

Skrining Metabolit Sekunder Bakteri Endofit yang Berfungsi sebagai Antidiabetes dari Daun Mimba (*Azadirachta Indica*)

Yuga Pratama^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

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

Article Info

Keywords:
neem leaves,
endophytic bacteria,
secondary
metabolites, α -
glucosidase enzyme

Kata Kunci:
Daun mimba,
bakteri endofit,
metabolit sekunder,
enzim α -
glukosidase

Abstract

Research on secondary metabolite screening of endophytic bacteria that acts as an antidiabetic of neem leaves (*Azadirachta indica*) has been performed. The objective of this study was to obtain morphological data, obtained data of growth curve of endophytic bacterial isolate from mimba leaf, obtained inhibition result of secondary metabolite of endophytic bacteria from miba leaf to α -glucosidase, and got information about chemical content of secondary metabolite of endophytic bacteria isolate obtained. Antidiabetic activity was tested using α -glucosidase enzyme inhibiting method. The results obtained were endophytic bacteria A5 and A6 of neem leaves were bacteria with a type of gram-negative bacteria, with different forms of microscopic sightings. Based on data of growth curve of endophytic bacteria it could be concluded that to obtain secondary metabolite is at hour 33 until 48 hours for isolate A5 and hour 36 until hours 48 for isolate A6. The power of inhibition of optimal α -glucosidase activity from secondary metabolites A5 and A6 at concentrations of 62.5 ppm respectively were 18.462% and 20.173%. Phytochemical screening in this study each of the secondary metabolites of endophytic bacteria A5 and A6 from neem leaves contain flavonoids, saponins, and terpenoids/steroids.

Abstrak

Telah dilakukan penelitian tentang skrining metabolit sekunder bakteri endofit yang berfungsi sebagai antidiabetes dari daun mimba (*Azadirachta indica*). Penelitian ini bertujuan memperoleh data morfologi, memperoleh data kurva pertumbuhan isolat bakteri endofit dari daun mimba, memperoleh hasil inhibisi metabolit sekunder bakteri endofit dari daun miba terhadap α -glukosidase, serta mendapatkan informasi mengenai kandungan kimia dari metabolit sekunder isolat bakteri endofit yang didapat. Aktivitas antidiabetes diuji menggunakan metode penghambatan enzim α -glukosidase. Hasil yang diperoleh adalah bakteri endofit A5 dan A6 dari daun mimba merupakan bakteri dengan jenis bakteri gram negatif, dengan bentuk penampakan mikroskopis yang berbeda. Berdasarkan data kurva pertumbuhan bakteri endofit dapat disimpulkan bahwa untuk memperoleh metabolit sekunder adalah pada jam ke-33 hingga jam ke-48 untuk isolat A5 dan jam ke-36 hingga jam ke-48 untuk isolat A6. Adapun daya inhibisi aktivitas α -glukosidase optimal dari metabolit sekunder A5 dan A6 masing-masing pada konsentrasi 62,5 ppm berturut-turut sebesar 18,462% dan 20,173%. Penapisan fitokimia pada penelitian ini masing-masing metabolit sekunder bakteri endofit A5 dan A6 dari daun mimba mengandung senyawa flavonoid, saponin, dan terpenoid/steroid.

1. Pendahuluan

Diabetes mellitus adalah gangguan metabolisme dari sistem endokrin. Penyakit ini ditemukan di semua bagian dunia dan meningkat dengan pesat di seluruh dunia. Orang yang menderita diabetes tidak dapat memproduksi atau menggunakan insulin, sehingga mereka memiliki glukosa darah tinggi. Studi mengenai antidiabetes yang sedang berkembang saat ini adalah dengan menghambat aktivitas enzim α -glukosidase dengan suatu senyawa inhibitor α -glukosidase.

Inhibitor α -glukosidase adalah senyawa yang memiliki kemampuan menghambat pencernaan karbohidrat kompleks (amilum) menjadi glukosa sehingga asupan glukosa ke dalam darah dapat dikurangi. Karbohidrat kompleks seperti pati dipecah menjadi gula sederhana di usus halus oleh α -glukosidase sebelum diabsorpsi. Dengan menggunakan inhibitor α -glukosidase, aktivitas dari enzim α -glukosidase dapat diinhibisi, sehingga pemecahan karbohidrat yang dikonsumsi dapat dicegah dan kadar glukosa dalam darah berkurang [1]. Senyawa inhibitor α -glukosidase dapat dihasilkan oleh mikroba endofit yang bersimbiosis di dalam tumbuhan [2].

