satunya adalah sebagai antioksidan alami. Banyak tumbuhan obat Indonesia dikenal sebagai sumber antioksidan, seperti kunyit, bawang merah, buah naga merah, teh, stevia dan lainnya. Tiga tumbuhan obat Indonesia yang diteliti antioksidannya sebagai ekstrak tunggal maupun kombinasi adalah daun kecibeling (*Strobilanthes crispus* (L.) Blume.), daun bakau merah (*Rhizophora stylosa* Griff) dan batang katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.). Berdasarkan beberapa hasil penelitian, ketiga tumbuhan tersebut dinyatakan mempunyai daya peredaman radikal bebas dalam kategori sedang.

Daun katuk banyak dimanfaatkan masyarakat Indonesia, selain sebagai sumber zat antioksidan, air rebusannya banyak diminum para wanita yang baru melahirkan untuk melancarkan produksi air susu ibu (Hayati *et al.* 2016). Ekstrak etanol daun katuk memiliki aktivitas antioksidan sedang dengan nilai inhibisi sebesar 62 % (Nahak dan Sahu 2010). Bagian lain dari katuk yang belum banyak dimanfaatkan adalah batangnya. Selama ini batang katuk menjadi limbah yang tidak termanfaatkan. Hasil penelitian (Wei *et al.* 2011) menyebutkan bahwa ekstrak methanol 70 % batang katuk memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 8,34 ppm. Berkaitan dengan hal tersebut, maka dilakukan penelitian terhadap batang katuk dengan metode ekstraksi yang berbeda, yaitu menggunakan pelarut etanol 96 % dan air.

Ekstrak metanol daun kecibeling memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} 100,36 ppm (Dali *et al.* 2017). Sementara itu, Adibi *et al.* (2017) melaporkan bahwa ekstrak etanolnya mempunyai daya peredaman radikal bebas terhadap DPPH sebesar 113,14 ppm.

Beberapa penelitian antioksidan dengan mengkombinasikan tanaman telah banyak dilakukan untuk meningkatkan potensi antioksidan seperti keladi tikus dengan sarang semut (Wimpy dan Harningsih 2017), sarang semut dengan daun sirsak (Wimpy dan Suharyanto 2014). Multi ekstrak atau kombinasi ekstrak adalah campuran ekstrak lebih dari satu simplisia, yang diekstraksi dengan pelarut secara terpisah. Sementara itu, multi herbal atau ekstrak kombinasi herbal merupakan hasil ekstraksi campuran lebih dari satu simplisia dengan pelarut tertentu.

Penggunaan jenis pelarut untuk mengekstraksi senyawa kimia dalam simplisia juga akan mempengaruhi kelarutan senyawa. Ekstraksi

dengan pelarut air yang disebut juga dengan cara *dekok* atau infusa adalah cara tradisional untuk membuat atau meramu obat herbal. Ekstraksi dengan pelarut alkohol (etanol) atau metanol yang dikenal sebagai cara maserasi, refluks atau lainnya adalah suatu cara modern yang sudah banyak dilakukan untuk pembuatan obat herbal terstandar (OHT) atau fitofarmaka (Ditjen 2000). Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui pengaruh metode ekstraksi (etanol 96 % dan air) yang digunakan untuk mengekstraksi simplisia daun kecibeling, daun bakau merah dan batang katuk maupun kombinasinya, terhadap aktivitas antioksidan.

BAHAN DAN METODE

Kegiatan penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Bahan Alam, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Cibinong, sejak September sampai Desember 2018. Daun kecibeling diperoleh dari daerah Citeureup, Jawa Barat; daun bakau merah dari daerah Banyuwangi, Jawa Timur; dan batang katuk dari Bogor, Jawa Barat (Gambar 1).

Pembuatan simplisia

Sebanyak 4 kg dari masing-masing sampel tanaman disortasi, dicuci dengan air mengalir, ditiriskan, kemudian dirajang tipis-tipis dengan ketebalan ± 1 cm. Selanjutnya, sampel dikeringkan dengan cara diangin-anginkan kemudian dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan saringan berukuran 40 mesh.

Simplisia kering disimpan di dalam wadah tertutup sampai digunakan untuk ekstraksi.

Ekstraksi metode maserasi dengan etanol

Ekstrak tunggal dari setiap simplisia kering dibuat dengan cara merendam sebanyak 600 g masing-masing daun kecibeling, daun bakau merah, dan batang katuk. Selanjutnya masing-masing simplisia dimasukan ke dalam toples kaca besar yang berbeda. Pelarut etanol 96 % kemudian ditambahkan sampai semua simplisia terendam kemudian toples disimpan pada kondisi ruangan dalam keadaan tertutup, serta terlindung dari cahaya selama 24 jam. Sese kali toples diaduk supaya proses maserasi berjalan maksimal. Selanjutnya, hasil maserasi dikocok menggunakan blender (Airlux) dan disaring dengan kertas saring sehingga diperoleh filtrat (maserat). Proses maserasi diulang tiga kali. Maserat kemudian dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* (Stuart RE3022C) pada suhu 40-50 °C sampai diperoleh ekstrak kental etanol dan dihitung persentase rendemennya dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100 \%$$

Ekstrak kombinasi dari simplisia diperoleh dengan cara mencampurkan ekstrak tunggal masing-masing simplisia (daun kecibeling, daun bakau merah, dan batang katuk) dengan perbandingan seperti yang ditampilkan pada Tabel 1.



Gambar 1. Bagian tanaman yang digunakan dalam penelitian, daun kecibeling (kiri), daun bakau (tengah), dan batang katuk (kanan).

Figure 1. Part of plants used in the study, leaves of *Strobilanthes crispata* (left), leaves of *Rhizophora stylosa* (center), and stems of *Sauropus androgynus* (right).

Tabel 1. Perbandingan ekstrak tunggal daun kecibeling, daun bakau merah, dan batang katuk dalam ekstrak campuran.

Table 1. Combination of single extracts of kecibeling leaves, red mangrove leaves, and star gooseberry stems.

No.	Perbandingan	Ekstrak daun kecibeling (g)	Ekstrak daun bakau merah (g)	Ekstrak batang katuk (g)
1	1:1:1	1	1	1
2	1:1:2	1	1	2
3	1:2:1	1	2	1
4	2:1:1	2	1	1

Ekstraksi metode infusa dengan air

Simplisia kering daun kecibeling, daun bakau merah, dan batang katuk masing-masing sebanyak 150 g berat kering dimasukkan ke dalam panci berisi akuades 1,5 l dan dipanaskan (diinfudasi) selama 15 menit dihitung mulai suhu 90 °C, kemudian ekstrak air disaring. Proses ekstraksi diulang sebanyak tiga kali. Filtrat yang diperoleh diuapkan di atas penangas air (*water bath*; Memmert) hingga diperoleh ekstrak kental. Rendemen ekstrak kental dihitung sebagai berikut:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100 \%$$

Kombinasi ekstrak air dibuat dengan metode yang sama seperti pada pembuatan kombinasi ekstrak etanol 96 % dengan perbandingan yang sama (Tabel 1).

Uji antioksidan

Pengujian antioksidan dari ekstrak tunggal dan kombinasi ketiga simplisia dilakukan dengan metode peredaman radikal bebas dengan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) berdasarkan metode Molyneux yang dimodifikasi (Molyneux, 2004; Sagar dan Singh 2011) menggunakan spektrofotometer UV-VIS (Hitachi U-3900H) pada panjang gelombang 517 nm sehingga menghasilkan absorbansi yang digunakan untuk menghitung persen inhibisi (%). Ekstrak yang memiliki nilai persentase inhibisi tertinggi kemudian akan diuji aktivitas antioksidannya (IC₅₀). Vitamin C digunakan sebagai kontrol positif (Molyneux 2004). Penghitungan persentase inhibisi ekstrak menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A_{\text{blanko}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{blanko}}} \times 100 \%$$

Keterangan/Note :

A = Nilai Absorbansi/Absorbance Value

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen ekstrak tunggal metode maserasi dan infusa

Ekstrak etanol dan ekstrak air dari simplisia kering daun kecibeling, daun bakau merah dan batang katuk yang diperoleh berbentuk kental, berwarna coklat tua, dan berbau khas. Persentase rendemen ekstrak etanol 96 % dan ekstrak air ditampilkan pada Tabel 2.

Hasil rendemen ekstrak tunggal pada metode maserasi (dengan pelarut etanol) memiliki rendemen yang lebih kecil dibanding dengan rendemen ekstrak tunggal metode infusa (dengan pelarut air) (Tabel 2). Adanya perbedaan ini dipengaruhi oleh faktor suhu, suhu tinggi pada metoda infusa dapat menarik senyawa kimia lebih banyak dibandingkan pada suhu rendah (maserasi) (Narsih dan Agato 2018).

Persentase inhibisi ekstrak tunggal dan kombinasi

Hasil uji aktivitas antioksidan untuk ekstrak tunggal menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% memiliki persentase inhibisi lebih tinggi dibandingkan ekstrak air pada tanaman yang sama (Tabel 3). Ekstrak etanol 96 % daun kecibeling memberikan inhibisi sebesar 94,07 %, sedangkan untuk ekstrak air daun kecibeling mempunyai persentase inhibisi 72,59 %. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstraksi dengan cara maserasi (pelarut

Tabel 2. Hasil rendemen ekstrak etanol (maserasi) dan ekstrak air (infusa) daun kecibeling, daun bakau merah, dan batang katuk.

Table 2. Yield of ethanol extract (maceration) and water extract (infusion) of kecibeling leaves, red mangrove leaves, and star gooseberry stems.

Sampel	Ekstrak etanol		Ekstrak air	
	Berat (g)	Rendemen (%)*	Berat (g)	Rendemen (%)**
Daun kecibeling	62,82	10,47	27,88	18,59
Daun bakau merah	78,33	13,05	57,97	38,65
Batang katuk	44,73	7,46	32,1	21,4

*) Dihitung dari 600 g berat kering simplisia/ The yield was calculated from 600 g dry weight of simplicia.

**) Dihitung dari 150 g berat kering simplisia/ The yield was calculated from 150 g dry weight of simplicia.

Tabel 3. Persentase inhibisi ekstrak etanol dan ekstrak air daun kecibeling, daun bakau merah, dan batang katuk pada konsentrasi 100 ppm.

Table 3. Inhibition percentage of ethanol extract and water extract of kecibeling leaves, red mangrove leaves, and star gooseberry stems at 100 ppm concentration

Sampel	Ekstrak etanol		Ekstrak air	
	Nilai absorbansi	Inhibisi (%)	Nilai absorbansi	Inhibisi (%)
Daun kecibeling	0,024	94,07	0,111	72,59
Daun bakau merah	0,035	91,36	0,041	89,88
Batang katuk	0,221	45,43	0,341	15,80
Kombinasi ekstrak daun kecibeling : daun bakau merah : batang katuk				
1:1:1	0,038	90,13	0,107	72,21
1:1:2	0,043	88,83	0,079	79,48
1:2:1	0,039	89,87	0,069	82,08
2:1:1	0,035	90,90	0,131	65,97
Blanko	0,385	--		
Vitamin C	0,013	96,54		

Keterangan/Note :

*) rerata dari tiga ulangan/average from three replications.

etanol 96 %) yang merupakan pelarut universal (Novriyanti 2016) sehingga dapat menarik senyawa non polar, semi polar dan polar, seperti senyawa asam lemak, alkaloid, steroid dan flavonoid yang berperan sebagai penghasil antioksidan (Herman 2013). Selain itu, etanol lebih disukai untuk mengekstraksi senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan karena toksisitasnya yang

rendah (Karadeniz *et al.* 2005). Sementara itu, pelarut air yang dikenal sebagai pelarut sangat polar adalah pelarut penarik senyawa glikosida, polisakarida, namun kurang efektif sebagai antioksidan.

Hasil uji aktivitas antioksidan

Tabel 4. Konsentrasi inhibisi (IC_{50}) ekstrak etanol tunggal daun kecibeling dan kombinasi terbaik daun kecibeling, daun bakau merah, dan batang katuk (2:1:1).

Table 4. Inhibition concentration (IC_{50}) of the best single extract (kecibeling leaves) and the best combination ratio of kecibeling leaves, red mangrove leaves, and star gooseberry stems extracts (2:1:1).

Konsentrasi (ppm)	Nilai absorbansi blanko	Nilai absorbansi*	Inhibisi (%)	IC ₅₀ (ppm)
<i>Ekstrak tunggal daun kecibeling</i>				
5	0,457	0,427	6,57	37,65
10		0,386	15,55	
25		0,237	48,10	
50		0,059	87,15	
100		0,026	94,23	
<i>Ekstrak kombinasi daun kecibeling : daun bakau merah : batang katuk (2:1:1)</i>				
5	0,457	0,383	16,20	18,78
10		0,304	33,43	
25		0,070	84,67	
50		0,041	91,02	
100		0,032	92,92	
<i>Vitamin C</i>				
4	0,457	0,516	46,64	4,24
6		0,386	60,14	
8		0,208	78,54	
10		0,034	96,52	
12		0,027	97,24	

Keterangan/Note :

*) rerata dari tiga ulangan/average from three replications.

Hasil uji antioksidan terhadap kombinasi ekstrak (Tabel 3) juga memperlihatkan bahwa persentase inhibisi kombinasi ekstrak etanol 96 % (maserasi) lebih tinggi dibandingkan dengan kombinasi ekstrak air (infusa). Kemudian setelah dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan menggunakan nilai IC_{50} , diperoleh bahwa kombinasi ekstrak etanol 96 % dengan perbandingan 2 : 1 : 1 lebih baik dibandingkan dengan ekstrak tunggal daun kecibeling dengan nilai IC_{50} berturut-turut adalah 18,78 ppm dan 37,65 ppm. Namun masih lebih rendah dari aktivitas antioksidan vitamin C (IC_{50} = 4,24 ppm) (Tabel 4). Hasil kombinasi ekstrak etanol 96 % daun kecibeling, daun bakau merah dan batang katuk memiliki efek yang lebih besar dibandingkan dengan penggunaan tunggal, maka dapat dikatakan mempunyai pengaruh sinergistis. Hidayat *et al.* (2014) juga menyatakan bahwa ekstrak kombinasi kacang kedelai dengan daun jati belanda memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dari ekstrak tunggalnya. Hasil yang sama juga diperoleh pada kombinasi ekstrak kayu secang dengan kelopak bunga rosella yang memiliki aktivitas antioksidan jauh lebih kuat dari ekstrak tunggal kelopak bunga rosela (Yulianty *et al.* 2016).

KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun kecibeling, daun bakau merah, dan batang katuk memiliki daya antioksidan lebih baik dibandingkan dengan ekstrak air (hasil infusa). Aktivitas antioksidan terkuat ditunjukkan oleh kombinasi ekstrak daun kecibeling, daun bakau merah, dan daun katuk (2:1:1) serta ekstrak tunggal daun kecibeling, dengan konsentrasi penghambatan (IC_{50}) berturut-turut adalah 18,78 ppm dan 37,65 ppm, tetapi masih di bawah keefektifan vitamin C (IC_{50} = 4,24 ppm). Ekstrak etanol daun kecibeling tunggal atau kombinasi dengan ekstrak daun bakau merah, dan batang katuk berpotensi untuk dikembangkan sebagai antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- Adibi, S., Nordan, H., Ningsih, S.N., Kurnia, M., Evando, E. & Rohiat, S. (2017) Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Daun Kecibeling (*Strobilanthes crispus*) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escheria coli*. *Allotrop Jurnal Pendidikan dan Ilmu Kimia*. 1 (2), 148-154.

- Dali, A., Ode, W., Miranda, Y. & Dali, N. (2017) Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Pecah Beling (*Strobilanthes crispus*). *Al Kimia*. 5 (2), 145–153. doi:10.24252/al-kimia.v5i2.3642.
- Degen, P. (2000) Parameter Standar Umum Ekstrak Tanaman Obat. *Cetakan Pertama, Jakarta : Departemen Kesehatan RI*.
- Djamil, R. & Anelia, T. (2009) Penapisan Fitokimia Uji BSLT dan Uji Antioksidan Ekstrak Metanol beberapa Spesies *Papilionaceae*. *Jurnal ilmu Kefarmasian Indonesia*. 7 (2), 65-71.
- Hayani, A., Aruningtyas, E.L., Indriyani, S. & Hakim, L. (2016) Local Knowledge of Katuk (*Scauropus androgynous* L. Merr) in East Jawa, Indonesia. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*. 7 (4), 210-215.
- Herman (2013) Aktivitas Antioksidan Beberapa Tumbuhan Obat Kalimantan Timur. *Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry*. 2 (2), 100–104. doi:10.25026/jtpc.v2i2.54.
- Hidayat, M., Soeng, S., Prahastuti, S., Patricia, T.H. & Yonathan, K.A. (2014) Aktivitas Antioksidan dan Antitrigliserida Ekstrak Tunggal Kedelai, Daun Jati Belanda serta Kombinasinya. *Bionatura*. 16 (2), 89-94.
- Karadeniz, F., Burdurlu, H.S., Koca, N. & Soyer, Y. (2005) Antioxidant Activity of Selected Fruits and Vegetables Grown in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 29 (4), 297-303.
- Malynoux, P. (2004) The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicryl- Hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. 26 (2), 211-219.
- Nahak, G. & Sahu, R.K. (2010) Free Radical Scavenging Activity of Multi-Vitamin Plant (*Scauropus androgynous* L. Merr). *Researcher*. 2 (11), 6-14.
- Narsih & Agato (2018) Efek Kombinasi Suhu dan Waktu Ekstraksi Terhadap Komponen Senyawa Ekstrak Kulit Lidah Buaya. *Jurnal Galung Tropika*. 7 (1), 75-87.
- Noviyanti (2016) Pengaruh Kepolaran Pelarut Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu Brazil Batu (*Psidium guineense* L.) dengan Metode DPPH. *Jurnal Farmako Bahari*. 7 (1), 29-35.
- Sagar, B.K. & Singh, R.P. (2011) Genesis and Development of DPPH Method of Antioxidant Assay. *Journal of Food Science and Technology*. 48 (4), 412-422. doi:10.1007/s13197-011-0251-1.
- Wei, L.S., Wendy, W.E.E., Siong, J.Y.F. & Syamsumir, D.F. (2011) Characterization of Antimicrobial, Antioxidant, Anticancer Properties and Chemical Composition of *Sauropus androgynus* Stem Extract. *Acta Medica Lituanica*. 18 (1), 12–16. doi:10.6001/actamedica.v18i1.1808.
- Wimpy & Suharyanto (2014) Uji Aktivitas Antioksidan Kombinasi Ekstrak Sarang Semut (*Myrmecodia pendans*) dan Daun Sirsak (*Annona muricata*) dengan Metode DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrilhidrazyl). *Jurnal Farmasi*. 3 (1), 18–24. doi:10.37013/jf.v3i1.22.
- Wimpy, W. & Harningsih, T. (2017) Uji Aktivitas Antioksidan Kombinasi Ekstrak Sarangsemut (*Myrmecodia pendans*) dan Ekstrak Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* Lodd.) dengan Metode DPPH (1, 1-Dipheyl-2-Picrilhidrazil). *Jurnal Kesehatan Kusuma Husada*. 35–41.
- Xu, D.-P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J.-J. & Li, H.-B. (2017) Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *International Journal of Molecular Sciences*. 18 (1), 96. doi:10.3390/ijms18010096.
- Yulianty, R., Murdifin, M. & Asma, N. (2016) Aktivitas Antioksidan Kombinasi Ekstrak Etanol Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) dan Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.). In: *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*. April 2016. Vol. 3. pp. 349-356.

DNA BARCODING ANGGREK OBAT *Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar MENGUNAKAN GEN *rbcL* DAN ITS

DNA Barcoding of Medicinal Orchid *Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar Using *rbcL* and ITS genes

Dian Al Ghifari Perwitasari, Siti Rohimah, Tri Ratnasari, Bambang Sugiharto,
dan Mukhamad Su'udi*

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember
Jalan Kalimantan No. 37 Sumbarsari, Jember, 68121

INFO ARTIKEL

Article history:

Diterima: 11 September 2019

Direvisi: 13 November 2019

Disetujui: 23 Maret 2020

Kata kunci:

Dendrobium *bigibbum*;
Dendrobium *discolor*
Merauke; bioinformatik;
identifikasi molekuler

Keywords:

Dendrobium *bigibbum*;
Dendrobium *discolor*
Merauke; bioinformatics;
molecular identification

ABSTRAK/ABSTRACT

Dendrobium discolor Lindl., Tanimbar adalah salah satu anggrek obat yang telah digunakan untuk mengobati penyakit kulit. Secara morfologi *D. discolor* Tanimbar menunjukkan kesamaan dengan *D. discolor* Merauke dan *D. bigibbum* sehingga menyulitkan dalam identifikasi. DNA barcoding menggunakan penanda gen spesifik *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large (rbcL)* dan *Internal Transcribed Spacer (ITS)* diharapkan dapat digunakan untuk mengidentifikasi *D. discolor* secara akurat. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi sekuen DNA yang berpotensi sebagai *barcode* untuk identifikasi anggrek obat *D. discolor* Tanimbar menggunakan penanda molekuler *rbcL* dan ITS. DNA genom *D. discolor* Tanimbar diisolasi dan digunakan sebagai *template* dalam reaksi PCR. Amplikon yang dihasilkan kemudian diurutkan (*sequencing*). Hasil penelitian menunjukkan urutan gen *rbcL* dari *D. discolor* memiliki homologi tinggi dengan *D. salaccense* (Accession: LC193510.1, *Prect. Ident*: 99,45 %), sedangkan ITS memiliki homologi tinggi dengan *D. nindii* (Accession: AY239985.1, *Prect. Ident*: 98,67 %). Analisis bioinformatika menunjukkan bahwa urutan gen *rbcL* dari *D. discolor* memiliki urutan homologi yang lebih tinggi daripada ITS. Namun, urutan ITS lebih spesifik dan mampu membedakan hingga tingkat spesies. Berdasarkan hasil penelitian ini maka sekuen ITS dapat direkomendasikan sebagai penanda molekuler untuk identifikasi anggrek obat *D. discolor* Tanimbar.

Dendrobium discolor Lindl., Tanimbar is one of the medicinal orchids that has been used to treat skin diseases. Morphologically, *D. discolor* Tanimbar shows similarities with *D. discolor* Merauke and *D. bigibbum*, making it challenging to identify. DNA barcoding using *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large (rbcL)* and *Internal Transcribed Spacer (ITS)* markers expected to be used to identify *D. discolor* accurately. This study aimed to identify potential DNA sequences as barcodes for the identification of medicinal orchid *D. discolor* Tanimbar using molecular markers *rbcL* and ITS. The DNA genome of *D. discolor* Tanimbar was isolated and used as a template in the PCR reaction. The resulting amplicons were then sequenced. The results showed that the *rbcL* gene sequence of *D. discolor* had high homology with *D. salaccense* (Accession: LC193510.1, *Prect. Ident* : 99.45 %), whereas the ITS had high homology with *D. nindii*

* Alamat Korespondensi : msuudi.rda@gmail.com

(Accession: AY239985.1 Identification: 98.67 %). Bioinformatics analysis showed that the *rbcL* gene sequence from *D. discolor* had more homology sequence than the ITS. However, the ITS sequence was more specific and could differentiate to species level. Based on the results of this study, the ITS sequence can be recommended as a molecular marker for the identification of the medicinal orchid *D. discolor* Tanimbar.

PENDAHULUAN

Orchidaceae memiliki sekitar 20.000 spesies yang terdistribusi dalam 899 genera dan mewakili 7 % dari total spesies tanaman berbunga yang ada di dunia (Erzurumlu *et al.* 2018). Orchidaceae memiliki nilai penting tidak hanya dari segi estetika, fitoterapi, dan ekologis tetapi juga dalam bidang terapeutik yaitu pemanfaatannya sebagai obat (Joshi *et al.* 2009; Hussain 2011; Wang *et al.* 2017). Terdapat 482 spesies anggrek obat tersebar di seluruh Asia dan tercatat 95 spesies ditemukan di Indonesia (Teoh 2016). Salah satu jenis anggrek obat berasal dari Kepulauan Tanimbar, Maluku yaitu *Dendrobium discolor* Lindl. Tumbuhan ini telah dimanfaatkan untuk mengobati berbagai macam penyakit seperti disentri, menghilangkan rasa sakit, mengobati kurap, dan bisul (Pant 2013; Teoh 2016). Suku Aborigin di Australia menggunakan batang muda *D. discolor* untuk tapal dan batang tua untuk obat kurap (Bulpitt 2005).

Identifikasi spesies *D. discolor* Lindl. menggunakan penanda morfologi memiliki keterbatasan. Hal ini dikarenakan adanya kemiripan morfologi organ vegetatif dalam genus *Dendrobium*, sedangkan organ generatif seperti bunga tidak mudah diperoleh (Han *et al.* 2018; Liu *et al.* 2019). Terlebih lagi, apabila bagian yang dimanfaatkan sebagai obat adalah batang semu (*canes*), hampir semua jenis anggrek *Dendrobium* memiliki morfologi batang yang sama, sehingga kesalahan dalam pemilihan dapat berakibat fatal. Oleh karena itu, perlu ada metode yang akurat sebagai alat pembeda. *D. discolor* Tanimbar secara morfologi memiliki organ vegetatif yang mirip dengan *D. discolor* Merauke (spesies intraspesifik) dan *D. bigibbum* Lindl. (spesies interspesifik) (Adams 2015). Selain itu, adanya inkonsistensi

antara nama lokal spesies (*vernacular names*) maupun sinonim ilmiah menjadi tantangan dalam identifikasi spesies secara konvensional (Ghorbani *et al.* 2017; Raclariu *et al.* 2018). Hal tersebut menjadi permasalahan dan kelemahan dalam identifikasi berdasarkan karakter morfologi, sehingga mendorong penggunaan metode baru yang jauh lebih efektif dalam menentukan identitas spesies tanaman, misalnya penanda molekuler/DNA (Subedi *et al.* 2013; Kim *et al.* 2014; Xu *et al.* 2015; Parveen *et al.* 2017).

Identifikasi spesies menggunakan penanda molekuler memiliki keunggulan karena keakuratannya yang tinggi, cepat, dan spesifik (Kim *et al.* 2014; Miftakhurohmah *et al.* 2016; Raclariu *et al.* 2018). Penanda molekuler spesifik pada hewan telah disepakati menggunakan gen *COI* (Hebert *et al.* 2003). Namun, gen *COI* kurang efektif apabila digunakan pada spesies tumbuhan. Hal ini dikarenakan rendahnya tingkat substitusi nukleotida pada genom mitokondria tanaman yang menyebabkan homologi antar sekuen tinggi (Hollingsworth *et al.* 2011; Kim *et al.* 2014). Oleh karena itu, dalam penelitian ini dicari penanda molekuler spesifik yang melibatkan sekuen dari kloroplas dan nukleus untuk membedakan spesies. Sekuen tersebut adalah *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL)* dan *Internal Transcribed Spacer (ITS)* yang telah direkomendasikan oleh *The Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) sebagai salah satu kandidat *barcode* universal pada tanaman (Hollingsworth *et al.* 2011). *rbcL* merupakan gen yang berasal dari genom plastid, sedangkan *ITS* berasal dari genom nukleus. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi sekuen berpotensi sebagai *barcode* pada anggrek obat *D. discolor* Lindl. Tanimbar menggunakan penanda molekuler *rbcL* dan *ITS*.

BAHAN DAN METODE

Koleksi sampel dan pengamatan morfologi

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Oktober 2018 sampai Mei 2019. Anggrek obat *D. discolor* Lindl. Tanimbar dipilih berdasarkan data *in silico* sekuen DNA anggrek obat *Dendrobium* dari Indonesia (Teoh 2016) yang tersedia di *GenBank* NCBI. Sampel diperoleh dari DD Orchid Nursery, Batu, Malang. Karakterisasi morfologi dilakukan dengan cara mengamati morfologi anggrek *D. discolor* Lindl. Tanimbar, yang meliputi habitus, organ batang, daun, dan bunga dan didukung dengan studi literatur.

