

BIOPRODUKSI SENYAWA KIMIA ANTIDIABETES OLEH ISOLAT KAPANG ENDOFIT KUMIS KUCING (*Orthosiphon spicatus* B. B. S.)

Lilik Sulastrri^{1,*}, Meta², Rudi Kartika³, Partomuan Simanjuntak^{2,4}

¹Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan Bogor, Jawa Barat;

²Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Srenseng Sawah Besar, Jakarta;

³Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman, Samarinda Kalimantan Timur;

⁴Pusat Riset Bahan Baku Obat dan Obat Tradisional (PR BBO OT), BRIN Cibinong

*Corresponding Author: liliksulastrri28@gmail.com

Diterbitkan: 31 Oktober 2024

ABSTRACT

Kumis kucing plant (*Orthosiphon spicatus* B. B. S.) are one of the plants that have been used as diuretic, antidiabetic and antihypertensive drugs. Identification of chemical compounds, and antidiabetic activity assay of bioproduction of endophytic fungi with code B.Os.1F that isolated from the stems of kumis kucing have been carried out. Two fermentation methods (dynamic and static fermentation) to determine the pH. The tlc profile analysis and pH showed that B.Os.1F isolate by dynamic fermentation for 12 days had the potential to produce chemical compounds as antidiabetics at pH 4 ~ 6. The product of fermentation are extracted with ethyl acetate, then fractionated by column chromatography (SiO₂): (i) *n*-hexane-ethyl acetate [10:1 ~ 1:1]; (ii) chloroform-methanol (20:1 ~ 1:1) based on "bioassay guided fractionation" with α -glucosidase enzyme inhibition assay. The isolate of B.Os.1F.2-3 had an activity of 76 %, and identify based on UV-Vis, Fourier-Transform Infra Red (FT-IR) spectroscopies and gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) are estimated to be Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol compounds.

Keywords : Endophytic fungus, *Orthosiphon spicatus* B.B.S., α -glucosidase enzyme, ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol.

PENDAHULUAN

Kumis kucing, *Orthosiphon spicatus* B.B.S. (Lamiaceae) merupakan salah satu tanaman yang dibudidayakan sebagai tanaman obat. Secara tradisional, kumis kucing digunakan untuk peluruh air seni, obat batu ginjal, kencing manis, menurunkan tekanan darah tinggi, dan obat encok. Kumis kucing mengandung sejumlah senyawa kimia di antaranya glikosida ortosifonin, minyak atsiri, minyak lemak, saponin, saponin, ionositol, alkaloid, flavonoid, polifenol dan sinensetin. [1]Kencing manis atau *diabetes mellitus* (DM) adalah suatu penyakit yang ditandai dengan adanya kadar glukosa darah yang melebihi normal (hiperglikemia) akibat tubuh kekurangan insulin baik absolut maupun relatif. Penyebab *diabetes mellitus* adalah aktivitas insulin yang tidak memadai, karena sekresi insulin yang berkurang atau karena adanya resistensi insulin pada jaringan yang peka insulin[2]. Endofit adalah kelompok mikroba yang hidup dalam jaringan tanaman dimana interaksi antara mikroba endofit dengan tanaman inangnya merupakan hubungan yang saling menguntungkan (*simbiosis mutualisme*). Tanaman memberikan nutrisi untuk mikroba, sedangkan mikroba mentransformasikannya menjadi metabolit sekunder. Mikroba endofit biasanya hidup dalam intraseluler kulit batang, akar (rimpang) atau daun tanaman[3]. Penelitian tentang endofit telah lama dilakukan, dan banyak pula penelitian yang mengungkapkan potensi dari mikroorganisme ini sebagai penghasil metabolit sekunder[4]. Pada tahun 2010 Edward J. dalam penelitiannya telah berhasil mengisolasi 8 isolat kapang endofit dari *Orthosiphon spicatus* B.B.S. dan melakukan uji aktivitas antidiabetes. Hasil penelitian tersebut disimpulkan bahwa isolat B.Os.1F mempunyai potensi besar sebagai metabolit sekunder yang dapat menghambat enzim α -glukosidase[5]. Atas dasar penelitian tersebut, dibuktikan bahwa mikroba endofit yang tumbuh secara simbiosis di dalam tanaman dapat menghasilkan metabolit sekunder yang potensial untuk kesehatan, sama seperti senyawa

This is an open-access article under the [CC-BY-SA](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/) license.



metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman inangnya. [6] Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui senyawa kimia hasil bioproduksi kapang endofit yang berasal dari tanaman Kumis kucing (*Orthosiphon spicatus* B. B. S.) yang berpotensi sebagai penghambat enzim α -glukosidase.