Mikroba endofit adalah mikroba yang hidup diantara sel tanaman dan bersimbiosis dengan tanaman inangnya [3]. Mikroba endofit yang hidup dalam tanaman dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder sama dengan yang dihasilkan inangnya [2].

Daun mimba (*Azadirachta indica*) mengandung beberapa senyawa yang terbukti mampu menghambat aktivitas enzim α -glukosidase yaitu ekstrak aseton dengan nilai IC_{50} sebesar 5,00 mg/mL, ekstrak ethanol dengan nilai IC_{50} sebesar 8,70 mg/mL, dan ekstrak air dengan nilai IC_{50} 7,25 mg/mL [4]. Priosoeryanto dkk. [5] menyatakan bahwa kadar glukosa darah pada tikus menurun setelah diberi perlakuan menggunakan ekstrak daun mimba yang sebelumnya glukosa darah pada tikus diinduksi dengan aloksan untuk meningkatkan glukosa darah awal pada tikus, dengan demikian dapat disimpulkan bahwa daun mimba berpotensi sebagai antidiabetes.

Pemanfaatan daun mimba sebagai obat antidiabetes masih terbatas pada khasiat dari berbagai komponen bioaktif yang terkandung dalam daun mimba, disisi lain beberapa tanaman yang memproduksi senyawa bioaktif seperti daun mimba juga bersimbiosis dengan mikroba endofit yang memiliki kemampuan memproduksi senyawa bioaktif yang sama dengan tanaman inangnya [6]. Pujiyanto dkk. [7] telah melakukan uji aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase mikroba endofit jenis aktinomiset yang diisolasi dari beberapa tanaman obat Indonesia, namun belum mencakup daun mimba.

Hasil penelitian Maharani [8] diperoleh tujuh isolat bakteri endofit dari daun mimba (*Azadirachta indica*), dari tujuh isolat tersebut kemampuan inhibisi tertinggi terhadap α -glukosidase dari metabolit sekunder yang dihasilkan isolat A6 sebesar 45,07% dan tertinggi kedua dari metabolit sekunder isolat A5 sebesar 38,52%. Penelitian Maharani [8] belum didapatkan data

morfologi, data kurva pertumbuhan yang menunjukkan karakterisasi bakteri endofit, serta kandungan kimia dari metabolit sekunder bakteri endofit. Pada penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan data kurva pertumbuhan, data karakterisasi dengan pewarnaan gram, dan data kandungan kimia dari metabolit sekunder yang dihasilkan.

2. Metode Penelitian

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini terdiri atas isolat bakteri endofit A5 dan A6 dari daun mimba dalam stok gliserol, media Yeast Malt Agar (YMA), pepton, soluble starch. Enzim α -glukosidase (Sigma; USA), Na_2CO_3 , DMSO, Bufer fosfat (Larutan A NaH_2PO_4 dan B Na_2HPO_4), Acarbose (Glucobay), HCl, Safranin, alcohol, aseton, lugol iodine, pewarna kristal ungu violet, metanol, HCl, asam klorida 2N, amoniak 25%, kloroform, pereaksi Dragendorff (bismut nitrat dan merkuri klorida dalam nitrit berair), pereaksi Meyer (kalium iodida dan merkuri klorida), serbuk magnesium, asam klorida pekat, besi (III) klorida, gelatin, anhidrida asam asetat, amil alkohol, eter, asam sulfat pekat dan p-nitrofenil α -D glukopiranosida.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri atas erlenmeyer 250 mL (Pyrex) ; gelas ukur 100 mL(Pyrex); gelas beker 1000 mL (Herma), 500 mL (Pyrex), dan 50 mL(Pyrex); neraca analitik, inkubator, spiritus, pengaduk, kaca arloji, kawat ose, mikro pipet, shaker, inkas , sentrifuge (Hettich Zentrifugen Micro 200R), autoklaf (*Clinical Autoclave Prestige Medical Series 2100*).