Isolasi, amplifikasi PCR, purifikasi, dan sekuensing DNA barcode *Dendrobium discolor* Tanimbar

Isolasi DNA genom, analisis PCR, dan purifikasi produk hasil PCR dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Isolasi DNA genom menggunakan 0,5 g sampel daun dilakukan menggunakan metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) (Doyle dan Doyle 1990) dan NEXprep™ *Plant DNA Mini Kit* (NEX™ Diagnostics, Korea).

Amplifikasi DNA menggunakan mesin PCR bertujuan untuk mengamplifikasi nukleotida secara *in vitro* dan mendeteksi pita DNA spesifik pada tanaman (Wang *et al.* 1993). Amplifikasi PCR dilakukan menggunakan dua set jenis primer spesifik yaitu *rbcL* dan *ITS*. Sekuen kloroplas DNA (*ITS*) dapat digunakan untuk mengidentifikasi hubungan interspesifik pada Angiospermae dan jenis tanaman lainnya. Daerah *coding* (*rbcL*) lebih mudah disejajarkan (*alignment*) dibandingkan daerah *non-coding* seperti *ITS* (Taberlet *et al.* 1991; Hollingsworth *et al.* 2009). Sekuen primer forward *rbcL* (5'-ATGTCACCACAAACAGA GACTAAAGC-3'), dan sekuen primer *rbcL* reverse (5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3') (Kress dan Erickson 2007). Sekuen primer *ITS* forward (5'-ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG

-3') dan sekuen primer *ITS* reverse (5'-TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC-3') (Williams dan Whitten 1999).

Kondisi PCR berdasarkan hasil optimasi terdiri atas pre-denaturasi pada suhu 95 °C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 95 °C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 53 °C selama 30 detik, dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 1 menit 15 detik sebanyak 35 x siklus. Visualisasi hasil PCR dilakukan menggunakan elektroforesis gel *agarose* 1,25 % yang ditambah 1 µl EtBr dan pengamatan pola pita DNA dilakukan menggunakan *UV-transilluminator*. Purifikasi produk PCR dilakukan menggunakan PCR *purification Kit* (Jena Bioscience, Jerman). Penentuan urutan/sekuens DNA hasil PCR yang telah dipurifikasi dilakukan dengan mesin DNA *sequencer* ke 1st BASE di Singapura.

Analisis pensejajaran (*alignment*) dan filogenetik *D. discolor* Lindl. Tanimbar

Analisis data dilakukan dengan metode komputasi, yaitu menggunakan beberapa software seperti *GenBank* NCBI, ClustalX 2.1, dan MEGAX. Sekuen hasil sekuensing yang telah didapat selanjutnya dianalisis menggunakan *Bioedit*, dan dikonfirmasi dengan sekuen yang terdapat pada *GenBank* database NCBI menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Spesies pada NCBI dengan urutan sepuluh teratas kemudian dipilih dan dikoleksi sekuennya untuk dianalisis lebih lanjut. Analisis pensejajaran (*alignment*) dilakukan dengan menggunakan software ClustalX 2.1 (Jeanmougin *et al.* 1998), dan rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan menggunakan software MEGAX (Kumar *et al.* 2008). Analisis filogenetik dilakukan menggunakan metode *Neighbor-Joining* (NJ) yang bertujuan untuk merekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan data jarak evolusi minimum atau berdasarkan nenek moyang terdekat (Saitou dan Nei 1987). Dalam rekonstruksi filogenetik *outgroup* dipilih di luar genus *Dendrobium* dan didasarkan pada perbedaan morfologi yang signifikan dengan struktur vegetatif yang relatif sederhana yang dianggap plesiomorfik.

BAGIAN DAN PEMBAHASAN

Morfologi dan karakteristik DNA *barcode* anggrek obat *Dendrobium discolor* Tanimbar

Anggrek obat *D. discolor* Tanimbar termasuk anggrek epifit *section spatulate* dengan perantaraan simpodial. Batang herbaceous berbentuk silinder, tegak, bagian bawah tertutup selaput tipis (*pseudobulb*). Daun berbentuk bulat telur mengang (*ovate-lanceolate*) dengan selubung di pangkal, duduk daun berseling, tepi rata (Gambar 1a, b) (Cribb 1986). Bunga terdiri atas satu sepal dorsal dan dua sepal lateral. Petal pertama dan ke dua berseling dengan sepal. Petal ke tiga mengalami modifikasi menjadi *labellum* (lipir) (Gambar 1c). Tipe bunga *D. discolor* termasuk dan teresupinasi (memutarnya sepal dan petal bunga), *labellum* melebar (*obtus*) dengan lobus lateral yang meninggi dan bunga berwarna kecoklatan (Kartikaningrum *et al.* 2004; Liddle dan Forster 1990; Millar 1978; Teoh 2016). Anggrek ini terdistribusi mulai dari selatan pantai Papua, Papua Nugini sampai dengan Australia (Schoteman 2013).

Berdasarkan hasil amplifikasi PCR *D. discolor* Tanimbar menunjukkan bahwa fragmen target teramplifikasi dengan baik yaitu spesifik satu pita pada ukuran target yang tepat. DNA yang berhasil diamplifikasi sebagai produk PCR atau ampikon terdapat pada posisi 600 bp untuk primer *med* (Gambar 2a). Hal ini relevan dengan literatur

hasil penelitian Baker (2018) yang menyebutkan bahwa umumnya *rbcL* menghasilkan pita DNA dengan ukuran 654 bp dan didukung penelitian lain yang mengemukakan ukuran ampikon *rbcL* pada tanaman darat dan tanaman obat berkisar antara 550-650 bp (Kress dan Erickson 2007; Malik *et al.* 2019). Hasil ampikon menggunakan primer *ITS* spesifik dan sesuai pada ukuran 900 bp (Gambar 2b) mewakili seluruh wilayah *nrITS* yang terdiri dari *ITS1*, 5.8S rDNA dan *ITS2*. Hal ini didukung oleh penelitian Kishor dan Devi (2009) yang menyebutkan bahwa ukuran produk hasil amplifikasi PCR sekuen *ITS* pada anggrek *Aerides candarum* Reichb.f x *Vanda stangeana* Reichb.f menggunakan primer 17SE dan 26SE sekitar 930 bp.

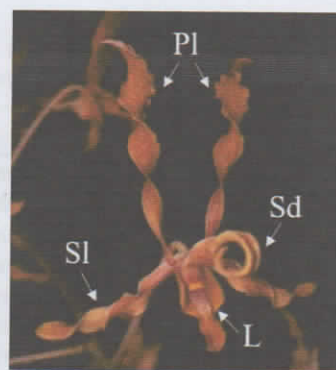
Beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan amplifikasi PCR adalah kemurnian DNA hasil ekstraksi, primer spesifik yang digunakan, efisiensi dan optimasi kondisi PCR yang tepat, terutama pada proses *annealing* (penempelan primer) (Ekman 1999). Pita yang jelas dan tebal menunjukkan tercapainya kondisi PCR yang optimal sehingga proses PCR dapat berlangsung dengan baik dan dapat diproses pada tahap selanjutnya yaitu purifikasi. Purifikasi bertujuan untuk memurnikan DNA hasil produk PCR dari komponen lainnya. Metode purifikasi tidak berasal dari purifikasi gel tetapi langsung dari produk hasil PCR karena pita DNA yang dihasilkan telah spesifik (satu *band*) dan sesuai dengan ukuran yang ditargetkan.



(a)



(b)



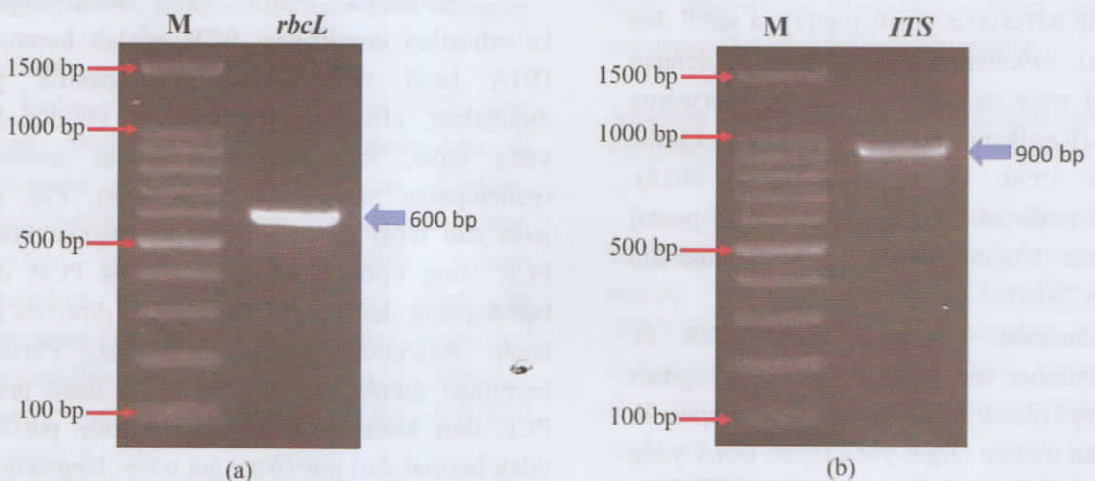
(c)

Gambar 1. Morfologi anggrek obat *Dendrobium discolor* Tanimbar; (a) batang dan daun; (b) daun; (c) bunga, Sd = pal dorsal, Sl = sepal lateral, L = labellum, dan Pl = petal.

Figure 1. Morphology of medicinal orchid *Dendrobium discolor* Tanimbar (a) stem and leaf; (b) flower, Sd = sepal dorsal, Sl = sepal lateral, L = labellum, dan Pl = petal.

Sekuensing DNA merupakan proses pembacaan urutan basa nukleotida (adenin, guanin, sitosin, dan timin) pada suatu sampel DNA. Hasil sekuensing produk PCR DNA *D. discolor* Tanimbar menggunakan primer *rbcL* memiliki panjang fragmen 550 bp (Gambar 2). Hasil analisis BLAST menggunakan sekuen gen *rbcL* menunjukkan tingkat homologi dengan genus yang lebih bervariasi. Hal tersebut menunjukkan sekuen gen *rbcL* mampu membedakan intra- dan inter-spesies sampai tingkat genus (Tabel 1). Sepuluh spesies teratas hasil analisis BLAST menggunakan sekuen gen *rbcL* menunjukkan terdapat empat sekuen dari genus *Dendrobium*, dan tujuh sekuen dari genus lain yang memiliki kemiripan secara genetik.

Hasil analisis BLAST sekuen *rbcL* da *D. discolor* Tanimbar menunjukkan tingkat homologi yang tinggi dengan *rbcL* dari spesies *D. salaccense* yang memiliki nomor akses LC193510.1. Persentase tingkat kemiripan secara genetik (*Perc. Ident*) mencapai 99,45 % (Tabel 1). Semakin tinggi tingkat kemiripan yang diperoleh, maka semakin tinggi tingkat homologi kedua sekuen. Homologi yang tinggi mengindikasikan rendahnya variasi genetik antar spesies tersebut. Nilai dugaan (*E-value*) bernilai nol (0), menunjukkan pensejajaran seluruh sekuen signifikan. Hal ini sesuai dengan pendapat Frederick *et al.* (2003) bahwa nilai *E-value* <0,05 bernilai signifikan.



Gambar 2. Visualisasi produk PCR anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar pada gel agarosa 1,25 % dengan penambahan 1 μ l EtBr menggunakan Marker (M) DNA 1 kb; (a) primer *rbcL*; (b) primer *ITS*.

Figure 2 Visualization of PCR product of medicinal orchid *Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar on agarose gel 1.25% with 1 μ l EtBr using Marker (M) DNA 1 kb; (a) *rbcL* primer; (b) *ITS* primer.

Tabel 1. Hasil BLAST urutan gen *rbcL* anggrek obat *Dendrobium discolor* Tanimbar.

Table 1. BLAST result of *rcbL* sequence of medicinal orchid *Dendrobium discolor* Tanimbar.

Nomor akses	Spesies	Nilai dugaan	Tingkat kemiripan secara genetik
LC193510.1	<i>Dendrobium salaccense</i>	0,0	99,45%
JF713180.1	<i>Dendrobium haemoglossum</i> (1)	0,0	99,45%
JF713179.1	<i>Dendrobium haemoglossum</i> (2)	0,0	99,45%
KT626800.1	<i>Dendrobium cunninghamii</i>	0,0	99,27%
MH116090.1	<i>Calanthe tricarinata</i> (1)	0,0	99,27%
MH116089.1	<i>Calanthe tricarinata</i> (2)	0,0	99,27%
KF852748.1	<i>Calanthe tricarinata</i> (3)	0,0	99,27%
KF852736.1	<i>Calanthe alpine</i>	0,0	99,27%
AF264158.1	<i>Bothriochilus bellus</i>	0,0	99,27%
KX527547.1	<i>Monomeria barbata</i>	0,0	99,27%

Panjang produk PCR *D. discolor* Tanimbar menggunakan primer ITS yang berhasil *amplifikasi* adalah 803 bp. Hasil analisis BLAST berdasarkan sekuen ITS menunjukkan bahwa spesies dengan tingkat kemiripan dengan sampel berasal dari genus yang sama dengan sampel, yaitu *Dendrobium*. Namun, dalam penelitian ini hanya diambil sepuluh spesies teratas saja. Hasil ini menunjukkan bahwa sekuen ITS secara genetik mampu mendiskriminasi sampel sampai tingkat spesies intra-spesies. (Tabel 2). Berdasarkan hasil analisis BLAST, *D. discolor* Lindl. Tanimbar secara genetik memiliki kesamaan/homologi dengan spesies *Dendrobium nindii* (AY239985.1). Persentase tingkat kemiripan (*Perc. Ident*) kedua spesies ini sebesar 98,67 % (Tabel 2). Nilai dugaan (*E-value*) bernilai nol (0) yang berarti pensejajaran seluruh sekuen bernilai signifikan pada tingkat spesies. ITS mampu membedakan hubungan interspesifik dan intraspesifik spesies tumbuhan. Hal tersebut dikarenakan, DNA nukleus seperti ITS sering mengalami pindah silang pada saat pembastaran sel sehingga menghasilkan rekombinan yang memiliki banyak variasi genetik. Semakin tinggi variasi genetik, menyebabkan tingkat homologi antar inter-spesies semakin rendah (Cheng *et al.* 2016).

Sekuen DNA *D. discolor* Lindl. baik Tanimbar maupun Merauke belum tersedia di GenBank. Oleh karena itu, ketika dilakukan analisis BLAST *D. discolor* Lindl. Tanimbar tidak menunjukkan tingkat homologi yang tinggi dengan *D. discolor* Lindl. Merauke. Walaupun secara morfologi, organ vegetatif *D. discolor* Lindl. Tanimbar menunjukkan adanya kemiripan dengan *D. bigibbum* Lindl. (Adams

2015), tetapi secara molekuler keduanya memiliki tingkat homologi yang rendah. Hal ini ditunjukkan dengan hasil BLAST yang didapatkan. Sekuen *D. bigibbum* gen *rbcL* belum tersedia di GenBank, sedangkan sekuen ITS telah tersedia di GenBank. Meskipun sekuen ITS *D. bigibbum* telah tersedia di GenBank, tetapi hasil BLAST tidak menunjukkan hal yang sama seperti karakter morfologi.

Pensejajaran (*alignment*) bertujuan untuk mengetahui kemiripan antar sekuen baik inter-maupun intra-spesies dengan membandingkan homologi sekuen dan variasi genetik yang dimiliki (Misener dan Krawetz 2000; Meshoul *et al.* 2005). *rbcL* merupakan salah satu gen yang berada dalam genom kloroplas yang terkonservasi (karakteristik struktur yang dipertahankan). Hal ini menyebabkan *rbcL* memiliki tingkat rekombinasi genetik cenderung lebih rendah dibandingkan dengan DNA nukleus (Cheng *et al.* 2016; Taberlet *et al.* 1991). Hasil penelitian menunjukkan bahwa tingkat rekombinasi genetik *rbcL* lebih rendah dibanding sekuen ITS (Gambar 3a, b) sehingga sesuai dengan hasil *alignment*, bahwa *rbcL* memiliki homologi tinggi yang menyebabkan tingkat divergensi rendah atau sedikit variasi genetik (Hasebe *et al.* 1994). Hasil pensejajaran sekuen *rbcL* spesies *D. discolor* Tanimbar menunjukkan adanya dua perbedaan basa nukleotida dari sampel lainnya yang terletak pada urutan ke 519 yaitu basa sitosin (C) sedangkan pada sekuen spesies lain adalah basa guanin (G). Perbedaan lainnya terletak pada urutan pensejajaran basa ke 539 yaitu basa timin (T) milik *D. discolor* Tanimbar menunjukkan perbedaan

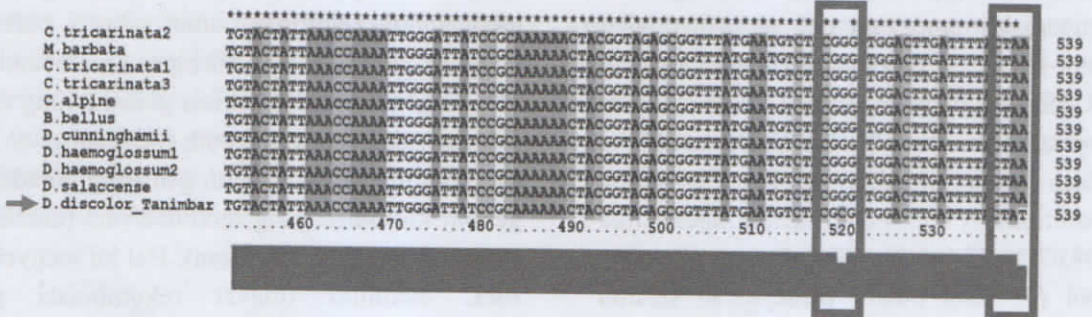
Tabel 2. Hasil BLAST urutan ITS anggrek obat *Dendrobium discolor* Tanimbar.
 Table 2. BLAST result of ITS sequence of medicinal orchid *Dendrobium discolor* Tanimbar.

Nomor aksesori	Spesies	Nilai dugaan	Tingkat kemiripan secara genetik (%)
AY239985.1	<i>Dendrobium nindii</i>	0,0	98,67
AB894142.1	<i>Dendrobium taurinum</i>	0,0	97,89
AB894132.1	<i>Dendrobium shiraishii</i>	0,0	92,65
AB894131.1	<i>Dendrobium macrophyllum</i>	0,0	91,82
AB894133.1	<i>Dendrobium amboinense</i>	0,0	90,93
AB894138.1	<i>Dendrobium kingianum</i>	0,0	90,74
AB894141.1	<i>Dendrobium spectabile</i>	0,0	89,94
AB894143.1	<i>Dendrobium speciosum</i>	0,0	90,51
EU430374.1	<i>Dendrobium callitrophilum</i>	0,0	89,19
EU430375.1	<i>Dendrobium canaliculatum</i>	0,0	92,41

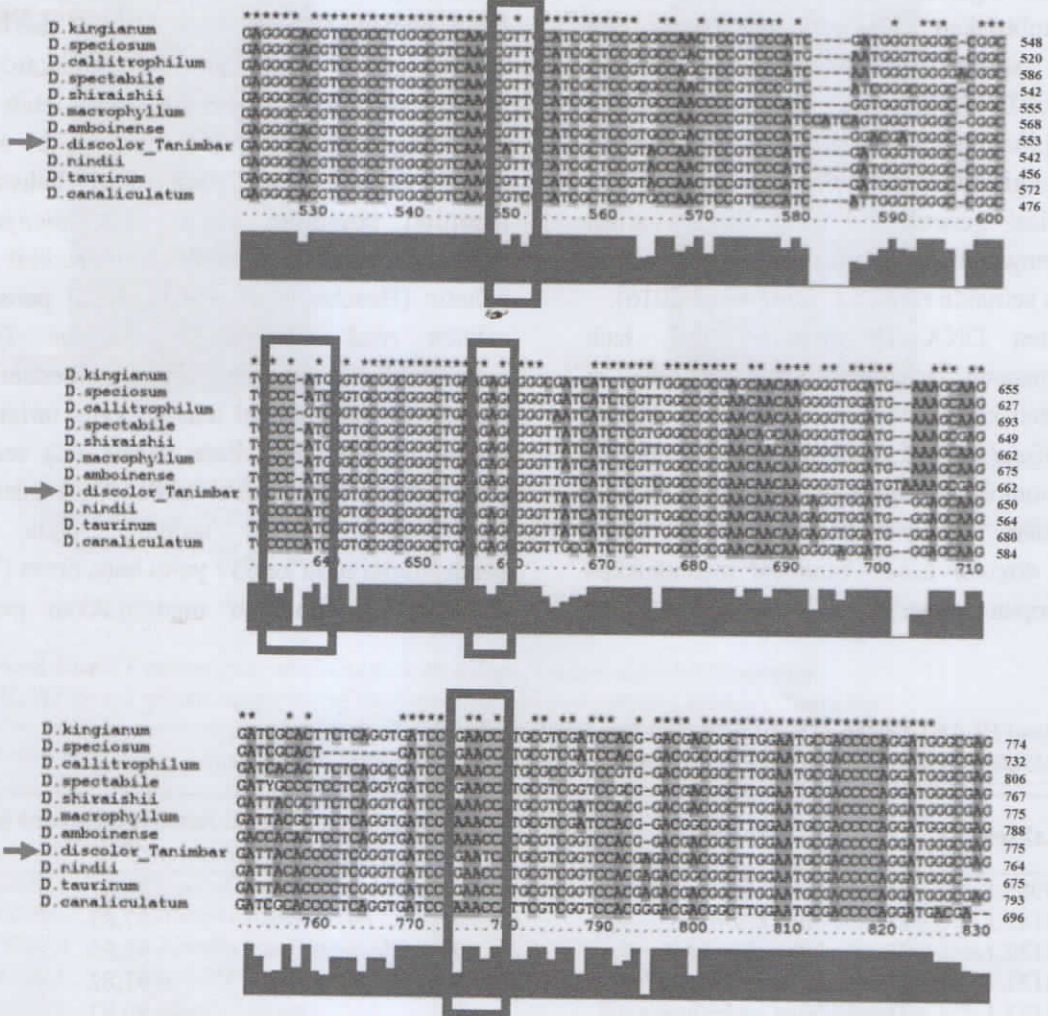
dengan sekuen spesies lainnya (Gambar 3a). Hasil ini mengindikasikan bahwa rendahnya variasi genetik pada sekuen *rbcL* menyebabkan *rbcL* kurang efektif digunakan sebagai penanda molekuler pada spesies *D. discolor* Tanimbar. Munculnya dua basa nitrogen pada *D. discolor*

Tanimbar yang berbeda dengan spesies yang lain dikarenakan tingginya nilai *Percent Identity* (*Perc. Ident*) merupakan angka yang menggambarkan tingkat kemiripan *query sequence* dengan sekuen target. Meskipun pada hasil analisis BLAST sekuen *rbcL* (Tabel 1) menunjukkan adanya dua

(a)



(b)



Gambar 3. Hasil penajaran urutan basa anggrek obat *Dendrobium discolor* Tanimbar menggunakan gen *rbcL* (a) dan *ITS* (b).

Figure 3. Alignment result of base sequence of medicinal orchid *Dendrobium discolor* Tanimbar using *rbcL* gene (a) and *ITS* (b).

kelompok nilai dengan *Perc. Ident* 99,45 % dan 99,27 %. Namun, setelah disejajarkan *D. discolor* Tanimbar menunjukkan adanya dua perbedaan basa nitrogen. Hal tersebut dikarenakan besarnya nilai *Perc. Ident* berkaitan dengan besarnya nilai *query cover* dan sekuen yang disejajarkan telah mengalami tahapan *trimming*.

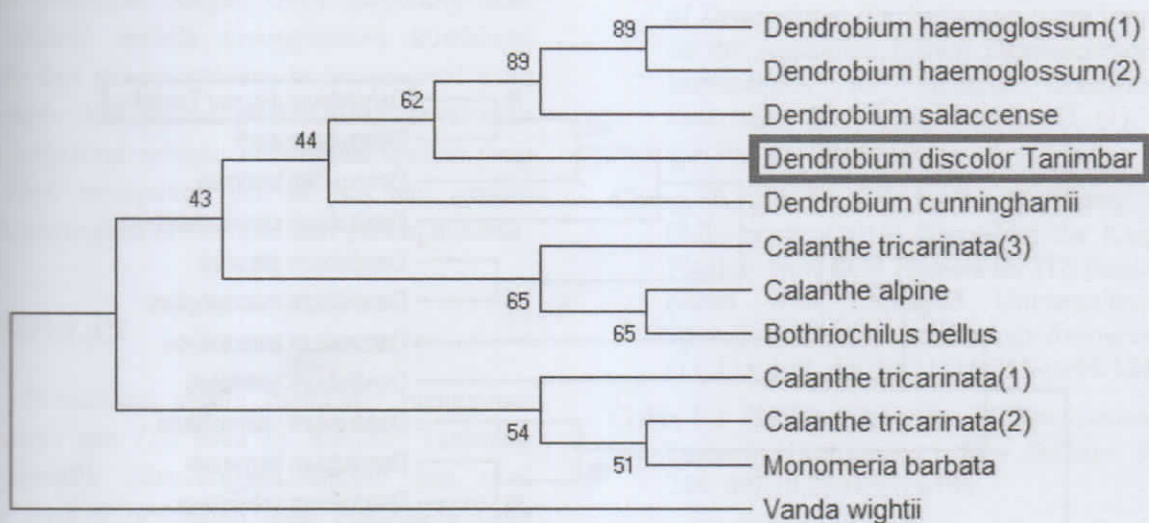
Hasil pensejajaran *D. discolor* Tanimbar menggunakan sekuen *ITS* menunjukkan beberapa perbedaan dengan spesies lainnya. Terdapat empat perbedaan basa nitrogen, antara lain pada urutan ke 549 yaitu pada basa Adenin (A) *D. discolor* Tanimbar dengan basa Guanin (G) sekuen *Dendrobium* lainnya. Perbedaan pada urutan ke 654-656 yaitu sekuen TCT yang berbeda dari sekuen basa lainnya. Dua perbedaan basa nitrogen lainnya terletak pada urutan ke 657 antara G dengan A serta perbedaan basa nitrogen T pada urutan ke 777 milik *D. discolor* Tanimbar dengan sekuen spesies lainnya (Gambar 3b). Hal ini mengindikasikan bahwa sekuen *ITS* memiliki keragaman genetik yang lebih tinggi dibandingkan sekuen *rbcL*.

Karakteristik pohon filogenetik anggrek obat *Dendrobium discolor* Tanimbar

Rekonstruksi pohon filogenetik menghasilkan empat kelompok utama yang terdiri atas kelompok genus *Dendrobium*, *Calanthe*,

Calanthe, dan *Vanda* (Gambar 4). Seluruh anggota genus *Dendrobium* berada pada satu klaster yang sama yang menandakan kedekatan hubungan kekerabatan karena beberapa karakter yang dimiliki seperti persamaan karakter morfologi yang dimiliki oleh genus *Dendrobium*. Pola pengklasteran yang didapat dari sekuen *rbcL* menunjukkan bahwa *D. discolor* Tanimbar memiliki kekerabatan genetik terdekat dengan *D. salaccense* sesuai dengan hasil BLAST dengan persentase identifikasi kesamaan sekuen mencapai 99,45 %. Anggrek *D. haemoglossum* terkait erat dengan *D. salaccense* (*section* *Grastidium*) dan mungkin terbukti merupakan varian darinya (Fernando dan Ormerod 2008). Namun, Govaerts (2003) menyatakan bahwa *D. haemoglossum* merupakan sinonim dari *D. salaccense* sehingga kedua spesies ini memiliki kekerabatan sangat dekat.

