# BAB II

# TINJAUAN PUSTAKA

## 2.1 Bengkuang *(Pachyrhizus erosus).*

### 2.1.1 Klasifikasi

Klasifikasi tumbuhan bengkuang menurut POWO adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Divisi : Streptophyta

Subdivisi : Equisetopsida

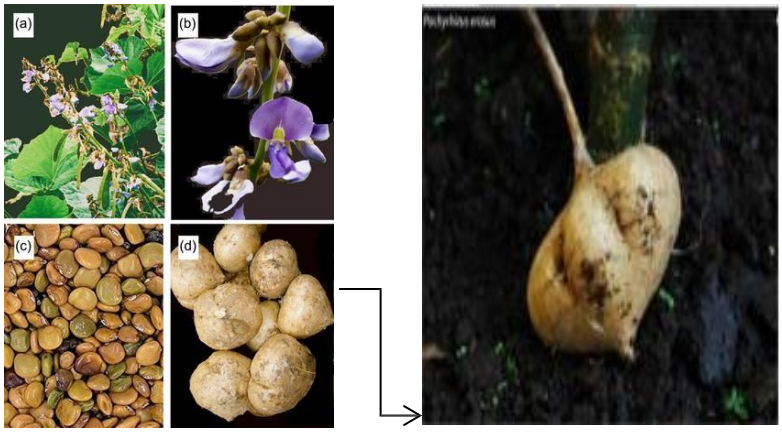
Kelas : Magnoliidae

Ordo : Fabales

Famili : Fabaceae

Genus : Pachyrhizus

Spesies : Pachyrhizus erosus L




**Gambar 2.1** Bagian Umbi Tanaman Bengkuang
Sumber : POWO (2014)

Tumbuhan bengkuang (*Pachyrhizus erosus* (L.) Urb.) merupakan tumbuhan yang terdapat pada Famili *Fabaceae.* Tumbuhan ini memiliki umbi yang berbentuk bulat, memiliki kulit yang tipis berwarna kuning dan buah dalamnya berwarna putih. Akar bengkuang berserabut tunggal dan berumbi mencapai 10-20 cm, dimana akar sebagai penyimpan cadangan makanan untuk tumbuhan Batang. Bengkuang umumnya sangat pendek, bentuk menjalar dengan panjang sekitar 1-2 m, biasanya mengarah ke bawah warna kehijauan; Daun bengkuang menyirip dengan anakan 3 daun berbentuk bulat melebar (Miksusanti et al., 2020; POWO, 2014).

Tumbuhan bengkuang ini masih merupakan tanaman yang kurang dimanfaatkan, tetapi karena kandungan nutrisinya yang tinggi, sifat fiksasi nitrogen untuk pertanian berkelanjutan, berbagai sifat farmakologisnya, dan keberhasilan pengenalan bengkuang di berbagai 11omoge di seluruh dunia, produksi bengkuang ini diperkirakan akan meningkat dalam waktu dekat. Tanaman ini dapat menghasilkan umbi penyimpanan yang besar dibandingkan dengan tanaman umbi lainnya yang sebanding, seperti singkong (Manihot esculenta), serta memiliki kandungan protein beberapa kali lipat lebih banyak (Montagnac *et al*., 2022).

Bengkuang (*Pachyrhizus erosus L*.) memiliki umbi yang dapat dikonsumsi secara langsung. Umbi bengkuang berbentuk membulat seperti gasing dengan kulit umbi yang tipis, berwarna kuning pucat dan bagian dalamnya berwarna putih dengan cairan rasa manis (Sorensen, 1996). Tanaman bengkuang termasuk dalam suku polongpolongan (Fabaceae), subfamily Papilionoidea. Di tempat

asalnya, tumbuhan ini dikenal sebagai jicama atau jicama dan memiliki banyak kandungan kimia didalamnya (Park, Lee and Han, 2016).




