

Isolasi Bakteri Endofit pada Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale* Linn. Var *Rubrum*) Penghasil Senyawa Antioksidan

Okky Triana^a, Purbowatiningrum Ria Sarjono^{a,*}, Nies Suci Mulyani^a

^a Biochemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

* Corresponding author: purbowatining@live.undip.ac.id

Article Info

Keywords:

endophytic bacteria, antioxidants, red ginger (*Zingiber officinale* Linn. Var *rubrum*)

Kata kunci:

Bakteri endofit, Antioksidan, jahe merah (*Zingiber officinale* Linn. Var *rubrum*)

Abstract

This research has been done about solation of Endophytic Bacteria on Rhizome Red Ginger (*Zingiber officinale* Linn. Var *rubrum*) as producer of antioxidan compounds. The purpose of this research is to obtain isolates of endophytic bacteria in symbiosis with red ginger rhizome, obtain data antioxidant activity by DPPH method and find out information about the chemical content of secondary metabolites of endophytic bacteria. The method used in this study are surface sterilization and spreading on YMA medium followed by antioxidant activity is analyzed by using DPPH radical scavenging method and phytochemical screening. This study resulted in three isolates of endophytic bacteria isolates namely J₁, J₂ isolates and isolates J₃ which has a different cell morphology as well as having the most effective antioxidant activity at concentrations of 31.25 ppm with values % inhibition on isolates J₁, J₂ and J₃, respectively for 22,71%; 20.86% and 13.08% and all the secondary metabolites of endophytic bacterial isolates contain flavonoids and saponins.

Abstrak

Telah dilakukan penelitian mengenai isolasi bakteri endhofit pada jahe merah (*zingiber officinale linn. var rubrum*) penghasil senyawa antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat bakteri endofit yang bersimbiosis dengan rimpang jahe merah, memperoleh data aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan mengetahui informasi mengenai kandungan kimia metabolit sekunder bakteri endofit. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah *surface sterilization* dan *spreading* pada media YMA dilanjutkan dengan uji aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal DPPH dan penapisan fitokimia. Tahapan penelitian ini meliputi isolasi bakteri endofit yang bersimbiosis dengan rimpang jahe, produksi metabolit sekunder isolat bakteri endofit, uji aktivitas antioksidan dan penapisan fitokimia. Penelitian ini menghasilkan tiga isolat bakteri endofit yaitu isolat J₁, isolat J₂ dan isolat J₃ yang memiliki morfologi sel berbeda serta memiliki aktivitas antioksidan yang paling efektif pada konsentrasi 31,25 ppm dengan nilai % inhibisi pada isolat J₁, J₂ dan J₃ berturut-turut sebesar 22,71% ; 20,86% dan 13,08% dan semua metabolit sekunder isolat bakteri endofit memiliki kandungan flavanoid dan saponin.

1. Pendahuluan

Penyakit yang timbul akhir-akhir ini disebabkan karena adanya radikal bebas. Maka dari itu tubuh memerlukan suatu substansi untuk menangkap radikal bebas yang bisa disebut dengan antioksidan. Menurut Ito *dkk.* [1] antioksidan sintetik memiliki efek samping yaitu dapat menimbulkan karsinogenik dalam konsentrasi yang berlebih, maka dari itu penggunaan antioksidan alami sangat potensial untuk dikembangkan.

Antioksidan dapat dihasilkan dari bakteri endofit yang bersimbiosis pada tumbuhan yang juga memiliki aktivitas antioksidan [2]. Hal ini dikarenakan adanya pertukaran genetik dan hubungan evolusi yang panjang.

Rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Linn. *Var Rubrum*) diketahui mempunyai beberapa senyawa yang berperan pada aktivitas antioksidan. Menurut Aruoma *dkk.* [3] senyawa bioaktif yang berperan sebagai antioksidan dalam jahe merah meliputi β -karoten, asam askorbat, terpenoid, alkaloid, dan polifenol seperti flavonoid, glikosida flavonoid, rutin, dll. Tanaman jahe merah dimungkinkan memiliki bakteri endofit yang berpotensi menghasilkan antioksidan.