D. cunninghamii merupakan spesies yang berasal dari Selandia Baru (*Australasian clade*) dan termasuk dalam *section* *Winika*. Spesies ini teridentifikasi sebagai kelompok *sister group* yang mencakup genus *Cadetia*, *Diplocaulobium* dan *Flickingeria*, serta *section* *Dendrobium* yang terdiri atas *Grastidium*, *Latouria*, dan *Spatulata* (Burke *et al.* 2008). Hal ini sesuai dengan hasil konstruksi pohon filogenetik yang menunjukkan bahwa *D. cunninghamii* dari *section* *Winika* merupakan



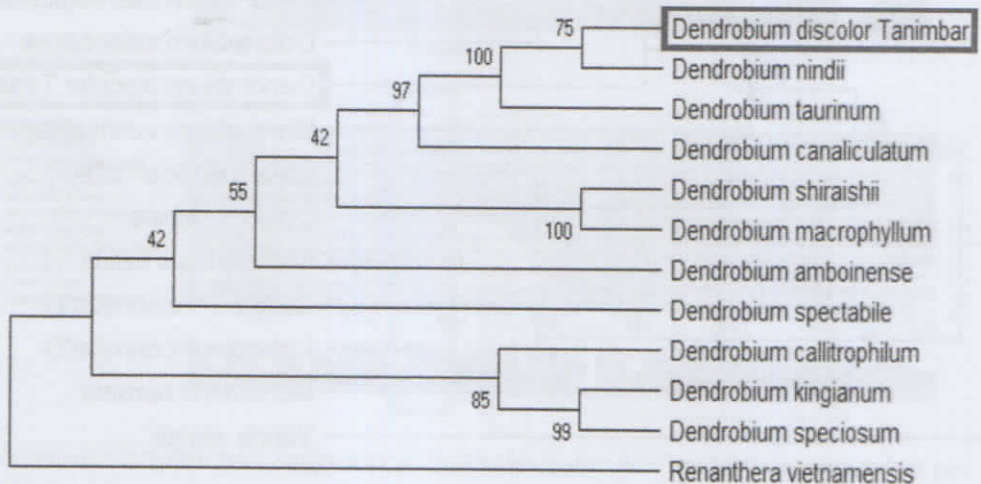
Gambar 4. Pohon filogenetik urutan gen *rbcL* anggrek obat *Dendrobium discolor* Tanimbar.
Figure 4. Phylogenetic tree of *rbcL* sequence of medicinal orchid *Dendrobium discolor* Tanimbar.

sister group dari *D. salaccense*, *D. haemoglossum* dari *section Grastidium* (Lokho 2013) yang berasal dari kawasan Asia (Indonesia sampai dengan Semenanjung Malaysia) dan *D. discolor* dari *section Spatulata* yang terdistribusi mulai dari Selatan Pantai Papua, Papua Nugini sampai dengan Australia (Schuiteman 2013).

Hasil konstruksi pohon filogenetik menunjukkan pembagian grup tidak hanya didasarkan pada garis kekerabatan yang dekat secara genetik tetapi juga karena adanya kemiripan karakter organ vegetatif (daun) yang dimiliki seperti pada *section Calanthe*. *Section* ini memiliki *pseudobulb* dan *bractea* yang kecil (Seidenfaden *et al.* 1992). *Bothriochilus bellus* tergolong dalam *section* ini dikarenakan memiliki kemiripan pada organ vegetatif. *Vanda wightii* dipilih sebagai *outgroup* yang menunjukkan struktur vegetatif yang relatif sederhana yang dianggap plesiomorfik (Gambar 4). Pola pengklasteran menggunakan sekuen *ITS* menunjukkan bahwa anggrek *D. discolor* Tanimbar menghasilkan tiga kelompok utama yang terdiri atas seluruh kelompok genus *Dendrobium* dan satu *outgroup*. *ITS* menunjukkan kemampuannya untuk mendiskriminasi sampai dengan tingkat spesies. Hasil pohon filogenetik *D. discolor* Tanimbar menggunakan primer *ITS* dibagi berdasarkan *section*. Anggota Genus *Dendrobium* dibagi menjadi empat *section* yang terdiri atas *section Spatulata*, *Latouria*, *Calypetrochilus*, dan *Dendrocoryne* (Gambar 5).

Section Spatulata terdiri atas *D. discolor* Tanimbar, *D. nindii*, *D. taurinum*, dan *D. canaliculatum* (Burke *et al.* 2008). *Section Spatulata* terdiri atas spesies yang tidak terpengaruh oleh musim. Sebagian besar tumbuh menjadi tanaman yang cukup besar dan kua dengan bunga yang bertahan lama di musim panas, iklim hangat sepanjang tahun dengan intensitas cahaya sedang hingga tinggi. Wilayah penyebaran meliputi Indonesia, Filipina, Papua Nugini, Australia sampai dengan Kepulauan Pasifik seperti Solomon, Kaledonia, Fiji, dan Samoa (Cribb 1986). *Section Latouria* terdiri atas *D. shiraishii*, *D. macrophyllum*, *D. amboinensis*, dan *D. spectabile*. *Section Latouria* memiliki karakter morfologi *pseudobulb* besar dan kasar, bunga majemuk tak terbatas (*inflorescentia racemosa*) dengan tipe perbungaan terminal, tegak dan bunga yang umumnya berwarna kuning kehijauan. Distribusi geografis dari *section Latouria* antara lain Indonesia (Papua), Papua Nugini, Kepulauan Pasifik, dan Kepulauan Solomon (Cribb 1983).

Section Dendrocoryne terdiri atas *D. kingianum* dan *D. speciosum* mungkin bersifat polifiletik, dengan spesies *D. callitrophilum* yang berasal dari *section Calypetrochilus* yang menyebabkan spesies ini berada di *clade* yang sama. Distribusi spesies berdasarkan letak geografis dua *section* ini berada di Australia. *Section Dendrocoryne* berdasarkan karakter morfologi memiliki *pseudobulb* yang berbentuk



Gambar 5. Pohon filogenetik urutan gen *ITS* anggrek obat *Dendrobium discolor* Tanimbar.

Figure 5. Phylogenetic tree of *ITS* sequence of medicinal orchid *Dendrobium discolor* Tanimbar

diatas (gada), daun sub-apikal, bunga berumbai dengan tipe perbungaan terminal yang menyerupai section *Latouria* (Blume) Schltr. Perbedaan nyata dari dua section terletak pada bunga yang lebih rapuh dan lebih halus, berdaging lebih sedikit. Anggota section *Dendrocoryne* sebagian besar terdistribusi di Australia Timur, Pulau Lord Howe, Kaledonia Baru, Fiji, dan Vanuatu (Burke *et al.* 2008). *Renanthera vietnamensis* dipilih sebagai outgroup karena memiliki karakter morfologi yang berbeda dengan genus *Dendrobium*. Perbedaan ini terletak pada percabangan batang dan diduga relatif parafiletik dengan spesies yang diuji (Gambar 5).

Ketika dilakukan analisis BLAST menggunakan sekuen *rbcL*, tidak semua spesies yang dianalisis menggunakan sekuen *ITS* muncul, seperti *D. nindii*. Hal ini dikarenakan sekuen DNA *D. nindii* yang tersedia di *GenBank database* adalah sekuen *ITS*, sedangkan sekuen gen *rbcL* belum tersedia di *GenBank*. Berdasarkan pemaparan tersebut identifikasi secara molekuler pada *D. discolor* Tanimbar menggunakan metode "barcoding DNA" dapat menjadi salah satu alat yang efektif untuk mengkonfirmasi spesies anggrek obat *D. discolor* Tanimbar dalam keragaman urutan sekuen famili Orchidaceae. Namun, untuk identifikasi molekuler akan lebih baik apabila menggunakan kombinasi dua penanda molekuler, yaitu *rbcL* dan *ITS*. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Fazekas *et al.* (2009) bahwa analisis molekuler dengan DNA *barcoding* akan lebih efektif apabila menggunakan kombinasi *barcode* dari genom nukleus kedua parental yang diwariskan dan genom plastid yang diwariskan secara *uniparent* sebagai identifikasi spesies yang kuat. *rbcL* merupakan gen berasal dari genom plastid, sedangkan *ITS* berasal dari genom nukleus.

KESIMPULAN

Identifikasi secara molekuler menggunakan urutan gen *ITS* pada *D. discolor* Tanimbar lebih spesifik dibandingkan dengan gen *rbcL* karena adanya perbedaan basa nukleotida yang berpotensi sebagai *barcode* spesifik. Oleh karena itu, identifikasi berdasarkan urutan gen *ITS* dapat direkomendasikan sebagai penanda molekuler

untuk spesies *D. discolor* Tanimbar. Cara mendeteksi anggrek obat *D. discolor* dengan menggunakan *barcoding* DNA lebih akurat sehingga dapat menjamin kebenaran dalam menentukan bahan baku anggrek obat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada LPPM Universitas Jember yang telah mendanai penelitian ini melalui skema Hibah KeRis tahun 2018 dan 2019.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, P.B. (2015) *Dendrobium bigibbum* (sect. *Phalaenanthus*) in Australia - Analysis of Diagnostic Characters, Review of Taxa and A New Classification. *Kew Bulletin*. 70 (2), Springer-Verlag London Ltd. doi:10.1007/s12225-015-9565-x.
- Baker, S.S. (2018) Using DNA Barcoding to Identify Duckweed Species as Part of An Undergraduate Ecology Course. *ACS Symposium Series*. 1276, 67-79. doi:10.1021/bk-2018-1276.ch005.
- Bulpitt, C.J. (2005) The Uses and Misuses of Orchids in Medicine. *Quarterly Journal of Medicine*. 98 (9), 625-631. doi:10.1093/qjmed/hci094.
- Burke, J.M., Bayly, M.J., Adams, P.B. & Ladiges, P.Y. (2008) Molecular Phylogenetic Analysis of *Dendrobium* (Orchidaceae), with Emphasis on the Australian Section *Dendrocoryne*, and Implications for Generic Classification. *Australian Systematic Botany*. 21 (1), 1-14. doi:10.1071/SB07038.
- Cheng, T., Xu, C., Lei, L., Li, C., Zhang, Y. & Shiliang, Z. (2016) Barcoding the Kingdom Plantae: New PCR Primers for ITS Regions of plants with Improved Universality and Specificity. *Molecular Ecology Resources*. 16 (1), 138-149. doi:10.1111/1755-0998.12438.
- Cribb, P.J. (1983) A Revision of *Dendrobium* sect. *Latouria* (Orchidaceae). *Kew Bulletin*. 38 (2), 229. doi:10.2307/4108109.
- Cribb, P.J. (1986) A Revision of *Dendrobium* sect. *Spatulata* (Orchidaceae). *Kew Bulletin*. 41 (3), 615-692. doi:10.2307/4108109.

- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1990) Isolation of DNA from Small Amounts of Plant Tissues. *BRL Focus*. 12, 13-15.
- Ekman, S. (1999) PCR Optimization and Troubleshooting, with Special Reference to the Amplification of Ribosomal DNA in Lichenized Fungi. *Lichenologist*. 31 (5), 517-531. doi:10.1006/lich.1999.0226.
- Erzurumlu, G.S., Sultana, N., Vural, M. & Serce, S. (2018) Genetic and Phenotypic Variation among Turkish Terrestrial Orchid Species as Revealed by RAPD and Morphological Characteristics. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 42 (4), 227-236. doi:10.3906/tar-1711-37.
- Fazekas, A.J., Kesanakurti, P.R., Burgess, K.S., Percy, D.M., Graham, S.W., Barrett, S.C.H., Newmaster, S.G., Hajibabaei, M. & Husband, B.C. (2009) Are Plant Species Inherently Harder to Discriminate than Animal Species Using DNA Barcoding Markers? *Molecular Ecology Resources*. 9 (SUPPL. 1), John Wiley & Sons, Ltd, 130-139. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02652.x.
- Fernando, S.S. & Ormerod, P. (2008) An Annotated Checklist of the Orchids of Sri Lanka. *Rheedea*. 18 (1), 1-28.
- Frederick, M.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*. Massachusetts, John Wiley & Sons, Inc.
- Ghorbani, A., Saeedi, Y. & de Boer, H.J. (2017) Unidentifiable by Morphology: DNA Barcoding of Plant Material in Local Markets in Iran. *PLoS ONE*. 12 (4). doi:10.1371/journal.pone.0175722.
- Govaerts, R. (2003) *World Checklist of Monocotyledons Database in ACCESS: 1-71827 (WCSP)*. London, The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew.
- Han, R., Xie, D., Tong, X., Zhang, W., Liu, G., Peng, D. & Yu, N. (2018) Transcriptomic Landscape of *Dendrobium huoshanense* and Its Genes Related to Polysaccharide Biosynthesis. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 87 (1), 1-11. doi:10.5586/asbp.3574.
- Hasebe, M., Omori, T., Nakazawa, M., Sano, T., Kato, M. & Iwatsuki, K. (1994) rbcL Gene Sequences Provide Evidence for the Evolutionary Lineages of Leptosporangiate Ferns. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91 (12), pp. 5730-5734. doi:10.1073/pnas.91.12.5730.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & Dewaard, J.R. (2003) Biological Identifications Through DNA Barcodes. In: *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 270 (1512), London, pp. 313-321. doi:10.1098/rspb.2002.2218.
- Hollingsworth, P.M., Forrest, L.L., Spouge, J.L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., & Fazekas, A. (2009) A DNA Barcode for Land Plants. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106 (31), pp. 12794-12797.
- Hollingsworth, P.M., Graham, S.W. & Little, D.P. (2011) Choosing and Using A Plant DNA Barcode. *PLoS ONE*. 6 (5), 1-13. doi:10.1371/journal.pone.0019254.
- Hossain, M.M. (2011) Therapeutic Orchids: Traditional Uses and Recent Advances - An Overview. *Fitoterapia*. 82 (2), Elsevier B.V., 102-140. doi:10.1016/j.fitote.2010.09.007.
- Jeanmougin, F., Thompson, J., Gouy, M. & Higgins, D. (1998) Multiple Sequence Alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences*. 23 (10), 403-405. doi:https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01285-7.
- Joshi, G.C., Tewari, L.M., Lohani, N., Upreti, K., Jalal, J.S. & Tewari, G. (2009) Diversity Of Orchids In Uttarakhand and Their Conservation Strategy with Special Reference to Their Medicinal Importance. *Report and Opinion*. 1 (3), 47-52.
- Kartikaningrum, S., Widiastoety, D. & Effendie, K. (2004) *Karakterisasi Tanaman Hias: Anggrek & Anthurium*. Bogor, Sekretariat Komisi Nasional Plasma Nutfah.
- Kim, H.M., Oh, S., Bhandari, G.S., Kim, C. & Park, C. (2014) DNA Barcoding of Orchidaceae in Korea. *Molecular Ecology Resources*. 14 (3), 499-507. doi:10.1111/1755-0998.12207.
- Kishor, R. & Devi, H.S. (2009) Induction of Multiple Shoots in A Monopodial Orchid Hybrid (*Aerides vandarum* Reichb.f $\times$ *Vanda stangeana* Reichb.f) Using Thidiazuron and Analysis of Their Genetic Stability. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 97 (2), 121-129. doi:10.1007/s11240-009-9506-1.

- Ramsey, W.J. & Erickson, D.L. (2007) A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. *PLoS One*. 2 (6), e508. doi:10.1371/journal.pone.0000508.
- Ramsey, S., Nei, M., Dudley, J. & Tamura, K. (2008) MEGA: A Biologist-Centric Software for Evolutionary Analysis of DNA and Protein Sequences. *Briefings in Bioinformatics*. 9 (4), 299-306. doi:https://doi.org/10.1093/bib/bbn017.
- Little, D.J. & Forster, P.I. (1990) The Recognition of Subspecies in *Dendrobium discolor* Lindley (Orchidaceae). *Austrobaileya*. 3 (2), Queensland Herbarium, 319-321. doi:10.2307/41738767.
- Lin, H., Fang, C., Zhang, T., Guo, L. & Ye, Q. (2019) Molecular Authentication and Differentiation of *Dendrobium* Species by rDNA ITS Region Sequence Analysis. *AMB Express*. 9 (1), Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1186/s13568-019-0767-8.
- Lukha, A. (2013) Diversity of *Dendrobium* Sw. Its Distributional Patterns and Present Status in the Northeast India. *International Journal of Scientific and Research Publications*. 3 (5), 1-9.
- Malik, S., Priya, A. & Babbar, S.B. (2019) Employing Barcoding Markers to Authenticate Selected Endangered Medicinal Plants Traded in Indian Markets. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 25 (2), Springer India, 327-337. doi:10.1007/s12298-018-0610-8.
- Mesboul, S., Layeb, A. & Batouche, M. (2005) A Quantum Evolutionary Algorithm for Effective Multiple Sequence Alignment. In: Bento, C., Cardoso, A. & Dias, G. (eds.) *Progress in Artificial Intelligence*. 3808 LNCS, Berlin, Springer, pp. 260-271. doi:10.1007/11595014_26.
- Mitakhurohmah, Mariana, M. & Wahyuno, D. (2016) Deteksi Piper Yellow Mottle Virus (PYMoV) Penyebab Penyakit Kerdil pada Tanaman Lada secara Polymerase Chain Reaction (PCR). *Bul Littro*. 27 (1), 77. doi:10.21082/bullittro.v27n1.2016.77-83.
- Miller, A. (1978) *Orchids of Papua New Guinea*. Portland, Oregon, Timber Press.
- Misener, S. & Krawetz, S.A. (2000) *Bioinformatics Methods and Protocols*. Methods in. Totowa, New Jersey, Humana Press.
- Pant, B. (2013) Medicinal Orchids and Their Uses: Tissue Culture A Potential Alternative for Conservation. *African Journal of Plant Science*. 7 (10), 448-467. doi:10.5897/ajps2013.1031.
- Parveen, I., Singh, H.K., Malik, S., Raghuvanshi, S. & Babba, S.B. (2017) Evaluating Five Different Loci (*rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, *matK* and ITS) for DNA Barcoding of Indian Orchids. *Genome*. 60 (8), 665-671.
- Raclariu, A.C., Heinrich, M., Ichim, M.C. & de Boer, H. (2018) Benefits and Limitations of DNA Barcoding and Metabarcoding in Herbal Product Authentication. *Phytochemical Analysis*. 29 (2), 123-128. doi:10.1002/pca.2732.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4 (4), Oxford University Press (OUP), 406-425. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Schuiteman, A. (2013) *A Guide to Dendrobium of New Guinea*. Kinabalu, Natural History Publications.
- Seidenfaden, G., Wood, J. & Holttum, R. (1992) *The Orchids of Peninsular Malaysia and Singapore*. Fredensborg, Olsen & Olsen.
- Subedi, A., Kunwar, B., Choi, Y., Dai, Y., van Andel, T., Chaudhary, R.P., de Boer, H.J. & Gravendeel, B. (2013) Collection and Trade of Wild-harvested Orchids in Nepal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 9 (1), 1-10. doi:10.1186/1746-4269-9-64.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J. (1991) Universal Primers for Amplification of Three Non-Coding Regions of Chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*. 17, pp. 1105-1109.
- Teoh, E.S. (2016) *Medicinal Orchids of Asia*. *Medicinal Orchids of Asia*. Singapore, Springer Nature. doi:10.1007/978-3-319-24274-3.
- Wang, H., Qi, M. & Cutler, A.J. (1993) A Simple Method of Preparing Plant Samples for PCR. *Nucleic Acids Research*. 21 (17), 4153-4154. doi:10.1093/nar/21.17.4153.
- Wang, X., Chen, X., Yang, P., Wang, L. & Han, J. (2017) Barcoding the *Dendrobium*

(Orchidaceae) Species and Analysis of the Intragenomic Variation Based on the Internal Transcribed Spacer 2. *BioMed research international*. 2017, 2734960. doi:10.1155/2017/2734960.

Williams, N.H. & Whitten, W.M. (1999) Molecular Phylogeny and Floral Fragrances of Male Euglossine Bee-Pollinated Orchids: A Study Of *Stanhopea* (Orchidaceae). *Plant*

Species Biology. 14, 129-134. doi:10.1046/j.1442-1984.1999.00016.x.

Xu, S., Li, D., Li, J., Xiang, X., Jin, W., Huang, W., Jin, X. & Huang, L. (2015) Evaluation of the DNA Barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from Mainland Asia. *PL ONE*. 10 (1), 1-11. doi:10.1371/journal.pone.0115168.

EFEKTIVITAS SENYAWA NONATSIRI DARI *Curcuma* spp. TERHADAP PENEKANAN PENYAKIT ANTRAKNOSA PADA BUAH CABAI

Effectiveness of Nonessential Compounds from Curcuma spp. on Reducing Anthracnose Disease of Chilli Pepper Fruit

Anella Retna Kumala Sari^{1*)}, Firdaus Auliya Rahmah²⁾, dan Syamsuddin Djauhari²⁾

¹⁾Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Bali-Kementerian Pertanian
Jalan By Pass Ngurah Rai Pesanggaran, Denpasar, 8022

²⁾Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya
Jalan Veteran, Kota Malang, 65145

INFO ARTIKEL

Article history:

Received: 03 Desember 2019

Revised: 04 Februari 2020

Accepted: 16 April 2020

Kata kunci:

Kurkumin; desmethoxycurcumin; senyawa anti-fungus

Keywords:

Curcumin; desmethoxycurcumin; anti-fungal compound

ABSTRAK/ABSTRACT

Salah satu penyakit penting pada buah cabai besar (*Capsicum annum*) ialah antraknosa yang disebabkan oleh *Colletotrichum capsici*. Potensi ekstrak dan minyak *Curcuma* sebagai anticendawan sudah banyak dilaporkan, tetapi komponen nonatsirinya masih belum banyak diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas senyawa nonatsiri dari rimpang *Curcuma longa*, *C. zedoaria*, dan *C. aeruginosa* terhadap *C. annum*. Penelitian dilaksanakan sejak November 2014 sampai Mei 2015 di Universitas Brawijaya. Senyawa nonatsiri diekstrak dengan cara merendam rimpang *Curcuma* dalam metanol selanjutnya didistilasi menggunakan rotary vacuum evaporator kemudian diidentifikasi menggunakan HPLC. Pengujian efektifitas senyawa nonatsiri dari rimpang tiga spesies *Curcuma* dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo*. Perlakuan yang diuji adalah kombinasi ketiga jenis rimpang dan enam konsentrasi senyawa nonatsiri (0 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, dan 12 ppm). Pengujian dirancang dengan Rancangan Acak Lengkap Faktorial, 18 kombinasi perlakuan dan diulang tiga kali. Hasil analisis HPLC menunjukkan ekstrak metanol ketiga jenis rimpang *Curcuma* mengandung kurkumin dan desmethoxycurcumin dalam jumlah yang beragam dan terbanyak ada di dalam ekstrak *C. longa* yaitu 13,792 ppm kurkumin dan 67,156 ppm desmethoxycurcumin. Berdasarkan hasil uji *in vitro*, senyawa nonatsiri dari *C. zedoaria* paling efektif menghambat pertumbuhan *C. annum* dibandingkan dengan dua jenis *Curcuma* lainnya yaitu pada 10 ppm dengan persentase penghambatan 81,53 %. Secara *in vivo*, senyawa nonatsiri *C. zedoaria* juga paling efektif menghambat perkembangan gejala antraknosa. Senyawa nonatsiri ketiga spesies *Curcuma* berpotensi dikembangkan sebagai fungisida nabati.

One of the important diseases on chili is anthracnose caused by Colletotrichum capsici. Curcuma extracts and their essential oils were known as antifungal, but nonessential compounds have not been widely tested. This study aimed to assay the effectiveness of nonessential compounds of Curcuma longa, C. zedoaria, and C. aeruginosa to C. annum. This study was conducted in November 2014 until Mei 2015 at Brawijaya University. The nonessential compound was obtained by soaking rhizome of C. longa, C. zedoaria, and C. aeruginosa in methanol, then distilled by

*Alamat Korespondensi : anellaretna@yahoo.com

using rotary vacuum evaporator. Nonessential chemical compounds were identified by using HPLC. Effectiveness evaluation of nonessential compounds from three species of *Curcuma* was done by in vitro and in vivo test. Tested treatments were three species of *Curcuma* spp and 6 concentration levels of nonessential compounds (0 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, and 12 ppm). The experiment was performed in Factorial Complete Randomized Design, with 18 treatments combination, and replicated three times. Results of HPLC analysis showed the rhizomes of the three *Curcuma* species contained curcumin and desmethoxycurcumin in various concentrations. The highest level was found in the *C. longa* extract (13.792 ppm curcumin and 67.156 ppm desmethoxycurcumin). However, in vitro test results showed nonessential compound of *C. zedoaria* was most effective in inhibiting *C. annuum* growth. The 10 ppm concentration inhibited 81.53 % of fungal growth. Further, the in vivo test, also indicated the same, it's most effective in hampering the growth of anthracnose symptoms. Therefore, curcumin and desmethoxycurcumin from three species of *Curcuma* have potential to be developed as botanical fungicide.

PENDAHULUAN

Salah satu komoditas sayuran unggulan Indonesia yang memiliki nilai ekonomi cukup tinggi ialah cabai merah (*Capsicum annuum*). Pada kurun waktu 2006-2015, produksi cabai merah besar di Indonesia mengalami rata-rata peningkatan 4,16 % per tahun, setara dengan 34.349 ton cabai besar per tahun (Kementerian Perdagangan 2016). Konsumsi tahunan cabai merah besar selama 10 tahun (2006-2015) relatif tidak banyak berubah, yaitu sekitar 1,38-1,65 kg/kapita/tahun (Pusat Data dan Sistem Informasi 2015). Namun, produksi cabai merah besar di Indonesia berfluktuasi akibat berbagai hal, seperti perubahan iklim, meningkatnya serangan OPT, dan pengendalian OPT yang belum optimal. Salah satu kendala yang dihadapi dalam budidaya cabai merah ialah penyakit antraknosa yang disebabkan oleh cendawan *Colletotrichum capsici*.

Penyakit antraknosa tergolong sangat berbahaya karena mampu menggagalkan panen hingga mencapai 100 %. Selama ini, pengendalian penyakit antraknosa menggunakan fungisida kimia, tetapi cara ini telah menyebabkan dampak negatif terhadap kesehatan dan lingkungan, serta menyebabkan resistensi patogen (Suhartono 2014; Syahri 2017). Jenis-jenis bahan aktif fungisida kimia yang digunakan untuk penyemprotan, antara lain propineb, maneb, zineb, karbendazim, mankozeb, benomil, dan kombinasinya. Oleh karena itu, perlu adanya alternatif pengendalian

yang lebih ramah lingkungan guna menggantikan peranan fungisida kimia tersebut, antara lain dengan pemanfaatan fungisida nabati.

Saat ini telah banyak penelitian pengendalian cendawan patogen menggunakan fungisida nabati. Salah satu tumbuhan yang dapat dijadikan sebagai fungisida nabati adalah tumbuhan genus *Curcuma* dari famili Zingiberaceae yang menghasilkan senyawa metabolit sekunder dan dapat digunakan sebagai antimikroba dan fungisida alami (Kusbiantoro 2018).

Tanaman yang digunakan untuk obat tradisional umumnya mengandung komponen alami yang potensial menjadi antimikroba, sebagai suatu alternatif yang efektif, murah, dan sebagai agen antimikroba untuk perlakuan infeksi mikroba (Masih *et al.* 2014). Salah satu jenis *Curcuma* yang umum digunakan ekstraknya untuk fungisida nabati yaitu kunyit (*Curcuma longa* Linn. syn. *Curcuma domestica* Val). Kunyit dan jenis *Curcuma* lainnya mengandung minyak atsiri yang memiliki sifat antimikroba. Kunyit sebagai anticendawan terbukti mampu menghambat perkecambahan spora *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum musae* (Yendi dan Prasetyo 2015), *Rigidoporus microporus* (Kusdiana *et al.* 2016), *Alternaria solani*, *Aspergillus fumigatus*, dan *Helminthosporium* spp. (Masih *et al.* 2014). Kandungan senyawa kunyit yang dipercaya dapat mengendalikan penyakit adalah senyawa turmerone. Stangarlin *et al.* (2011), menyatakan

ekstrak kunyit 10 dan 15 % menghambat pertumbuhan miselium cendawan *A. solani* sebesar 20,2 dan 23,2 %, serta mengurangi sporulasi cendawan sebesar 71,7 dan 87 %. Tidak hanya kunyit, jenis *Curcuma* lainnya juga mengandung metabolit sekunder yang memiliki fungsi yang sama dalam pertahanan terhadap patogen. Kandungan utama tanaman jenis *Curcuma* adalah minyak atsiri dan senyawa nonatsiri.

