

## Uji *in Vitro* dan *in Vivo* Aktivitas Inhibitor $\alpha$ -Amilase Ekstrak Khamir Endofit Tanaman Brotowali (*Tinospora crispa*, L.) sebagai Antiobesitas

Anik Oktavia<sup>1)</sup>, Sri Pujiyanto<sup>2)</sup>, dan Sunarno<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro

JL. Prof. H. Soedharto, SH, Tembalang, Semarang, Indonesia

Email: anikoktaviacaad@gmail.com

### Abstrak

Brotowali mengandung senyawa triterpenoid (saponin) yang bersifat antimakan (*antifeedant*) karena rasanya yang pahit dan kemampuan dalam menurunkan kerja enzim pencernaan (protease dan amilase). Penelitian ini bertujuan menganalisis kemampuan ekstrak etil asetat isolat khamir endofit pada tanaman Brotowali (*Tinospora crispa*, L.) berfungsi sebagai inhibitor  $\alpha$ -amilase untuk penurunan kadar lemak abdominal, lemak subkutan, dan bobot badan pada tikus. Campuran reaksi uji inhibitor  $\alpha$ -amilase dengan ekstrak 1%, 5%, 10% dan acarbose 0,1% sebesar 25  $\mu$ l, uji kontrol ditambah aquades 25  $\mu$ l. Enzim sebesar 475  $\mu$ l dicampurkan dan diinkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit. Substrat amilum sebesar 500  $\mu$ l ditambahkan ke dalam campuran reaksi dan diinkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan 2 ml DNS. Semua larutan yang telah dicampurkan dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit dan didinginkan. Larutan yang dihasilkan dengan perubahan warna kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 540 nm. Penelitian *in vivo* menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 5 perlakuan dengan 3 kali ulangan, yaitu kelompok kontrol, perlakuan acarbose 0,1% dan perlakuan ekstrak isolat khamir endofit DG26 dosis 40 mg, 50 mg, dan 60 mg. Pemberian pakan dan minum secara *ad libitum*. Hasil uji *in vitro* ekstrak 1% memiliki kemampuan inhibisi terhadap  $\alpha$ -amilase sebesar 10,87%, hampir sama dengan acarbose sebesar 9,52%. Hal ini menunjukkan bahwa isolat terpilih yaitu isolat khamir endofit DG26 memiliki potensi untuk dimanfaatkan sebagai inhibitor  $\alpha$ -amilase. Hasil uji *in vivo* menunjukkan bahwa pemberian ekstrak khamir endofit DG26 berpengaruh signifikan pada penurunan bobot lemak abdominal dan lemak subkutan ( $p < 0,05$ ). Bobot badan setelah aklimatisasi terjadi peningkatan yang menunjukkan bahwa tikus dalam keadaan sehat dan terjadi penurunan diakhir perlakuan. Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak isolat khamir endofit DG26 pada dosis 60 mg mampu menurunkan bobot lemak abdominal, lemak subkutan, dan menyebabkan terjadinya perbedaan penurunan bobot badan pada tikus (*Rattus norvegicus*).

**Kata kunci** : Antiobesitas, brotowali (*Tinospora crispa* L.), inhibitor  $\alpha$ -amilase, lemak abdominal, lemak subkutan.

### ABSTRACT

Brotowali contains triterpenoid compounds (saponins) which are antifeedant because of its bitter taste and ability to reduce the work of digestive enzymes (proteases and amylases). This study aims to analyze the ability of ethyl acetate extract of endophytic yeast isolates in Brotowali plants (*Tinospora crispa*, L.) which function as  $\alpha$ -amylase inhibitors for decreasing levels of abdominal fat, subcutaneous fat, and body weight in mice. The mixture of  $\alpha$ -amylase inhibitor test reaction with extracts of 1%, 5%, 10% and acarbose 0,1% by 25  $\mu$ l, control test plus 25  $\mu$ l distilled water. An enzyme of 475  $\mu$ l was mixed and incubated at 25°C

for 10 minutes. A starch substrate of 500  $\mu$ l was added to the reaction mixture and incubated at 25°C for 10 minutes. The reaction was stopped with 2 ml of DNS. All the mixed solutions were heated at 100°C for 5 minutes and cooled. The solution produced with color change is then measured its absorbance using spectrophotometry at a wavelength of 540 nm. The *in vivo* study used a Completely Randomized Design (CRD) consisting of 5 treatments with 3 replications, namely the control group, 0,1% acarbose treatment and the endophytic Yeast isolate extract isolate dose of 40 mg, 50 mg, and 60 mg. Feeding and drinking ad libitum. *In vitro* test results of 1% extract have the ability to inhibit  $\alpha$ -amylase of 10,87%, almost the same as acarbose of 9,52%. This shows that the selected isolate, the DG26 endophytic yeast isolate, has the potential to be used as an  $\alpha$ -amylase inhibitor. *In vivo* test results showed that the administration of DG26 endophytic yeast extract had a significant effect on reducing abdominal fat weight and subcutaneous fat ( $p < 0,05$ ). Body weight after acclimation increased, which showed that the rats were in good health and there was a decrease at the end of the treatment. Based on the research it can be concluded that the administration of DG26 endophytic yeast isolate extract at a dose of 60 mg can reduce the weight of abdominal fat, subcutaneous fat, and cause differences in body weight reduction in rats (*Rattus norvegicus*).

Key words: Antiobesity, brotowali (*Tinospora crispa* L.),  $\alpha$ -amylase inhibitors, abdominal fat, subcutaneous fat.