Peremajaan Isolat Bakteri Endofit dari Daun Mimba (*Azadirachta indica*)

Peremajaan ini menggunakan isolat bakteri endofit A5 dan A6 dari daun mimba dalam stok gliserol, isolat A5 dan A6 yang berada dalam stok gliserol ditanam pada permukaan media YMA secara aseptik. Media yang telah berisi sampel tersebut kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama tiga hari. Koloni bakteri yang tumbuh kemudian dipisahkan menurut kenampakan morfologisnya sehingga menjadi isolat tunggal. Isolat bakteri yang telah dipisahkan selanjutnya diuji dengan pewarnaan gram dan dilakukan penentuan kurva pertumbuhan metabolit sekunder bakteri endofit.

Karakterisasi Bakteri Endofit dengan Perwarnaan Gram Isolat A5 dan A6

Pengamatan morfologi koloni dilakukan dengan pewarnaan gram. Satu ose isolat bakteri endofit disuspensikan ke dalam akuades steril dan difiksasi di atas kaca benda bersih. Olesan bakteri diberi 2-3 tetes pewarna Kristal violet (gram A) dan dibiarkan selama 1 menit. Zat warna berlebih dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Olesan bakteri digenangi dengan 2 tetes larutan lugol iodine (gram B), dibiarkan selama 1 menit. Zat warna berlebih dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Olesan dicuci dengan larutan alcohol aseton (gram C) selama 30 detik. Zat pewarna berlebih dibilas dengan air mengalir dan dikeringanginkan.

Olesan diberi cat safranin (gram D) selama 2 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Preparat diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran kuat (1000x) menggunakan minyak emersi.

Kurva Pertumbuhan Metabolit Sekunder Bakteri Endofit

Hasil peremajaan isolat bakteri endofit A5 dan A6 dari masing-masing diambil menggunakan kawat ose steril dan dimasukkan pada Erlenmeyer yang berisi 200 mL media cair. Media cair yang digunakan mengandung pepton, soluble starch, yeast dan akuades [9]. Isolat kemudian diinkubasi dalam shaker incubator dengan kecepatan 100 rpm pada suhu ruang. Pada botol lain berisi 100 mL media cair dijadikan sebagai kontrol negatif yaitu tidak ditanami isolat bakteri endofit yang kemudian diinkubasi dalam shaker incubator dengan kecepatan 100 rpm pada suhu ruang juga. Setiap 3 jam dilakukan pengambilan sebanyak 10 mL sampel dan botol lain berisi kontrol negatif dan isolat bakteri endofit. Pertumbuhan jumlah sel bakteri diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 600 nm.

Produksi Metabolit Sekunder Isolat Bakteri Endofit A5 dan A6

Isolat bakteri endofit A5 dan A6 diambil dengan kawat ose steril dan dimasukkan dalam media cair 100 mL. Media cair yang digunakan mengandung pepton, soluble starch, yeast dan akuades [9]. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang menggunakan inkubator bergoyang dengan kecepatan 75 rpm selama 7 hari [10]. Kultur disentrifugasi 4000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Filtrat dari kultur ini selanjutnya dipekatkan menggunakan freeze dryer. Residu yang diperoleh merupakan metabolit sekunder yang digunakan untuk menentukan daya hambat larutan tersebut terhadap aktivitas enzim alfa glukosidase.

Uji Aktivitas Antidiabetes Metabolit Sekunder Melalui Mekanisme Inhibisi α -Glukosidase

Uji Inhibisi α -glukosidase dari metabolit sekunder menggunakan metode dari Sancheti dan Seo [11]. Masing-masing hasil pemekatan kemudian dibuat larutan induk 1000 ppm, selanjutnya larutan induk diencerkan menjadi 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, dan 62,5 ppm. Setiap konsentrasi dipipet sebanyak 10 μ L kedalam microplate ditambahkan 25 μ L substrat (p-nitrophenil- α -D-glukopiranosida), 50 μ L buffer posfat pH 7.0, dan 25 μ L enzim α -glukosidase, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 100 μ L Na₂CO₃ dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 410 nm.