Hasil dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam spesies *Curcuma* dapat menghambat pertumbuhan miselium cendawan, sehingga tanaman jenis *Curcuma* dapat dijadikan sebagai pengendali penyakit tanaman yang disebabkan oleh cendawan. Senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam *Curcuma* spp. diklasifikasikan sebagai senyawa atsiri (volatil) dan nonatsiri (nonvolatil). Senyawa atsiri terdiri dari *ar-turmerone*, *turmerone*, *ar-curcumene*, *zingiberene*, *α-phellandrene*, *curlone*, *1,8-cineole* dan *monoterpenes* lainnya (Ferreira *et al.* 2013). *Turmerone* merupakan senyawa utama minyak atsiri yang terlibat dalam berbagai penghambatan berbagai aktivitas biologis patogen (Ferreira *et al.* 2013). Senyawa *1,8-cineole* dalam minyak atsiri *C. zedoaria* terbukti mampu menekan pertumbuhan *C. capsici* (Kumala *et al.* 2019). Selain itu, senyawa nonatsiri utama dalam *Curcuma* spp. adalah kurkuminoid yang terdiri dari beberapa senyawa turunan polifenol tidak beracun yaitu kurkumin, *bisdesmethoxycurcumin*, *demethoxycurcumin* (Dosoky dan Setzer 2018). Senyawa kurkumin telah dilaporkan peranannya sebagai antimikroba antara lain sebagai anticendawan terhadap patogen tanaman *Phytophthora infestans*, *Puccinia recondita*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, dan *Helminthosporium oryzae* (Zorofchian *et al.* 2014). Namun, penggunaan senyawa nonatsiri *Curcuma* spp. terhadap patogen *C. annuum* masih sangat jarang ditemukan.

Banyak penelitian yang menjelaskan pengaruh ekstrak *Curcuma* dan minyak atsiri untuk pengendalian cendawan patogen. Namun, belum banyak penelitian tentang pemanfaatan senyawa nonatsiri dari *Curcuma* sebagai anticendawan. Penelitian bertujuan untuk mengevaluasi potensi senyawa nonatsiri dari tiga spesies *Curcuma*, yaitu

C. longa, *C. zedoaria*, dan *C. aeruginosa* terhadap penekanan penyakit antraknosa *Colletotrichum capsici* pada buah cabai merah.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan sejak November 2014 sampai Mei 2015 di Laboratorium Mikologi dan Toksikologi Pestisida, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan (HPT), Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Bahan yang digunakan untuk penelitian yaitu buah cabai merah besar, senyawa nonatsiri tiga spesies *Curcuma* yaitu *C. longa sensu* Val, *C. zedoaria* (Berg.) Roscoe dan *C. aeruginosa* Roxb yang diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan dan telah diidentifikasi oleh Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi.

Isolasi cendawan *C. capsici*

Isolat cendawan *C. capsici* berasal dari buah cabai merah yang terinfeksi penyakit antraknosa dari lahan budidaya cabai merah di Desa Junrejo, Batu, Malang. Isolasi *C. capsici* dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan oleh Nugraheni *et al.* (2014) dan Sudirga (2016).

Ekstraksi senyawa nonatsiri dari rimpang

Ekstraksi senyawa nonatsiri pada penelitian ini mengacu pada metode ekstraksi yang dilakukan oleh Mashita (2017) dengan menggunakan pelarut metanol dan dimodifikasi dengan metode Jansirani *et al.* (2014) dan Sahne *et al.* (2016) untuk mendapatkan senyawa nonatsiri yang diharapkan yaitu kurkuminoid. Selanjutnya dilakukan analisa dengan menggunakan alat HPLC di Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Senyawa nonatsiri yang telah diperoleh kemudian disimpan dalam botol kaca gelap.

Analisis kandungan senyawa nonatsiri menggunakan HPLC

Analisis senyawa kimia utama dari ekstrak kental metanol rimpang *Curcuma* dilakukan dengan menggunakan alat *High Performance*

Liquid Chromatography (HPLC) mengacu pada Gugulothu dan Patravale (2012) serta Kumudhavalli MV (2011).

Pengujian aktivitas anticendawan senyawa nonatsiri *Curcuma*

Senyawa nonatsiri dari ekstrak kental metanol rimpang *Curcuma* diencerkan menggunakan pelarut metanol kemudian dimasukkan ke dalam medium PDA sehingga diperoleh konsentrasi akhir 0 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, dan 12 ppm. Selanjutnya, medium PDA yang telah mengandung senyawa nonatsiri dituang ke dalam cawan petri steril. Setiap perlakuan diulang tiga kali.

Koloni berupa potongan miselia dari kultur *C. capsici* yang berumur 14 hari pada media PDA diambil menggunakan *cork borer* kemudian diletakkan di bagian tengah cawan petri yang telah berisi media PDA yang telah diperlakukan dengan senyawa nonatsiri rimpang *Curcuma*. Media PDA tanpa mengandung senyawa nonatsiri digunakan sebagai kontrol. Kultur *C. capsici* diinkubasikan pada suhu 25 °C. Pengamatan diameter pertumbuhan *C. capsici* dilakukan setiap hari hingga koloni cendawan pada cawan petri, perlakuan kontrol penuh.

Pengaruh senyawa nonatsiri terhadap gejala penyakit antraknosa pada buah cabai merah

Buah cabai merah yang sehat disterilkan terlebih dahulu dengan cara dicuci menggunakan sabun, disemprot alkohol 70 % dan direndam di dalam akuades steril. Selanjutnya, buah cabai merah tersebut ditiriskan terlebih dahulu sebelum direndam ke dalam larutan senyawa nonatsiri selama 5 menit sesuai perlakuan. Kemudian, buah cabai merah dikeringanginkan selama 12 jam pada kotak atau wadah terbuka. Buah cabai merah tersebut selanjutnya ditusuk di bagian permukaannya dan ditetesi dengan suspensi konidia inokulum *C. capsici*.

Pengujian secara *in vitro* dan *in vivo* menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RALF) 18 perlakuan dengan masing-masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali, terdiri dari dua faktor. Faktor pertama adalah perlakuan senyawa nonatsiri dari tiga spesies *Curcuma* (*C. longa*, *C. zedoaria*, dan *C. aeruginosa*) dan

faktor kedua yaitu perlakuan konsentrasi senyawa nonatsiri (0 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, dan 12 ppm).

Diameter pertumbuhan koloni *Colletotrichum capsici* secara *in vitro* dan *in vivo*

Daya hambat senyawa nonatsiri terhadap pertumbuhan koloni *C. capsici* terhadap pertumbuhan cendawan *C. capsici* dihitung berdasarkan hasil pengukuran diameter koloni cendawan di cawan petri (*in vitro*) dan diameter panjang gejala penyakit antraknosa yang muncul di buah cabai merah (*in vivo*) dengan rumus :

$$D = \frac{d1 + d2}{2}$$

Keterangan/Note :

- D = diameter koloni cendawan/fungi colony diameter
- d1 = diameter vertikal koloni cendawan dan atau antraknosa yang diamati/vertical diameter of colony and/or observed anthracnose symptoms
- d2 = diameter horizontal koloni cendawan dan atau gejala antraknosa yang diamati/ horizontal diameter of fungi colony and/or observed anthracnose symptoms

Berat kering biomassa miselium *Colletotrichum capsici*

Penimbangan berat kering miselium dilakukan sesuai dengan metode Sulistyani dan Supriyadi (2017) serta Wulansari *et al.* (2017). Pengukuran berat kering (biomassa) miselium cendawan digunakan untuk mengetahui hambatan pertumbuhan cendawan *C. capsici* terhadap senyawa nonatsiri *Curcuma* melalui bobot kering. Formula penghitungan bobot kering (biomassa) sebagai berikut :

$$M = m1 - m0$$

Keterangan/Note :

- M = massa miselium *C. capsici*/mass of *C. capsici* mycelium.
- m0 = bobot kertas saring kosong/weight of empty paper.
- m1 = bobot kertas saring + miselia *C. capsici*/weight of filter paper + *C. capsici* mycelium.

Analisis data

Data yang diperoleh diuji dengan menggunakan uji F taraf 5% dan apabila hasil pengujian sidik ragam diperoleh perlakuan berbeda nyata, maka dilanjutkan dengan Uji Duncan Multiple Range Test 0,05 (Duncan, 1965).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Komponen senyawa nonatsiri

Senyawa nonatsiri, khususnya kurkuminoid, yang terdeteksi di dalam ekstrak metanol rimpang *C. longa*, *C. zedoaria* dan *C. aeruginosa* adalah kurkumin dan desmethoxycurcumin (Tabel 1). Kandungan senyawa desmethoxycurcumin di dalam ketiga jenis rimpang, lebih tinggi dibandingkan dengan kurkumin. Namun, kadar senyawa kurkumin dan desmethoxycurcumin tertinggi diperoleh dari ekstrak *C. longa*, yaitu masing-masing 13,79 ppm dan 67,16 ppm. Kedua senyawa tersebut dapat dipastikan bukan sebagai senyawa atsiri berdasarkan perbedaan dalam metode ekstraksinya. Senyawa atsiri (minyak atsiri) dari bahan yang sama pernah dilakukan oleh Kumala *et al.* (2019) melalui metode penyulingan. Sementara itu, senyawa nonatsiri kurkuminoid didapatkan berdasarkan metode Jansirani *et al.* (2014) dan Jume *et al.* (2016) yang dimodifikasi. Kedua senyawa nonatsiri ini sering dimanfaatkan dalam bidang farmakologi sebagai antioksidan, antiinflamasi, antibakteri dan antikarsinogenik (Rahd *et al.* 2018) serta anticendawan (Diastuti *et al.* 2019). Kandungan kurkumin ketiga spesies *Curcuma* lebih rendah dibandingkan kandungan desmethoxycurcumin. Semakin lama waktu ekstraksi maka kadar kurkumin semakin kecil karena kurkumin hanya dapat terekstrak pada tahap awal ekstraksi sehingga selanjutnya yang muncul adalah senyawa lain (Sembiring *et al.* 2006). Oleh karena itu, perlu diuji lebih lanjut pengaruh lamanya proses distilasi senyawa nonatsiri kurang dari 5 jam, seperti yang dilakukan pada percobaan ini.

Tabel 1. Kandungan kurkuminoid pada tiga spesies *Curcuma* berdasarkan hasil analisis HPLC.
Table 1. Content of curcuminoids on three *Curcuma* species based on HPLC analysis.

<i>Curcuma</i>	Kandungan (ppm)	
	Kurkumin	Desmethoxycurcumin
<i>C. longa</i>	13,79	67,16
<i>C. zedoaria</i>	0,61	13,62
<i>C. aeruginosa</i>	0,20	32,22

Diameter pertumbuhan cendawan *C. capsici* secara *in vitro*

Penghambatan pertumbuhan cendawan *C. capsici* dapat dilihat dari dua keadaan, yaitu diameter pertumbuhan yang menandakan cendawan tidak mampu tumbuh dan ketebalan koloni yang berhubungan dengan kemampuan bersporulasi. Hasil analisis menunjukkan terdapat interaksi yang nyata antara perlakuan jenis senyawa nonatsiri dari tiga spesies *Curcuma* dengan konsentrasi bahan terhadap diameter pertumbuhan *C. capsici* (Tabel 2). Demikian juga masing-masing perlakuan menunjukkan pengaruh yang nyata. Hasil terbaik yang didapatkan adalah kombinasi senyawa nonatsiri *C. zedoaria* pada konsentrasi 10 ppm meskipun tidak berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 12 ppm. Semakin tinggi konsentrasi yang diberikan, ada kecenderungan diameter pertumbuhan yang semakin kecil. Hasil penelitian tersebut selaras dengan hasil penelitian Ciqiong *et al.* (2018) bahwa ekstrak alkohol *Curcuma* dapat menekan pertumbuhan cendawan patogen, seperti *Alternaria alternate*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. higginsianum*, *Fusarium chlamydosporum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, dan *Rhizopus oryzae*. Penghambatan pertumbuhan cendawan *C. capsici* dapat disebabkan oleh metabolit sekunder yang terkandung di dalam senyawa nonatsiri *Curcuma*. Penelitian Yoon *et al.* (2013) menunjukkan bahwa tiga jenis kurkuminoid, yaitu kurkumin, desmethoxycurcumin, dan bisdemethoxycurcumin yang diperoleh dari ekstrak metanol rimpang *C. longa* bersifat sebagai anticendawan. Di antara ketiga jenis kurkuminoid tersebut, desmethoxycurcumin merupakan senyawa yang paling aktif dalam mengendalikan penyakit blast pada padi dan layu pada tomat. Selain itu, kurkuminoid terutama jenis bisdemethoxycurcumin, dapat menghambat pertumbuhan spora *Colletotrichum cocodes*. Desmethoxycurcumin merupakan kurkuminoid yang paling efektif dalam menekan antraknosa pada bawang merah yang disebabkan oleh *C. cocodes* (Yoon *et al.* 2013).

Cendawan *C. capsici* pada medium PDA yang diberi perlakuan jenis dan konsentrasi senyawa nonatsiri tiga spesies *Curcuma* menunjukkan diameter pertumbuhan yang lebih lambat dibandingkan kontrol (Gambar 1). Secara

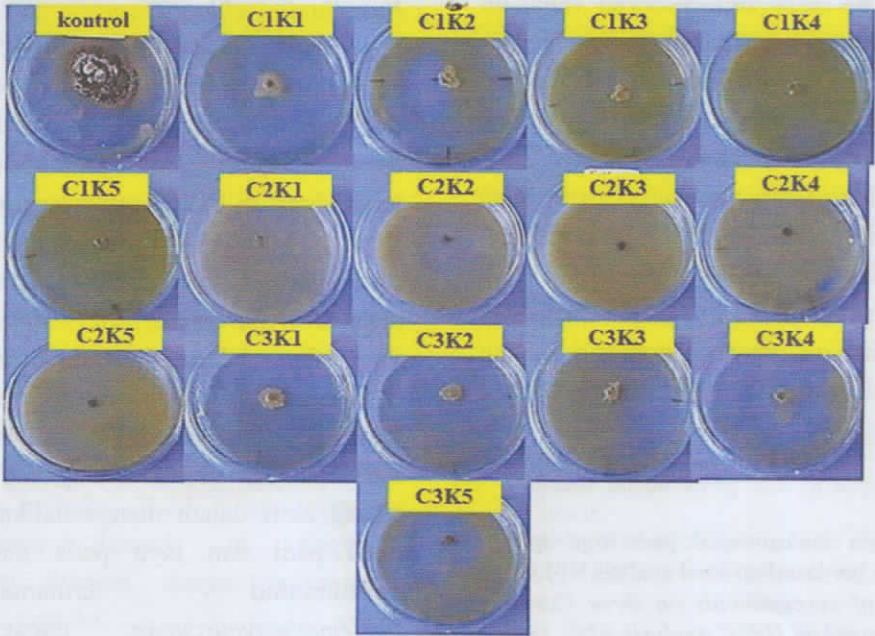
visual, pengaruh perlakuan tidak berbeda satu sama lainnya, sehingga senyawa nonatsiri dari ketiga spesies *Curcuma* tersebut mempunyai aktivitas anticendawan dan berpotensi untuk dikembangkan sebagai fungisida nabati.

Tabel 2. Rata-rata diameter pertumbuhan koloni cendawan *Colletotrichum capsici* pada interaksi senyawa nonatsiri tiga spesies rimpang *Curcuma* dengan berbagai konsentrasi pada uji *in vitro* metode peracunan makanan 14 hari setelah inokulasi.

Table 2. Colony diameter average of *Colletotrichum capsici* due to the interaction of nonessential compound three *Curcuma* species with various concentration by *in vitro* test of poisoning food at the 14th day after inoculation.

Konsentrasi (ppm)	Diameter pertumbuhan cendawan (cm)			Rata-rata
	<i>C. longa</i>	<i>C. zedoaria</i>	<i>C. aeruginosa</i>	
0 (kontrol)	2,13 e	2,90 f	2,13 e	2,39
4	1,90 cde	0,70 a	1,90 cde	1,50
6	1,98 de	0,62 a	1,77 cde	1,46
8	1,40 bc	0,55 a	1,45 bcd	1,13
10	0,78 a	0,50 a	0,97 ab	0,75
12	0,58 a	0,57 a	0,58 a	0,58
Rata-rata	1,46	0,97	1,47	(+)
KK/CV (%)	23			

Keterangan/Note :
Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata pada uji Duncan 0,05/Numbers followed by the same letters were not significantly different at DMRT 0.05
Tanda (+) berarti ada interaksi nyata perlakuan dari kedua factor/(+) indicated significant interaction between two factors.



Keterangan/Note :
C1= *C. longa* ; C2= *C. zedoaria* ; C3= *C. aeruginosa*
Kontrol/Control = 0 ppm ; K1= 4 ppm ; K2= 6 ppm ; K3= 8 ppm ; K4= 10 ppm ; K5= 12 ppm

Gambar 1. Pertumbuhan cendawan *Colletotrichum capsici* pada medium PDA yang mengandung senyawa nonatsiri pada 14 hari setelah inokulasi.

Figure 1. Growth of *Colletotrichum capsici* fungi on the PDA media contained nonessential oil compound at the 14 day after inoculation.

Gejala penyakit antraknosa pada buah cabai merah

Hasil analisis menunjukkan terdapat interaksi yang nyata dari kedua perlakuan terhadap rata-rata panjang gejala antraknosa (*C. capsici*) pada buah cabai merah (Tabel 3). Konsentrasi bahan 4-12 ppm dari ketiga spesies rimpang *Curcuma* menunjukkan keefektifan yang berbeda-beda dengan perlakuan konsentrasi 0 ppm (kontrol). Daya anticendawan dari *C. longa* yang diuji selaras dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Gupta *et al.* (2017), bahwa ekstrak *C. zedoaria* mampu menghambat pertumbuhan miselium *Fusarium oxysporum*. Mekanisme anticendawan dari ketiga spesies rimpang yang diuji diduga berkaitan dengan gangguan sintesis protein dan enzim pada cendawan (Ciqiong *et al.* 2018) atau fungsi kerja membran dan organel sel, serta mitokondria (Freiesleben dan Jager 2014). Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengetahui pengaruh tidak langsung dari senyawa nonatsiri dari ketiga spesies rimpang *Curcuma* terhadap peningkatan ketahanan tanaman. Alsahli *et al.* (2015) menyatakan bahwa ekstrak *C. longa* mampu menginduksi ketahanan tanaman bunga matahari terhadap *Fusarium solani*, sedangkan ekstrak *C. xanthorrhiza* dapat menginduksi ketahanan tanaman jahe terhadap serangan

Ralstonia solanacearum (Hartati 2015).

Bobot kering miselium

Kombinasi perlakuan senyawa nonatsiri tiga spesies *Curcuma* dengan enam konsentrasi yang diujikan menunjukkan interaksi yang nyata pada parameter bobot kering miselium (Tabel 4). Kombinasi perlakuan senyawa nonatsiri *C. zedoaria* pada konsentrasi 4-12 ppm merupakan kombinasi perlakuan terbaik yang menghasilkan bobot kering miselium 0 mg. Kurkuminoid yang terkandung dalam ekstrak kental metanol tiga spesies rimpang *Curcuma* tersebut tergolong dalam senyawa flavonoid. Senyawa tersebut diketahui mampu menghambat proses pembentukan dinding sel cendawan, mendenaturasi protein dan menyebabkan kerusakan membran sel yang dapat meningkatkan permeabilitas sel sehingga mengakibatkan kerusakan sel cendawan. Denaturasi protein menyebabkan enzim tidak dapat bekerja optimal sehingga mengganggu metabolisme dan proses penyerapan nutrisi oleh cendawan (Diana *et al.* 2014).

Hasil penelitian mengindikasikan bahwa senyawa nonatsiri ekstrak metanol rimpang dari *C. longa*, *C. zedoaria*, dan *C. aeruginosa* berpotensi untuk dikembangkan sebagai fungisida nabati untuk mengendalikan *C. capsici* penyebab penyakit antraknosa pada buah cabai.

Tabel 3. Penekanan perkembangan gejala penyakit antraknosa pada buah cabai besar pada interaksi perlakuan senyawa nonatsiri tiga spesies rimpang *Curcuma* dengan berbagai konsentrasi pada 14 hari setelah inokulasi.
Table 3. Suppression of anthracnose symptoms development on red chilli due to the interaction of nonessential compound of three species of *Curcuma* rhizome with various concentration at the 14th day after inoculation.

Konsentrasi (ppm)	Panjang gejala antraknosa (cm)			Rata-rata
	<i>C. longa</i>	<i>C. zedoaria</i>	<i>C. aeruginosa</i>	
0 (kontrol)	1,44 g	1,10 f	0,80 de	1,11
4	0,67 cde	0,88 e	0,78 de	0,78
6	0,85 e	0,00 a	0,54 bc	0,46
8	0,60 bcd	0,00 a	0,51 bc	0,37
10	0,45 b	0,00 a	0,49 bc	0,31
12	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00
Rata-rata	0,67	0,33	0,52	(+)
KK/CV (%)	22			

Keterangan/Note :
Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata pada uji Duncan 0,05/Numbers followed by the same letters were not significantly different at DMRT 0.05.
Tanda (+) berarti ada interaksi nyata perlakuan dari kedua factor/(+) indicated significant interaction between two factors.

Tabel 4. Bobot kering miselium cendawan *Colletotrichum capsici* pada medium PDA yang mengandung senyawa nonatsiri tiga spesies rimpang *Curcuma* dengan berbagai konsentrasi pada 14 hari setelah inokulasi.
 Table 4. Dry weight of *Colletotrichum capsici* mycelium in PDA media contained non essential compound of three species of *Curcuma* rhizome with various concentration at the 14th day after inoculation.

Konsentrasi (ppm)	Berat kering miselium (mg)			Rata-rata
	<i>C. longa</i>	<i>C. zedoaria</i>	<i>C. aeruginosa</i>	
0 (kontrol)	388,10 g	364,23 f	397,97 g	383,43
4	80,53 bc	0,00 a	69,00 b	49,84
6	95,46 cd	0,00 a	105,57 d	67,01
8	143,30 e	0,00 a	112,23 d	85,17
10	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00
12	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00
Rata-rata	117,90	60,71	114,13	(+)
KK/CV (%)	12			

Keterangan/Note :

Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata pada uji Duncan 0,05/Numbers followed by the same letter were not significantly different at DMRT 0.05.

Tanda (+) berarti ada interaksi nyata perlakuan dari kedua factor/(+) indicated significant interaction between two factors.

KESIMPULAN

Senyawa nonatsiri yang berasal dari ekstrak metanol rimpang *C. longa*, *C. zedoaria* dan *C. aeruginosa* mampu menghambat pertumbuhan dan perkembangan *C. capsici* baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Senyawa nonatsiri dari ekstrak metanol rimpang *C. zedoaria* paling efektif menekan pertumbuhan *C. capsici* baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Kurkumin dan desmethoxycurcumin merupakan senyawa utama nonatsiri yang terkandung di dalam rimpang *C. longa*, *C. zedoaria* dan *C. aeruginosa*. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui keefektifan senyawa nonatsiri dari tiga spesies *Curcuma* yang diuji terhadap *C. capsici* pada percobaan skala lapangan, serta mempelajari mekanisme penghambatannya.

KONTRIBUSI PENULIS

Anella Retna Kumala Sari merupakan kontributor utama yang merancang penelitian, pelaksanaan kegiatan penelitian, pengumpulan data, analisis data, dan penyusunan artikel ilmiah. Firdaus Auliya Rahmah merupakan kontributor anggota yang membantu dalam pelaksanaan kegiatan penelitian. Syamsuddin Djauhari merupakan kontributor anggota dan pembimbing dalam pelaksanaan kegiatan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Alsahli, A.A., Alaraidh, I.A., Rashad, Y.M., & Razik, E.S.A. (2015). Extract from *Curcuma longa* L. Triggers The Sunflower Immune System and Induces Defence-Related Genes Against *Fusarium* Root Rot. *Phytopathologia mediterranea*. 54 (2), 241-252. doi:10.14601/Phytopathol.
- Ciqiong, C., Li, L., Fusheng, Z., Qin, C., Cheng, C., Xiaorui, Y., Qingya, L., Jinku, B., Zhangfu, L. (2018). Antifungal Activity, Main Active Components and Mechanism of *Curcuma longa* Extract Against *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE*. 13 (3), 1-19. doi:10.1371/journal.pone.0194284.
- Diana, N., Khotimah, S., & Mukarlina (2014). Penghambatan Pertumbuhan Jamur *Fusarium oxysporum* Schlecht Pada Batang Padi (*Oryza sativa* L.) Menggunakan Ekstrak Metanol Umbi Bawang Mekah (*Eleutherine palmifolia* Merr.). *Protobiont*. 3 (2), 225-231.
- Diastuti, H., Asnani, A. & Chasani, M. (2019). Antifungal Activity of *Curcuma xanthorrhiza* and *Curcuma soloensis* Extracts and Fractions. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 509 (1). doi:10.1088/1757-899X/509/1/012047.
- Dosoky, N.S. & Setzer, W.N. (2018). Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of *Curcuma* Species. *Nutrients*. 10 (9), 10-17. doi:10.3390/nu10091196.

- Samra, F.D., Mossini, S.A., Dias Ferreira, F.M., Amoreira, C.C., Da Costa, C.L., Nakamura, C.V., & Machinski, M.Jr. (2013). The Inhibitory Effects of *Curcuma longa* L. Essential Oil and Curcumin on *Aspergillus* Root Link Growth and Morphology. *The Scientific World Journal*. 2013 (December). doi:10.1155/2013/343804.
- Sandhu, S.H. & Anna, K.J. (2014). Correlation Between Plant Secondary Metabolites and Their Antifungal Mechanisms. A Review. *Medicinal & Aromatic Plants*. 03 (02). doi:10.4172/2167-0412.1000154.
- Singh, D.B. & V.B. Patravale. (2012). A New Stability-Indicating HPLC Method for Simultaneous Determination of Curcumin and Celecoxib at Single Wavelength: an Application to Nanoparticulate Formulation. *Pharmaceutica Analytica Acta*. 03 (04), 4-9. doi:10.4172/2153-2435.1000157.
- Singh, A.K., Chaudhary, S., Samuel, C.O. & Upadhyaya, P.P. (2017). Study of Antifungal Efficiency of *Curcuma zedoaria* (christm.) Roscoe Against *Fusarium oxysporum* F. Sp. Uthm. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6 (1), 95-98. doi:10.20546/ijcmas.2017.601.012.
- Sul, S., Artanti, A.N., Rinanto, Y. & Wahyuni, D.S.C. (2018). Curcuminoid Content of *Curcuma longa* L. and *Curcuma xanthorrhiza* Rhizome Based on Drying Method with NMR and HPLC-UV. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 349 (1). doi:10.1088/1757-899X/349/1/012058.
- Susanto, S.Y. (2015). Tanaman Akar Kucing, Sembiloto dan Temulawak Sebagai Elisitor Penginduksi Ketahanan Tanaman Jahe Terhadap Penyakit Layu Bakteri. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat*. 23 (2). 161-168. doi:10.21082/bullittro.v23n2.2012.
- Ministerial Perdagangan. (2016). Profil Komoditas Barang Kebutuhan Pokok dan Barang Penting Komoditas Cabai. Cetakan 2016. Kementerian Perdagangan.
- Sudhantoro, D.Y.P. (2018). Pemanfaatan Kandungan Metabolit Sekunder pada Tanaman Kunyit dalam Mendukung Peningkatan Pendapatan Masyarakat. *Kultivasi*. 17 (1), 544-549.
- Juliantika, A.P.K., Munir, M. & Suryaningtyas, H. (2016). Studi Pemanfaatan Ekstrak Kunyit (*Curcuma domestica* Valetton) untuk Pengendalian Penyakit Jamur Akar Putih pada Tanaman Karet. *Warta Per karetan*. 35 (1). doi:10.22302/wp.v35i1.85.
- Masih, H., Peter, J.K., & Tripathi, P. (2014). A Comparative Evaluation of Antifungal Activity of Medicinal Plant Extracts and Chemical Fungicides Against Four Plant Pathogens. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*. 3 (5), 97-109.
- Kumudhavalli, MV., Saravanan, C., Thamizh, M.M. & Jayakar, B. (2011). Analytical Method Development and Validation of Curcumin in Tablet Dosage form by RP-HPLC Method. Page 233-236 IRJP 2 (1) Jan 2011. *International Research Journal of Pharmacy*. 2 (1), 233-236.
- Nugraheni, A.S., Syamsuddin, D., Choliq, F.A. & Utomo, E.P. (2014). Potensi Minyak Atsiri Serai Wangi (*Cymbopogon winterianus*) sebagai Fungisida Nabati terhadap Penyakit Antraknosa (*Colletotrichum gloeosporioides*) pada Buah Apel (*Malus sylvestris* Mill). *Hpt*. 2 (4), 42-50.
- Retno, A.M. (2017). Efek Antimikroba Ekstrak Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Saintika Medika*. 10 (2), 138. doi:10.22219/sm.v10i2.4184.
- Kumala, A.R.S., Rahmah, F.A., Syamsuddin, D. & Trisnawati, N.W. (2019). Potensi Minyak Atsiri *Curcuma longa*, *C.zedoaria* dan *C.aeruginosa* terhadap Penekanan Penyakit Antraknosa pada Cabai Merah Besar. *Buletin Informasi dan Teknologi Pertanian*. 3, 146-154.
- Sembiring, B.B., Ma'mun & Ginting, E.I. (2006). Pengaruh Kehalusan Bahan dan Lama Ekstraksi terhadap Mutu Ekstrak Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* roxb). *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat*. 17 (2), 53-58. doi:10.21082/bullittro.v17n2.2006.
- Stangarlin, J.R., Kuhn, O.J., Assi, L., & Schwan-Estrada, K.R.F. (2011). Control of Plant Diseases Using Extracts from Medicinal Plants and Fungi. *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. (1), 1033-1042.