## PENDAHULUAN

Obesitas didefinisikan sebagai akumulasi lemak di jaringan adiposa subkutan dan organ visceral rongga abdominal secara berlebihan yang dapat mengganggu kesehatan. *Body Mass Index* (BMI) atau Indeks Massa Tubuh (IMT) adalah indeks sederhana untuk mengukur berat badan dan tinggi badan yang biasa digunakan untuk mengklasifikasikan status gizi orang dewasa. Indeks ini didefinisikan sebagai berat badan seseorang dalam kilogram dibagi dengan kuadrat tinggi dalam meter ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). IMT lebih dari atau sama dengan 25 adalah kelebihan berat badan (*overweight*) sedangkan IMT lebih dari atau sama dengan 30 adalah obesitas. Prevalensi obesitas di seluruh dunia pada tahun 2004 meningkat berkisar lebih dari 20% di Amerika Serikat, Seychelles dan Selandia Baru (Aprilliana, 2016). Survei yang dilakukan *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) pada tahun 2009 menunjukkan bahwa Indonesia menduduki peringkat ke-4 di Asia dengan prevalensi obesitas

mencapai 2,4%. Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar tahun 2007, prevalensi obesitas di Indonesia mencapai 19,1% dari penduduk usia 15 tahun ke atas (Setyono *et al.*, 2014).

Obesitas diartikan sebagai suatu penyakit yang disebabkan oleh ketidakseimbangan energi akibat dari asupan kalori yang melebihi kebutuhan tubuh. Ketidakseimbangan ini mengakibatkan akumulasi lemak tubuh. Akumulasi lemak tubuh berlebih berkaitan dengan beberapa penyakit dengan morbiditas kronik seperti diabetes mellitus tipe II, penyakit jantung koroner, hipertensi, kanker, dan dislipidemia. Penderita obesitas juga memiliki risiko kematian tiga kali lebih tinggi dibandingkan dengan orang dengan berat badan normal (Setyono *et al.*, 2014). Obesitas terjadi karena adanya akumulasi lemak di tubuh atau jaringan adiposa yang berlebih atau abnormal. Lemak tubuh terbesar 50% di subkutan, 45% disekeliling organ (rongga abdomen), dan

5% sisanya di jaringan intramuskular (Inandia, 2012). Pertambahan massa lemak selalu disertai perubahan fisiologis tubuh yang sebagian besar bergantung pada distribusi regional massa lemak. Timbunan lemak pada jaringan visceral (intra-abdomen) yang tergambar penambahan lingkaran perut akan mendorong perkembangan peningkatan kadar insulin plasma, sindrom resistensi insulin, hipertrigliseridemia dan hiperlipidemia (Nangge *et al*, 2018).

Pemanfaatan tanaman obat tradisional supaya menjadi bentuk sediaan yang lebih modern, maka tanaman obat tersebut perlu dilakukan ekstraksi terhadap kandungannya sehingga dapat diperoleh ekstrak yang sesuai dengan jenis sediaan yang diinginkan (Wahyuningsih dan Tasminatun, 2007). Tanaman brotowali merupakan tumbuhan liar di hutan, ladang atau ditanam dekat pagar yang biasa ditanam sebagai tumbuhan obat. Tanaman ini tumbuh di tempat panas, termasuk golongan perdu, memanjat, tinggi batang sampai 2,5 m. Batang sebesar jari kelingking, berbintil rapat, rasanya pahit. Daun tunggal bertangkai berbentuk seperti jantung atau agak bulat telur berujung lancip panjang 7-12 cm, lebar 5-10 cm. Bunga kecil warna hijau muda berbentuk tandan semu dan diperbanyak dengan stek (Malik, 2015). Brotowali mengandung zat pahit tinokriposid, damar lunak, pati, glikosida, pikroretosid, harsa, kolumbin, kaokulin atau pikrotoksin, dan beberapa alkaloid seperti aporfin, beberin, dan palmatin. Senyawa yang paling penting yang terdapat pada batang brotowali diduga merupakan senyawa tinokrisposid yang memiliki aktivitas sebagai antimalaria, antiinflamasi, dan antidiabetes

## BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi PDA, isolat khamir endofit DG26, medium *pepton starch* (YS) cair, etil asetat, aquades, alkohol 70%, DNS, NaOH, Na sodium tartat, amilum,

(Marthianti, 2006). Pemanfaatan tanaman brotowali sebagai tanaman obat tanpa eksploitasi sangat diperlukan agar kelestarian hayati tetap terjaga, yaitu dengan memanfaatkan mikroorganisme endofit.

Endofit merupakan mikroorganisme yang secara alami terintegrasi dengan tanaman sehat, hidup di dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan efek negatif dan bahkan bisa berfungsi dalam pemenuhan kebutuhan nutrisi dan pengendalian patogen yang menyerang tanaman Khamir endofit memiliki potensi untuk produksi skala industri di bidang obat (Yulianti, 2012). Penelitian lebih lanjut telah dilakukan Pramitasari *et al* (2017), dengan uji aktivitas inhibitor  $\alpha$ -amilase dari supernatan isolat khamir endofit DG26 tanaman brotowali yang menunjukkan kemampuan inhibitor terbaik yakni sebesar 68,27% lebih tinggi dibandingkan dengan obat antidiabetik komersial yaitu acarbose 0,1%. Oleh karena itu, penelitian terhadap isolat terpilih yaitu isolat khamir endofit DG26 memiliki potensi untuk dimanfaatkan sebagai inhibitor  $\alpha$ -amilase.

Pada penelitian yang akan dilakukan yaitu “Uji *in Vitro* dan *in Vivo* Aktivitas Inhibitor  $\alpha$ -Amilase Ekstrak Khamir Endofit Tanaman Brotowali (*Tinospora crispa*, L.) sebagai Antiobesitas”. Melalui penelitian ini, diharapkan pengaruh konsumsi ekstrak etil asetat isolat khamir endofit brotowali untuk penurunan kadar lemak abdominal, lemak subkutan, bobot badan pada tikus dapat diketahui secara jelas, sehingga dapat ditemukannya suatu terapi alternatif yang efektif dan terjangkau untuk mencegah terjadinya obesitas.

enzim  $\alpha$ -amilase, DMSO,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , tikus (*Rattus norvegicus*) 15 ekor, pakan, minum, aquadest (aqua destilata) dan kloroform.

### Peremajaan Isolat Khamir Endofit

Isolat khamir endofit DG26 diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi Departemen Biologi Universitas Diponegoro sebagai kultur stok. Isolat khamir endofit DG26 diremajakan dengan cara ditumbuhkan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dalam cawan petri, kemudian inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu ruang.