Tabel 1: Sistem reaksi penentuan inhibisi metabolit sekunder bakteri endofit terhadap enzim α -glukosidase

Sampel	Blanko μ L	Kontrol negatif μ L	Sampel μ L
Larutan metabolit sekunder	-	10	10
Buffer	25	25	25
Substrat (p-nitrophenil- α -D-glukopiranosida)	25	25	25
Enzim α -glukosidase	25	-	25
Inkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit			
Na ₂ CO ₃	100	100	100

Aktivitas enzim diukur berdasarkan hasil absorbansi p-nitrofenol. Apabila sampel memiliki kemampuan menghambat aktivitas enzim α -glukosidase maka p-nitrofenol yang dihasilkan akan berkurang. Apabila nilai absorbansi p-nitrofenol tinggi maka kemampuan inhibisi dari sampel rendah. Sebaliknya, jika nilai absorbansi dari p-nitrofenol rendah, maka kemampuan inhibisi yang dimiliki sampel tinggi. Daya inhibisi dapat dihitung dari persamaan:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel})}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100$$

Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia berdasar metode yang digunakan oleh Farnsworth [12] dilakukan pada masing-masing metabolit sekunder bakteri endofit yang telah dipekatkan melalui tahap freeze dryer dan simplisia daun mimba. Senyawa yang diidentifikasi adalah senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan steroid/triterpenoid.

Uji Alkaloid

Sebanyak 1g sampel uji ditambahkan dalam 10 mL kloroform lalu penambahan 5 tetes NH₄OH, Campuran disaring dan filtratnya di kocok dengan penambahan 10 tetes H₂SO₄ 2 M. Kemudian lapisan asam (atas) dibagi menjadi dua ke dalam tabung reaksi. Tabung pertama ditetesi dengan pereaksi Dragendorff dan uji positif ditandai dengan terbentuknya warna merah atau jingga. Tabung kedua ditambahkan setetes pereaksi Meyer. Terbentuknya kabut putih hingga endapan putih menunjukkan adanya alkaloid.

Uji Flavonoid

Sebanyak 0,5 g sampel ditambahkan 10 mL metanol dan 10 mL akuades kemudian disaring. Lalu ditambahkan 5 mL eter kemudian dikocok dan didiamkan. Ambil lapisan metanol dan uapkan pada suhu 40°C kemudian larutkan dalam 5 mL etil asetat, penambahan 1 mL etanol, ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium, 1 mL asam klorida pekat lalu dikocok kuat-kuat dan dibiarkan memisah. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya warna merah, kuning.

Uji Saponin

Sebanyak 0,5 g sampel ditambahkan 10 mL akuades panas dan dididihkan selama 10 menit lalu di saring, kemudian dikocok kuat secara vertikal selama 10 detik. Adanya saponin ditandai dengan terbentuknya busa setinggi 1–10 cm yang stabil sekitar 10 menit dan tidak hilang ketika ditambahkan 1 tetes asam klorida 2N.

Uji Tanin

Sebanyak 1 g sampel ditambahkan 10 mL akuades panas dan dididihkan selama 10 menit lalu di saring, ditambahkan larutan besi (III) klorida 1%. Adanya tanin bebas ditandai dengan terbentuknya warna hijau kehitaman.

Uji Triterpenoid/Steroid

Sebanyak 2 g sampel ditambahkan dengan 5 mL etanol panas selama 1 jam, kemudian disaring dan residunya di tambahkan eter. Ekstrak ditambahkan 3 tetes anhidrida asam asetat dan 1 tetes asam sulfat pekat ke plat tetes. Adanya steroid ditunjukkan jika terbentuk warna biru atau ungu, sedangkan bila terbentuk warna merah menandakan adanya triterpenoid.

3. Hasil dan Pembahasan

Isolasi Bakteri Endofit

Tahap peremajaan isolat bakteri endofit A5 dan A6 pada penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri yang masih dalam kondisi baik. Langkah awal dari tahap peremajaan ini adalah pembuatan media YMA (Yeast Malt Agar) sebagai media untuk peremajaan isolat yang telah didapat. Media YMA merupakan media padat untuk penumbuhan atau penginkubasian mikroba endofit secara selektif dan juga disebut media ISP (International Streptomyces Project) no. 2, yakni media selektif untuk menumbuhkan bakteri dari jenis streptomyces [13]. Media ini berisi yeast extract, malt extract, dextrose, dan agar bakteriologi. Dextrose dan malt extract berfungsi sebagai sumber karbon sedangkan yeast extract sebagai sumber nitrogen yang diperlukan mikroba untuk tumbuh.