Penelitian terdahulu melaporkan aktivitas antimikroba metabolit sekunder mikroba endofit yang diisolasi dari akar jahe merah, namun sampai saat ini belum pernah dilaporkan mengenai aktivitas antioksidan metabolit sekunder bakteri endofit dari rimpang jahe merah. Sehingga pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antioksidan dari metabolit sekunder isolat bakteri endofit dan mengetahui kandungan kimia yang terdapat dalam metabolit sekunder tersebut.

2. Metode Penelitian

Alat

Alat yang digunakan antara lain erlenmeyer 250 mL; gelas ukur 100 mL, 50 mL, dan 25 mL; gelas beker 1000 mL, 500 mL, dan 50 mL; labu ukur 1000 mL; tabung reaksi, cawan petri, neraca analitik, spiritus, pengaduk, kaca arloji, kawat ose, micro pipet, shaker, inkas, *spreader*, autoklaf (Clinical Autoclave Pretige Medical Series 2100), *freeze dryer*, mikroskop, sentrifuge (Hettich Zentrifuge Micro 200R) dan spektrofotometer UV-VIS.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Linn *Var. rubrum*), Yeast extract, Dextrosa, Malt Extract Agar, Nystatin, soluble strach, pepton, etanol 70%, kalsium dipoklorit, aquades steril, DPPH, aquades, safranin, alkohol aseton, lugol iodin, pewarna kristal ungu violet, metanol, asam klorida p.a.10%, amoniak p.a 25%, kloroform p.a., kertas saring, pereaksi Dragendorff, pereaksi mayer, serbuk magnesium, amil alkohol p.a., asam klorida p.a. 2 N, ferri klorida p.a 1%, natrium hidroksida p.a. 1 N, anhidrida asam asetat p.a., dietil eter p.a dan asam sulfat p.a.

Preparasi dan Sterilisasi Bahan Baku

Bahan baku jahe merah didapatkan dari perkebunan jahe di daerah Ungaran, Semarang. Metode sterilisasi yang digunakan adalah metode *surface sterilization*. Sampel disterilisasi permukaan dengan cara merendamnya dalam etanol 70% selama 60 detik. Langkah berikutnya perendaman dengan $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 5,25% selama 3 menit, kemudian direndam lagi dengan etanol 70% selama 60 detik. Langkah terakhir adalah pembilasan dengan menggunakan aquades steril secara bertahap dengan pengulangan sebanyak tiga kali [4]. Bagian yang sudah disterilisasi selanjutnya digerus menggunakan mortar secara aseptik untuk mendapatkan ekstrak dari rimpang jahe merah tersebut.

Isolasi Bakteri Endofit

Ekstrak sampel yang telah diperoleh kemudian diambil sebanyak 100 μL , kemudian diinokulasikan secara aseptik pada media *yeast malt agar (YMA)* dan kemudian diinkubasi pada suhu ruang hingga koloni bakteri endofit tumbuh [5]. Berdasarkan perbedaan kenampakan morfologinya, koloni bakteri endofit dapat dipisahkan sehingga mendapatkan isolat tunggal.

Produksi Metabolit Sekunder Isolat Bakteri Endofit

Sebanyak 2 mL kultur hasil peremajaan diinokulasikan pada 200 mL media cair dan diinkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu 25° C. Kultur di panen pada saat fasa stasioner mendekati fasa kematian sesuai dengan hasil kurva pertumbuhan yang didapatkan. Tahap selanjutnya kultur disentrifugasi 5000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dari kultur ini selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan *freeze dryer*.

Uji Aktivitas antioksidan dari metabolit sekunder

Uji aktivitas antioksidan dari metabolit sekunder menggunakan metode DPPH. Setiap sampel dibuat larutan induk 1000 ppm. Setiap sampel diencerkan menjadi 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm dan 31,25 ppm. Setiap konsentrasi sampel dipipet sebanyak 0,2 mL kedalam *microplate* ditambahkan 3,8 mL larutan DPPH. Kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Larutan standar (vitamin C) dibuat dengan konsentration 10 ppm, 5 ppm, 2,5 ppm, 1,25 ppm dan 0,3125 ppm.