- Sudirga, S.K. (2016). Isolasi dan Identifikasi Jamur *Colletotrichum* spp. Isolat PCS Penyebab Penyakit Antraknosa pada Buah Cabai Besar (*Capsicum annuum* L.) di Bali. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*. 3 (1), 23-30. doi:10.24843/METAMORFOSA.2016.v03.i01.p04.
- Suhartono (2014). Dampak Pestisida terhadap Kesehatan. In: *Prosiding Seminar Nasional Pertanian Organik*. pp. 15-23.
- Sulistyaningtyas, A.R. & Supriyadi, A. (2017). Produksi Miselium Jamur Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*) dalam Medium Air Kelapa Tua dan Tauge Extract Broth dengan Metode Kultur Terendam Teragitasi. *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*. 19 (1), 58. doi:10.14710/bioma.19.1.58-61.
- Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian (2015). Komoditas Pertanian Subsektor Hortikultura Cabai. *Kementerian Pertanian*.
- Syahri, R.U.S. (2017). Studi Dampak Aplikasi Pestisida terhadap Residu yang ditimbulkannya pada Sayuran di Sumatera Selatan. In: *Prosiding Seminar Nasional Lahan Suboptimal 2017*. pp. 978-979.
- Wulansari, N.K., Prihatiningsih, N., & Djatmiko, H.A. (2017). Mekanisme Lima Isolat *Bacillus subtilis* Terhadap *Colletotrichum capsici* dan *C. gloiosporoides* In Vitro. *Jurnal Agrin*. 21 (2), 1410-1439.
- Yendi, T.P., Efri & Prasetyo, J. (2015). Pengaruh Ekstrak Beberapa Tanaman Famili *Zingiberaceae* terhadap Penyakit Antraknosa pada Buah Pisang. *Jurnal Agrotek Tropika*. 3 (2), 231-235.
- Yoon, M.Y., Cha, B. & Kim, J.C. (2013). Recent Trends in Studies on Botanical Fungicides in Agriculture. *Plant Pathology Journal*. 29 (1), 1-9. doi:10.5423/PPJ.RW.05.2012.0072.
- Zorofchian, S.M., Kadir, H.A., Hassandarvish, P., Tajik, H., Abubakar, S. & Zandi, K. (2014). A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin. *BioMed Research International*. 2014 (April). doi:10.1155/2014/186864.

IN VITRO ACTIVITY OF PARIJOTO FRUIT EXTRACT (*Medinilla speciosa* B.) FOR REDUCING BLOOD GLUCOSE

Aktivitas In Vitro Penurun Gula Darah dari Ekstrak Buah Parijoto (Medinilla speciosa B.)

Rissa Laila Vifta^{1*)}, Wilantika¹⁾, dan Yustisia Dian Advistasari²⁾

¹⁾ Universitas Ngudi Waluyo

Jalan Diponegoro No. 186, Ungaran Timur, 50519

²⁾ STIFAR “Yayasan Pharmasi” Semarang

Jalan Sarwo Edie Wibowo, Plamongansari, 50199

INFO ARTIKEL

Received:

Revised: 01 April 2019

Accepted: 19 Juli 2019

Published: 30 April 2020

Keywords:

Keywords: hyperglycemia;

ethanol fraction; Nelson-

Somogyi

Keywords:

Keywords: hiperglikemia;

fraksi etanol; Nelson-

Somogyi

ABSTRACT/ABSTRAK

Diabetes mellitus is one of the highest causes of death in the world, with symptoms of increased blood glucose levels (hyperglycemia). One of the efforts made as a treatment and prevention of DM is through complementary therapy using natural ingredients. Parijoto fruit (*Medinilla speciosa*) contains flavonoid compounds potential to reduce glucose levels. The study aimed to analyze the effectiveness of ethanol extracts and its fractions of parijoto fruit (EEBP) to decrease glucose levels in vitro. The study was conducted at the Ngudi Waluyo University Laboratory in April to August 2018. Identification and screening of flavonoid compounds from ethanol extracts and its fractions of parijoto fruit were performed qualitatively and by thin-layer chromatography (TLC). *In vitro* testing for antidiabetic activity of EEBP was performed with non-enzymatic reaction by Nelson Somogyi method (ethanol extract and its fractions). Experiment was arranged in a randomized block design, with 12 treatments and three replications. The concentrations of parijoto fruit tested were 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, and 60 ppm. The results of qualitative identification and TLC showed that the ethanol extract and its fraction of EEBP contained flavonoid compounds. At a concentration of 30 ppm, EEBP was able to reduce glucose levels by 42.43 %, while the ethanol fraction decreased glucose levels by 83.38 %. The results showed parijoto fruit ethanol extract and its fractions were sources of antidiabetic. Hence its pharmacologically effect was necessary to be further studied.

Penyakit diabetes melitus (DM) merupakan salah satu penyebab kematian tertinggi di dunia dengan gejala peningkatan kadar glukosa (hiperglikemia) dalam darah. Salah satu upaya yang dilakukan sebagai pengobatan dan pencegahan DM adalah melalui terapi komplementer menggunakan bahan alam. Buah parijoto (*Medinilla speciosa*) mengandung senyawa flavonoid yang berpotensi dalam menurunkan kadar glukosa. Tujuan penelitian adalah menganalisis keefektifan ekstrak dan fraksi etanol buah parijoto (EEBP) terhadap penurunan kadar glukosa secara in vitro. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Universitas Ngudi Waluyo sejak April sampai Agustus 2018. Identifikasi dan skrining senyawa flavonoid dari ekstrak dan fraksi etanol buah parijoto dilakukan secara kualitatif dan kromatografi lapis tipis (KLT). Aktivitas antidiabetes EEBP diuji secara in

*Korespondensi : rissa_laila@yahoo.co.id

DOI: <https://doi.org/10.21082/bullitro.v31n1.2020.31-39>

© 2017 Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat

This is an open access article under the CC BY-NC-SA license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>)

Registrasi Kemenristekdikti Number : 30/E/KPT/2018

vitro dengan metode non-enzimatis Nelson-Somogyi (ekstraksi dan fraksi etanol) menggunakan rancangan acak kelompok, 12 perlakuan dengan tiga ulangan. Konsentrasi buah parijoto yang diuji adalah 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, dan 60 ppm. Hasil identifikasi kualitatif dan KL7 menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi etanol EEBP mengandung senyawa flavonoid. Pada konsentrasi 30 ppm, EEBP mampu menurunkan kadar glukosa sebesar 42,43 %, sedangkan fraksi etanolnya menurunkan kadar glukosa 83,38 %. Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi etanol buah parijoto berpotensi sebagai sumber antidiabetes, namun perlu diteliti lebih lanjut secara farmakologis.

INTRODUCTION

Diabetes (DM) is a long-term dysfunction in the body's organs, especially concerning the function of the kidneys, eyes, nerves, heart, and blood vessels (American Diabetes Association 2014). The epidemiological studies showed that the main factor causing DM was increasing blood glucose levels or hyperglycemia (Jakus & Rietbrock 2004; Prashanto K. Das *et al.* 2011). The prevalence of DM tends to increase every year in both productive and non-productive ages (Shaw *et al.* 2010). In 2018, the prevalence of DM sufferers between the ages of 35-44 years was 1.1 %, 45-54 years was 3.9 %, and it increased by 6.4 % at the age of 55-64 years (RISKESDAS 2018). The effort to prevent DM is by reducing the prevalence rate. Early prevention can be done by always maintaining the consistency of the pattern and quality of food. The use of oral drugs does not always have a positive impact on DM treatment. Oral medication use often has side effects that lead to other symptoms causing complications (Fadillah 2014; Fatimah 2015).

The use of natural ingredients as traditional medicine is one alternative treatment for DM. Phenolic and flavonoid compound content in most natural ingredients has the potential as antidiabetic by decreasing glucose index (Rao *et al.* 2010). Plant belongs to *Medinilla* genus, which reported to have secondary metabolite compounds as antidiabetic, is *Medinilla speciosa* B, known as parijoto fruit. Parijoto fruit harvested at one-month-old has the highest content of phenolic compounds and antioxidant activity compared to two and three months old (Ameliawati 2018). Moreover, the methanol extract of parijoto fruit

reported to contains flavonoid compounds (Tussanti dan Johan 2014); (Sa'Adah *et al.* 2018). Flavonoid compounds can reduce glucose levels *in vitro* by binding the -OH group to glucose. The remaining glucose that did not bind the -OH groups can be observed spectrophotometrically visible by the Nelson-Somogyi method (Somogyi 1951; Razak *et al.* 2012).

The activity of active compounds of a natural substance could increase through the fractionation process based on the compounds nature. Fractionation aims at extracting the desired compound, eliminating other compounds that interfere with, and concentrating the content of compound. Several studies have shown that the fractionation process can improve the functional specifications of a secondary metabolite compound in natural substances (Sasidharan *et al.* 2011). The purpose of this study was to analyze the effectiveness of ethanol extracts and its fractions of parijoto fruit to decrease glucose levels *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted from April to August 2018 at the Phytochemical Laboratory for the extraction and fractionation of parijoto fruit. The reduction of glucose levels *in vitro* analyzed with a non-enzymatic method using the Nelson-Somogyi procedure at the Instrument Laboratory of Ngudi Waluyo University. The experiment arranged in a randomized block design (RBD), 12 treatments, and three replications. The treatments tested were six concentrations (10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, and 60 ppm) of both ethanolic extract and its fraction of parijoto fruits.

Parijoto Fruit

Parijoto fruit (*Medinilla speciosa* B.) having purplish color and sour taste collected from farmer at Colo Village, Dawe District, Kudus Regency, Central Java. Three kilograms of the fruit were cleaned from dirt and debris, washed with running water, and then air-dried. The fruits were then chopped to quicken the drying process. The dried fruit was ground and sieved using a 60 mesh sieve to obtain a homogeneous powder.

Extraction and fractionation

Extraction was performed using the maceration method with 96% technical grade ethanol as solvent (Azwanida 2015). The dried pieces of parijoto fruits were macerated with ethanol (1:10) for two days and remacerated for 24 hours using the same method. The resulting extract was then evaporated with a rotary evaporator (RE 100Plus) to produce the viscous extract. The resulting viscous extract was assumed to contain secondary polar, semi-polar and non-polar metabolites.

The parijoto fruit ethanol extract (10 g extract) was fractionated using liquid-liquid fractionation. The first stage of the fractionation process used n-hexane solvent, followed by ethyl acetate, and the last was by ethanol 96 % (1:10). The ethanol phase was taken and evaporated with a rotary evaporator until a viscous phase was obtained. The fraction was the result of the extract partitioned with polar solvents (ethanol) to get polar compounds.

Qualitative screening and identification of flavonoids

Qualitative identification of active compounds was analyzed by thin-layer chromatography (TLC) to screen the phytochemical characteristics of secondary metabolites such as flavonoid, saponins, tannins, and alkaloids following (Sheela 2011) method. Flavonoid identification used the mobile phase of chloroform, acetic acid, and distilled water (3: 1: 1) and the stationary phase of silica gel GF₂₅₄. The TLC test was initiated with the saturation of the

mobile phase in the vessel or chamber to obtain atmospheric homogeneity to minimize the evaporation of solvents from the TLC plate (stationary phase) during development. It aimed to separate the spot entirely (Gwatidzo *et al.* 2018; Bhawani *et al.* 2010). The TLC process was continued by spotting the ethanol extract of the parijoto fruit onto a silica plate and developed in a vessel that contained a mobile phase. The spot appearance to confirm the presence of flavonoid compound was examined using ammonia vapor to provide alkaline condition (Mu'awwanah & Ulfah 2015).

In vitro glucose reduction test

The effect of ethanol extract and fractionation of the parijoto fruit in reducing glucose levels in vitro was examined following Nelson-Somogyi method (Somogyi 1951) using D-glucose. The principle of the Nelson-Somogyi's operation was that the flavonoid compounds in the extract and ethanol fraction of the parijoto fruit would bind glucose and form a flavonoid-glucose complex bond. In contrast, the remaining glucose, which is not bound by flavonoids, will be reduced and bound by arsenic-molybdate compounds in the Nelson-Somogyi solution. Thus, a UV-Vis spectrophotometer can read the colored mixture. The smaller the remaining glucose that was not bound by flavonoids, the higher the ability of these compounds to reduce glucose levels.

The first step in the glucose reduction testing was determining the maximum wavelength in the range of 700-780 nm and proceed with determining operating time. The research was arranged in a complete randomized block designed, repeated three times. The parijoto fruit ethanol extract and its fractions were formulated with a series of concentrations of 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, and 60 ppm. A standard glucose solution of 80 ppm was added to the series ethanol extract concentration and its fraction of parijoto fruit. Thereafter, Nelson reagent and arsenic-molybdate were added to form a complex colored solution. Data analysis used the following equation :

$$\text{Percentage of glucose reduction} = \frac{\text{Initial level} - \text{Final level}}{\text{early content}}$$

Note/Keterangan :

Initial level/level awal = standard glucose level/level glukosa standar.

Final levels/level akhir = levels after addition of ethanol extracts and its fractions of the parijoto fruit/level glukosa setelah penambahan ekstrak dan fraksi etanol buah parijoto.

Data analysis

The data were analyzed using analysis of variant and tested further with Tukey (HSD) at 5% if there were significant differences.

RESULTS AND DISCUSSION

Parijoto fruit extraction and fractionation

The yield of parijoto ethanol extract was 8.66%. This yield was higher than the results of maceration using methanol conducted by (Sa'adah *et al.* 2017; Sa'adah *et al.* 2018). It was likely due to the 96% ethanol solvent being able to attract more active compounds present in the extract of the parijoto fruit. (Arifianti *et al.* 2014) suggested the ideal solvent in the maceration process was alcohol or a mixture of lye and water. The ethanol-water mixture ratio of 7: 3 was more suitable for the extraction of roots, stems, or wood plant materials. However, the alkaline-water mixture (1: 1) was more appropriate for removing chlorophyll, resin, and polymer. The yield of the parijoto fruit extract fraction was 42.91 %. Fractionation with ethanol solvents was expected to increase the flavonoid content.

Qualitative screening and identification of flavonoids

Phytochemical screening results of fruit extract and ethanol fraction of parijoto fruit showed the presence of flavonoid, saponins, tannins, and alkaloids (Table 1). Based on the results of the analysis using the Wilstater method, the flavonoid compounds in the sample were identified as orange after the addition of Mg and HCl powders. It occurred because Mg and HCl powders reduced the benzopiron nucleus contained in the flavonoid structure, resulted in color change

Table 1. The result of phytochemical-qualitative screening of ethanol extract and its fraction of parijoto fruit.

Tabel 1. Hasil skrining fitokimia ekstrak dan fraksi etanol buah parijoto secara kualitatif.

Active compound	Identification method	Result	
		Ethanol extract	Ethanol fraction
Flavonoid	Wilstater Cyanidin test	+	+
Saponin	Forth test	+	+
Tannin	Ferric chloride test	+	+
Alkaloid	Dragendroff's reagent	+	+

Note/Keterangan :

+ (positive reaction/reaksi positif).

into orange (Sheela 2011). These results confirmed the flavonoid presence in the ethanol extract and its fraction of parijoto fruits.

The presence of flavonoids in the ethanol extract and its fraction of parijoto fruit was further confirmed by TLC analysis (Table 2). The TLC separation on the ethanol extract and fraction showed the presence of brown spots when exposed to UV254, indicated the presence of flavonoid. After being evaporated with ammonia, the flavonoid compounds appear to be a greenish yellow color, as reported by (Mu'awwanah & Ulfah 2015). Gwatidzo *et al.* (2018), also affirmed that the presence of flavonoids in natural material samples was marked in yellow, blue, or green, and gave a more intense yellow color after the ammonia vaporization. These results indicated that the ethanol extract and its fraction of parijoto fruit contained flavonoid compounds potential to reduce glucose levels.

In vitro glucose reduction test

Testing of glucose reducing activity of ethanol extract and its fraction of parijoto fruit based on the Nelson-Somogyi method showed positive results, as indicated by the formation of gluconic acid compounds (Figures 1 and 2). The advantages of using the Nelson-Somogyi method to measure the glucose level were its selectiveness and control easiness during measurement (Razali *et al.* 2012). Gluconic acid formation indicated

glucose content reduction. The Nelson reagent (mixture of Nelson A and B containing copper) was used with glucose to produce gluconic acid and cuprous oxide (Cu_2O), characterized by the presence of a red-orange precipitate (Figure 1). The formed cuprous oxide was then reacted with arsenic-molybdate to form a copper (II) compound and a phosphomolybdate-molybdenum complex (Figure 2). The intensity of the color produced was proportional to the amount of glucose contained in the sample. Subsequently, the samples could be measured using a UV-Vis spectrophotometer at a wavelength region of 400-800 nm (Al-Kayyis & Al-Kayyis, 2014).

The treatment of ethanol extracts of *Curatella* that decreased glucose levels $42.43 \pm 0.04\%$ at 30 ppm (Table 3). However, its ethanol extract reduced more glucose $83.38 \pm 0.42\%$ than

the ethanol extract, because the fraction has different polar nature (Table 3). Therefore, the flavonoid compounds in the fraction were more active in lowering glucose. The solvents in the fractionation process can increase the distribution of the separation of phenolic compounds and natural flavonoids (Irawaty *et al.* 2014; Wijaya *et al.* 2017).

Flavonoid compounds contained in ethanol extracts and its fractions of parijoto fruit were proven to reduce glucose levels. In vitro experiment showed flavonoid compounds could bind the -OH group to glucose hence decreasing glucose levels (Razak *et al.* 2012; Al-Kayyis & Susanti 2016). Flavonoid possessed a free -OH (hydroxy) group that might be bound to glucose to form a glucose-flavonoid complex. The reaction between the -OH group in flavonoids and glucose

Identification of flavonoid compound on the ethanol extract and its fraction of parijoto fruit by using a thin layer chromatography (TLC).

...*ekstrak dan fraksi etanol buah parijoto dengan metode kromatografi lapis*

	Standard	Ethanolic extract	Ethanolic fraction
Colour	Brown	Brown	Brown
Fluorescence	Greenish yellow	Greenish yellow	Greenish yellow

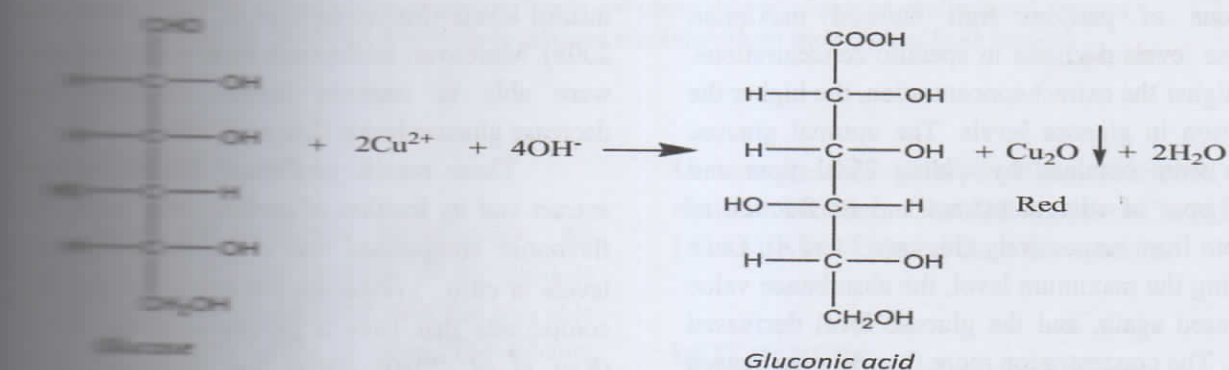


Figure 1. The reaction between Nelson reagent and glucose formed cupro-oxide.

Gambar 1. Reaksi antara pereaksi Nelson dan glukosa membentuk kupri-oksida.

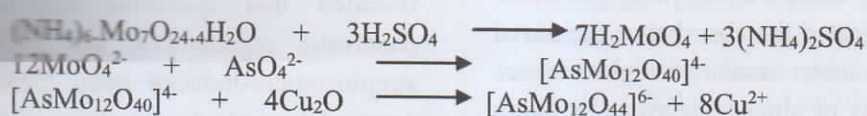


Figure 2. The formation of molybdate and cupric (Cu^{2+}) complex.

Gambar 2. Pembentukan kompleks molybdate dan tembaga (Cu^{2+}).

Table 3. Glucose levels decrease due to the addition of ethanolic extract and its fraction of parijoto fruit at several concentrations.

Tabel 3. Penurunan glukosa dengan penambahan ekstrak dan fraksi etanol buah parijoto pada beberapa konsentrasi

Treatments	Concentration (ppm)	Glucose level decrease percentage (%)
Ethanolic extract of parijoto fruit	10	21.50±0.39 ^c
	20	37.62±0.61 ^d
	30	42.43±0.64 ^e
	40	18.29±0.41 ^b
	50	9.01±0.57 ^a
	60	7.95±0.71 ^a
Ethanolic fraction of parijoto fruit	10	49.46±0.28 ^g
	20	58.29±0.24 ^h
	30	83.38±0.42 ⁱ
	40	57.73±0.32 ^h
	50	48.02±0.29 ^f
	60	41.84±0.39 ^e

Note/Keterangan :

The number followed by the same letter in the same column were not significantly different at 5 % HSD Tukey test/Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji Tukey HSD 5 %.

resulted in decreasing glucose levels in the standard solution. The remaining glucose, which was not bound by flavonoids, then reacting with the Nelson reagent to form a brick-red precipitate, which was then added to the arsenomolybdate reagent to form a greenish-blue molybdate complex (Mutiarra & Wildan 2014; Wardatun *et al.* 2016).

The treatment of ethanol extracts and its fractions of parijoto fruit showed maximum glucose levels decrease in specific concentrations. The higher the extract concentration, the higher the reduction in glucose levels. The optimal glucose levels were obtained by adding 25.01 ppm and 31.47 ppm of ethanol extract and its fraction of parijoto fruit, respectively (Figures 3 and 4). Once reaching the maximum level, the absorbance value decreased again, and the glucose level decreased again. The concentration more than 30 ppm caused saturation, represented that all free glucose has completely reacted. At this circumstance, the higher the concentration of ethanol extract and fraction added, the more concentrated the color formed. These indicated the absorbance measured by the spectrophotometer remained higher, hence lessening the activity of glucose decrease (Mutiarra & Wildan 2014; Wardatun *et al.* 2016).

The ability of flavonoids to reduce glucose levels was related to its activity as an antioxidant.

The higher the phenolic or flavonoid content in the plant, the higher the antioxidant activity (Septia & Simanjuntak 2018). The provision of antioxidants and components of phenolic compounds can reduce oxidative stress, increase insulin sensitivity by improving insulin performance, and lessening free radicals formation. The active flavonoid compound in *Gurmara* plant extract could reduce glucose levels by increasing insulin levels (Shewamene *et al.* 2015; Widowati 2008). Moreover, isoflavones from soybean extract were able to improve insulin resistance and decrease glucose levels (Liu *et al.* 2010).

These results confirmed that the ethanolic extract and its fraction of parijoto fruit contain flavonoid compounds that could reduce glucose levels in vitro. Flavonoids are one of the phenolic compounds that have a glucose-lowering effect (Rao *et al.* 2010) stated that flavonoids from *Lantana camara* and *Combretum micranthum* also showed anti hyperglycemic in DM type I and type II. (Prashanto *et al.* 2011) and (Tapas *et al.* 2008) revealed that quercetin also could increase pancreatic regeneration and insulin release in streptozotocin-induced mice. Further studies are required to evaluate the pharmacological effect of the parijoto fruit ethanol extract and its fraction on the glucose level.

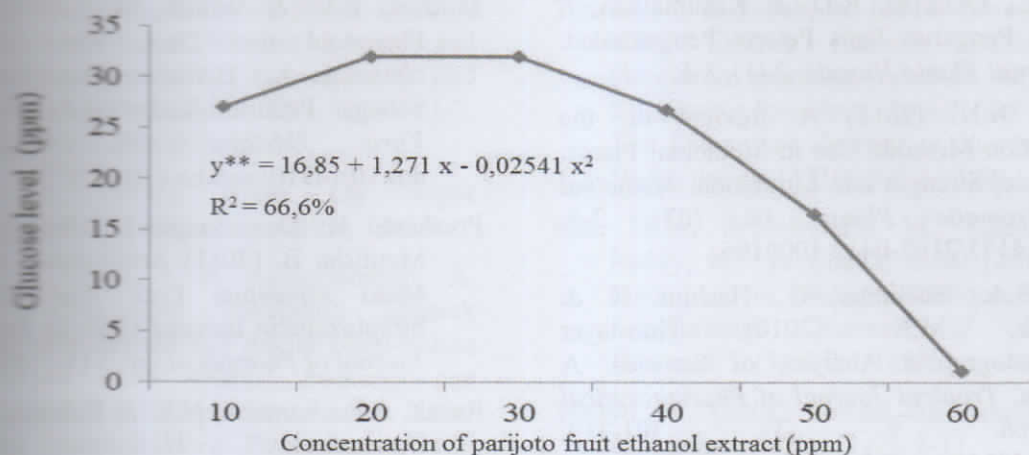


Figure 3. Correlation of glucose levels and concentration of parijoto fruit ethanol extract.

Gambar 3. Korelasi antara kadar glukosa dan konsentrasi ekstrak etanol buah parijoto.