### Fermentasi Sel Khamir Endofit

Isolat khamir endofit DG26 diambil sebanyak satu ose, diinokulasikan ke dalam media *Pepton Starch* (YS) cair dengan komposisi 0,05 gr *soluble starch*, 0,25 gr pepton dan 0,075 gr *yeast* dalam 50 ml aquades sebagai starter, inkubasi dilakukan selama 24 jam. Pemindahan inokulum sebesar 20 ml (2%) ke dalam media *Pepton Starch* (YS) cair menurut Pramitasari *et al.*, (2017) dengan komposisi : 0,1% *soluble starch*, 0,5% pepton dan 0,15% *yeast* dalam 100 ml aquades, kemudian media dibuat sebanyak 1000 ml. Inkubasi menggunakan *rotary shaker* pada suhu ruang selama 72 jam.

### Ekstraksi Kultur Khamir Endofit

Inokulum dimasukkan dalam erlenmeyer dan dicampur etil asetat dengan perbandingan 1:1. Campuran inokulum dan etil asetat dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* selama 15 menit dan dibiarkan selama 24 jam hingga membentuk dua fraksi. Fraksi etil asetat dipisahkan menggunakan corong pisah. Menurut Setyaningsih *et al.*, (2014) selanjutnya fraksi etil asetat dipisahkan dari pelarutnya (dipekatkan) menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50°C selama 8 jam hingga diperoleh ekstrak kental.

### Uji Inhibitor $\alpha$ -Amilase

Uji penghambatan enzim  $\alpha$ -amilase dilakukan berdasarkan pada pemecahan substrat untuk menghasilkan produk berwarna, diukur absorbansinya selama periode waktu tertentu. Pengujian dilakukan dengan 2 uji yaitu uji kontrol dan uji sampel. Sampel inhibitor (ekstrak) dengan konsentrasi 1%, 5%, dan 10% sebesar 25  $\mu$ l, sedangkan uji kontrol 0  $\mu$ l. Menurut Pramitasari *et al.*, (2017), larutan Acarbose 0,1% digunakan sebagai kontrol positif. Enzim  $\alpha$ -amilase 100 unit dilarutkan dalam 1 ml buffer fosfat (1000  $\mu$ l) pH 7. Kemudian dipisahkan kedalam 4 tabung eppendorf yang masing-masing dengan konsentrasi 25 unit/0,25 ml. Saat pengambilan larutan enzim pada satu tabung yang berisi 25 unit/0,25 ml ditambah 50 ml buffer fosfat dengan konsentrasi 0,5 unit/ml untuk masing-masing uji sebesar 475  $\mu$ l. Penambahan aquades pada uji kontrol sebesar 25  $\mu$ l, sedangkan uji sampel sebesar 0  $\mu$ l. Reaksi campuran diinkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit.

Menurut Pramitasari *et al.*, (2017), larutan *soluble starch* (0,5%) dibuat dengan melarutkan 0,25 g amilum kedalam 50 ml akuades steril. Substrat amilum masing-masing uji 500  $\mu$ l. Reaksi campuran diinkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan 2 ml 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). Semua larutan yang telah dicampurkan kemudian direbus pada suhu 100°C selama 5 menit dan didinginkan. Larutan yang dihasilkan dengan perubahan warna kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm.

**Tabel 3.1** Campuran reaksi uji inhibitor  $\alpha$ -amilase

	Kontrol (c)	Sampel (s)
Sampel inhibitor (ekstrak) 1%, 5%, 10% dan Acarbose 0,1% (pembanding)	-	25 $\mu$ l
Enzim	475 $\mu$ l	475 $\mu$ l
Pelarut	25 $\mu$ l	-
Amilum	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l
DNS	2 ml	2 ml

Menurut Pujiyanto dan Ferniah (2010) persentase inhibisi diukur dengan rumus % inhibisi =  $\frac{(c-s)}{c} \times 100\%$ . Dimana c adalah absorbansi kontrol, sedangkan s adalah absorbansi sampel. Absorbansi kontrol dikurangi absorbansi sampel, selanjutnya dibagi absorbansi kontrol kemudian dikali 100%.

### Hewan Percobaan dan Manajemen Pemeliharaan

Hewan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar berjumlah 15 ekor, berumur 2,5 bulan dengan bobot badan berkisar 160-180 g yang diperoleh dari UD Wistar (*Laboratory rat*) Yogyakarta. Tikus wistar tersebut ditempatkan ke dalam 9 buah petak kandang untuk dilakukan aklimatisasi selama satu minggu. Masing-masing petak kandang berisi dua ekor tikus dan ada yang satu ekor tikus, serta diberi tanda garis satu dan dua pada tikus yang berbeda pada bagian ekor. Kandang penelitian dilengkapi dengan alas berupa serutan kayu. Pemeliharaan tikus pada kandang yang terbuat dari bak plastik dengan panjang 40 cm, lebar 15 cm dan tinggi 10 cm. Pada bagian atap petak kandang pemeliharaan tikus putih dipasang anyaman besi dengan ukuran 1 cm (Widiartini *et al*, 2013). Pemberian pakan standar BR-2 dan air minum secara *ad libitum*. Pakan standar mengandung air 12%, protein 19-21%, lemak 4-8%, serat

kasar 5%, abu 8%, kalsium 0,9-1,2% dan fosfor 0,7-1% (Syadza, 2014). Hewan percobaan dipilih yang sehat dengan penurunan bobot badan tidak melebihi 10% selama pemeliharaan.

### Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima jenis perlakuan, terdiri atas satu perlakuan berupa kelompok kontrol dan empat perlakuan berupa ekstrak khamir endofit yang dibuat dengan berbagai dosis. Ekstrak khamir endofit DG26 dilarutkan dalam 0,5 ml aqua destilata diberikan secara *gavage* dengan spuit injeksi ujung berkanul. Perlakuan ekstrak khamir endofit DG26 diberikan sebanyak satu kali sehari. Ekstrak diberikan selama dua minggu secara berturut-turut, dimulai setelah tikus aklimatisasi. Masing-masing perlakuan terdiri atas tiga ulangan. Penempatan sampel pada setiap ulangan menggunakan sistem pengundian. Pemberian ekstrak pada perlakuan disusun sebagai berikut:

- KN: Kelompok tikus normal (hanya mendapatkan sonde aqua destilata).
- KP : Kelompok tikus yang diberi Acarbose 0,1% sebesar 0,9 mg/200 Gbb.
- E1 : Kelompok tikus yang diberi ekstrak khamir endofit 7,2 mg/200 gBB.
- E2 : Kelompok tikus yang diberi ekstrak khamir endofit 9 mg/200 gBB.
- E3 : Kelompok tikus yang diberi ekstrak khamir endofit 10,8 mg/200 gBB.