Pada jam ke-24 masa penginkubasian media telah ditumbuhi mikroba, sedangkan pada waktu yang sama media kontrol negatif tetap bersih dan tidak ditumbuhi mikroba. Untuk meyakinkan bahwa mikroba yang tumbuh adalah bakteri endofit, masa penginkubasian dilanjutkan hingga hari ke tiga. Pada hari ketiga masa penginkubasian media semakin banyak ditumbuhi mikroba dengan bentuk yang sama, sedangkan media kontrol negatif tetap bersih dan tidak ditumbuhi mikroba. Ini menguatkan bahwa mikroba yang tumbuh pada media sampel merupakan bakteri endofit hasil peremajaan dari sebelumnya. Isolat yang telah melalui tahap peremajaan selanjutnya adalah karakterisasi bakteri endofit dengan pewarnaan gram.

Pewarnaan Gram

Tujuan dari pewarnaan gram pada penelitian ini adalah memastikan bahwa kelima isolat yang dipilih

memiliki bentuk morfologis yang berbeda. Hasil pewarnaan gram dapat dilihat pada tabel 2 berikut.

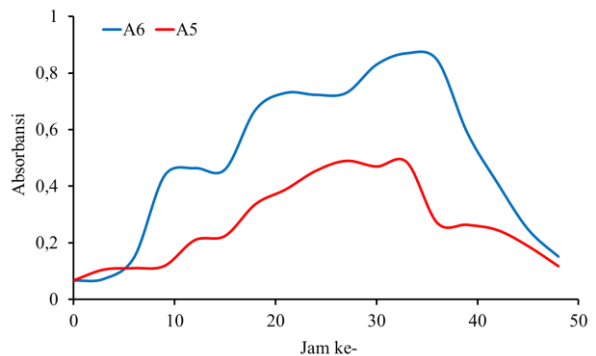
Tabel 2: Penampakan morfologis isolat bakteri endofit daun mimba (*Azadirachta indica*)

Isolat	Penampakan mikroskopis	Hasil Pewarnaan	Gram
A5	Bulat, berkelompok (stafilokokus)	Merah	Negatif
A6	Batang yang khas (basilus)	Merah	Negatif

Pengamatan pewarnaan gram dilakukan pada mikroskop dengan pembesaran 1000x. Kedua bakteri endofit merupakan jenis bakteri gram negatif dan bentuk yang berbeda. Hasil penampakan mikroskopis menunjukkan bahwa isolat A5 memiliki bentuk morfologis yang berbeda dengan isolat A6. Perbedaan ini memungkinkan menjadi penyebab perbedaan aktivitas antidiabetes dari metabolit yang dihasilkan.

Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Endofit

Pertumbuhan bakteri dapat ditandai dengan peningkatan jumlah dan massa sel sedangkan kecepatan pertumbuhan tergantung pada lingkungan fisik dan kimianya. White [14] menyatakan bahwa setiap bakteri menghasilkan pola pertumbuhan bakteri yang berbeda-beda, tergantung dari gen yang dimiliki dan sumber karbon yang digunakan. Pertumbuhan bakteri diamati dengan cara mengukur nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer UV/VIS pada panjang gelombang 600 nm setiap tiga jam sekali hingga jam ke-48.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan isolat bakteri endofit dari daun mimba A5 dan A6

Pemanenan metabolit sekunder dari mikroba dapat dilakukan pada fasa stasioner menuju kematian. Berdasarkan data grafik kurva pertumbuhan yang didapat pemanenan metabolit sekunder A5 dapat dilakukan dari jam ke-33 hingga jam ke-48, sedangkan untuk metabolit sekunder A6 dapat dilakukan dari jam ke-36 hingga jam ke-48.