**Gambar 2.2** Fitokimia yang dilaporkan dari Bengkuang
Sumber : Varun *et al* (2022)

Sejumlah penelitian telah berhasil mengisolasi serta mengidentifikasi berbagai senyawa fitokimia dari biji, umbi, dan daun *P. erosus*. Umumnya, analisis fitokonstituen dilakukan karena adanya dugaan potensi aktivitas biologis

tanaman tersebut. Oleh sebab itu, sifat bioaktif dari senyawa-senyawa yang berhasil dipisahkan dan ditentukan strukturnya juga turut dievaluasi. Beberapa ekstrak yang ditemukan terbukti berkontribusi terhadap aktivitas biologis *P. erosus*, seperti efek antikanker, antijamur, dan antivirus, sebagaimana diuraikan lebih lanjut pada bagian berikutnya. Mayoritas senyawa yang berhasil diidentifikasi tergolong dalam kelompok flavonoid, meskipun jenis senyawa lain—seperti triterpen, berbagai asam 13omogen, asam lemak, serta senyawa 13omogen juga telah dilaporkan dari berbagai bagian tanaman. Rangkuman penelitian-penelitian tersebut disajikan pada Tabel 1 (Varun *et al*., 2022).

Pada bagian umbi bengkuang (*Pachyrhizus erosus*), telah dilaporkan adanya senyawa aktif yang berkontribusi terhadap aktivitas pencerahan kulit. Senyawa dominan yang teridentifikasi pada tuber berasal dari golongan isoflavonoid, terutama genistein dan daidzein, yang diketahui berperan dalam penghambatan enzim tirosinase serta aktivitas antioksidan. Data kandungan menunjukkan bahwa genistein memiliki kadar tertinggi pada umbi bengkuang, yaitu sekitar 1655 $\mu$g/g, sehingga memberikan kontribusi terbesar terhadap efek whitening, sedangkan daidzein ditemukan dalam jumlah sekitar 329,93 $\mu$g/g. Keberadaan dan perbandingan kadar senyawa tersebut menjadi dasar teoritis dalam menjelaskan potensi umbi bengkuang sebagai sumber bahan aktif alami untuk formulasi pencerah kulit (Laovachirasuwan dan Phadungkit, 2023).

**Tabel 2.1** Kandungan Tumbuhan Bengkuang dan Aktivitasnya

| No | Nama Senyawa | Jenis | Jumlah/Hasil | Sampel | Aktivitas |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 12a-Hydroxydolineone | Rotenoid | 31 $\mu$g/g | Biji | Terhadap HSV tipe 1 dan 2 |
| 2. | 12a-Hydroxyerosone | Rotenoid | 6 $\mu$g/g | Biji | Tidak ada aktivitas |
| 3. | 12a-Hydroxyrotenone | Rotenoid | 9 $\mu$g/g | Biji | Antikanker dan terhadap HSV tipe 1 dan 2 |
| 4. | Dehydrorotenone | Isoflavon | 4 $\mu$g/g | Biji | Aktivitas antijamur |
| 5. | Rotenone | Rotenoid | 153 $\mu$g/g | Biji | Antikanker dan aktivitas antijamur |
| 6. | (8,9)-Furanyl-pterocarpan-3-ol | Pterokarpan | 141,05 $\mu$g/g | Umbi | Antioksidan dan pencerah kulit |
| 7. | 2-Butoxy-2,5-bis(hydroxymethyl)-tetrahydrofuran-3,4-diol | Lainnya | - | Umbi | Antioksidan dan pencerah kulit |
| 8. | 4-(2-(Furane-2-yl)ethyl)-2-methyl-2,5-dihydro-furan-3-carbaldehyde | Lainnya | - | Umbi | Antioksidan dan pencerah kulit |
| 9. | Daidzein-7-O-β-glucopyranose / Daidzin | Isoflavonoid | 329,93 ± 10,00 $\mu$g/g | Umbi | Antioksidan dan pencerah kulit |
| 10. | Daidzein | Isoflavonoid | 2356,10 ± 38,47 $\mu$g/g | Sari umbi | Antioksidan dan pencerah kulit |
| 11. | Formononetin | 7-hidroksiisoflavon | 65,13 ± 3,01 $\mu$g/g | Daun | Tidak ada aktivitas |

Sumber : Laovachirasuwan dan Phadungkit (2023)

Evaluasi terhadap ekstrak umbi bengkuang menunjukkan potensi sebagai sumber penghambat tirosinase alami. Uji aktivitas enzim mengungkap bahwa ekstrak mampu menghambat oksidasi L-DOPA oleh tirosinase jamur secara bergantung dosis, di mana penurunan aktivitas enzim berlangsung secara cepat, bukan hanya perlahan. Pola penghambatan tersebut sejalan dengan temuan sebelumnya yang melaporkan efek serupa dari ekstrak tanaman terhadap tirosinase. Kemampuan tersebut diduga berkaitan dengan kandungan senyawa fenolik dan flavonoid, yang diketahui dapat menekan aktivitas tirosinase dan mengurangi pembentukan melanin pada melanosit (Laovachirasuwan dan Phadungkit, 2023).