Persen inhibisi dapat dihitung dari persamaan:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(c-s)}{c} \times 100\%$$

Keterangan:

S = Absorbansi sampel

C = Absorbansi tidak mengandung sampel

Penapisan Fitokimia

Pengujian senyawa metabolit sekunder dilakukan terhadap ekstrak isolat bakteri endofit rimpang jahe merah dengan tujuan untuk mengetahui kandungan golongan senyawa kimia meliputi uji alkaloid, saponin, flavanoid, tanin, triterpenoid dan steroid dengan menggunakan metode Farnsworth [6].

3. Hasil dan Pembahasan

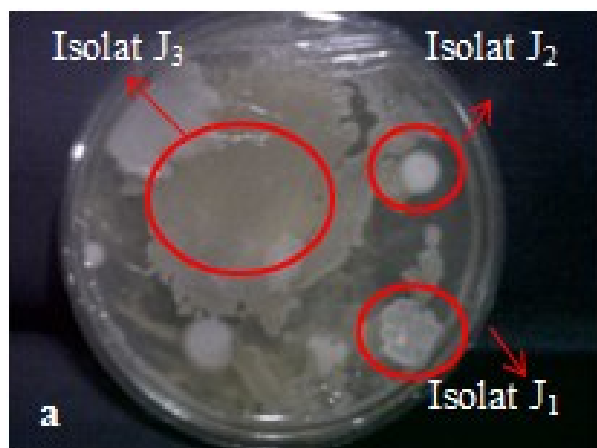
Preparasi dan Sterilisasi Bahan

Sampel tanaman jahe merah (*Z. Officinale Linn. Var Rubrum*) diperoleh dari perkebunan jahe di daerah Ungaran, Semarang. Jahe yang telah diperoleh, selanjutnya disterilisasi permukaan dengan merujuk pada metode [7]. Menurut Purwanto [8], etanol berfungsi untuk mendenaturasi protein bakteri kontaminan sehingga tidak mengganggu proses isolasi. Proses selanjutnya, jahe merah direndam dengan $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 3,125% selama 3 menit. Dalam larutan, *calcium hypochlorite* akan melepaskan radikal klor (Cl) yang mampu merusak membran dan protein bakteri [8]. Perendaman dengan $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ tidak boleh terlalu lama untuk mencegah masuknya $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ melalui pori-pori sampel yang akan mematikan bakteri endofit di dalam sampel. Tahap selanjutnya direndam di dalam $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, kemudian direndam lagi dengan etanol 70% selama 60 detik. Langkah terakhir adalah pembilasan dengan menggunakan aquades steril secara bertahap dengan pengulangan sebanyak tiga kali [4]. Hal ini bertujuan untuk mencuci sisa etanol dan $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ pada tahap sebelumnya.

Sterilisasi permukaan bertujuan untuk menghilangkan bakteri kontaminan yang terdapat pada sampel rimpang jahe merah yang telah diperoleh sehingga bakteri yang diisolasi hanya merupakan bakteri endofit dari rimpang jahe merah tersebut. Bagian yang sudah disterilisasi selanjutnya digerus menggunakan mortar secara aseptik agar bakteri endofit yang terdapat di dalam jaringan jahe merah dapat keluar dan bisa diisolasi. Dengan mendapatkan ekstrak kasar rimpang jahe merah, diharapkan bakteri endofit terdapat di dalamnya dan bisa diisolasi dengan media *Yeast Malt Agar* (YMA).