METODE PENELITIAN

Bahan kimia yang digunakan :

Potatoes dextrose broth (PDB), *n*-heksan, etil asetat, metanol, kloroform, serum sulfat, sea sand B, silika gel 60 mesh, selite 545, air suling, silika gel GF₂₅₄, kuersetin, DMSO, enzim α -glukosidase, *Potatoes dextrose agar* (PDA), KH₂PO₄·H₂O, K₂HPO₄·2H₂O, *p*-nitrofenil- β -D-glucopyranoside, KBr, Na₂CO₃.

Alat yang digunakan :

Kromatografi kolom, Evaporator (Janke & Kunkel RV 05-ST), pendingin (Fisons Haake K15), pompa vakum (Aspirator A-35), inkubator uji α -glukosidase (Grant), homogenizer, pengaduk magnetik, timbangan analitik, alat-alat gelas, shaker, laminar air flow (LAF), autoklaf, lempeng silika gel GF₂₅₄, pH meter, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV 1700), spektrofotometer UV-Vis (Beckman DU-650), spektrofotometer *Fourier-Transform Infra Red* (Shimadzu 800s), kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS Fisons Instrument GC 8000 series-MD 800).

Metodologi

1. Inokulasi isolat kapang untuk pemeriksaan pH

Isolat kapang endofit B.Os.1F yang sebelumnya telah diremajakan dalam cawan Petri, difermentasikan dalam tabung reaksi (12 tabung) dengan media PDB selama 22 hari pada *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm dan juga difermentasi tanpa shaker (12 tabung reaksi) pada suhu ruangan ($\pm 25^\circ\text{C}$). Setiap 2 hari, pH media pertumbuhan kapang endofit dari fermentasi dinamis dan statis diperiksa menggunakan pH meter.[7]

2. Inokulasi isolat kapang untuk pembuatan kurva pertumbuhan

Isolat kapang endofit B.Os.1F difermentasikan dalam Erlenmeyer (100 mL, 12 buah) dengan media PDB selama 22 hari pada *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm dan fermentasi tanpa shaker dalam Erlenmeyer (100 mL, 12 buah), pada suhu ruang ($\pm 25^\circ\text{C}$). Setiap 2 hari sekali biomassa hasil fermentasi baik dinamis maupun statis dipanen dengan penyaringan, setelah dipisahkan dengan filtratnya. Biomassa dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 60°C selama 1 hari kemudian ditimbang. [8]

3. Produksi senyawa berpotensi

Produksi senyawa berpotensi dilakukan untuk memperoleh hasil fermentasi dengan jumlah yang lebih banyak, sehingga dapat digunakan untuk tahap penelitian lebih lanjut. Isolat kapang endofit B.Os.1F difermentasi dengan *scale-up* dalam Erlenmeyer 3 L yang berisi 1,5 L media PDB selama 21 hari pada suhu ruang (25°C) tanpa menggunakan shaker. Setelah panen media cair dipisahkan dari biomassa dengan filtrasi vakum. Filtrat yang diperoleh diekstrak dengan etil asetat sebanyak 3 kali dan diuapkan. Sementara biomassa yang diperoleh dikeringkan dalam oven kemudian diekstraksi dengan menggunakan etil asetat sebagaimana halnya filtrat.[9]

4. Isolasi dan Pemurnian Ekstrak dengan Kromatografi kolom

Ekstrak etilasetat yang diperoleh difraksinasi menggunakan kromatografi kolom (SiO₂); 1). *n*-heksan etilasetat = 10 : 1 ~ 1:1; dan CHCl₃-MeOH : 1) 10 : 1 ~ 1:1 2). *n*-heksan-etilasetat = 2 : 1