**Tabel 3.2** Rancangan percobaan penelitian

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
KN	KN.1	KN.2	KN.3
KP	KP.1	KP.2	KP.3
E1	E1.1	E1.2	E1.3
E2	E2.1	E2.2	E2.3
E3	E3.1	E3.2	E3.3

### Prosedur Pembedahan

Pembiusan tikus dilakukan dengan menggunakan kloroform. Tikus dimasukkan ke dalam toples kaca, diberi kapas yang telah ditetesi kloroform, dan ditutup dengan segera. Dua sampai lima menit kemudian dilakukan pengamatan terhadap nafas dan denyut jantung, apabila tikus sudah tidak bernafas, tutup toples kaca dibuka, sebelum dilakukan pembedahan tikus didislokasi pada tulang leher untuk memastikan hewan coba telah benar-benar mati. Tindakan pembedahan mayor (bedah dengan membuka rongga tubuh).

### Pengambilan dan Pengukuran Sampel Penelitian

Parameter yang akan diamati yaitu bobot lemak abdominal, lemak subkutan dan bobot badan tikus. Bobot lemak abdominal dan lemak subkutan ditimbang diakhir perlakuan setelah tindakan pembedahan. Bobot badan tikus ditimbang pada waktu yang berbeda yaitu sebelum aklimatisasi, setelah aklimatisasi, diakhir perlakuan minggu pertama dan diakhir perlakuan minggu kedua. Sampel yang akan diukur diambil dari masing-masing tikus. Lemak abdominal diperoleh dari lemak didalam rongga perut termasuk disekitar organ pencernaan. Lemak subkutan yang diperoleh dari deposisi lemak utama yaitu pada bagian anterior

dan posterior. Lemak abdominal dan lemak subkutan diambil dengan menggunakan alat bedah. Lemak abdominal, lemak subkutan dan bobot badan tikus ditimbang dengan menggunakan timbangan digital dan dinyatakan dengan g/ekor (Sibarani *et al*, 2014).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Produksi Ekstrak Khamir Endofit DG26

Proses produksi ekstrak khamir endofit DG26 dengan cara melakukan peremajaan pada media pertumbuhan. Fitria (2017) menyatakan bahwa peremajaan biakan mikroba dilakukan dengan memindahkan atau memperbaharui biakan mikroba dari biakan lama ke medium tumbuh yang baru secara berkala dan mengaktifkan kembali mikroba inaktif karena disimpan dalam lemari pendingin sehingga dapat menghasilkan enzim secara optimal. Octavia dan Wantini (2017) menyatakan bahwa *Potato Dextrose Agar* (PDA) merupakan media yang sangat umum yang digunakan untuk menumbuhkan dan mengembangbiakkan serta mengidentifikasi jamur dan khamir. Memiliki pH yang rendah (pH 4,5 sampai 5,6) sehingga menghambat pertumbuhan bakteri yang membutuhkan lingkungan yang netral dengan pH 7,0 dan suhu optimum untuk pertumbuhan antara 25-30°C. PDA mengandung sumber karbohidrat dalam jumlah cukup yaitu 20% ekstrak kentang dan 2% gula sehingga baik untuk pertumbuhan kapang dan khamir tetapi kurang baik untuk pertumbuhan bakteri.

Produksi senyawa inhibitor  $\alpha$ -amilase dibuat dengan cara menumbuhkan isolat khamir DG26 pada medium *Pepton Starch* (YS) cair sebagai media produksi. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Pramitasari *et al*, (2017) bahwa media *Pepton Starch* (YS) cair dengan komposisi 0,1% *soluble starch*, 0,5% pepton dan 0,15% *yeast*. Pertama

dibuat kultur starter dimana populasi mikroba dalam jumlah dan kondisi fisiologis yang siap diinokulasikan pada media fermentasi. Mikroba pada starter ditumbuhkan selama 24 jam. Yumas dan Rosniati (2014) menyatakan, proses pembuatan starter yaitu medium fermentasi diinkubasi pada suhu kamar sampai pertumbuhan selnya mencapai fase logaritmik dalam waktu 24 jam.

Pemindahan inokulum kedalam medium *Pepton Starch* (YS) cair dengan waktu inkubasi selama 72 jam. Pembuatan inokulum bertujuan untuk memperpendek fase lag yaitu dengan cara mengadaptasikan sel kedalam media fermentasi. Fase stasioner merupakan waktu optimum dalam proses fermentasi. Menurut Rendowaty *et al*, (2017) fase stasioner menunjukkan terjadinya penumpukan hasil metabolisme sekunder yang diproduksi mikroba pada media cair di fase akhir pertumbuhan (idiophase). Fase stasioner ditandai terjadinya pertumbuhan secara konstan,

berkurangnya jumlah nutrisi dalam media dan produk metabolit yang meningkat. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Pramitasari *et al*, (2017) yang menunjukkan bahwa metabolit sekunder yaitu inhibitor  $\alpha$ -amilase yang diproduksi oleh khamir yang mengalami peningkatan pada fase stasioner. Pertumbuhan khamir DG26 diduga memasuki fase stasioner di atas jam ke 24 dan menunjukkan aktivitas penghambatan optimal ditunjukkan pada waktu inkubasi 72 jam.



**Gambar 4.1** Pertumbuhan khamir DG26 pada medium *Pepton Starch* (YS) cair selama 72 jam

Ekstraksi kultur khamir endofit dilakukan dengan mencampurkan inokulum menggunakan pelarut etil asetat. Romadanu *et al*, (2014) menyatakan, etil asetat adalah pelarut semi polar yang memiliki kemampuan melarutkan senyawa semi polar pada dinding sel mikroba. Proses pencampuran inokulum dengan pelarut etil asetat akan menghasilkan dua fraksi yaitu etil asetat dan biomassa mikroba. Setyaningsih *et al*, (2014) menyatakan, fraksi etil asetat akan terpisah dari pelarutnya melalui proses pemekatan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50°C selama 8 jam.