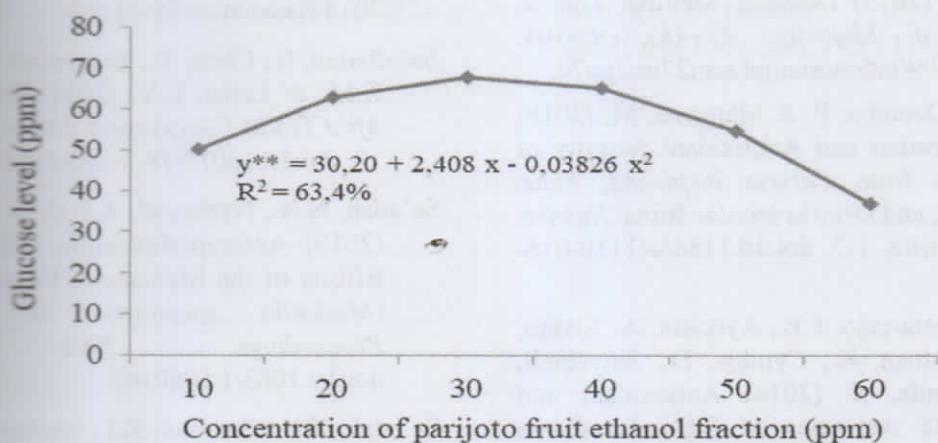


Figure 4. Correlation of glucose levels and concentration of parijoto fruit ethanol fraction.

Gambar 4. Korelasi antara kadar glukosa dan konsentrasi fraksi etanol buah parijoto.

CONCLUSIONS

Based on qualitative identification, the ethanol extracts and its fractions of the parijoto fruit contained a flavonoid compound that was able to decrease glucose levels *in vitro*. The ethanol fraction has a better ability to lower glucose levels compared to its ethanol extract. However, further research needs to explore for proving parijoto fruit as the antidiabetic candidate.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to acknowledge the Ministry of Research, Technology, and Higher Education for awarding Grant Fund for Beginner

Lecturer Research (PDP) for Fiscal Year 2018 with contract Number: 002/KTR-RESEARCH/DIKTI/LPPM/UNW/V/2018 to fund the research.

REFERENCES

- Al-Kayyis, H.K. & Susanti, H. (2016) Perbandingan Metode Somogyi-Nelson dan Anthrone-Sulfat pada Penetapan Kadar Gula Pereduksi dalam Umbi Cilembu (*Ipomea batatas* L.). *Journal of Pharmaceutical Sciences and Community*. 13 (02), 81-89. doi:10.24071/jpsc.2016.130206.
- American Diabetes Association (2014) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 81-90. doi:10.2337/dc14-S081.

- Arifianti, L., Oktarina, R.D. & Kusumawati, I. (2014) Pengaruh Jenis Pelarut Pengekstraksi. *E-Journal Planta Husada*. 2 (1), 3-6.
- Azwanida, N.N. (2015) A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*. 04 (03), 3-8. doi:10.4172/2167-0412.1000196.
- Bhawani, S.A., Sulaiman, O., Hashim, R. & Ibrahim, M.N. (2010) Thin-layer Chromatographic Analysis of Steroids: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 9 (3), 301-313. doi:10.4314/tjpr.v9i3.56293.
- Fadillah, R.U. (2014) Antidiabetic Effect of *Morinda citrifolia* L. As A Treatment of Diabetes Mellitus. *J Majority*. 3 (7), 107-112.
- Fatimah, R.N. (2015) Diabetes Mellitus Tipe 2. *Journal of Majority*. 4 (5), 93-101. doi:10.14499/indonesianjpharm27iss2pp74.
- Gwatidzo, L., Dzomba, P. & Mangena, M. (2018) TLC Separation and Antioxidant Activity of Flavonoids from *Carissa bispinosa*, *Ficus sycomorus*, and *Grewia bicolor* fruits. *Nutrire*. 43 (1), Nutrire, 1-7. doi:10.1186/s41110-018-0062-5.
- Irawaty, W., Soetaredjo, F.E., Ayucitra, A., Sianto, M.E., Jonathan, K., Cynthia, D., Setyabudi, C. & Tanda, S. (2014) Antioxidant and Antidiabetic Activities of Ethanolic Citrus Hystrix Peel Extract: Optimization of Extraction Conditions. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 8 (14), 85-89.
- Jakus, V. & Rietbrock, N. (2004) Advanced Glycation End-Products and the Progress of Diabetic Vascular Complications. *Physiological Research*. 53 (2), 131-142.
- Liu, Z.M., Chen, Y.M., Ho, S.C., Ho, Y.P. & Woo, J. (2010) Effects of Soy Protein and Isoflavones on Glycemic Control and Insulin Sensitivity: A 6-mo double-blind, Randomized, Placebo-controlled Trial in Postmenopausal Chinese Women with Prediabetes or Untreated Early Diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition*. 91 (5), 1394-1401. doi:10.3945/ajcn.2009.28813.
- Mu'awwanah, A. & Ulfah, M. (2015) Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Heksan Ekstrak Etanol Daun Karika (*Carica pubescens*) dan Identifikasi Senyawa Alkaloid dan Flavonoidnya. *Prosiding Seminar Nasional Peluang Herbal sebagai Alternatif Medicine*. 118-124.
- Mutiara, E.V. & Wildan, A. (2014) Ekstrak Flavonoid dari Daun Pare (*Momordica charantia* L.) Berbantu Gelombang Mikro Sebagai Penurun Kadar Glukosa Secara *In Vitro*. *Metana*. 10 (01), 1-11. doi:10.14710/metana.v10i01.9771.
- Prashanto K. Das, Sanjib B., Pandey, J.N. & Moulissha B. (2011) Antidiabetic Activity of *Musa sapientum* Fruit Peel Extract on Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Global Journal of Pharmacology*. 5 (3), 186-190.
- Razak, A.R., Sumarni, N.K. & Rahmat, B. (2012) Optimalisasi Hidrolisis Sukrosa Menggunakan Resin Penukar Kation Tipe Sulfonat. *Jurnal Natural Science*. 1 (1), 119-131.
- RISKESDAS (2018) Hasil Utama RISKESDAS 2018 Kesehatan. 20-21.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K.M. & Latha, L.Y. (2011) Proper Actions of *Medinilla speciosa*. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 8 (1), 1-10. doi:10.1007/978-3-540-69153-2_6.
- Sa'adah, N.N., Nurhayati, A.P.D. & Purwani, K.I. (2018) Antihyperlipidemic and Anti-obesity Effects of the Methanolic Extract of Parijoto (*Medinilla speciosa*). *AIP Conference Proceedings*. 2002 (August). doi:10.1063/1.5050142.
- Sa'adah, N.N., Purwani, K.I., Nurhayati, A.P.D. & Ashuri, N.M. (2017) Analysis of Lipid Profile and Atherogenic Index in Hyperlipidemic Rats (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) that Given the Methanolic Extract of Parijoto (*Medinilla speciosa*). *AIP Conference Proceedings*. 1854. doi:10.1063/1.4985422.
- Septiana, E. & Simanjuntak, P. (2018) Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Batang *Calophyllum pulcherrimum*, *C. soulattri* dan *C. teysmannii*. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat*. 29 (2), 59-68.
- Shaw, J.E., Sicree, R.A. & Zimmet, P.Z. (2010) Global Estimates of the Prevalence of Diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 87 (1), 4-14. doi:10.1016/j.diabres.2009.10.007.
- Sheela, J.A.H. (2011) Qualitative Analysis of Secondary Metabolites. *International Journal of Biotech Trends and Technology*. 1 (3), 21-22.
- Shewamene, Z., Abdelwuhab, M. & Birhanu, Z. (2015) Methanolic Leaf Extract of *Otostegia*

integrifolia Benth Reduces Blood Glucose Levels in Diabetic, Glucose Loaded and Normal Rodents. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 15 (1), 1-7. doi:10.1186/s12906-015-0535-5.

Samogi, M. (1951) Notes On Sugar Determination. *J. Biol. Chem.* (195), 19-23.

Wardana, S., Yulia, I. & Aprizayansyah, A. (2016) Kandungan Flavonoid Ekstrak Metanol dan Ekstrak Etil Asetat Daun Sukun (*Artocarpus altilis* (Park.) Fosberg) dan Aktivitasnya terhadap Penurunan Kadar Glukosa Secara *In Vitro*. *Fitofarmaka*. 6 (2), 52-63.

Tapas, A.R., Sakarkar, D.M. & Kakde, R.B. (2008) Flavonoids as Nutraceuticals. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 7 (3), 1089-1099. doi:10.1007/978-0-387-28822-2_8.

Tussanti, I. & Johan, A. (2014) Sitotoksitas In Vitro Ekstrak Etanolik Buah Parijoto (*Medinilla speciosa*, reinw.ex bl.) terhadap Sel Kanker Payudara. *Jurnal Gizi Indonesia: The Indonesian Journal of Nutrition*. 2 (2), 53-58. doi:10.14710/jgi.2.2.53-58.

Rao, M.U., Sreenivasulu, M., Chengaiah, B., Reddy, K.J. & Chetty, C.M. (2010) Herbal Medicines for Diabetes Mellitus: A Review. *International Journal of PharmTech Research*. 2 (3), 1883-1892.

Wahyu, W. (2008) Potensi Antioksidan sebagai Antidiabetes. *JKM*. 7 (2), 1-11.

Wijaya, Y.A., Widyadinata, D., Irawaty, W. & Ayucitra, A. (2017) Fractionation of Phenolic Compounds from Kaffir Lime (*Citrus hystrix*) Peel Extract and Evaluation of Antioxidant Activity. *Reaktor*. 17 (3), 111. doi:10.14710/reaktor.17.3.111-117.

EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL BIJI MIMBA, MAHONI DAN SUREN TERHADAP LARVA *Tenebrio molitor* Linnaeus (Tenebrionidae: Coleoptera)

Effectiveness of Ethanol Extract of Neem, Mahogany and Surian Seeds on Tenebrio molitor Linnaeus Larva (Tenebrionidae : Coleoptera)

Wida Darwiati^{1*)}, Ujang Wawan Darmawan¹⁾ dan Cheppy Syukur²⁾

¹⁾ Pusat Penelitian dan Pengembangan Hutan
Jalan Gunung Batu No 5 Bogor, 16118

²⁾ Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Jalan Tentara Pelajar No. 3 Bogor, 16111

INFO ARTIKEL

Article history:

Diterima: 27 Desember 2019

Direvisi: 18 Februari 2020

Disetujui: 30 Maret 2020

Kata kunci:

Fitokimia; insektisida nabati;
toksisitas

Keywords:

Botanical insecticide;
phytochemical; toxicity

ABSTRAK/ABSTRACT

Biji mimba, mahoni, dan suren mengandung metabolit sekunder yang dapat digunakan sebagai biopestisida. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keefektifan ekstrak biji mimba, mahoni, dan suren terhadap larva uji *Tenebrio molitor* L. (Tenebrionidae: Coleoptera) pada skala laboratorium. Tahapan penelitian adalah penyiapan ekstrak biji, analisis fitokimia ekstrak dan pengujian efikasi ekstrak terhadap serangga uji (*T. molitor*). Biji mimba, suren, dan mahoni yang telah kering (kadar air < 10%) dihaluskan (100 mesh), dimaserasi dengan pelarut etanol 95% selama tujuh jam pada suhu 70 °C, lalu dianalisis kandungan alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan steroid/triterpenoidnya. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Acak Kelompok, 3 ulangan, masing-masing 10 ekor larva. Faktor pertama adalah tiga jenis ekstrak biji (mimba, suren, dan mahoni), sedangkan faktor kedua adalah lima taraf konsentrasi ekstrak (0 mg.l⁻¹, 9 mg.l⁻¹, 15 mg.l⁻¹, 30 mg.l⁻¹ dan 45 mg.l⁻¹). Pengujian keefektifan ekstrak dilakukan pada *T. molitor*, larva instar ketiga. Hasil analisis fitokimia menunjukkan bahwa biji mahoni mengandung alkaloid dan triterpenoid, pada biji suren terdapat kandungan tannin, alkaloid, steroid/triterpenoid sedangkan pada biji mimba mengandung saponin dan alkaloid. Hasil uji efikasi ekstrak biji mahoni, suren dan mimba efektif menyebabkan kematian secara nyata pada larva *T. molitor*. Ekstrak etanol biji mimba lebih toksik terhadap larva uji (LC₅₀ = 0,72 mg.l⁻¹), dibandingkan mahoni (LC₅₀ = 5,2 mg.l⁻¹) dan suren (LC₅₀ = 7,02 mg.l⁻¹). Ekstrak biji mimba lebih prospektif dikembangkan sebagai insektisida nabati.

Neem, mahogany, and surian seeds contain secondary metabolites that can be used as biopesticides. This study aimed to determine the effectiveness of neem, mahogany, and surian seed extracts to the larvae of the Tenebrio molitor L. (Tenebrionidae: Coleoptera) at laboratory scale. The stages of the research were the preparation of seed extracts, phytochemical analysis of the extracts, and efficacy of extracts against T. molitor larvae. Dried seeds of neem, surian, and mahogany (water content < 10%) were ground (100 mesh) and macerated with 95% ethanol solvent for seven hours at 70 °C. The alkaloids, flavonoids, tannins, saponins, and steroids/triterpenoid were then analyzed. The effectiveness of the extracts was tested

* Alamat Korespondensi : wdarwiati@yahoo.com

DOI : <http://dx.doi.org/10.21082/bullitro.v31n1.2020.40-47>

0215-0824/2527-4414 @ 2017 Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
This is an open access article under the CC BY-NC-SA license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>)

Accreditation Kemenristekdikti Number : 30/E/KPT/2018

against the 3rd larva of *T. molitor*. The experiment designed in Randomize block design, three replications, each with ten larvae. The first factor was seed extracts (neem, surian, and mahogany), while the second factor was five levels of extract concentration (0 mg.l⁻¹, 9 mg.l⁻¹, 15 mg.l⁻¹, 30 mg.l⁻¹ and 45 mg.l⁻¹). Phytochemical analysis showed that mahogany seeds contained alkaloids and triterpenoids. Meanwhile, surian seeds contained tannin, alkaloid, steroid/triterpenoid, but neem seeds contained saponin and alkaloids. The mahogany, surian, and neem seed extracts were effective in causing significant mortality to *T. molitor* larvae. Ethanol extract of neem seeds was more toxic to larvae (LC₅₀ = 0.72 mg.l⁻¹), compared to mahogany (LC₅₀ = 5.2 mg.l⁻¹) and surian (LC₅₀ = 7.02 mg.l⁻¹). Mimba seed extract is more prospective to be developed as a botanical insecticide.

KESIMPULAN

Penggunaan insektisida sintetik walaupun lebih efektif, relatif murah, mudah, dan praktis, namun dapat berdampak tidak baik terhadap lingkungan. Selain itu, serangga hama akan menjadi resisten terhadap insektisida. Salah satu alternatif untuk mengatasi hal itu adalah menggunakan insektisida nabati. Insektisida nabati menggunakan bahan yang mudah terdegradasi di alam sehingga dampaknya terhadap lingkungan menjadi tidak berbahaya. Oleh karena itu, insektisida nabati dapat digunakan sebagai alternatif pengganti insektisida sintetik.

Insektisida nabati pada dasarnya memanfaatkan senyawa metabolit sekunder tumbuhan sebagai bahan aktifnya. Senyawa metabolit sekunder dari tumbuhan dapat berfungsi sebagai penolak, penarik, dan pembunuh, serta sebagai penghambat nafsu makan serangga hama. Penggunaan bahan tanaman yang telah diketahui memiliki sifat tersebut di atas khususnya sebagai bahan aktif insektisida nabati diharapkan mampu mengganti atau sebagai substitusi insektisida sintetik sehingga berbagai efek negatifnya terhadap manusia, hewan dan lingkungan dapat ditekan seminimal mungkin (Wiratno *et al.* 2011). Banyak jenis tumbuhan/ tanaman yang sudah diketahui sebagai insektisida nabati, karena mengandung senyawa metabolit sekunder seperti golongan alkaloid, steroid, terpenoid, fenol, flavonoid, dan saponin (Sinaga 2009). Di antara berbagai jenis tumbuhan Famili Meliaceae, seperti mimba (*Azadirachta indica* A. Juss), mahoni (*Swietenia mahagoni* L.), dan suren (*Toona sinensis* M. Roem), telah lama diketahui berpotensi sebagai

pengendali hama (Darwiati 2009). Menurut (Debashri dan Tamal 2012), semua bagian dari pohon mimba memiliki aktivitas pestisida. Biji dan daun mimba mengandung empat senyawa kimia alami yang aktif sebagai pestisida, yaitu azadirachtin, salanin, meliatriol dan nimbin. Ekstrak daun, bunga dan biji mimba dapat digunakan untuk mengendalikan berbagai jenis hama, misalnya kepik pengisap buah, ulat jengkal, kutu aphid, wereng, dan kutu beras, serta larva nyamuk (Maragathavalli *et al.* 2012). Menurut Rachmawaty *et al.* (2017), biji mimba juga mengandung selulosa, amilum, protein, dan trigliserida, serta triterpenoid, sulfur, fenol, dan flavonoid. Dari beberapa senyawa metabolit sekunder berasal dari tanaman mimba, azadirachtin telah terbukti paling berpotensi digunakan sebagai pestisida alami (Aradilla 2009). Senyawa azadirachtin dapat menghambat pertumbuhan serangga hama, mengurangi nafsu makan, mengurangi produksi dan penetasan telur, meningkatkan mortalitas, mengaktifkan infertilitas, serta menolak hama (Dewi *et al.* 2017).

Jenis tumbuhan lain yang berkhasiat sebagai insektisida nabati adalah suren (*Toona sinensis* M. Roem). Suren juga dikenal sebagai surian, tumbuh tersebar luas di Sumatera, Jawa, dan Sulawesi (Pramono dan Danu 2013). Di Cina, tumbuhan suren dimanfaatkan sebagai sayuran dan obat tradisional (Hakim 2014). Suren mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder, seperti limonoid, fitol, flavonoid, minyak atsiri, triterpenoid, dan fenol (Pangesti *et al.* 2017). Senyawa metabolit sekunder lainnya yang berasal dari suren adalah surenon, surenin, dan surenolaktone yang berperan sebagai penghambat

pertumbuhan serangga, insektisidal, dan penolak ulat sutera.

Selain mimba dan suren, tanaman yang berkhasiat sebagai insektisida nabati adalah mahoni (*Swietenia mahogani* L.). Menurut Heviyanti *et al.* (2016), ekstrak biji mahoni pada konsentrasi 5% dapat menghambat makan larva *Plutella xylostella*, sedangkan ekstrak biji 0,25% dapat mematikan larva *Crocidolomia pavonana*. Senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam biji mahoni adalah saponin dan flavonoid yang bersifat sebagai penolak dan racun serangga (Ardwiantoro 2011). Saponin banyak dihasilkan oleh berbagai jenis tumbuhan, bersama-sama dengan senyawa sekunder lainnya, apabila dimakan oleh serangga dapat menurunkan aktivitas enzim pencernaan dan penyerapan makanan. Biji mahoni mengandung senyawa metabolit sekunder yang mirip dengan *butane hexane chlor* (BHC) yang bersifat sebagai racun perut dan racun pernafasan. Biji mahoni, juga digunakan untuk kesehatan manusia karena memiliki efek farmakologis, seperti antipiretik, antijamur, menurunkan tekanan darah tinggi, kencing manis, demam, dan rematik (Dalimartha 2009). Berbagai jenis senyawa limonoid, seperti tetranortriterpenoid, swietenine, swietenolide (senyawa pahit), swietenine asetat, dan swietenolide diasetat ada di dalam biji mahoni (Heviyanti *et al.* 2016).

Pada beberapa pengujian insektisida, penggunaan larva *Tenebrio molitor* masih sering digunakan sebagai serangga uji, selain serangga ini merupakan salah satu hama utama pada produk biji-bijian, juga mudah dikembangkan di laboratorium dalam jumlah banyak (Rao *et al.* 2010). Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji efektivitas ekstrak etanol biji mimba, mahoni dan suren terhadap larva *Tenebrio molitor*.

BAHAN DAN METODE

Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Puslitbang Hasil Hutan dan Laboratorium Hama Penyakit Puslitbang Hutan, Bogor. Penelitian ini dilaksanakan sejak September sampai November 2016.

Penyiapan ekstrak

Biji mimba diperoleh dari Jawa Timur (Balittas, Malang), sedangkan biji suren dan mahoni diperoleh dari petani pengumpul di Ciamis, Jawa Barat. Semua biji kondisinya baik dan tidak rusak sehingga layak untuk dijadikan sebagai bahan penelitian. Biji dikering anginkan ditimbang sebanyak 50 g dan dibungkus dengan kertas saring, kemudian dimasukkan ke dalam ekstraktor *soxhlet* berisi pelarut etanol 95%. Ekstraksi dilakukan selama tujuh jam pada suhu 70 °C sampai tetesan tidak berwarna, yang menandakan bahwa bahan sudah tersari sempurna (Saifudin *et al.* 2011). Hasil ekstraksi dipekatkan di dalam *rotary evaporator*, kemudian dipanaskan di dalam oven pada suhu 40 °C. Selanjutnya, ekstrak didinginkan di dalam desikator dan dihitung rendemennya. Perhitungan rendemen dilakukan dengan rumus :

$$\text{Rendemen} = (\text{berat ekstrak/berat awal bahan}) \times 100$$

Analisis fitokimia ekstrak

Pengujian fitokimia dilakukan untuk mengetahui secara kualitatif kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam simplisia kering dan ekstrak biji mimba, mahoni dan suren. Biji mimba, mahoni, dan suren masing-masing 50 g dikeringkan di dalam oven suhu 40 °C sampai kadar airnya kurang dari 10%. Setelah kering, bahan dihaluskan dan disaring dengan saringan berukuran 100 mesh. Selanjutnya, serbuk biji yang telah kering dimaserasi dengan pelarut etanol 95% selama tujuh jam pada suhu 70 °C kemudian dianalisis kandungannya, menggunakan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

Pengujian efikasi ekstrak terhadap serangga uji

Serangga uji yang digunakan yaitu larva *Tenebrio molitor* yang diperoleh dari Laboratorium Hama Penyakit Tanaman IPB, kemudian diperbanyak di laboratorium Hama Penyakit Hutan Puslitbang Hutan. Fase larva uji yang digunakan adalah larva instar ke tiga.

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Acak Kelompok, 3 ulangan, masing-masing 10 ekor larva. Faktor pertama adalah tiga jenis

mimba biji (mimba, mahoni, dan suren), sehingga faktor kedua adalah lima taraf konsentrasi ekstrak (0 mg.l⁻¹; 9 mg.l⁻¹; 15 mg.l⁻¹; 30 mg.l⁻¹; 45 mg.l⁻¹).

Larutan ekstrak biji setiap konsentrasi 0,1 ml disemprotkan secara merata pada tubuh larva 7 molitor yang ditempatkan di dalam cawan petri, kemudian larva yang telah diperlakukan dimasukkan ke dalam cawan petri lain yang sudah ada kertas saring supaya tidak lembap dan diberi pakan umbi kentang segar. Pengamatan mortalitas larva dilakukan setiap hari (24 jam). Setiap 48 jam, pakan larva diganti dengan yang baru tanpa diberi perlakuan. Larva yang mati diambil dan dihitung. Pengamatan mortalitas larva dilakukan selama tujuh hari. Ekstrak dianggap aktif apabila mengakibatkan lebih dari 90% kematian dari populasi serangga uji pada hari ke-4 setelah perlakuan, dihitung menggunakan rumus:

$$MA (\%) = (A/B) \times 100\%$$

Legenda/Note:

- MA = Persentase kematian yang diamati/ *Percentage of death observed.*
- A = Jumlah larva yang mati dalam setiap perlakuan/ *The total number of dead larvae in each treatment.*
- B = Jumlah seluruh larva dari setiap perlakuan/ *The total number of larvae in each treatment.*

Tabel 1. Rendemen ekstrak biji mahoni, suren dan mimba menggunakan pelarut etanol 95%
Tabel 1. *Yield of mahogany, surian, and neem seed extracts using 95% ethanol solvent*

Serbuk biji (50 g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)	Bentuk	Warna
Mimba	1,67	4,19	Padatan	Cokelat kehitaman
Suren	4,08	10,19	Padatan	Cokelat kekuningan
Mahoni	5,55	13,88	Padatan	Cokelat tua

Tabel 2. Profil fitokimia ekstrak etanol biji mimba, mahoni dan suren.

Tabel 2. *Phytochemical profile of ethanol extracts of neem, mahogany, and surian seeds.*

	Metabolit sekunder						Steroid/ Triterpenoid
	Tanin	Saponin	Flavonoid	Alkaloid	Steroid	Triterpenoid	
Mimba	-	-	-	+	-	+	-
Mahoni	-	+	-	+	-	-	-
Suren	+	-	-	+	-	-	+

Legenda/Note:

- tidak terdapat senyawa metabolit sekunder di dalam ekstrak yang diuji/ *There were no secondary metabolites in the extract tested*
- +

Analisis data

Tingkat mortalitas serangga uji dianalisis menggunakan sidik ragam dan dilanjutkan dengan uji BNT, analisis probit (*probability unit*) dilakukan untuk menentukan tingkat konsentrasi letal 50% (LC₅₀).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen ekstrak etanol dan fitokimia biji mimba, mahoni dan suren

Rendemen ekstrak etanol serbuk kering biji mimba, mahoni dan suren berkisar antara 4,1-13,8 %, ekstrak biji mahoni menghasilkan rendemen yang paling banyak, kemudian suren dan mimba (Tabel 1).

Hasil uji fitokimia dari ekstrak etanol mimba, mahoni, dan suren menunjukkan bahwa senyawa alkaloid ditemukan terkandung didalam ketiga ekstrak biji yang diuji, tetapi tannin hanya ditemukan dalam biji suren, saponin dalam biji mimba, triterpenoid dalam biji mahoni, dan steroid/triterpenoid dalam biji suren (Tabel 2). Biji suren paling banyak mengandung senyawa metabolit sekunder (tannin, alkaloid, dan steroid/triterpenoid) dibandingkan dengan mahoni dan

mimba. Senyawa metabolit sekunder, seperti tannin, saponin, alkaloid, steroid dan triterpenoid bersifat anti serangga (Sinaga 2009).

Efektivitas ekstrak biji terhadap larva *Tenebrio molitor*

Hasil pengujian ekstrak etanol biji mimba, mahoni, dan suren terhadap larva *T. molitor* menunjukkan bahwa pada pengamatan hari pertama (24 jam setelah aplikasi), semua perlakuan konsentrasi ekstrak menyebabkan terjadinya mortalitas pada larva uji (Tabel 3). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak ketiga jenis biji yang diuji bersifat “*knock down*” (untuk mengetahui berapa lama serangga uji atau larva menjadi lemah dan mati setelah kontak dengan pestisida nabati tersebut). Pada pengamatan hari kedua dan ketiga, walaupun ada peningkatan mortalitas tetapi tidak semua serangga uji mati. Larva yang hidup tetap menunjukkan aktivitas walaupun agak lemah.

Berdasarkan hasil uji beda nyata menggunakan anova, mortalitas larva *T. molitor* pada perlakuan ekstrak biji mimba, mahoni dan

suren menunjukkan hasil yang berbeda nyata kontrol. Perlakuan ekstrak biji mahoni konsentrasi 9 mg.l⁻¹ persentase mortalitasnya paling kecil berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan konsentrasi 45 mg.l⁻¹, tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi 15 mg.l⁻¹ dan 30 mg.l⁻¹.

Pestisida nabati berbahan baku ekstrak suren dan ekstrak biji mimba juga menunjukkan hasil yang serupa. Perlakuan kontrol berbeda nyata dengan keempat perlakuan konsentrasi lain. Perlakuan pestisida nabati dengan kedua bahan umumnya tidak berbeda nyata pada semua konsentrasi. Mortalitas tertinggi terlihat pada pengamatan 72 jam setelah perlakuan pada konsentrasi 30 mg.l⁻¹ dan 45 mg.l⁻¹. Perlakuan pestisida nabati pada konsentrasi 45 mg.l⁻¹ umumnya menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan perlakuan pada konsentrasi 9 mg.l⁻¹. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan pestisida nabati dapat diterapkan dengan baik pada konsentrasi tertinggi (45 mg.l⁻¹) dan membutuhkan waktu reaksi mortalitas sekitar 48-72 jam. Pada kontrol

Tabel 3. Mortalitas larva *T. molitor* pada perlakuan konsentrasi ekstrak etanol biji mimba, mahoni dan suren pada 24 jam, 48 jam dan 72 jam setelah aplikasi.