5. Pengujian aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase

Pengujian aktivitas antidiabetes dilakukan dengan uji penghambatan enzim α -glukosidase berdasarkan prosedur Kim *et al*, 2009 yang telah dimodifikasi.[10]

6. Identifikasi senyawa isolat

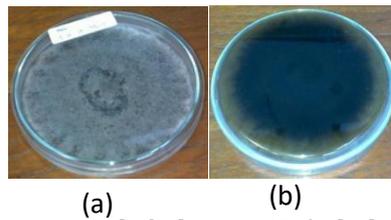
Identifikasi senyawa kimia dilakukan dengan menginterpretasi data spektra ultra violet (UV), infra merah (FT-IR) dan spektra kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS)

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Karakteristik Kapang endofit

Isolat murni kapang endofitik B.Os.1F diremajakan di dalam media PDA, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari, dilakukan pengamatan secara makroskopis untuk mengetahui karakteristik morfologi kapang endofitik tersebut, yaitu meliputi diameter dan permukaan koloni, terbentuknya

zonasi, terbentuknya spora/konidia, warna miselium, dan terdapatnya hifa fertil/hifa steril. Karakteristik morfologi kapang endofitik B.Os.1F dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Karakteristik morfologi kapang endofitik B.Os.1F (inkubasi 7 hari)

Keterangan: B : Isolat yang ditanam pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*)
 Os : *Orthosiphon spicatus* B.B.S
 1F : Fungi (kapang) no:1

Berdasarkan identifikasi secara makroskopik, kapang endofit memiliki diameter koloni 9 cm, tidak memiliki spora, miselium bagian Tengah berwarna hitam, bagian pinggir berwarna putih, permukaan miselium datar dan kasar serta tersebar dipermukaan media. Sedangkan kapang saat posisi dibalik, bagian Tengah miselium berwarna hitam, pinggir berwarna coklat dengan permukaan menyebar.

Identifikasi isolat kapang endofitik B.Os.1F pada suatu kelas tertentu belum dapat diketahui karena belum melakukan pengamatan morfologi secara mikroskopik. Untuk mengetahui nama spesies dari isolat kapang tersebut, diperlukan penelitian mikroorganisme lebih lanjut seperti melalui pengamatan morfologi dan ukuran sel, susunan DNA sel, zat-kimia yang dihasilkan mikroorganisme tersebut dari proses metabolismenya. Data karakter morfologi secara makroskopis dan mikroskopis yang lengkap dapat memberikan informasi identitas suatu isolat sampai tingkat genus maupun spesies.

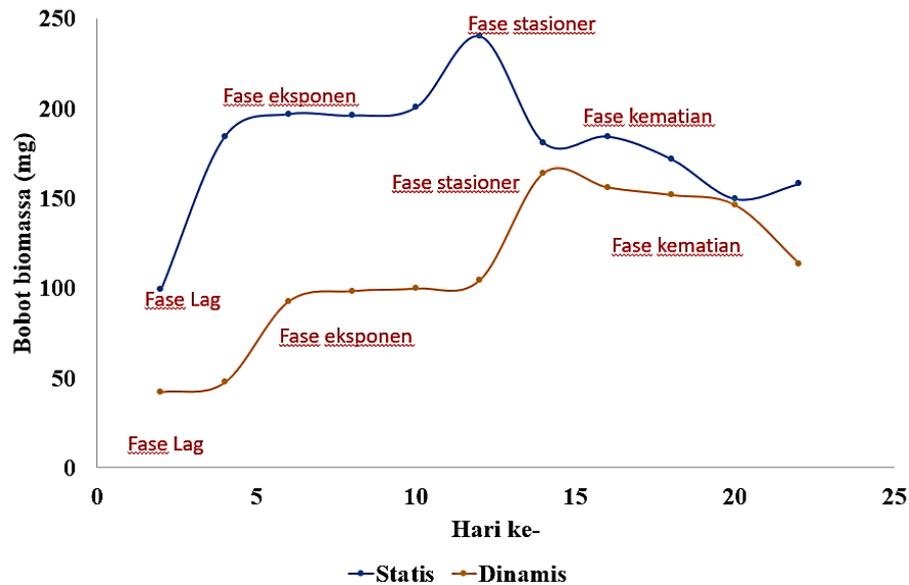
2. Bobot biomassa dan kurva pertumbuhan kapang endofit hasil fermentasi