Produksi Metabolit Sekunder Isolat Bakteri Endofit A5 dan A6

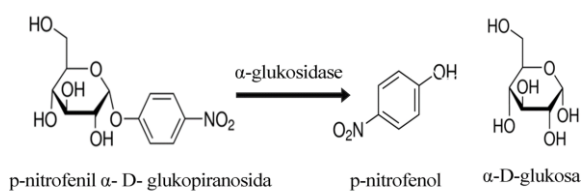
Tahap ini bertujuan untuk memproduksi metabolit sekunder bakteri endofit yang diharapkan memiliki aktivitas inhibitor α -glukosidase. Tahap produksi ini menggunakan metode Chen *dkk.* [9]. Media cair yang digunakan mengandung yeast, pepton, *soluble starch*, dan

akuades. Yeast dan pepton merupakan sumber nitrogen, sedangkan *soluble starch* berfungsi sebagai sumber karbon yang digunakan mikroba untuk tumbuh. Karbon merupakan senyawa yang digunakan sebagai penyusun utama sel, sedangkan nitrogen digunakan mikroba sebagai bahan untuk mensintesis asam-asam amino.

Hasil produksi bakteri endofit tersebut kemudian disentrifugasi pada kecepatan 5000rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Sentrifugasi bertujuan untuk memisahkan filtrat dan residu yang dimana filtrat mengandung senyawa metabolit sekunder dari bakteri endofit daun mimba.

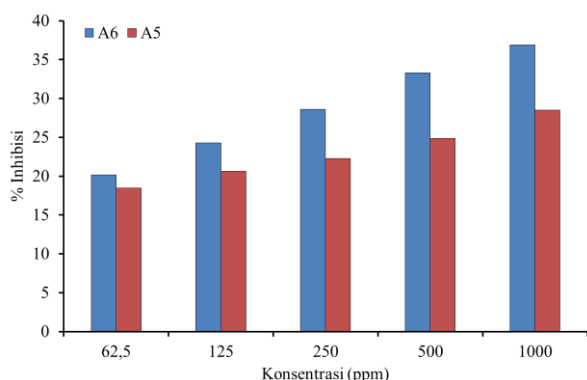
Uji Aktivitas Antidiabetes Metabolit Sekunder Isolat Melalui Mekanisme Inhibisi α -Glukosidase

Tahap ini bertujuan untuk mendapatkan data aktivitas antidiabetes metabolit sekunder dari isolat bakteri endofit yang didapatkan. Metode pengujian dilakukan secara *in vitro* yakni melalui mekanisme inhibisi enzim α -glukosidase terhadap substrat *p*-nitrofenil α -D- glukopiranosida. Mekanisme reaksi dari hidrolisis substrat *p*- nitrofenil α -D- glukopiranosida oleh enzim α -glukosidase dapat dilihat pada gambar 2 berikut:



Gambar 2. Persamaan reaksi enzimatik α -glukosidase dan *p*-nitrofenil- α -D glukopiranosida

Adapun hasil pengujian dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Grafik hasil uji kemampuan inhibisi metabolit sekunder isolat bakteri endofit terhadap α -glukosidase

Berdasarkan gambar 3 menunjukkan bahwa besarnya nilai inhibisi dipengaruhi oleh tingginya konsentrasi senyawa inhibitor. Semakin tinggi konsentrasi senyawa inhibitor akan semakin besar pula kemampuan inhibisinya, meskipun tidak dengan kenaikan yang signifikan. Kenaikan kemampuan inhibisi ini dikarenakan senyawa inhibitor dari metabolit sekunder dimungkinkan memiliki kemampuan untuk menghambat aktivitas enzim secara kompetitif, non kompetitif, ataupun inkompetitif. Proses inhibisi

kompetitif, non kompetitif, dan inkompetitif akan berlangsung optimal apabila konsentrasi inhibitor tinggi, karena konsentrasi inhibitor yang tinggi akan memperbesar peluang inhibitor untuk menutup sisi aktif enzim ataupun berikatan dengan enzim dan kompleks enzim substrat.