**Gambar 4.2** Ekstrak khamir DG26

Produksi ekstrak isolat khamir endofit DG26 dilakukan sebanyak tiga kali. Hasil rendemen ekstrak isolat khamir endofit DG26 yang diperoleh dari pelarut etil asetat sebanyak 1 liter yaitu 0,8, 0,75, dan 0,86 gram.

#### UJI IN VITRO

Aktivitas penghambatan produk fermentasi khamir yaitu inhibitor  $\alpha$ -amilase dapat diketahui dengan menggunakan indikator gula reduksi. Gula reduksi memiliki keterkaitan erat dengan aktifitas enzim. Suatu enzim yang memiliki aktifitas inhibitor tinggi biasanya akan diikuti dengan produk yang sedikit. Enzim  $\alpha$ -amilase dengan substrat amilum akan menghasilkan produk monosakarida berupa glukosa. Kadar glukosa atau gula

reduksi dalam sampel yang merupakan produk reaksi enzimatis pendegradasi polisakarida dapat diketahui dengan metode DNS (*Dinitrosalicylic Acid*). Azizah (2017) menyatakan prinsip metode *dinitrosalisilat* (DNS) adalah oksidasi gugus aldehyd pada rantai polisakarida menjadi gugus karboksil. Gugus ini juga akan mereduksi asam 3,5-dinitrosalisilat menjadi asam 3-amino-5-nitrosalisilat menghasilkan senyawa yang dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540-550 nm menggunakan spektrofotometri. Reaksi tersebut akan berlangsung terus-menerus selama terdapat gula pereduksi dalam larutan yang diujikan. Gula reduksi pada sampel akan bereaksi dengan larutan DNS yang ditandai dengan terbentuknya warna kuning sampai menjadi warna jingga kemerahan. Pramitasari *et al*, (2017) menyatakan, aktivitas inhibitor yang

semakin besar pada enzim tertentu akan diikuti produk yang semakin sedikit yang diindikasikan oleh warna larutan setelah inkubasi menjadi lebih cerah. Uji inhibisi  $\alpha$ -amilase menggunakan acarbose 0,1% dengan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 540-550 nm. Acarbose 0,1% pada penelitian ini berfungsi sebagai kontrol positif dengan kemampuan sebagai inhibitor  $\alpha$ -amilase. Ndraha (2014) menyatakan, acarbose memiliki aksi sebagai inhibitor  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glucosidase yang berpengaruh terhadap penurunan absorpsi glukosa di usus halus. Hasil aktivitas inhibisi  $\alpha$ -amilase isolat khamir endofit tumbuhan brotowali (*Tinospora crispa*) dapat dilihat pada Tabel 4.2.

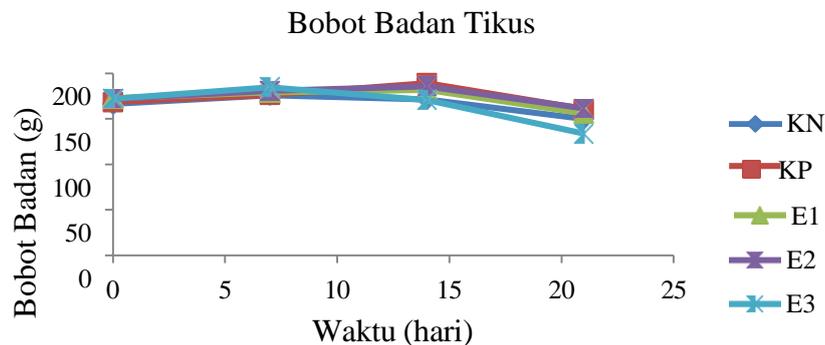
**Tabel 4.2** Aktivitas inhibisi  $\alpha$ -amilase khamir endofit DG26

Konsentrasi	Absorbansi		% Inhibisi
	Kontrol	Sampel	
1%	0,46	0,41	10,87
5%	0,46	0,39	15,22
10%	0,37	0,42	(-13,51)
Acarbose 0,1%	0,42	0,38	9,52

Hasil uji inhibisi  $\alpha$ -amilase mempunyai kemampuan inhibisi terbaik, yaitu sebesar 15,22%. Berdasarkan hasil yang diperoleh bahwa ekstrak khamir 1% memiliki kemampuan inhibisi terhadap  $\alpha$ -amilase sebesar 10,87%. Bahan ini memiliki kemampuan relatif sama dengan daya inhibisi acarbose sebesar 9,52%, yang bertujuan untuk membandingkan pengaruh pemberian ekstrak dan acarbose. Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, persentase inhibisi acarbose lebih rendah dibandingkan inhibisi isolat khamir DG26 yaitu sebesar 10,87%. Hal ini menunjukkan bahwa isolat terpilih yaitu isolat khamir endofit DG26 memiliki potensi untuk dimanfaatkan sebagai inhibitor  $\alpha$ -amilase.

#### UJI *IN VIVO*

Uji *in vivo* bertujuan untuk menganalisa respon fisiologis pada kondisi praklinis dengan menggunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) yang berumur 2,5 bulan dengan bobot badan berkisar antara 160-180 gram. Uji praklinis merupakan uji lanjutan dari uji *in vitro* yang menggunakan ekstrak isolat khamir endofit DG26 untuk dilihat pengaruhnya terhadap lemak abdominal, lemak subkutan, dan bobot badan tikus. Hasanah (2015) menyatakan, aklimatisasi adalah pemeliharaan hewan uji pada kandang percobaan baru yang bertujuan untuk penyesuaian perilaku dan kondisi fisiologis hewan pada lingkungan baru tersebut.