Dari hasil penimbangan bobot biomassa diketahui bahwa untuk hasil fermentasi dinamis diperoleh bobot optimum pada hari ke-14 dengan bobot 164 mg sedangkan hasil fermentasi statis didapatkan bobot optimum pada hari ke-12 dengan bobot sebesar 240,1 mg. Hal tersebut menunjukkan bahwa proses fermentasi mempengaruhi jumlah rendemen, namun tidak semua rendemen yang besar berpengaruh terhadap aktivitas. Nilai rendemen hasil fermentasi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Bobot biomassa ekstrak hasil fermentasi statis dan dinamis

Pengambilan sampel Hari ke-	Bobot biomassa (mg)	
	Statis	Dinamis
2	99,1	42,1
4	184,3	47,5
6	196,8	92,5
8	196	98,3
10	200,6	99,7
12	240,1	104,5
14	180,7	164
16	184,3	155,9
18	171,7	151,7
20	149,5	146,1
22	157,9	113,7

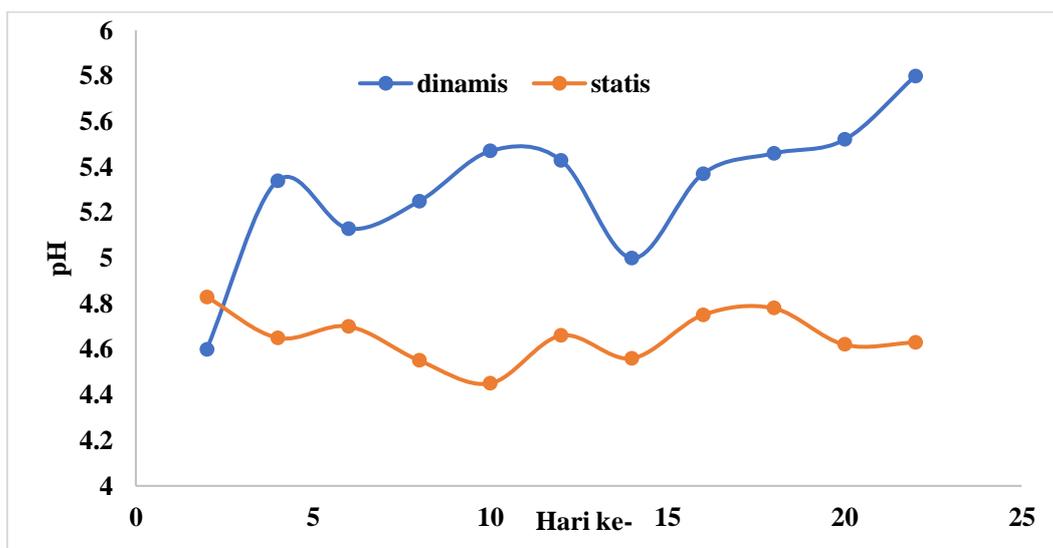
Kurva pertumbuhan kapang dilakukan dengan maksud untuk melihat pertumbuhan kapang yang meliputi fase lag (*lag phase*), fase eksponensial (*exponential growth phase*), fase stasioner (*stationary phase*) dan fase kematian (*death phase*). Grafik pertumbuhan kapang fermentasi dinamis diketahui bahwa fase lag dimulai pada hari ke-2, fase eksponensial dimulai dari hari ke-4 sampai hari ke-10, fase stasioner dimulai dari hari ke-12, pada hari ke-14 sampai hari ke-22 kapang endofit sudah memasuki fase kematian. Sedangkan hasil fermentasi statis diketahui bahwa fase lag dimulai pada hari ke-2 sampai hari ke-4, fase eksponensial dimulai dari hari ke-6 sampai hari ke-12, fase stasioner dimulai dari hari ke-14, pada hari ke-16 sampai hari ke-22 kapang endofit sudah memasuki fase kematian. Grafik yang menggambarkan pertumbuhan kapang hasil fermentasi dinamis pada Gambar 2.