Pada gambar 4 menunjukkan bahwa metabolit sekunder A6 pada konsentrasi 1000 ppm memiliki kemampuan inhibisi α -glukosidase tertinggi yaitu sebesar 36,881%, sedangkan untuk metabolit sekunder A5 pada konsentrasi 1000 ppm memiliki kemampuan inhibisi terhadap α -glukosidase tertinggi sebesar 28,481%. Kemampuan inhibisi dari metabolit sekunder isolat A6 dan A5 pada konsentrasi 62,5 ppm tidak terpaut jauh dengan kemampuan inhibisi pada konsentrasi 1000 ppm, yaitu untuk A6 pada konsentrasi 62,5 ppm inhibisi terhadap α -glukosidase sebesar 20,173% sedangkan untuk A5 pada konsentrasi 62,5 ppm inhibisi terhadap α -glukosidase sebesar 18,462%. Oleh karena itu dari data kemampuan inhibisi dapat diperoleh informasi bahwa konsentrasi optimal untuk aktivitas inhibisi dari metabolit sekunder isolat A6 dan A5 adalah 62,5 ppm.

Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia terhadap daun mimba (*Azadirachta indica*) dan metabolit sekunder yang didapat bertujuan untuk mengetahui jenis metabolit sekunder yang terdapat pada daun mimba seperti flavonoid, alkaloid, kuinon, tanin, saponin, triterpenoid dan steroid. Hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa daun mimba mengandung senyawa golongan flavonoid, tanin, saponin, alkaloid, kuinon, triterpenoid dan steroid, sedangkan pada metabolit sekunder bakteri endofit mengandung saponin, flavonoid, triterpenoid dan steroid. Berikut hasil penapisan fitokimia dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2: Hasil penapisan fitokimia senyawa metabolit sekunder isolat bakteri endofit daun mimba (*Azadirachta indica*)

Jenis Uji	Hasil		
	A5	A6	Simplisia
Alkaloid	-	-	+
Flavonoid	+	+	+
Kuinon	-	-	+
Saponin	+	+	+
Terpenoid/Steroid	+	+	+
Tanin	-	-	+

Hasil penapisan fitokimia dapat diperoleh informasi bahwa semua isolat bakteri endofit menunjukkan hasil negatif dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, kuinon, dan tanin, sedangkan pada simplisia daun mimba menunjukkan hasil positif untuk senyawa metabolit sekunder alkaloid, kuinon, dan tanin. Hasil tersebut menunjukkan bahwa semua isolat bakteri endofit yang didapat tidak mampu menghasilkan metabolit sekunder berupa alkaloid, kuinon, dan tanin. Pengujian flavonoid, saponin, dan terpenoid/steroid pada simplisia menghasilkan hasil uji positif, sedangkan pengujian dari senyawa yang dihasilkan oleh isolat

menunjukkan hasil positif pada semua isolat. Hasil ini menunjukkan bahwa semua isolat bakteri endofit mampu menghasilkan metabolit sekunder yang mengandung senyawa flavonoid, saponin, dan terpenoid/steroid. Strobel dkk. [6] menyatakan bahwa beberapa tanaman yang memproduksi senyawa bioaktif juga berasosiasi dengan mikroba endofit, dimana akan memproduksi senyawa serupa dengan tanaman inangnya.

Dari hasil penapisan fitokimia dapat diperoleh informasi bahwa ada hubungan antara senyawa flavonoid, saponin, terpenoid/steroid yang terdapat dalam daun mimba mempunyai kemampuan untuk menghambat α -glukosidase. Hasil tersebut menunjukkan bahwa senyawa metabolit sekunder flavonoid, tanin dan saponin memiliki efek antihiperlikemik, dan Mun'im dan Andriani [15] menyatakan bahwa daun mimba yang memiliki kandungan senyawa alkaloid, terpenoid, tanin, saponin, dan flavonoid memiliki kemampuan sebagai penghambat α -glukosidase.

Data dan informasi yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan bahwa bakteri endofit daun mimba berpotensi sebagai antidiabetes sehingga penggunaan daun mimba secara langsung sebagai obat antidiabetes dapat diminimalisir untuk menjaga kelestarian daun mimba.