**Gambar 4.3** Perbandingan bobot badan tikus sebelum aklimatisasi, setelah aklimatisasi, perlakuan minggu 1 dan perlakuan minggu 2

Pengukuran bobot badan tikus dilakukan pada waktu sebelum aklimatisasi, setelah aklimatisasi, perlakuan minggu pertama dan perlakuan minggu kedua. Hasil pengukuran bobot badan tikus ditunjukkan pada gambar 4.3. Bobot badan tikus sebelum aklimatisasi berkisar antara 166,33-172,67 g, setelah aklimatisasi meningkat sebesar 175,67-184,67 g. Peningkatan bobot badan hewan uji ini menunjukkan adanya peningkatan konsumsi pakan. Kondisi ini memiliki keterkaitan dengan kemampuan adaptasi hewan uji pada lingkungan yang baru dan proses metabolisme yang berlangsung secara optimal. Bukti penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Mawarti *et al*, (2012) yang menyatakan bahwa *Rattus norvegicus* strain Wistar dengan jenis kelamin jantan yang berumur 6-8 minggu memiliki bobot badan antara 150-200 g. Hasil penelitian Nurmawati (2016) menyatakan, aklimatisasi untuk adaptasi terhadap lingkungan baru dilakukan selama 7 hari. Pakan dan minum diberikan secara *ad libitum* pada saat aklimatisasi tikus. Selama penelitian bobot badan tikus mengalami peningkatan.

Tikus yang diinjeksi dengan berbagai macam dosis ekstrak khamir endofit DG26 selama minggu pertama menunjukkan peningkatan rata-rata bobot badan, baik pada perlakuan kontrol positif, ekstrak dosis 40 mg, dan ekstrak dosis 50 mg. Bobot tikus pada perlakuan kontrol positif rata-rata sebesar 189,33 g,

meningkat 13 g (7,37%) dibanding saat akhir aklimatisasi. Bobot badan tikus pada perlakuan kontrol negatif dan ekstrak dosis 60 mg, berturut-turut adalah 171,33 g dan 170,67 g atau mengalami penurunan sebesar 4,34 g (2,47%) dan 14 g (7,58%). Ekstrak khamir endofit DG26 yang diberikan untuk hewan uji pada minggu kedua berpengaruh pada penurunan bobot badan pada setiap perlakuan. Penurunan tertinggi terjadi pada perlakuan dosis 60 mg sebesar 37 g, menurun dari bobot badan dari 170,67 g menjadi 133,67 g (21,68%). Penurunan bobot badan tikus dipengaruhi oleh faktor penurunan konsumsi pakan. Fitriyana (2018) menyatakan bahwa pada kondisi normal dan tikus dalam kondisi sehat, jumlah pakan yang dikonsumsi dapat mempengaruhi perubahan bobot badan baik penurunan maupun peningkatan. Adanya penurunan jumlah pakan yang dikonsumsi menyebabkan tikus kekurangan energi yang digunakan untuk pertumbuhan sehingga berakibat pada penurunan biomassa tubuh atau bobot badan.

Penurunan konsumsi pakan memiliki keterkaitan dengan palatabilitas hewan uji terhadap bahan yang digunakan untuk perlakuan. Senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak khamir endofit diduga menjadi faktor penyebab terjadinya penurunan palatabilitas dan bobot badan hewan uji. Nuningtyas (2014) menyatakan, palatabilitas merupakan tingkat kesukaan

ternak terhadap pakan. Penurunan palatabilitas pakan akibat injeksi ekstrak isolat khamir endofit DG26 bersumber dari bahan yang memiliki rasa pahit. Safitri (2018) menyatakan, Brotowali (*Tinospora crispa*, L) memiliki kandungan zat alkaloid (pikroretin, barberin, palmatin, kolumbin), damar lunak, glikosida, flavonoid, tinokrisposid dan triterpenoid (saponin). Zat alkaloid, tinokrisposid dan triterpenoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang bersifat antimakan (*antifeedant*) karena memiliki rasa yang pahit. Permadi dan Fitrihidajati (2019) menyatakan bahwa senyawa triterpenoid (saponin) memiliki kemampuan dalam menurunkan kerja enzim pencernaan (protease dan amilase) dapat mengganggu pembentukan ATP yang mengakibatkan kekurangan energi dan penyerapan makanan. Senyawa triterpenoid pada konsentrasi tinggi dapat menurunkan aktivitas makan akibat masuknya senyawa yang menstimulasi *kemoreseptor* (alat indera yang merespon terhadap rangsangan zat kimia yaitu indera pembau dan pengecap) yang menstimulasi sistem saraf. Hal ini dapat diketahui bahwa pemberian ekstrak isolat khamir endofit DG26 yang mengandung senyawa triterpenoid (saponin) mampu mempengaruhi penurunan palatabilitas dan tingkat konsumsi pakan.

Pemberian perlakuan yang dilakukan selama 2 minggu, selanjutnya proses anestesi dilakukan satu persatu

terhadap hewan coba yaitu dengan memasukkan hewan coba ke dalam toples kaca yang berisi kapas yang sudah ditetesi kloroform. Hal ini sesuai dengan penelitian Pramitasari *et al*, (2012) bahwa anestesi dilakukan secara inhalasi pada hewan coba dengan dosis kloroform 10 ml/10 hewan coba, anestesi dilakukan sampai tikus pingsan, kemudian dihitung selama  $\pm 20$  detik, kemudian diangkat dari toples pembiusan, sebelum dilakukan pembedahan tikus didislokasi pada tulang leher untuk memastikan hewan coba telah benar-benar mati. Tindakan pembedahan mayor (bedah dengan membuka rongga tubuh).

Hasil analisis terhadap parameter yang diamati yaitu bobot lemak abdominal dan lemak subkutan setelah pemberian ekstrak isolat khamir endofit DG26. Data bobot lemak abdominal dan lemak subkutan yang diperoleh, dianalisis menggunakan Uji Normalitas dan Uji Homogenitas untuk mengetahui apakah data tersebut terdistribusi normal dan memiliki variasi yang homogen atau tidak. Hasil dari uji Normalitas (*N pair test*) menunjukkan bahwa data tersebut terdistribusi normal ( $P > 0,05$ ). Selanjutnya hasil dari Uji Homogenitas menunjukkan bahwa variasi data tersebut homogen ( $P > 0,05$ ). Hasil pengukuran bobot lemak abdominal dan lemak subkutan pada hewan uji setelah pemberian ekstrak isolat khamir endofit DG26 dapat dilihat pada tabel 4.3.