Gambar 2. Kurva pertumbuhan dan bobot biomassa fermentasi statis dan dinamis

3. pH ekstrak hasil fermentasi

Hasil pengamatan selama proses bioproduksi, pH sampel media dari hari ke-2 sampai dengan hari ke-22 fermentasi dinamis adalah berkisar antara 4,60 ~ 5,80. Hasil pengamatan pH fermentasi dinamis dapat dilihat pada Gambar 3.

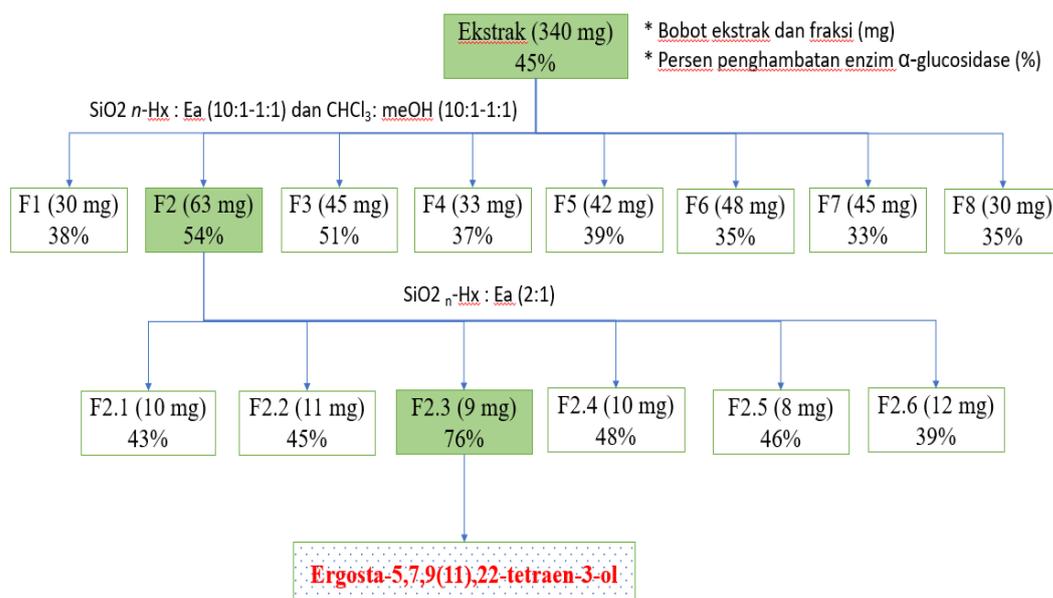


Gambar 3. Pemeriksaan pH sampel dan media fermentasi statis dan dinamis

Hasil pengamatan selama proses bioproduksi, pH sampel dan media dari hari ke-2 sampai dengan hari ke-22 fermentasi statis adalah berkisar antara 4,45~ 4,87. Hasil pengamatan pH fermentasi statis dapat dilihat pada Tabel 4. Hasil pengamatan pH sampel, media selama proses bioproduksi berada pada pH sedikit asam yaitu pada rentang pH 4,45 - 4,87, dengan hasil ini berarti sampel B.Os.1F dapat tumbuh baik pada rentang pH 4,45 - 4,87. Pemeriksaan pH dilakukan untuk mengetahui pH pertumbuhan kapang dan pH pada saat terjadinya proses bioproduksi. Tingkat keasaman (pH) media sekitar 4,87. pH optimum untuk pertumbuhan kapang adalah sekitar 5,5 namun kisaran pH 2-9 masih dapat ditoleransi. [11] Hasil pengamatan pH dapat disimpulkan bahwa hasil fermentasi dinamis dan fermentasi statis mempunyai rentang pH yang sama, yaitu pH 4-6.

4. Aktivitas Antidiabetes ekstrak B.Os.1F dan hasil purifikasi

Hasil uji antidiabetes dengan metode penghambatan enzim α -glucosidase terhadap ekstrak hasil fermentasi dinamis dan kuersetin dengan konsentrasi larutan uji sebesar 500 ppm dapat dilihat pada Gambar 4.