4. Kesimpulan

Bakteri endofit A5 dan A6 dari daun mimba merupakan bakteri dengan jenis bakteri gram negatif, dengan bentuk penampakan mikroskopis yang berbeda. Berdasarkan data kurva pertumbuhan bakteri endofit dapat disimpulkan bahwa untuk memperoleh metabolit sekunder adalah pada jam ke-33 hingga jam ke-48 untuk isolat A5 dan jam ke-36 hingga jam ke-48 untuk isolat A6. Adapun daya inhibisi aktivitas α -glukosidase optimal dari metabolit sekunder A5 dan A6 masing-masing pada konsentrasi 62,5 ppm berturut-turut sebesar 18,462% dan 20,173%. Penapisan fitokimia pada penelitian ini masing-masing metabolit sekunder bakteri endofit A5 dan A6 dari daun mimba mengandung senyawa flavonoid, saponin, dan terpenoid/steroid.

5. Daftar Pustaka

- [1] Jean-Louis Chiasson, Robert G. Josse, Ramon Gomis, Markolf Hanefeld, Avraham Karasik, Markku Laakso, Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial, *The Lancet*, 359, 9323, (2002) 2072-2077 [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08905-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08905-5)
- [2] Maksun Radji, Peranan bioteknologi dan mikroba endofit dalam pengembangan obat herbal, *Pharmaceutical Sciences and Research (PSR)*, 2, 3, (2012) 113-126
- [3] Shirly Kumala, Robert Utji, Pratiwi Sudarmono, Leonardus BS Kardono, Isolation of endophytic fungi from *Brucea javanica* L.(Merr.) and cytotoxic evaluation of their n-butanol extract from fermentation broth, *Pak. J. Biol. Sci*, 9, (2006) 825-832
- [4] MI Kazeem, TV Dansu, SA Adeola, Inhibitory Effect of *Azadirachta indica* A. Juss Leaf Extract on the Activities of α -Amylase and α -Glucosidase, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16, 21, (2013) 1358-1362
- [5] Bambang Pontjo Priosoeryanto, Bayu Febram Prasetyo, Ietje Wientarsih, Rini Madyastuti, Efek antihiperlikemik ekstrak etanol daun mimba (*azadirachta indica* j) pada tikus diabetes yang diinduksi Aloksan dan pengembangannya menjadi sediaan tablet Menggunakan metode granulasi basah, IPB's Books, Bogor, (2009).
- [6] 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)
- [7] Sri Pujiyanto, YULIN Lestari, Antonius Suwanto, S Budiarti, LATIFAH K Darusman, Alpha-glucosidase inhibitor activity and characterization of endophytic actinomycetes isolated from some Indonesian diabetic medicinal plants, *Int J Pharm Pharm Sci*, 4, 1, (2012) 327-333
- [8] Lina Maharani, Isolasi Aktinomiset Endofit dari Daun Mimba (*Azadirachta Indica*) dan Uji Aktivitas Sebagai Antidiabetes Melalui Mekanisme Inhibisi α -Glukosidase, Departemen Kimia, Universitas Diponegoro, Semarang
- [9] Haimin Chen, Xiaojun Yan, Wei Lin, Li Zheng, Weiwei Zhang, A New Method for Screening α -Glucosidase Inhibitors and Application to Marine Microorganisms, *Pharmaceutical Biology*, 42, 6, (2004) 416-421 <http://dx.doi.org/10.1080/13880200490885987>
- [10] Sri Pujiyanto, Rejeki Siti Ferniah, Aktifitas inhibitor α -glukosidase bakteri endofit PR-3 yang diisolasi dari tanaman pare (*Momordica charantia*), *Bioma*, 12, 1, (2010) 1-5
- [11] Shruti Sancheti, SungYum Seo, *Chaenomeles sinensis*: a potent α - and β -glucosidase inhibitor, *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 4, 1, (2009) 8-11
- [12] 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>
- [13] A Nurkanto, M Rahmansyah, A Kanti, Teknik Isolasi Aktinomisetes, LIPI Press, Jakarta, 2008.
- [14] David White, The physiology and biochemistry of prokaryotes, Oxford University Press, 1995.
- [15] Abdul Mun'im, Ayu Andriani, Skrining Fitokimia dan Uji Penghambatan Aktivitas alfa-glukosidase pada Ekstrak Etanol dari Beberapa Tanaman yang Digunakan sebagai Obat Antidiabetes, *Pharmaceutical Sciences and Research (PSR)*, 9, 1, (2014) 31-41 <http://dx.doi.org/10.7454/psr.v9i1.3362>