**Tabel 4.3** Lemak abdominal dan lemak subkutan pada hewan uji setelah pemberian ekstrak isolat khamir endofit DG26

	KN	KP	E1	E2	E3
Lemak abdominal (g)	1,38 <sup>b</sup> ±0,32	1,16 <sup>b</sup> ±0,16	1,10 <sup>b</sup> ±0,18	1,26 <sup>b</sup> ±0,32	0,60 <sup>a</sup> ±0,17
Lemak subkutan (g)	0,57 <sup>b</sup> ±0,13	0,55 <sup>b</sup> ±0,10	0,22 <sup>a</sup> ±0,05	0,19 <sup>a</sup> ±0,04	0,15 <sup>a</sup> ±0,08

Keterangan: KN= kontrol negatif (aqua), KP= pemberian acarbose 0,1%, E1= pemberian ekstrak khamir endofit dosis 40 mg, E2= pemberian ekstrak khamir endofit dosis 50 mg, dan E3= pemberian ekstrak khamir endofit dosis 60 mg.

Hasil dari uji tersebut di analisis lebih lanjut dengan *Analysis of Variant* (ANOVA). Berdasarkan analisis sidik ragam ANOVA pada taraf kepercayaan 95% menunjukkan bahwa ekstrak khamir endofit DG26 berpengaruh nyata terhadap variabel yang diamati ( $P < 0,05$ ). Hal ini menunjukkan perlakuan ekstrak khamir endofit dengan dosis 60 mg mampu memberikan pengaruh secara optimal terhadap penurunan pada bobot lemak abdominal pada tikus dibandingkan dengan perlakuan yang lainnya.

Pemberian ekstrak isolat khamir endofit DG26 pada dosis 60 mg mampu menurunkan bobot lemak abdominal secara nyata. Bobot lemak abdominal hasil penelitian sebesar 0,60 g, yang nilainya berbeda nyata dengan perlakuan yang lainnya. Kemampuan inhibitor  $\alpha$ -amilase pada ekstrak isolat khamir endofit DG26 berhubungan dengan karbohidrat reduksi yang diabsorpsi. Adanya senyawa inhibitor  $\alpha$ -amilase sehingga karbohidrat reduksi yang dihasilkan dalam jumlah yang rendah. Menurut Siregar (2014) peranan utama karbohidrat di dalam tubuh adalah untuk menyediakan glukosa bagi sel-sel tubuh, yang kemudian akan diubah menjadi energi. Glukosa ini akan dibawa oleh darah ke seluruh bagian tubuh yang memerlukan seperti otak, sistem saraf, jantung, dan organ tubuh lain. Karbohidrat dalam sel target cukup untuk memenuhi kebutuhan pada sel tubuh. Jumlah glukosa dalam sel target tidak berlebih sehingga tidak disimpan dalam jaringan adiposa dan disekitar organ visceral sehingga tidak terjadi peningkatan biomassa lemak abdominal.

Berdasarkan analisis sidik ragam ANOVA pada taraf kepercayaan 95% menunjukkan bahwa ekstrak khamir endofit DG26 berpengaruh nyata terhadap

variabel yang diamati ( $P < 0,05$ ). Hal ini berarti perlakuan ekstrak khamir endofit dengan dosis 40, 50, dan 60 mg yang diberikan mampu memberikan pengaruh secara nyata terhadap penurunan pada bobot lemak subkutan pada tikus. Bobot lemak subkutan setelah pemberian ekstrak isolat khamir endofit DG26 pada dosis 40, 50 dan 60 mg memiliki pengaruh yang nyata dibandingkan dengan perlakuan kontrol negatif dan kontrol positif yaitu berkisar antara 0,15-0,22 g. Penurunan bobot lemak subkutan yang tertinggi pada dosis 60 mg sebesar 0,15 g. Menurut Inandia (2012) Jaringan lemak subkutan merupakan bagian utama dari jaringan adiposa yang dapat ditemukan dibawah kulit. Lemak tubuh terbesar 50% pada jaringan subkutan. Apabila tidak terjadi deposisi kelebihan glukosa yang disimpan dalam jaringan adiposa sehingga tidak terjadi pembentukan lemak subkutan.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Uji *in vitro* ekstrak khamir endofit 1% memiliki kemampuan inhibisi terhadap  $\alpha$ -amilase sebesar 10,87% yang relatif sama dengan daya inhibisi acarbose sebesar 9,52%. Kemampuan inhibisi acarbose lebih rendah dibandingkan inhibisi isolat khamir DG26. Hal ini menunjukkan bahwa isolat terpilih yaitu isolat khamir endofit DG26 memiliki potensi untuk dimanfaatkan sebagai inhibitor  $\alpha$ -amilase.
2. Uji *in vivo* pemberian ekstrak isolat khamir endofit DG26 dengan dosis 40, 50, dan 60 mg mampu menurunkan bobot lemak abdominal dan lemak subkutan secara signifikan pada dosis 60 mg pada tikus (*Rattus norvegicus*).