Table 3. Mortality of *T. molitor* larvae treated with ethanol extracts of neem, mahogany, and surian seeds at 24 hours, 48 hours and 72 hours after application.

Perlakuan	Konsentrasi ekstrak (mg.l ⁻¹)	Mortalitas larva <i>Tenebrio molitor</i> setelah aplikasi		
		Waktu (jam setelah aplikasi)		
		24	48	72
Ekstrak biji mahoni	0	0,33 a	0,67 a	1,00 d
	9	3,33 b	4,33 b	4,33 b
	15	4,00 b	5,33 b	5,67 b
	30	4,67 b	6,00 b	6,00 b
	45	7,00 c	6,67 b	6,67 b
Ekstrak biji suren	0	1,00 a	0,67 a	1,00 a
	9	3,00 b	3,67 b	5,67 b
	15	4,33 c	4,67 c	5,67 b
	30	5,33 c	6,33 d	6,67 b
	45	7,67 d	7,67 e	7,67 c
Ekstrak Biji mimba	0	0,00 a	0,33 a	1,00 a
	9	2,67 b	3,67 b	5,33 b
	15	3,00 c	5,00 c	6,00 b
	30	5,33 d	6,00 d	7,33 c
	45	7,33 e	7,33 e	7,33 c

Keterangan/Note:

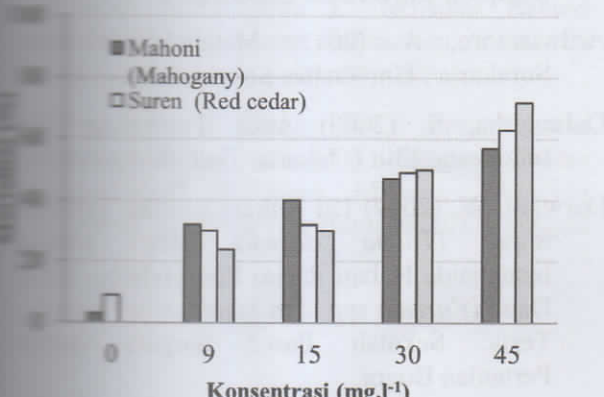
Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada setiap kolom, tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNT pada taraf 5 %/Numbers followed by the same letters within each column are not significantly different according to LSD at 5 % level.

menjadi mortalitas sebesar 3 sampai 8% dikarenakan adanya uji yang digunakan kemungkinan belum beradaptasi, keadaan larva kurang baik dan stress sehingga menyebabkan kematian pada saat dilakukan penelitian.

Grafik pada Gambar 1 menunjukkan bahwa mortalitas tertinggi sebesar 72% dicapai pada perlakuan biji mimba dengan konsentrasi 45 mg.l⁻¹, sedangkan ekstrak biji suren mortalitas hanya 65% dan ekstrak mahoni 57%. Pada konsentrasi 30 mg.l⁻¹ mortalitas tertinggi dicapai pada perlakuan ekstrak biji suren dan ekstrak biji mahoni sekitar 50%, berbeda dengan ekstrak biji mimba yang mortalitasnya hanya 48%. Sedangkan pada konsentrasi 9 mg.l⁻¹ dan 15 mg.l⁻¹ ekstrak biji mahoni menunjukkan mortalitas tertinggi dibanding ekstrak biji suren dan ekstrak biji mimba.

Mortalitas ekstrak biji

Konsentrasi letal (*Lethal Concentration*, LC₅₀) dari ekstrak etanol biji mimba, mahoni dan suren menunjukkan bahwa ketiga jenis ekstrak dapat mematikan larva *T. molitor* (Tabel 4). Hal ini berarti bahwa didalam ekstrak biji mimba, mahoni dan suren mengandung racun yang dapat mematikan larva uji. Mekanisme aktivitas ekstrak



Gambar 1. Mortalitas *T. molitor* pada 72 jam setelah aplikasi ekstrak biji mahoni, suren dan mimba. Garis vertikal pada tiap grafik menggambarkan standar deviasi.

Figure 1. Mortality of *T. molitor* in 72 hours after application of mahogany, surian and neem seed extracts. Vertical lines within each bar describes the value of a standard deviation.

terhadap larva *T. molitor* diindikasikan melalui gangguan pernafasan serangga (Gambar 2). Kematian larva pada pemberian ekstrak mimba, mahoni dan suren menunjukkan gejala kaku dan tubuh berubah menjadi hitam yang dimulai dari bagian kepala menuju ke seluruh

Tabel 4 LC₅₀ ekstrak biji mimba, mahoni dan suren terhadap larva *T. molitor*.

Table 4. LC₅₀ of neem, mahogany, and surian seed extracts to *T. molitor* larvae.

No.	Ekstrak biji	LC 50 (%)
1	Mimba	0,72
2	Mahoni	5,23
3	Suren	7,02



Gambar 2. Kematian serangga uji, larva *T. molitor* setelah aplikasi dengan ekstrak biji. Atas : Umhi kentang yang diberi perlakuan ekstrak biji mimba dan diberi larva *T. Molitor*; Bawah : Larva *T. molitor* yang telah mati.

Figure 2. Death on target pest, *T. molitor* larvae, after seed extracts application. Above: potato cultivars treated with the extract of neem seed and provided with *T. molitor* larvae; Bellow: Death of *T. molitor* larvae.

tubuh. Ekstrak biji mimba dan suren mengandung minyak yang dapat menempel pada bagian tubuh serangga sehingga *spirakel* serangga tersumbat, kemungkinan lain senyawa aktif dari ekstrak biji mimba, mahoni dan suren berpenetrasi melewati kutikula serangga dan meresap ke dalam tubuh, lalu terakumulasi sehingga terjadi kelumpuhan dan selanjutnya mengakibatkan kematian (Darwiati 2009).

Berdasarkan nilai LC_{50} , maka ekstrak biji mimba yang paling toksik terhadap larva *T. molitor* dibandingkan dengan ekstrak biji suren dan mahoni, dengan nilai LC_{50} ekstrak biji mimba sebesar 0,72 %, diikuti dengan LC_{50} biji mahoni sebesar 5,23 % dan LC_{50} ekstrak biji suren sebesar 7,02 %. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Putri *et al.* (2015).

Hasil analisis fitokimia, menunjukkan ekstrak etanol biji mimba, suren, dan mahoni mengandung senyawa yang bersifat toksik terhadap serangga, dan efektif terhadap larva *T. molitor*. Oleh karena itu, perlu dilakukan lebih lanjut, seperti pengujian frekuensi aplikasi, mekanisme aktivitas racun, dan gangguan hormonal lainnya. Menurut Aradilla (2009), sifat racun insektisida nabati dari tanaman Famili *Meliaceae* seringkali tidak mematikan target serangga secara cepat sehingga perlu diulang aplikasinya.

Senyawa alkaloid dan flavonoid yang terkandung dalam ekstrak daun mimba juga dilaporkan menyebabkan kematian pada wereng cokelat (Febrianti dan Rahayu 2012). Selain itu semakin tinggi konsentrasi yang digunakan terhadap serangga, maka semakin tinggi daya penolak makannya (Hidayati *et al.* 2013).

Mortalitas pada perlakuan ekstrak suren lebih tinggi daripada mimba dan mahoni, hal ini diduga karena pada suren mengandung senyawa triterpenoid seperti surenon, surenin dan surenolakton. Senyawa tersebut bersifat sebagai penolak serangga (Pangesti *et al.* 2017) yang memiliki bau yang menyengat dan rasa sepat yang menyebabkan larva tidak mau makan. Pada ekstrak tersebut juga terdapat senyawa flavonoid yang mampu menghambat pertumbuhan larva, terutama tiga hormon utama pada serangga, yaitu hormon otak, hormon eksdison dan hormon pertumbuhan (*juvenile hormone*) (Kurniawan *et al.* 2013).

KESIMPULAN

Ekstrak etanol biji mahoni, suren, dan mimba efektif membunuh larva *T. molitor*. Ekstrak biji mahoni mengandung alkaloid dan triterpenoid, biji suren mengandung tannin, alkaloid, dan steroid/ triterpenoid, sedangkan ekstrak biji mimba mengandung saponin dan alkaloid. Ekstrak etanol biji mimba lebih toksik terhadap larva *T. molitor* ($LC_{50}=0,72 \text{ mg.l}^{-1}$), dibandingkan mahoni ($LC_{50}=5,23 \text{ mg.l}^{-1}$) dan suren ($LC_{50}=7,02 \text{ mg.l}^{-1}$). Ekstrak biji mimba lebih prospektif dikembangkan sebagai insektisida nabati.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Puslitbang Hutan atas bantuan dana DIP, penelitian, dan kepada teknisi laboratorium Hama dan Penyakit Puslitbang Hutan yang membantu dalam proses ekstraksi biji dari mimba, mahoni dan suren, serta pengujian efektifitas ekstrak terhadap serangga uji.

DAFTAR PUSTAKA

- Aradilla, A.S. (2009) Uji Efektivitas Larvasida Ekstrak Ethanol Daun Mimba (*Azadirachta indica*) terhadap Larva *Aedes aegypti* (skripsi). Universitas Diponegoro.
- Ardwiantoro, A. (2011) Metabolit Sekunder Surakarta : Universitas Sebelas Maret.
- Dalimartha, S. (2009) Atlas Tumbuhan Obat Indonesia, Jilid I. Jakarta. *Trubus*. Agriwidya.
- Darwiati, W. (2009) Uji Efikasi Ekstrak Tanaman Suren (*Toona sinensis* Merr) sebagai Insektisida Nabati dalam Pengendalian Hama Daun (*Eurema* spp. dan *Spodoptera litura* F.). Tesis. Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.
- Debashri, M. & Tamal, M. (2012) A Review on Efficacy of *Azadirachta indica* A. Juss based Biopesticides: An Indian perspective. *Research Journal of Recent Sciences*. 1 (3). 94-99.
- Febrianti, N. & Rahayu, D. (2012) Aktivitas Insektisidal Ekstrak Etanol Daun Kirinyuh Terhadap Wereng Cokelat. In : *Prosiding Seminar Nasional IX*. Pendidikan Biologi.

INSIPENS. Semarang. pp. 661-664.

- Putri, L. (2014) Etnobotani dan Manajemen Obat Pekarangan Rumah: Ketahanan Pangan, Kesehatan dan Agrowisata. Penerbit Jember: Malang.
- Putri, M., Husni & Rusdy, A. (2016) Efektivitas Ekstrak Biji Mahoni (*Swietenia sonchifolia* Jacq.) terhadap Mortalitas dan Waktu Kematian Larva *Plutella xylostella* pada Tanaman Sawi. *Jurnal Pendidikan*. 3 (1), 27-37.
- Rachmawati, N.N., Yuliani & Kuswanti, N. (2013) Pengaruh Ekstrak Daun Suren dan Daun Mahoni terhadap Mortalitas dan aktivitas Ulat Daun (*Plutella xylostella*) pada Tanaman Kubis. *Lentera Bio*. Surabaya. 2, 15-20.
- Rachmawati, N.N., Karta, I.W., Wati, N.L.C. & Dewi, N.M.A. (2017) Uji Efektivitas Larvasida Daun Mimba (*Azadirachta indica*) terhadap Larva Lalat *Sarcophaga* pada Sayur untuk Upakara Yadnya Di Bali. *Jurnal Sains dan Teknologi*. 6 (1), 126-135. doi:10.23887/Jst-Undiksha.V6i1.9233.
- Rachmawati, N., Yulianti & Rachmadiarti, F. (2013) Uji Bioaktivitas Ekstrak Daun Suren (*Toona sinensis*) terhadap Mortalitas Larva *Plutella xylostella* pada tanaman Sawi Hijau. *Lentera Bio*. 2 (3), 203-206.
- Rachmawati, R.D., Cahyono, E. & Kusumo, E. (2017) Peningkatan Daya Antibakteri Ekstrak dan Minyak *Piper betle* L. terhadap Bakteri *Staphylococcus mutans*. *Indonesian Journal Of Chemical Science*. 6 (3), 291-299.
- Rachmawati, A.A. & Danu. (2013) Peta Sebaran Tanaman (*Toona sinensis*) dengan Sistem Agroforestri di Jawa Malang. Prosiding Seminar Nasional Agroforestry 2013, tanggal 21 Mei 2013 di Malang.
- Putri, D.F., Martosudiro, M., Afandhi, A. & Bedjo. (2015) Virulensi Beberapa Isolat *Spodoptera litura* Nuclear Polyhedrosis Virus (SLNPV) terhadap *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) Pada Tanaman Kedelai (*Glycine max* L.). *Jurnal Hama Penyakit Tumbuhan*. 3 (4), 60-68.
- Rachmawaty, Suryadarma, I. & Suhartini. (2017) Pengaruh Pemberian Ekstrak Batang Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) sebagai Pestisida Nabati *Spodoptera litura* pada Tanaman Cabai Merah (*Capsicum annum* (L.)). *Jurnal Prodi Biologi*. 6 (4), 227-235.
- Rao, G.R., Rameshwar Rao, V. & Nigam, S.N. (2010) Post Harvest Insect Pests of Groundnut and Their Management. Andhra Pradesh: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
- Maragathavalli, S., Brindha, S., Kaviyarasi, N.S., Annadura, B. & Gangwar, S.K. (2012) Mosquitoes Larvicidal Activity of Leaf Extract of Neem (*Azadirachta indica*). *International Journal of Advanced Biological Research*. 2 (1), 138-142.
- Saifudin, A., Rahayu & Terima. (2011) Standarisasi Bahan Obat Alam. Yogyakarta. Graha Ilmu.
- Sinaga, R. (2009) Uji Efektivitas Pestisida Nabati Terhadap Hama *Spodoptera litura* (Lepidoptera : Noctuidae) pada Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabaccum* L). Skripsi. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Wiratno, Rizal, M. & Laba, I.W. (2011) Potensi Ekstrak Tanaman Obat dan Aromatik sebagai Pengendali Keong Mas. *Bul Littro*. 22(1), 54-64.

KARAKTERISASI BAKTERI DARI PERAKARAN *Nepenthes mirabilis* UNTUK PENGENDALIAN HAYATI *Fusarium oxysporum*

Characterization of Rhizobacteria from Roots of Nepenthes mirabilis as Biological Control Agents against Fusarium oxysporum

Mardhiana¹⁾, Muh Adiwena¹⁾, dan Ankardiansyah Pandu Pradana²⁾

¹⁾Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Borneo Tarakan
Jalan Amal Lama No. 1, Tarakan Timur, Tarakan, Kalimantan Utara

²⁾Program Studi Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Jember
Jalan Kalimantan No. 37, Krajan Timur, Sumbersari, Jember, Jawa Timur

INFO ARTIKEL

Article history:

Diterima: 05 Desember 2019

Direvisi: 24 Februari 2020

Disetujui: 30 April 2020

Kata kunci:

Biokontrol; enzim ekstra-
seluler; fenotip; fisiologi;
HCN

Keywords:

Biocontrol; extracellular
enzymes, phenotypes,
physiology, HCN

ABSTRAK/ABSTRACT

Cendawan patogen *Fusarium oxysporum* dapat mengakibatkan kerugian besar pada berbagai tanaman rempah. *Fusarium oxysporum* dilaporkan dapat dikendalikan dengan bakteri antagonis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter fisiologi dan antagonis bakteri dari perakaran *Nepenthes mirabilis*, sebagai pengendali hayati *F. oxysporum*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Perlindungan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Borneo, Tarakan, sejak Oktober sampai November 2017. Medium *Nutrient Agar* (NA) digunakan untuk mengisolasi bakteri antagonis dari akar *N. mirabilis*. Pengujian keamanan hayati terhadap tanaman dan mamalia dilakukan menggunakan uji hipersensitif dan uji hemolisis. Isolat bakteri yang aman kemudian dikarakterisasi fenotip dan sifat fisiologisnya serta diuji kemampuannya dalam menghambat *F. oxysporum* secara *in vitro*. Hasil penelitian menunjukkan terdapat 10 dari 26 isolat bakteri dari akar *N. mirabilis* yang aman bagi tanaman dan mamalia. Uji fisiologis menunjukkan empat isolat dapat menghasilkan enzim proteolitik, lima isolat menghasilkan enzim kitinolitik, enam isolat mampu melarutkan fosfat, dan empat isolat dapat memproduksi HCN. Sebanyak 3 isolat (Mrb2, Mrb6, dan Mrb16) menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap *F. oxysporum* secara *in vitro*.

Phytopathogenic fungi Fusarium oxysporum causes significant yield losses in various spices plants. The fungus can be controlled with numerous types of antagonistic bacteria. This study aimed to determine the physiological characteristic and antagonistic properties of the bacterial from the roots of Nepenthes mirabilis, as a biological control to F. oxysporum. The study was conducted at the Plant Protection Laboratory, Faculty of Agriculture, the University of Borneo, Tarakan, from October to November 2017. Nutrient Agar medium was used to isolate antagonistic bacteria from the roots of N. mirabilis. Biosafety test against plants and mammals were conducted using hypersensitive and hemolysis analysis. The bacterial isolates passed from those tests were characterized further for their phenotype and physiological properties as well as their ability to inhibit the growth of F. oxysporum in a dual culture test in vitro. The results showed that there were 10 out of

* Alamat Korespondensi : pandu@unej.ac.id

26 bacterial isolates originated from *N. mirabilis* roots that were safe for plants and mammals. Physiological tests showed that four isolates could produce the proteolytic enzyme, five isolates produced the chitinolytic enzyme, six isolates were able to dissolve phosphate, and four isolates could produce HCN. Furthermore, three isolates (Mrb2, Mrb6, and Mrb16) showed inhibitory activity against *Fusarium* spp. There were differences in the phenotype character and physiological activity between the Mrb2, Mrb6, and Mrb16 isolates, but all three have the potential to inhibit *F. oxysporum*.

PENDAHULUAN

Cendawan fitopatogen *Fusarium* spp. memiliki sifat polifag dan dapat menyebabkan kerugian yang besar. Patogen ini mampu menginfeksi tanaman hortikultura, pangan, obat-obatan, dan tanaman rempah. Tanaman lada yang terinfeksi oleh cendawan *Fusarium* spp. yang bersinergi dengan nematoda *Meloidogyne* spp. dan bakteri *Xanthomonas* spp. akan menunjukkan gejala penyakit kuning (Daras dan Pranowo 2017). Penyakit kuning pada tanaman lada cukup sulit diidentifikasi secara konvensional karena inokulum patogen berada di bawah tanah, dan patogen dapat membentuk inokulum sekunder di lapangan (Rahul dan Sulistiawati 2014). Tanaman rempah jahe yang dapat terinfeksi oleh *Fusarium* spp. sangat jarang. Penyakit busuk rimpang jahe yang disebabkan oleh *F. oxysporum* Schlecht f.sp. merupakan salah satu kendala utama dalam budidaya jahe (Li *et al.* 2014). Penyakit ini dilaporkan menghambat budidaya jahe di berbagai daerah di Jawa Tengah (Prabowo *et al.* 2016).

Upaya yang dapat dilakukan untuk mengurangi kerugian akibat infeksi *Fusarium* spp. pada tanaman rempah adalah mengendalikan populasi inokulum *Fusarium* spp. menggunakan agen pengendali hayati (Fravel *et al.* 2003). Agen hayati dari golongan bakteri dapat mengendalikan populasi cendawan patogen telah banyak dilaporkan sebelumnya (Liu dan Fravel 1998; Zhao *et al.* 2011). Isolasi dan isolasi agen hayati, terutama dari kelompok bakteri seringkali dilakukan dari bagian perakaran tanaman. Agen hayati dapat berasal dari tanaman yang sama maupun berbeda (Liu *et al.* 2011). Pradana *et al.* (2015) melaporkan bakteri antagonis yang diisolasi dari perakaran tomat efektif menekan *Fusarium* spp.

yang diisolasi dari tanaman tomat. Menurut Tariq *et al.* (2017) bakteri antagonis dapat diisolasi dari tanaman dengan kriteria sehat dan memiliki ketahanan terhadap cekaman biotik dan abiotik yang baik.

Berdasarkan kriteria di atas, salah satu tumbuhan yang berpotensi sebagai sumber agens antagonis adalah *Nepenthes mirabilis*. Tumbuhan tersebut banyak ditemui pada lahan yang kurang subur di Kalimantan Utara (Ilma *et al.* 2014). Tumbuhan *N. mirabilis* relatif sehat atau jarang ditemui dalam keadaan terinfeksi patogen. Kemampuannya bertahan pada lingkungan yang kurang menguntungkan, diduga ada kaitannya dengan bakteri yang bersimbiosis dengannya. Pada studi sebelumnya, Bhore *et al.* (2013) mengisolasi bakteri endofit dari *Nepenthes* spp., dan menemukan 55,2 % bakteri yang berasosiasi dengan *Nepenthes* spp. berasal dari genus *Bacillus*. Selanjutnya, pada studi lainnya, Li *et al.* (2012) berhasil mengisolasi 25 isolat bakteri dari *N. mirabilis* dan melaporkan bahwa bakteri asal *N. mirabilis* mampu memproduksi enzim protease. Tujuan penelitian adalah mengkarakterisasi bakteri dari perakaran *N. mirabilis*, khususnya karakter fisiologi dan kemampuan antagonisnya terhadap *F. oxysporum*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan lokasi penelitian

Sampel *N. mirabilis* diambil dari Hutan Penelitian Kota Tarakan (Kalimantan Utara, Indonesia). Selanjutnya, isolasi bakteri dan pengujian *in vitro* dilakukan di Laboratorium Perlindungan Tanaman, Universitas Borneo Tarakan, Indonesia. Penelitian dilaksanakan sejak Oktober sampai November 2017.

Isolasi bakteri asal akar *N. mirabilis*

Bakteri diisolasi dari bagian akar *N. mirabilis* yang tumbuh di Hutan Penelitian Kota Tarakan mengikuti metode yang dideskripsikan oleh Pradana *et al.* (2015) yang telah dimodifikasi (tanpa sterilisasi permukaan). Sampel akar dibilas dengan hati-hati menggunakan akuades steril untuk membersihkan partikel-partikel tanah yang menempel. Selanjutnya, sampel dikeringkan menggunakan kertas tisu steril.

Sebanyak 1 g sampel dimaserasi menggunakan mortar steril dengan penambahan akuades steril 1:10 (w/v). Medium *Nutrient Agar* (NA) 20 % dibuat dengan melarutkan 1,6 g medium *Nutrient Broth* (NB) (Merck, Jerman) dan 18 g agar-agar bakto ke dalam 1.000 ml akuades. Sebanyak 0,1 ml suspensi hasil maserasi kemudian diratakan pada medium *Nutrient Agar* (NA) 20 % lalu diinkubasi selama 72 jam pada suhu 27 °C. Koloni bakteri yang tumbuh kemudian dimurnikan pada medium *Nutrient Agar* (NA). Koloni bakteri yang telah dimurnikan kemudian digunakan untuk pengujian selanjutnya.

Isolat bakteri yang diperoleh disimpan di dalam *tube endorf* pada medium *Nutrient Broth* (NB) yang mengandung 40 % gliserol, dan disimpan pada suhu 4 °C sampai digunakan untuk uji selanjutnya (Munif *et al.* 2012).

Pengujian reaksi hipersensitif

Isolat bakteri yang telah dimurnikan ditumbuhkan pada medium *Nutrient Agar* (NA), dan diinkubasi selama 48 jam. Koloni yang tumbuh kemudian dipanen menggunakan 2 ml akuades steril. Sebanyak 250 µl suspensi yang terbentuk kemudian diinfiltrasikan ke bagian bawah lamina daun tembakau menggunakan *disposable syringe* ukuran 1 ml tanpa menggunakan jarum. Daun tembakau kemudian diinkubasi selama 48 jam. Tanaman tembakau yang digunakan adalah varietas Kemloko 3, berumur 3 bulan, dan daun yang digunakan untuk pengujian reaksi hipersensitif adalah daun ke-4 sampai dengan ke-6 dari atas. Isolat yang menyebabkan nekrosis pada daun tembakau dalam waktu 48 jam tidak digunakan pada pengujian selanjutnya karena berpotensi sebagai patogen tanaman (Klement dan Goodman 1967).

Pengujian aktifitas hemolisis

Isolat bakteri yang tidak menyebabkan reaksi hipersensitif pada pengujian sebelumnya digunakan pada pengujian ini. Isolat bakteri ditumbuhkan pada medium *Blood Agar* (BA) dan diinkubasi selama 48 jam.

Bakteri yang menghasilkan toksin α -hemolisis akan membentuk zona gelap, yang menghasilkan toksin β -hemolisis akan membentuk zona terang, dan yang menghasilkan toksin $\alpha\beta$ -hemolisis akan membentuk zona terang diikur agak gelap di sekitar koloni (Payment *et al.* 1994). Isolat yang memproduksi toksin α -hemolisis β -hemolisis, dan $\alpha\beta$ -hemolisis akan didestruksi dan isolat yang tidak memproduksi toksin hemolisis akan digunakan pada pengujian selanjutnya.

Karakterisasi fenotip koloni bakteri

Isolat bakteri yang tidak menimbulkan reaksi hipersensitif dan tidak memproduksi toksin hemolisis kemudian diamati karakter fenotipnya. Karakter yang diamati adalah bentuk koloni, ukuran, tekstur, warna, dan elevasi (Munif *et al.* 2012).

Karakterisasi Gram menggunakan KOH

Koloni bakteri diletakkan di atas gelas objek yang telah diberi 1-2 tetes larutan KOH 3 % dengan menggunakan lup inokulasi. Isolat bakteri dicampur dengan KOH 3 % hingga merata. Reaksi Gram negatif (-) ditunjukkan dengan adanya lendir yang ikut terangkat pada lup inokulasi (Gregerse 1978).

Sumber isolat *Fusarium oxysporum*

Isolat *F. oxysporum* diisolasi dari perakaran tanaman tomat yang menunjukkan gejala layu. Sebanyak 1 g akar tanaman tomat dibersihkan dengan air, lalu digerus menggunakan 10 ml akuades steril. Suspensi yang terbentuk diencerkan sampai pengenceran 10^{-4} . Suspensi hasil pengenceran kemudian diambil 0,1 ml untuk dikulturkan pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA). Cendawan yang tumbuh kemudian dimurnikan dan dikarakterisasi berdasarkan bentuk makrokonidianya. Isolat yang memiliki karakter

F. oxysporum dikonfirmasi sifat patogeniknya melalui metode *Postulat Koch*. Isolat cendawan yang terkonfirmasi sebagai *F. oxysporum* kemudian dikulturkan pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) dengan metode agar miring dan diamati reaksinya, dan disimpan pada suhu 4 °C (Nugroho 2010).

4.2 Kemampuan bakteri dalam menghambat pertumbuhan *Fusarium spp.* secara *in vitro*

Pengujian dilakukan pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) dengan metode *dual culture*. Isolat bakteri ditumbuhkan pada bagian tengah cawan petri, kemudian cendawan *F. oxysporum* ditumbuhkan pada ¼ bagian dari cawan petri yang sama. Jari-jari pertumbuhan *F. oxysporum* yang tumbuh ke arah bakteri dan ke arah yang berlawanan dengan bakteri diukur pada hari ke-5 setelah pengujian dilakukan. Sebagai kontrol, cendawan *F. oxysporum* ditumbuhkan pada cawan petri yang bagian tengahnya diolesi akuades steril. Hasil pengukuran kemudian dimasukkan ke dalam rumus berikut:

$$P = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100 \%$$

eterangan Note :

- 1) persentase penghambatan pertumbuhan (%); Percentage of growth retardation (%).
 - 2) jarak jari-jari miselium hingga tepi cawan petri (cm); Mycelium radius distance to the edge of the petridish (cm).
 - 3) jarak jari-jari miselium hingga tepi zona hambat (cm); Mycelium radius distance to the edge of the inhibition zone (cm).
- Sumber : Pradana et al. 2015.

4.3 Karakterisasi sifat fisiologis bakteri

Aktivitas proteolitik diuji pada medium *Skim Milk Agar* (SMA) yang terdiri atas 10 g susu sapi pada 500 ml medium *Natrium Agar* (NA). Isolat bakteri digores pada media *Skim Milk Agar* (SMA) kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 27 °C. Aktivitas proteolitik ditandai dengan munculnya zona bening di sekitar koloni setelah 48 jam pengujian (Sessitsch et al. 2004).