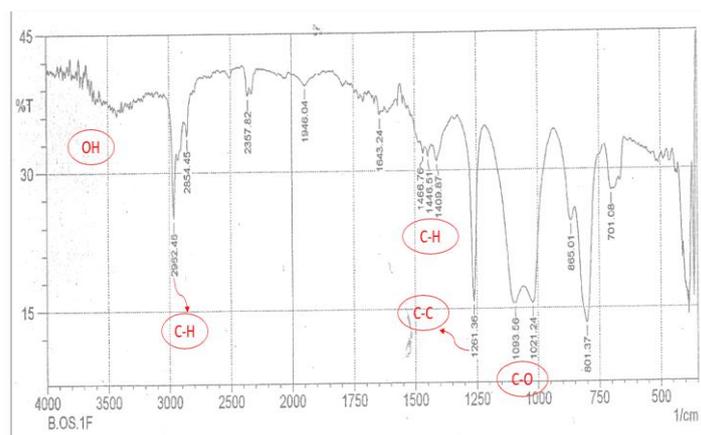
Gambar 4. Hasil uji penghambatan enzim α -glucosidase ekstrak dan fraksi B.Os.1F

Fraksi yang paling tinggi antidiabetesnya ditandai dengan persen hambatan yang paling besar yaitu B.Os.1F.st-2-3 sebesar 76%.

5. Identifikasi Isolat B.Os.1F.2-3 METODE SPEKTROSKOPI

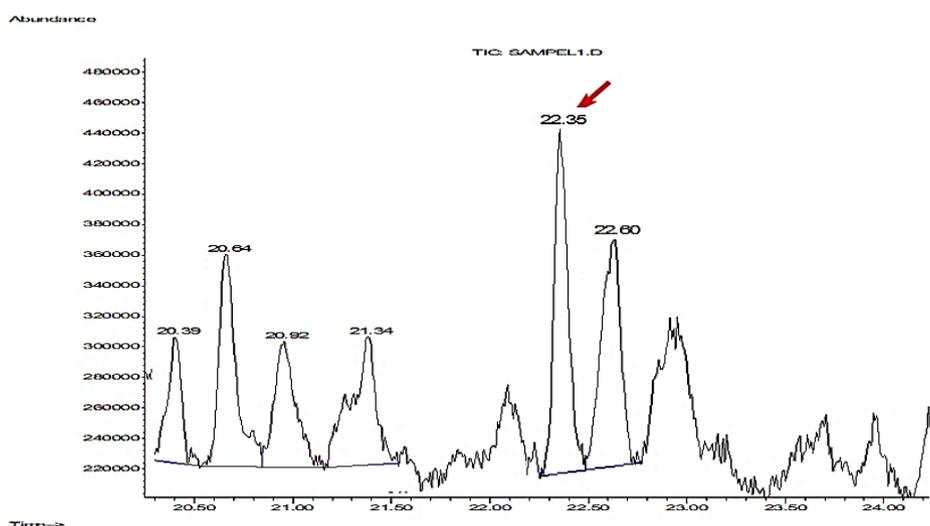
Pengambilan data serapan spektrum UV-Vis untuk isolat X menunjukkan adanya serapan di atas 200 nm yang memberi informasi adanya gugus kromofor dari ikatan rangkap terkonjugasi pada panjang gelombang 234 dan 242 nm.

Interpretasi spektrum infra merah *Fourier-Transform* untuk isolat X menunjukkan adanya bilangan gelombang 3490 cm^{-1} (OH); 2962 cm^{-1} C-H [(alkana/alkena)]; 1261 cm^{-1} (C=C/C-C) dan 1093 cm^{-1} (C-O)