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit

Isolasi dilakukan selama 72 jam penginkubasian pada suhu ruang. Hasil yang didapat pada tahap isolasi adalah diperoleh 3 isolat bakteri dengan karakteristik koloni berbeda yang diberi nama isolat J_1 , isolat J_2 dan isolat J_3 . Gambar 1 menunjukkan hasil isolasi bakteri endofit dari rimpang jahe merah (*Z.officinale Linn. Var rubrum*)



Gambar 1. Hasil Isolasi Bakteri Endofit pada Ja

Hasil isolasi bakteri endofit dari rimpang jahe merah pada jam ke-72 didapatkan 3 isolat bakteri yang memiliki karakter koloni dan morfologi sel yang berbeda, terlihat pada tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik morfologi isolat bakteri endofit dari rimpang jahe merah

Isolat Koloni	Morfologi				
	Warna	Bentuk	Tepi	Gram (+/-)	Bentuk sel
J1	Putih	Tidak beraturan	Tepian bergelombang	negatif	diplobasil
J2	Putih susu	Bulat	Bulat, bertepi	negatif	streptobasil
J3	Putih bening	Tidak beraturan	Tepian berlekuk	negatif	monobasil

Hasil karakterisasi gram bakteri menunjukkan bahwa ketiga isolat bakteri merupakan bakteri gram negatif. Pengelompokan bakteri ini berdasarkan pada komponen dinding selnya. Bakteri gram negatif memiliki dinding sel yang lebih kompleks daripada bakteri gram positif. Dari data di atas juga memperlihatkan bahwa ketiga isolat menunjukkan bahwa karakter dan morfologi sel berbeda. Sehingga diharapkan memiliki aktivitas antioksidan dari metabolit sekundernya berbeda pula.

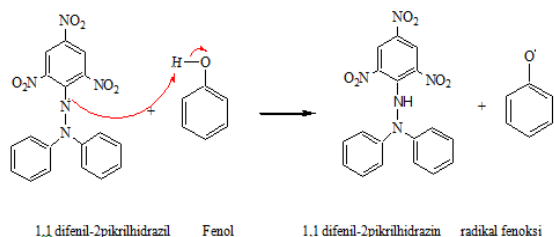
Produksi Metabolit Sekunder Isolat Bakteri Endofit

Tahap Produksi Metabolit Sekunder bertujuan untuk mendapatkan metabolit sekunder yang diharapkan memiliki aktivitas antioksidan. Produksi metabolit sekunder isolat bakteri dilakukan selama 45 jam.

Tahap setelah mencapai jam ke-45, media fermentasi tersebut disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit untuk memisahkan sel bakteri dan supernatan. Sentrifugasi pada suhu rendah dimaksudkan agar metabolit sekunder yang terdapat didalam sel tidak rusak. Supernatan yang diperoleh dari hasil sentrifugasi merupakan ekstrak kasar metabolit sekunder. Ekstrak kasar ini selanjutnya dilakukan pemekatan dengan menggunakan metode *freeze drying*. Massa sampel hasil *freeze dry* isolat J_1 sebesar 0,427 g, isolat J_2 sebesar 0,418 g dan isolat J_3 sebesar 1,169 g. Perbedaan massa sampel yang dihasilkan oleh isolat bakteri menunjukkan setiap bakteri menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang berbeda. Oleh karena itu kemungkinan aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh ketiganya juga berbeda.

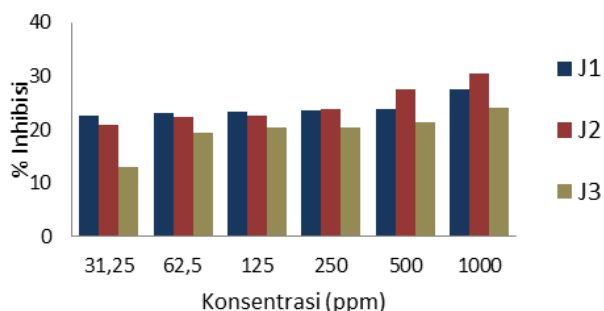
Aktivitas Antioksidan

Tahap ini bertujuan untuk mendapatkan data aktivitas antioksidan metabolit sekunder dari isolat bakteri endofit yang didapatkan. Metode pengujian dilakukan secara *in vitro* dengan DPPH yakni melalui mekanisme penangkapan radikal bebas oleh senyawa antioksidan. Mekanisme reaksi dari Reaksi antara DPPH dengan suatu molekul antioksidan ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Reaksi antara DPPH dengan suatu molekul antioksidan [9]