Aktivitas kitinolitik diuji pada medium *Kitin Agar* yang terdiri atas 15 g agar-agar bakto; 2 g pepton; 10 g koloidal kitin; 0,5 g CaCl_2 ; 0,5 g MgSO_4 ; 0,5 g NaCl dalam 1 s liter akuades. Isolat bakteri digores pada media uji dan

diinkubasi selama 5 hari pada suhu 27 °C. Aktivitas kitinolitik ditandai dengan munculnya zona bening di sekitar koloni setelah 5 hari pengujian (Quecine et al. 2008).

Kemampuan bakteri dalam menghasilkan senyawa volatil HCN diuji menggunakan medium spesifik yaitu *Nutrient Agar* (NA) yang telah ditambahkan dengan 4,4 g glisin. Isolat bakteri ditumbuhkan pada media dan diinkubasi selama 7 hari. Pada bagian tutup cawan petri ditempel kertas saring yang telah direndam menggunakan *Cyanide Detection Solution* (CDS) yang tersusun atas 8 g sodium karbonat di dalam 200 ml akuades steril. Perubahan warna kertas saring dari kuning menjadi jingga atau kecokelatan menunjukkan bakteri mampu memproduksi senyawa HCN (Lorck 1948).

Kemampuan bakteri dalam melarutkan fosfat diuji pada medium *Pikovskaya Agar* (Himedia, India). Isolat bakteri ditumbuhkan pada medium uji dan diinkubasi selama 5 hari pada suhu 27 °C. Aktivitas melarutkan fosfat ditunjukkan dengan munculnya zona bening di sekitar koloni setelah 5 hari pengujian (Sharma et al. 2011).

Analisis data

Data dianalisis secara deskriptif dengan menjelaskan hasil dari setiap pengujian yang dilakukan dalam bentuk tabel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan uji keamanan hayati

Sebanyak 26 isolat bakteri berhasil diisolasi dan dimurnikan. Berdasarkan hasil penelitian diketahui sebanyak 14 isolat mampu menyebabkan reaksi hipersensitif. Reaksi hipersensitif ditandai dengan munculnya nekrosis pada daun tanaman tembakau yang diinfiltrasi menggunakan isolat yang diuji. Selanjutnya, pengujian aktivitas hemolisis yang menunjukkan 1 isolat mampu menghasilkan toksin α hemolisis, dan 1 isolat lainnya mampu menghasilkan toksin β hemolisis. Dari 26 isolat yang diuji, terdapat 16 isolat yang tidak dapat digunakan pada pengujian selanjutnya karena memiliki potensi sebagai patogen bagi tumbuhan dan manusia. Pada

pengujian selanjutnya hanya digunakan 10 isolat bakteri yang aman, yaitu isolat Mrb2, Mrb3, Mrb4, Mrb6, Mrb8, Mrb9, Mrb15, Mrb16, Mrb18 dan Mrb21 (Tabel 1).

Reaksi hipersensitif (HR) merupakan salah satu mekanisme pertahanan tanaman dalam melokalisir penyebaran patogen (Klement dan Goodman 1967). Secara umum terdapat 3 tahapan

Tabel 1. Hasil pengujian reaksi hipersensitif dan aktivitas hemolisis isolat bakteri asal akar *N. Mirabilis*.

Table 1. Test results for hypersensitivity reactions and hemolysis activity of bacterial isolates from roots of *N. mirabilis*.

Isolat	Uji reaksi hipersensitif	Uji aktivitas hemolisis
Mrb1	+	x
Mrb2	-	-
Mrb3	-	-
Mrb4	-	-
Mrb5	-	β
Mrb6	-	-
Mrb7	+	x
Mrb8	-	-
Mrb9	-	-
Mrb10	+	x
Mrb11	+	x
Mrb12	+	x
Mrb13	+	x
Mrb14	+	x
Mrb15	-	-
Mrb16	-	-
Mrb17	+	x
Mrb18	-	-
Mrb19	-	α
Mrb20	+	x
Mrb21	-	-
Mrb22	+	x
Mrb23	+	x
Mrb24	+	x
Mrb25	+	x
Mrb26	+	x

Keterangan/Note :

- + : Menyebabkan nekrotik pada daun tanaman tembakau/Caused necrotic on tobacco leaves.
- : Tidak menyebabkan gejala nekrotik atau tidak memproduksi toksin hemolisis/Did not cause necrotic on tobacco leaves or did not produce hemolysis toxins.
- α : Mampu memproduksi toksin α-hemolisis/Able to produce α-hemolysis toxins.
- β : Mampu memproduksi toksin β-hemolisis/Able to produce β-hemolysis toxins.
- x : Tidak diuji karena menimbulkan reaksi hipersensitif pada pengujian sebelumnya/not tested due a hypersensitive reaction

yang terjadi pada mekanisme Reaksi hipersensitif (HR): (1) fase induksi, (2) fase laten, dan (3) fase kolaps. Gen Avr diantarkan kedalam sel inang dengan mekanisme sekresi khusus sehingga menyebabkan rusaknya membran sel tengah sel tanaman. Mekanisme ini menyebabkan sel inang pada daerah yang terinokulasi patogen mengalami kolaps dan mengering (nekrosis) (Balint-Ku 2019). Isolat bakteri yang menyebabkan reaksi hipersensitif tidak dapat digunakan sebagai agen hayati karena berpotensi memiliki sifat patogen yang dapat membahayakan tanaman dan menyebabkan kerusakan ekosistem.

Hemolisis merupakan fenomena rusaknya jaringan darah akibat lepasnya haemoglobin dari stroma eritrosit (butir darah merah). Fenomena hemolisis dapat dipicu oleh beberapa faktor seperti adanya pelarut organik, saponin, garam empedu, sabun, enzim, toksin, dan faktor-faktor lainnya yang dapat merusak komplek lemak-protein di stroma. Terdapat 3 jenis hemolisis yang dapat disebabkan oleh bakteri, yaitu β-hemolisis dan α-hemolisis. β-hemolisis merupakan lisis lengkap sel darah merah dan haemoglobin, sedangkan α-hemolisis merupakan lisis parsial atau lisis sebagian dari sel darah merah dan haemoglobin. Bakteri yang mampu menghasilkan toksin hemolisin berpotensi membahayakan kesehatan manusia karena dapat merusak sel darah merah (Guillaud *et al.* 2012).

Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Mardhiana *et al.* (2017) yang mengisolasi bakteri endofit dari akar *Cyperus rotundus* juga ditemui beberapa isolat yang mampu menyebabkan reaksi hipersensitif dan memproduksi toksin hemolisin. Penelitian lain yang dilakukan oleh Wiratno *et al.* (2019) yang mengisolasi bakteri endofit dari akar *P. nigrum* juga terdapat beberapa isolat yang menyebabkan reaksi hipersensitif dan memproduksi toksin hemolisin. Pada kedua studi tersebut, isolat yang berpotensi sebagai patogen tumbuhan dan membahayakan manusia tidak digunakan pada pengujian selanjutnya.

Karakter morfologi dan Gram isolat bakteri

Dari 10 isolat bakteri yang aman digunakan sebagai agens hayati, seluruhnya

memiliki karakter fenotip yang berbeda. Sebanyak 1 isolat memiliki warna dasar putih, dan 1 isolat lainnya memiliki warna dasar cokelat. Berdasarkan bentuknya, 6 isolat memiliki bentuk *irregular*, 1 isolat memiliki bentuk *circular*, dan 1 lainnya memiliki bentuk *spindle*. Berdasarkan pengamatan elevasi koloni, diketahui 1 isolat memiliki elevasi *flat*, 4 isolat berelevasi *convex*, 1 isolat berelevasi *punctate*, dan 4 isolat berelevasi *raised*. Sebagian besar isolat bakteri memiliki karakter tepian koloni *entire* (7 isolat), dan 3 lainnya memiliki karakter tepian koloni *undulate*. Ukuran koloni bakteri yang diamati cukup beragam, 2 isolat memiliki ukuran *punctiform*, 3 isolat berukuran *small*, 5 isolat memiliki ukuran *moderate*. Lebih lanjut, sebanyak 1 isolat teridentifikasi memiliki gram negatif, dan 9 isolat lainnya memiliki gram positif (Tabel 2).

Karakter fenotip merupakan hasil interaksi antara karakter genotip dengan lingkungan. Gen-gen tertentu karakter fenotip akan aktif pada kondisi lingkungan yang cocok. Munif *et al.* (2019) mengisolasi bakteri endofit dari tanaman *Centrosema*, sebagian besar isolat yang diperoleh memiliki karakter fenotip yang berbeda. Sebagian karakter fenotip bakteri endofit telah melalui isolasi dan dikarakterisasi dari perakaran tanaman mangrove yang dilaporkan Oktafiyanto *et al.* (2018). Kedua hasil penelitian tersebut sejalan dengan hasil penelitian ini yang memperoleh isolat bakteri dengan karakter yang berbeda-beda.

Antagonisme bakteri terhadap *Fusarium oxysporum*

Dari 10 isolat bakteri yang diuji, semuanya mampu menghambat pertumbuhan

F. oxysporum secara *in vitro*. Penghambatan tertinggi ditunjukkan berturut-turut oleh isolat Mrb16 (67 %), Mrb6 (60 %), dan Mrb2 (5 %) (Gambar 1). Selain ketiga isolat tersebut, isolat lainnya tidak menunjukkan aktifitas penghambatan *F. oxysporum* secara *in vitro* (Tabel 3).

Agens hayati dari golongan bakteri dilaporkan mampu menghambat pertumbuhan patogen melalui beberapa mekanisme, salah satunya adalah mekanisme antibiosis. Antibiosis merupakan mekanisme antagonis oleh agens hayati dengan memproduksi metabolit sekunder berupa antibiotik atau senyawa metabolit sekunder yang mirip antibiotik seperti enzim lisis, senyawa volatil, siderofor, atau senyawa lainnya (Haggag

Tabel 3. Kemampuan bakteri asal akar *N. mirabilis* dalam menghambat pertumbuhan *F. oxysporum* secara *in vitro*.
Table 3. The ability of bacteria from roots of *N. mirabilis* in inhibiting the growth of *F. oxysporum* *in vitro*.

Isolat	Penghambatan pertumbuhan (%)
Mrb2	5
Mrb3	-
Mrb4	-
Mrb6	60
Mrb8	-
Mrb9	-
Mrb15	-
Mrb16	67
Mrb18	-
Mrb21	-

Keterangan/Note :
- = Tidak mampu menghambat pertumbuhan *Fusarium* spp./Did not inhibit the growth of *Fusarium* spp.

Tabel 2. Karakter fenotip dan Gram bakteri antagonis asal perakaran tanaman *N. mirabilis*.
Table 2. Phenotypic and Gram character of antagonistic bacteria from roots of *N. mirabilis*.

Isolat	Warna	Bentuk	Elevasi	Tepian	Ukuran	Gram
Mrb1	Putih kekuningan	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	<i>Moderate</i>	-
Mrb2	Cokelat muda	<i>Circular</i>	<i>Convex</i>	<i>Entire</i>	<i>Punctiform</i>	+
Mrb3	Putih kecokelatan	<i>Irregular</i>	<i>Pulvinate</i>	<i>Undulate</i>	<i>Small</i>	+
Mrb4	Putih kekuningan	<i>Irregular</i>	<i>Raised</i>	<i>Undulate</i>	<i>Moderate</i>	-
Mrb5	Putih cerah	<i>Irregular</i>	<i>Convex</i>	<i>Entire</i>	<i>Moderate</i>	+
Mrb6	Putih transparan	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	<i>Entire</i>	<i>Punctiform</i>	+
Mrb7	Putih	<i>Irregular</i>	<i>Convex</i>	<i>Undulate</i>	<i>Moderate</i>	+
Mrb8	Putih	<i>Circular</i>	<i>Convex</i>	<i>Entire</i>	<i>Small</i>	+
Mrb9	Putih kekuningan	<i>Spindle</i>	<i>Raised</i>	<i>Entire</i>	<i>Moderate</i>	+
Mrb10	Putih kemerahan	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	<i>Entire</i>	<i>Small</i>	-



Gambar 1. Hasil uji antagonis bakteri asal akar *N. mirabilis* dalam menghambat pertumbuhan *Fusarium* spp. secara *in vitro*.

Figure 1. The antagonistic test result of bacteria from roots of *N. mirabilis* in inhibiting the growth of *Fusarium* spp. *in vitro*.

dan Mohamed 2007; Prihatiningsih *et al.* 2015). Antibiotik merupakan senyawa organik dengan berat molekul rendah yang dihasilkan sebagai metabolit sekunder dan bersifat menghambat mikroorganisme lainnya dalam konsentrasi yang rendah (Walsh dan Wencewicz 2014). Prihatiningsih *et al.* (2015) melaporkan bakteri *Bacillus subtilis* strain B315 mampu menghasilkan senyawa antibiosis dan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Ralstonia solanacearum* secara *in vitro*. Umumnya, mekanisme antibiosis ditunjukkan dengan munculnya zona bening di sekitar koloni bakteri yang memiliki kemampuan antibiosis. Tanda lainnya adalah dengan terhambatnya pertumbuhan suatu patogen ke arah agens hayati yang memproduksi senyawa antibiosis (Prihatiningsih *et al.* 2015).

Mekanisme antibiosis oleh bakteri asal perakaran tanaman telah dilaporkan pada penelitian-penelitian sebelumnya. Pradana *et al.* (2015) berhasil mengisolasi 21 isolat bakteri asal perakaran tanaman *Rhoeo discolor* dan 7 isolat diantaranya mampu menghambat pertumbuhan *F. oxysporum* secara *in vitro* melalui mekanisme antibiosis. Wiratno *et al.* (2019) yang mengisolasi bakteri endofit asal akar tanaman lada juga melaporkan beberapa isolat bakteri yang berhasil diisolasi efektif menekan pertumbuhan *F. oxysporum* secara *in vitro* melalui mekanisme

antibiosis. Hasil penelitian Pradana *et al.* (2015) dan Wiratno *et al.* (2019) di atas selaras dengan hasil yang diperoleh dari penelitian ini, yaitu beberapa bakteri asal perakaran tumbuhan dapat menghambat pertumbuhan patogen melalui mekanisme antibiosis.

Aktifitas fisiologi bakteri asal perakaran *N. mirabilis*

Hasil pengujian aktifitas fisiologi menunjukkan terdapat 4 isolat yang memiliki aktifitas proteolitik, 5 isolat memiliki aktifitas kitinolitik, 6 isolat mampu melarutkan fosfat, dan 4 isolat mampu memproduksi senyawa volatil HCN (Tabel 4).

Isolat bakteri dinyatakan memiliki aktifitas proteolitik apabila mampu memproduksi enzim protease ekstraseluler. Enzim protease atau sering disebut proteinase adalah enzim golongan hidrolase yang mampu memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana seperti oligo peptida pendek atau asam amino (Das dan Prasad 2010). Isolat bakteri dinyatakan memiliki aktifitas kitinolitik apabila mampu memproduksi enzim kitinase ekstraseluler. Kitinase adalah enzim yang akan mengkatalisis pemecahan senyawa polimer kitin pada ikatan glikosidik β -1,4. Enzim kitinase

Tabel 4. Aktivitas fisiologi bakteri antagonis asal perakaran *N. mirabilis*.

Tabel 4. *Physiological activities of antagonistic bacteria from N. mirabilis roots.*

Kode Isolat	Proteolitik	Kitinolitik	Melarutkan Fosfat	Produksi HCN
Mrb2	-	+	-	-
Mrb3	-	+	-	-
Mrb4	-	+	+	+
Mrb6	+	+	+	-
Mrb8	-	-	+	-
Mrb9	+	-	-	+
Mrb15	+	-	-	-
Mrb16	+	+	+	+
Mrb18	-	-	+	-
Mrb21	-	-	+	+

Keterangan/Note :

→ Menunjukkan aktivitas/Indicates activity.

→ Tidak menunjukkan aktivitas/No activity.

mampu menghidrolisa senyawa polimer kitin menjadi kitin oligosakarida atau monomer N-asetil glukosamin dengan menghidrolisis kitin secara langsung pada ikatan glikosidik (Dahiya *et al.* 2006).

Enzim protease, enzim kitinase, dan HCN merupakan senyawa yang diproduksi pada mekanisme antibiosis. Satu agens hayati dapat memproduksi salah satu atau lebih dari ketiga senyawa di atas (Sivasakthi *et al.* 2014). Penelitian yang dilakukan oleh Wiratno *et al.* (2019) menyatakan bahwa isolat bakteri yang memproduksi enzim kitinase efektif dalam menghambat perkembangan *Fusarium* spp. Tan *et al.* (2015) juga melaporkan bakteri endofit yang memiliki aktifitas proteolitik mampu menghambat perkembangan *Fusarium* spp. secara in vitro. Selanjutnya, bakteri yang memproduksi HCN juga dilaporkan efektif dalam menghambat pertumbuhan *Fusarium* spp. secara *in vitro* (Wiratno *et al.* 2019).

Enzim protease dan kitinase dilaporkan mampu mendegradasi dinding sel *Fusarium* spp. (Rahma dan Rabeeth 2010). Dinding sel cendawan patogen tanaman umumnya terdiri dari bahan organik yang melekat pada gula, protein, lipid, dan berbagai polisakarida. Kerusakan dinding sel akan menghambat pertumbuhan *Fusarium* spp. (Rahma dan Rabeeth 2010). Komponen-komponen penyusun dinding sel memiliki peran yang besar dalam transportasi nutrisi, degradasi substrat, dan

komunikasi (*signalling*) (Quecine *et al.* 2008; Tang-um dan Niamsup 2012). Sekitar 80 % dinding sel cendawan patogen tanaman terdiri atas polisakarida. Struktur serat yang terdapat pada dinding sel cendawan tersusun atas chitin, chitosan, β -glukan, dan berbagai heteropolysaccharides (Bartnicki-Garcia dan Lippman 1989; Bowman dan Free 2006).

Diduga kemampuan bakteri asal *N. mirabilis* dalam menghambat pertumbuhan *Fusarium* spp. ada kaitannya dengan kemampuannya memproduksi enzim ekstraseluler dan senyawa HCN. Isolat Mrb16 mampu memproduksi enzim protease, enzim kitinase, dan HCN. Isolat Mrb6 mampu memproduksi enzim kitinase dan protease. Isolat Mrb2 mampu memproduksi enzim kitinase (Tabel 4).

Agens hayati juga diketahui memiliki peran ganda, selain mampu melindungi tanaman dari infeksi patogen, juga mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman melalui berbagai mekanisme (Santoyo *et al.* 2012). Bakteri pelarut fosfat dapat melarutkan fosfat dari ikatan fosfat tak larut melalui mekanisme sekresi asam-asam organik atau mineralisasi fosfat dari bentuk ikatan fosfat-organik menjadi fosfat-anorganik (Chen *et al.* 2006). Beberapa isolat bakteri pelarut fosfat memiliki kemampuan sebagai agens pemacu pertumbuhan dan juga sebagai agens hayati (Vassilev *et al.* 2006).

KESIMPULAN

Terdapat 10 isolat bakteri asal perakaran *N. mirabilis* dengan karakter fisiologi yang beragam, yakni mampu memproduksi enzim protease, enzim kitinase, senyawa volatil HCN atau melarutkan fosfat. Tiga isolat diantaranya bersifat antagonis terhadap *F. oxysporum*, yang ditunjukkan dengan kemampuan menghambat pertumbuhan *F. oxysporum* secara *in vitro*. Ketiga isolat tersebut adalah isolat Mrb16 dengan kemampuan penghambatan 67 %, Mrb6 (60 %), dan Mrb2 (5 %).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Mukhammad Johannari, S.P. dan Megariana Mangande, S.P. atas bantuannya selama proses penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Anitha, A. & Rabeeth, M. (2010) Degradation of Fungal Cell Walls of Phytopathogenic Fungi by Lytic Enzyme of *Streptomyces griseus*. *African Journal of Plant Science*. 4 (3), 61-66.
- Balint-Kurti, P. (2019) The Plant Hypersensitive Response: Concepts, Control and Consequences. *Molecular Plant Pathology*. 20 (8), 1163-1178. doi:10.1111/mpp.12821.
- Bartnicki-Garcia, S. & Lippman, E. (1989) Fungal Cell Wall Composition. *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press, 381-404.
- Bhore, S.J., Komathi, V. & Kandasamy, K.I. (2013) Diversity of Endophytic Bacteria in Medicinally Important *Nepenthes* Species. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*. 4 (2), 431-434. doi:10.4103/0976-9668.117022.
- Bowman, S.M. & Free, S.J. (2006) The Structure and Synthesis of the Fungal Cell Wall. *Bioessays*. 28 (8), 799-808. doi:10.1002/bies.20441.
- Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A. & Young, C. (2006) Phosphate Solubilizing Bacteria from Subtropical Soil and Their Tricalcium Phosphate Solubilizing Abilities. *Applied Soil Ecology*. 34 (1), 33-41. doi:10.1016/j.apsoil.2005.12.002.
- Dahiya, N., Tewari, R. & Hoondal, G.S. (2006) Biotechnological Aspects of Chitinolytic Enzymes: A Review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71 (6), 773-782. doi:10.1007/s00253-005-0183-7.
- Daras, U. & Pranowo, D. (2017) Kondisi Kiri Lada Putih Bangka Belitung dan Alternatif Pemulihannya. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian*. 28 (1), 1-6.
- Das, G. & Prasad, M.P. (2010) Isolation Purification & Mass Production of Protease Enzyme from *Bacillus subtilis*. *International Research Journal of Microbiology*. 1 (2), 26-31.
- Fravel, D., Olivain, C. & Alabouvette, C. (2003) *Fusarium oxysporum* and its Biocontrol. *New Phytologist*. 157 (3), 493-502. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00700.x.
- Gregersen, T. (1978) Rapid Method for Distinction of Gram-negative from Gram-positive Bacteria. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 5 (2), 123-127. doi:10.1007/BF00498806.
- Guillaud, C., Loustau, V. & Michel, M. (2012) Hemolytic Anemia in Adults: Main Causes and Diagnostic Procedures. *Expert Review of Hematology*. 5 (2), 229-241. doi:10.1586/ehm.12.3.
- Haggag, W.M. & Mohamed, H.A.A. (2007) Biotechnological Aspects of Microorganisms used in Plant Biological Control. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*. 1 (1), 7-12.
- Ilma, S., Rohman, F. & Ibrohim, I. (2014) Analisis Vegetasi *Nepenthes spp.* di Hutan Penelitian Universitas Borneo Tarakan. In: *Proceeding Biology Education Conference: Biology, Science, Environmental, and Learning*. 11 (1), pp. 284-289.
- Klement, Z. & Goodman, R.N. (1967) The Hypersensitive Reaction to Infection by Bacterial Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 5 (1), 17-44.
- Larkin, R.P. & Fravel, D.R. (1998) Efficacy of Various Fungal and Bacterial Biocontrol Organisms for Control of *Fusarium* wilt of Tomato. *Plant Disease*. 82 (9), 1022-1028. doi:10.1094/PDIS.1998.82.9.1022.
- Li, W-P., Li S-J., Li J-C., Ye G-C., Zhu L-F., Wang X-X., An W-X., Yang L. & Liu Y. (2012) Isolation and Identification of the

- Protease Producing Endophyte Bacteria from *Nepenthes mirabilis*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*. 32 (12), 2551-2555.
- Chi, L.D., Mao, L.G., Yan, D.D., Wu, Z.F., Ma, T.T., Guo, M.X., Wang, Q.X., Ouyang, C.B. & Cao, A.C. (2014) First Report of Ginger Rhizome Rot Caused by *Fusarium oxysporum* in China. *Plant Disease*. 98 (2), 282. doi:10.1094/PDIS-07-13-0729-PDN.
- Costa, R. (1948) Production of Hydrocyanic Acid by Bacteria. *Physiologia Plantarum*. 1 (2), 140-146. doi:10.1111/j.1399-3054.1948.tb07118.x.
- Prasad, M.N.V., Rajkumar, M. & Freitas, R. (2011) Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Endophytes Accelerate Phytoremediation of Metalliferous Soils. *Biotechnology Advances*. 29 (2), 248-258. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.12.001.
- Mardhiana, Ankardiansyah, P.P., Adiwena, Muh., Dwi, S., Rizza, W., & Aditya, M. (2017) Use of Endophytic Bacteria from Roots of *Cyperus rotundus* for Biocontrol of *Meloidogyne incognita*. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 18 (4), 1308-1315. doi:10.13057/biodiv/d180404.
- Abdul, Supramana, Elis, N.H. & Ankardiansyah, P.P. (2019) Endophytic Bacterial Consortium Originated from Forestry Plant Roots and Their Nematicidal Activity Against *Meloidogyne incognita* Infestation in Greenhouse. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 67 (5), 1171-1182. doi:10.11118/actaun201967051171
- Hallmann, J. & Sikora, R.A. (2012) Isolation of Root Endophytic Bacteria from Tomato and its Biocontrol Activity Against Fungal Diseases. *Microbiology Indonesia*. 6 (4), 148-156. doi:10.5454/mi.6.4.2.
- A. & Sulistiawati, I. (2014) Pengelolaan Penyakit Kuning pada Tanaman Lada oleh Petani di Wilayah Bangka. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. 10 (1), 8-16. doi:10.14692/jfi.10.1.8.
- Agusri, E.S. (2010) Karakterisasi Biologi Isolat-isolat *Fusarium* sp pada Tanaman Cabai Merah (*Capsicum annum* L.) asal Boyolali. [Disertasi]. Universitas Sebelas Maret, Indonesia.
- M.F., Munif, A. & Mutaqin, K.H. (2018) Aktivitas Antagonis Bakteri Endofit asal Mangrove terhadap *Ralstonia solanacearum* dan *Meloidogyne* spp. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. 14 (1), 23-29. doi:10.14692/jfi.14.1.23.
- Payment, P., Coffin, E. & Paquette, G. (1994) Blood Agar to Detect Virulence Factors in Tap Water Heterotrophic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 60 (4), 1179-1183.
- Prabowo, A.K.E., Prihatiningsih, N. & Soesanto, L. (2006) Potensi *Trichoderma harzianum* dalam Mengendalikan Sembilan Isolat *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *zingiberi* Trujillo pada Kencur. *Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian Indonesia*. 8 (2), 76-84.
- Pradana, A.P., Putri, D. & Munif, A. (2015) Eksplorasi Bakteri Endofit dari Akar Tanaman Adam Hawa dan Potensinya sebagai Agens Hayati dan Pemacu Pertumbuhan Tanaman Padi. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. 11 (3), 73-78. doi:10.14692/jfi.11.3.73.
- Prihatiningsih, N., Arwiyanto, T., Hadisutrisno, B. & Widada, J. (2015) Mekanisme Antibiosis *Bacillus subtilis* B315 untuk Pengendalian Penyakit Layu Bakteri Kentang. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*. 15 (1), 64-71. doi:10.23960/j.hppt.11564-71
- Quecine, M.C., Araujo, W.L., Marcon, J., Gai, C.S., Azevedo, J.L., Pizzirani-Kleiner, A.A. (2008) Chitinolytic Activity of Endophytic *Streptomyces* and Potential for Biocontrol. *Letters in Applied Microbiology*. 47 (6), 486-491. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02428.x.
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M. del C. & Govindappa, M. (2012) Mechanisms of Biocontrol and Plant Growth-promoting Activity in Soil Bacterial Species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: A Review. *Biocontrol Science and Technology*. 22 (8), 855-872. doi:10.1080/09583157.2012.694413.
- Sessitsch, A., Reiter, B. & Berg, G. (2004) Endophytic Bacterial Communities of Field-grown Potato Plants and Their Plant-growth-promoting and Antagonistic Abilities. *Canadian Journal of Microbiology*. 50 (4), 239-249. doi:10.1139/w03-118.
- Sharma, S., Kumar, V. & Tripathi, R.B. (2011) Isolation of Phosphate Solubilizing Microorganism (PSMs) from Soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 1 (2), 90-95.