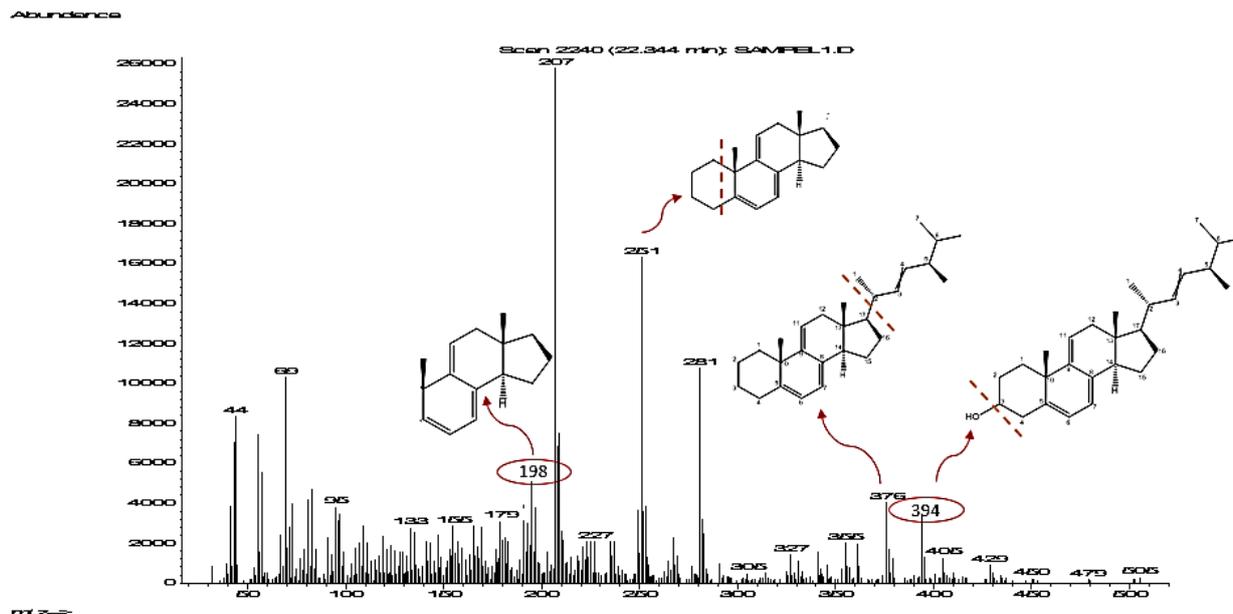
Gambar 5. Spektrum FTIR isolat B.Os.1F.2-3

Analisa dengan metode GC-MS diperoleh kromatogram berupa spektrum dengan hasil fragmentasi dengan waktu retensi tertentu. Masing-masing fragmen memiliki spektrum massa dengan bobot molekul yang berbeda-beda. Berdasarkan kromatogram GCMS diperoleh senyawa dominan pada Rt 22,35. Kromatogram kromatografi gas dan analisa fragmentasi dapat dilihat pada Gambar 6.



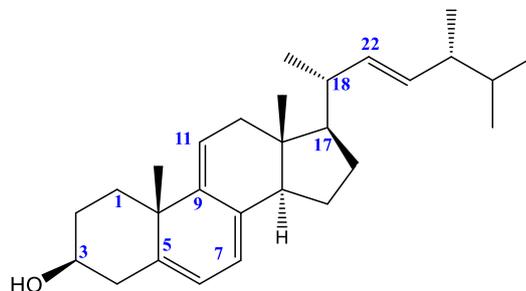
Gambar 6. Kromatogram GCMS isolat B.Os.1F.2-3

Pola fragmentasi GCMS dari senyawa yang muncul pada Rt 22,34. Peak yang tinggi menunjukkan bahwa senyawa yang terdapat pada waktu retensi (tR) tersebut memiliki kuantitas atau kadar yang paling besar yaitu pada tR 23,34 menit. Berdasarkan database Willey7n.1 adalah senyawa dengan pola fragmentasi tersebut merupakan senyawa golongan steroid yaitu Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol dengan kemiripan 91%, dengan m/z 394, [12]. Pola fragmentasi dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Pola fragmentasi isolat B.Os.1F.2-3 hasil GCMS

Berdasarkan penelitian Kumar pada tahun 2022, senyawa Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol merupakan senyawa golongan fitosterol, turunan ergosterol yang sangat hidrofobik dan tidak larut dalam air, yang berhasil diisolasi dari ekstrak metanol *Premna latifolia* Roxb yang diidentifikasi menggunakan GCMS yang muncul pada Rt 22,48 dan memiliki aktivitas sebagai antitumor. [13] selain itu, senyawa golongan fitosterol mampu menurunkan efek samping diabetes, sebagai agen antihiperlipemik dan mampu meningkatkan toleransi glukosa pada penderita diabetes.[14] struktur kimia dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Struktur kimia Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol

DAFTAR PUSTAKA

- [1] S. P. Mohd Bohari, L. S. Chua, N. Adrus, Z. Rahmat, and H. A. Abdullah Al-Moalemi, "Biochemical Characterization of *Orthosiphon Aristatus* and Evaluation of Pharmacological Activities," *J. Herbs, Spices Med. Plants*, vol. 27, no. 3, pp. 305–321, 2021, doi: 10.1080/10496475.2021.1911904.
- [2] D. Hardianto, "Telaah Komprehensif Diabetes Melitus: Klasifikasi, Gejala, Diagnosis, Pencegahan, Dan Pengobatan," *J. Bioteknologi Biosains Indones.*, vol. 7, no. 2, pp. 304–317, 2021, doi: 10.29122/jbbi.v7i2.4209.
- [3] V. K. Singh and A. Kumar, "Secondary metabolites from endophytic fungi: Production, methods of analysis, and diverse pharmaceutical potential," *Symbiosis*, vol. 90, no. 2, pp. 111–125, 2023, doi: 10.1007/s13199-023-00925-9.
- [4] M. Jia *et al.*, "A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: A systematic review," *Front. Microbiol.*, vol. 7, no. JUN, pp. 1–14, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.00906.
- [5] E. J. Dompeipen, Y. Srikandace, W. P. Suharso, H. Cahyana, and P. Simanjuntak, "Potential

- endophytic microbes selection for antidiabetic bioactive compounds production," *Asian J. Biochem.*, vol. 6, no. 6, pp. 465–471, 2011, doi: 10.3923/ajb.2011.465.471.
- [6] H. Kuncoro and N. E. Sugijanto, "Jamur Endofit, Biodiversitas, Potensi dan Prospek Penggunaannya Sebagai Sumber Bahan Obat Baru," *J. Trop. Pharm. Chem.*, vol. 1, no. 3, pp. 247–262, 2011, doi: 10.25026/jtpc.v1i3.35.
- [7] N. S. Jayamohan, P. K. P, and K. Jayachandra, "Surveillance of Invitro Antioxidant and Anthelmintic Activity of Methanolic Extract of Syzygium Cumini Bark (Myrtaceae) * Correspondence Info :," *Ijpp*, vol. 3, no. 2, pp. 56–62, 2013, doi: 10.7439/ijpp.
- [8] A. H. Hashem *et al.*, "Bioactive compounds and biomedical applications of endophytic fungi: a recent review," *Microb. Cell Fact.*, vol. 22, no. 1, pp. 1–23, 2023, doi: 10.1186/s12934-023-02118-x.
- [9] M. Octaviani, W. Y. Ameliah, N. Frimayanti, M. Djohari, and H. Fadhli, "Isolation of Endophytic Fungus from Leaves of *Uncaria cordata* (Lour.) Merr and Antibacterial Activity Against *Propionibacterium acnes* and *Escherichia coli*," *Borneo J. Pharm.*, vol. 5, no. 3, pp. 279–287, 2022, doi: 10.33084/bjop.v5i3.3692.
- [10] G. N. Kim, J. G. Shin, and H. D. Jang, "Antioxidant and antidiabetic activity of Dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) extract treated with *Aspergillus saitoi*," *Food Chem.*, vol. 117, no. 1, pp. 35–41, 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.03.072.
- [11] S. Nurayni and D. Handayani, "Optimization Of Andalas Endophytic Fungi Fermentation Conditions (*Morus Macroura* Miq .) Isolate CED 3 To Produce Antibacterial Compounds Optimasi Kondisi Fermentasi Cendawan Endofit Andalas (*Morus Macroura* Miq .) Isolat CED 3 Untuk Menghasilkan Senyawa Pendahuluan Bahan dan Metode," vol. 6, no. 2, pp. 42–46, 2021.
- [12] P. Isolated, "NPC Natural Product Communications," vol. 1, no. 4, pp. 9–12, 2010.
- [13] R. Kumar *et al.*, "GC-MS analysis of Phytocomponents in the Methanol Extract of *Premna latifolia* Roxb," vol. 14, no. 1, pp. 19–23, 2022.
- [14] M. Prasad *et al.*, "A Comprehensive Review on Therapeutic Perspectives of Phytosterols in Insulin Resistance: A Mechanistic Approach," *Molecules*, vol. 27, no. 5, pp. 1–17, 2022, doi: 10.3390/molecules27051595.