Adapun hasil pengujian aktivitas antioksidan terhadap metabolit bakteri endofit jahe merah dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Grafik hasil pengukuran antioksidan metabolit sekunder

Pada gambar 3 dapat dilihat bahwa terdapat korelasi antara meningkatnya konsentrasi dengan % inhibisi. Hal ini dikarenakan karena dengan meningkatnya konsentrasi sampel maka memiliki metabolit sekunder yang lebih banyak sehingga dapat meningkatkan % inhibisinya. Namun peningkatan konsentrasi terhadap % inhibisi tidak terlalu signifikan. Pada isolat J₁ di konsentrasi 31,25 ppm; 62,5 ppm; 125 ppm; 250 ppm; 500 ppm; dan 1000 ppm mempunyai nilai % inhibisi berturut-turut sebesar 22,72%; 23,09%; 23,34%; 23,58%; 23,95% dan 27,53%. Pada isolat J₂ di konsentrasi 31,25 ppm; 62,5 ppm; 125 ppm; 250 ppm; 500 ppm; dan 1000 ppm mempunyai nilai % inhibisi berturut-turut sebesar 20,86%; 22,46%; 22,71%; 23,95%; 27,65% dan 30,61%. Pada isolat J₃ 31,25 ppm; 62,5 ppm; 125 ppm; 250 ppm; 500 ppm; dan 1000 ppm mempunyai nilai % inhibisi berturut-turut sebesar 13,08%; 19,5%; 20,37%, 20,5%; 21,35% dan 24,07%.

Dengan peningkatan konsentrasi, nilai % inhibisi ketiga isolat bakteri endofit hanya meningkat sebesar 1,01-1,14 kali lebih tinggi. Apabila konsentrasi tertinggi (1000 ppm) dibandingkan dengan konsentrasi terendah (31,25 ppm) nilai persen inhibisi ketiga isolat bakteri endofit yaitu J₁; J₂ dan J₃ hanya meningkat sebesar 1,21; 1,46; dan 1,84 kali. Dari pemaparan data diatas, dapat disimpulkan bahwa ketiga isolat mempunyai konsentrasi optimal untuk meredam radikal bebas pada konsentrasi terendah yaitu pada konsentrasi 31,25 ppm.

Senyawa yang digunakan sebagai pembanding pada pengujian ini adalah asam askorbat. pada pengujian ini asam askorbat memiliki kemampuan meredam radikal

bebas sebesar 57,03% pada konsentrasi 10 ppm. Perbedaan kemampuan inhibisi dari metabolit sekunder isolat bakteri dengan asam askorbat disebabkan karena asam askorbat merupakan senyawa yang telah diketahui memiliki ikatan rangkap terkonjugasi untuk mendonorkan proton, sedangkan sampel merupakan padatan metabolit sekunder yang belum murni sehingga kemampuan untuk meredam radikal bebas kurang optimal.

Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui senyawa kimia yang berperan dalam meredam radikal bebas. Sampel yang digunakan pada tahap penapisan fitokimia ini adalah rimpang jahe merah yang digunakan sebagai simplisia tanaman inang dan endapan metabolit sekunder dari hasil freeze dry. Rimpang jahe merah digunakan sebagai pembanding untuk mengetahui senyawa kimia sebelum dilakukan isolasi. Golongan kimia yang diidentifikasi pada penelitian ini antara lain alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid dan steroid Hasil dari penapisan fitokimia tertera pada Tabel 2.

Tabel 2 Hasil penapisan fitokimia

Golongan Senyawa	Hasil			
	J ₁	J ₂	J ₃	Simplisia
Alkaloid	-	-	-	-
Flavonoid	+	+	+	+
Tanin	+	+	-	+
Saponin	+	+	+	+
Steroid	-	-	-	-
Triterpenoid	+	+	-	+

Pada hasil penapisan fitokimia penelitian ini terdapat beberapa senyawa dari tumbuhan inang yang tidak mampu dihasilkan oleh isolat bakteri endofit kulit rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Linn. Var *Rubrum*). Menurut Nofiani dkk. [10] terdapat dugaan bahwa isolat tersebut memiliki gen pengkode pembentukan senyawa metabolit sekunder, namun tidak terekspresi pada media produksi yang digunakan. Gen tersebut baru terekspresi ketika diinduksi terlebih dahulu. Pada media produksi yang digunakan kemungkinan tidak ada inducer untuk mengekspresikan gen pembentukan senyawa metabolit sekunder.