## DAFTAR PUSTAKA

- Aprilliana KF. 2016. Pengaruh pemberian tempe terhadap gambaran histopatologi pankreas mencit (*Mus musculus* L.) obesitas (Skripsi). Bandar Lampung: Universitas Lampung.
- Azizah N. 2017. Pemurnian enzim selulase dari isolat khamir jenis *Candida utilis* menggunakan fraksinasi amonium sulfat (Skripsi). Makasar: UIN Alaudin.
- Inandia K. 2012. Kejadian obesitas berdasarkan persen lemak tubuh dan rasio lingkaran pinggang pinggul serta faktor-faktor lain yang berhubungan pada prelansia dan lansia kelurahan depok jaya (Skripsi). Depok: Universitas Indonesia.
- Fitria A. 2017. Pengaruh suhu dan lama fermentasi terhadap produksi eksopolisakarida dari tetes tebu oleh *Lactobacillus plantarum* dan identifikasi senyawa gula penyusunnya (Skripsi). Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Fitriyana IN. 2018. Pengaruh pemberian minyak bekatul terhadap berat badan dan akumulasi lemak intra-abdominal pada tikus normal (Skripsi). Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Hasanah A. 2015. Efek jus bawang bombay (*Allium cepa* Linn.) terhadap motilitas spermatozoa mencit yang diinduksi streptozotocin (stz). 11(2):92-101.
- Malik MM. 2015. The potential of brotowali stem extract (*Tinospora crispa*) as an alternative antimalarial drug. *Journal Majority* 4(5):45-49.
- Marthianti A. 2006. Pengaruh pemberian ekstrak batang *Tinospora crispa* dibandingkan dengan kloroquin terhadap jumlah eritrosit mencit swiss yang diinfeksi *Plasmodium berghei* (Skripsi). Semarang: Universitas Diponegoro.
- Mawarti H, Ratnawati R, Lyrawati D. 2012. *Epigallocatechin gallate* menghambat resistensi insulin pada tikus dengan diet tinggi lemak. *Jurnal Kedokteran Brawijaya* 27(1):43-50.
- Nangge M, Masi G, Oroh W. 2018. Hubungan obesitas dengan kejadian diabetes melitus di wilayah kerja puskesmas ranomut kota manado. *E-Journal Keperawatan* 6(1):1-6.
- Ndraha S. 2014. Diabetes melitus tipe 2 dan tatalaksana terkini. *Medicinus* 27(2):9-16.
- Nurmawati T. 2016. Hubungan berat badan dan kadar kolesterol darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) setelah diberikan diet tinggi lemak. *Jurnal Ners dan Kebidanan* 3(3):202-206.
- Nuningtyas YF. 2014. Pengaruh penambahan tepung bawang putih (*Allium sativum*) sebagai aditif terhadap penampilan produksi ayam pedaging. *Jurnal Ternak Tropika* 15(1):21-30.
- Octavia A, Wantini S. 2017. Perbandingan pertumbuhan jamur *Aspergillus flavus* pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dan media alternatif dari singkong (*Manihot esculenta* Crantz). *Jurnal Analis Kesehatan* 6(2):625-631.

- Permadi MSD, Fitrihidajati H. 2019. Pengaruh pemberian ekstrak batang brotowali (*Tinospora crispera*) terhadap mortalitas kutu daun (*Aphis gossypii*). *LenteraBio* 8(2):101-106.
- Pramitasari MD, Pujiyanto S, Supriyadi A. 2017. Aktivitas inhibitor  $\alpha$ -amilase isolat khamir endofit dari tumbuhan brotowali (*Tinospora crispera* L.). *Jurnal Biologi* 6(3):76- 84.
- Pramitasari MR, Riana R, Bahrudin M. 2012. Pengaruh ekstrak bawang putih (*Allium sativum* L.) terhadap perbaikan profil lipid pada *Rattus norvegicus* strain wistar hiperkolesterolemia. 8(2):85-96.
- Pujiyanto S, Ferniah RS. 2010. Aktifitas inhibitor alpha-glukosidase bakteri endofit PR-3 yang diisolasi dari tanaman pare (*Momordica charantia*). *Bioma* 12(1):1-5.
- Rendowaty A, Djamaan A, Handayani D. 2017. Waktu kultivasi optimal dan aktivitas antibakteri dari ekstrak etil asetat jamur simbion *Aspergillus unguis* (WR8) dengan *Haliclona fascigera*. *Jurnal Sains Farmasi dan Klinis* 4(2):49-54.
- Romadanu, Rachmawati SH, Lestari SD. 2014. Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak bunga lotus (*Nelumbo nucifera*). *Fishtech* 3(1):1-7.
- Safitri Y. 2018. Pengaruh campuran ekstrak batang brotowali dan rimpang kunyit terhadap mortalitas dan aktivitas makan ulat krop (*Crocidolomia pavonana* F.) pada tanaman sawi caisim (*Brassica juncea* L.) (Skripsi). Lampung: Universitas Islam Negeri Raden Intan.
- Setyaningsih D, Pandji C, Perwatasari DD. 2014. Kajian aktivitas antioksidan dan antimikroba fraksi dan ekstrak dari daun dan ranting jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) serta pemanfaatannya pada produk *personal hygiene*. *Agritech* 34 (2):126-137.
- Setyono J, Nugroho DA, Mustofa, Saryono. 2014. Efek orlistat, ekstrak biji kopi hijau, dan kombinasinya terhadap kadar adiponektin dan profil lipid. *Jurnal Ners* 9(1):26-34.
- Sibarani J, Yuniyanto VD, Mahfudz LD. 2014. Persentase karkas dan non karkas serta lemak abdominal ayam broiler yang diberi *acidifier* asam sitrat dalam pakan *double step down*. *Animal Agriculture Journal* 3(2):273-280.
- Siregar SN. 2014. Karbohidrat. *Jurnal Ilmu Keolahragaan* 13(2):38-44.
- Syadza MN. 2014. Pengaruh pemberian jus pare (*Momordica charantia* Linn.) dan jus jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap peningkatan kadar kolesterol HDL (*high density lipoprotein*) tikus *sprague dawley* dislipidemia (Skripsi). Semarang: Universitas Diponegoro.
- Wahyuningsih N, Tasminatun S. 2007. Efek infusa batang brotowali (*Tinospora crispera*) terhadap nafsu makan dan berat badan tikus putih (*Rattus norvegicus*). *Mutiara Medika* 7(2):105-110.
- Widiartini W, Siswati E, Setiyawati A, Rohmah IM, Prastyo E. 2013. Pengembangan usaha produksi tikus putih (*Rattus norvegicus*) tersertifikas dalam upaya memenuhi kebutuhan hewan

laboratorium. Semarang:  
Universitas Diponegoro.

peningkatan produksi gula.  
*Prespektif* 11(2):111-122.

Yulianti T. 2012. Menggali potensi endofit  
untuk meningkatkan kesehatan  
tanaman tebu mendukung

Yumas M, Rosniati. 2014. Pengaruh  
konsentrasi starter dan lama  
fermentasi pulp kakao terhadap  
konsentrasi etanol. *Biopropal  
Industri* 5(1):13-22.