Adanya aktivitas antioksidan dikarenakan pada isolat J₁, J₂, dan J₃ mempunyai senyawa metabolit sekunder yang potensial untuk meredam radikal bebas yaitu flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu komponen yang mengandung gugus fenol. Perbedaan aktivitas antioksidan dari ketiga isolat disebabkan karena perbedaan kandungan senyawa yang akan menyumbangkan hidrogennya. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian [3] yang menunjukkan bahwa senyawa golongan flavonoid memiliki kemampuan sebagai antioksidan.

4. Kesimpulan

Diperoleh tiga isolat bakteri endofit dari rimpang jahe merah (isolat J₁, isolat J₂, dan isolat J₃). Isolat bakteri yang diperoleh memiliki bentuk beragam yakni diplobasil (isolat J₁), streptobasil (isolat J₂) dan monobasil (isolat J₃). Semua metabolit sekunder isolate mampu menghambat radikal bebas pada konsentrasi yang paling efektif yaitu pada konsentrasi 31,25 ppm dengan nilai % inhibisi pada isolat J₁, J₂ dan J₃ berturut-turut sebesar 22,71%; 20,86% dan 13,08%. Kandungan kimia yang terdapat pada semua isolat meliputi flavonoid dan saponin.

Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis, 1, 2, (2009) 33-41

5. Daftar Pustaka

- [1] N. Ito, M. Hirose, S. Fukushima, H. Tsuda, T. Shirai, M. Tatematsu, Studies on antioxidants: Their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis, *Food and Chemical Toxicology*, 24, 10, (1986) 1071-1082
[http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915\(86\)90291-7](http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915(86)90291-7)
- [2] Gary Strobel, Eugene Ford, Jeerepun Worapong, James K. Harper, Atta M. Arif, David M. Grant, Peter C. W. Fung, Raymond Ming Wah Chau, Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities, *Phytochemistry*, 60, 2, (2002) 179-183
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00062-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00062-6)
- [3] Okezie I. Aruoma, Jeremy P. E. Spencer, Donna Warren, Peter Jenner, John Butler, Barry Halliwell, Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations, *Food Chemistry*, 60, 2, (1997) 149-156
[http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(95\)00254-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(95)00254-5)
- [4] Justin T Coombs, Christopher MM Franco, Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots, *Applied and environmental microbiology*, 69, 9, (2003) 5603-5608
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.9.5603-5608.2003>
- [5] Sri Pujiyanto, Rejeki Siti Ferniah, Aktifitas inhibitor alpha-glukosidase bakteri endofit PR-3 yang diisolasi dari tanaman pare (*Momordica charantia*), *Bioma*, 12, 1, (2010) 1-5
- [6] Norman R. Farnsworth, Biological and phytochemical screening of plants, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, 3, (1966) 225-276
<http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600550302>
- [7] Abdul Kafur, Anisa Basheer Khan, Isolation of endophytic actinomycetes from *Catharanthes roseus* (L.) G. Don leaves and their antimicrobial activity, *Iranian Journal of Biotechnology*, 9, 4, (2011) 302-306
- [8] Purwanto, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Penghambat Polimerisasi HEM dari Fungsi Endofit Tanaman *Artemisia annua* L., in: *S2 Ilmu Farmasi*, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- [9] Hiroe Kikuzaki, Nobuji Nakatani, Antioxidant Effects of Some Ginger Constituents, *Journal of Food Science*, 58, 6, (1993) 1407-1410
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb06194.x>
- [10] Risa Nofiani, Siti Nurbetty, Ajuk Sapar, Aktivitas antimikroba ekstrak metanol bakteri berasosiasi spons dari pulau Lemukutan, Kalimantan Barat, e-