Di antara berbagai fraksi yang diuji, ekstrak diklorometana dari umbi menunjukkan aktivitas paling kuat, ditunjukkan oleh nilai IC50 sebesar 2,08 ± 0,40 mg/mL, berhubungan dengan tingginya kandungan flavonoid total. Temuan ini selaras dengan laporan Lukitaningsih dan kolega, yang mengidentifikasi flavonoid seperti daidzein dan 5-hydroxyldaidzein-7-O-β-glucopyranose sebagai komponen utama penghambat tirosinase dalam bengkuang. Selain itu, ekstrak etil asetat dari bengkuang juga dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan tertinggi, sehingga semakin memperkuat konsistensi hasil tersebut dalam konteks penghambatan tirosinase berbasis senyawa flavonoid (Laovachirasuwan dan Phadungkit, 2023).

Biji dan daun tanaman bengkuang juga mengandung beragam senyawa fitokimia, yang mendorong minat para peneliti untuk mengembangkannya

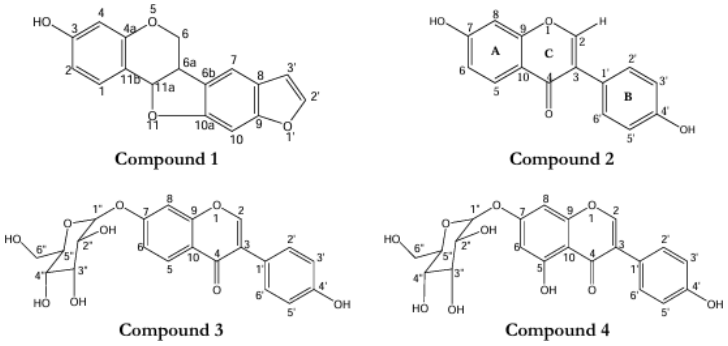
sebagai sumber bahan obat. Sejumlah penelitian telah menunjukkan potensi tanaman bengkuang dalam pengobatan berbagai penyakit serta kemampuannya meningkatkan kekebalan tubuh. Hal ini menegaskan bahwa tanaman tersebut memiliki prospek besar sebagai tanaman obat, meskipun masih tergolong kurang dimanfaatkan. Walaupun produksi dari pemanfaatan tanaman bengkuang diprediksi akan terus meningkat, kajian yang menyeluruh mengenai sifat farmakologis dan fitokimianya masih terbatas. Oleh karena itu, tinjauan ini berupaya merangkum informasi mengenai kandungan fitokimia dan aktivitas biologis dari berbagai bagian tanaman ini, yang diharapkan dapat menjadi dasar bagi pengembangan intervensi farmakologis alami untuk beragam penyakit serta peningkatan kesehatan dan aplikasi kosmetik (Sujono *et al.*, 2021)

## 2.2 Kandungan Kimia dan Bioaktivitas Senyawa Bengkuang *(Pachyrhizus erosus)*.

Dalam penelitian yang bertujuan mengeksplorasi aktivitas antioksidan dan efek pemutih kulit dari umbi tanaman bengkuang para ilmuwan berhasil mengidentifikasi enam senyawa aktif pada fraksi etil asetat. Senyawa-senyawa tersebut meliputi daidzein, daidzin, genistin, (8,9)-furanyl-pterocarpan-3-ol, 4-(2-(furane-2-il)etil)-2-metil-2,5-dihidro-furane-3-karbaldehida, serta 2-butoxy-2,5-bis(hidroksimetil)tetrahidrofuran-3,4-diol. Pada penelitian sebelumnya turut melaporkan keberadaan beberapa senyawa aktif pada umbi bengkuang memperkuat bukti mengenai adanya tiga isoflavonoid, yaitu daidzein, daidzein-7-O-glukopiranoza, dan 5-hidroksi-daidzein-7-O-glukopiranoza, bersama dengan pterokarpan baru (8,9-furanyl-pterocarpan-3-ol) yang memiliki aktivitas. Selain itu, analisis menggunakan metode HPLC menunjukkan bahwa kandungan

daidzein dan genistein dalam umbi masing-masing mencapai 110,454 mg/100 g dan 165,530 mg/100 g (Lukitaningsih dan Holzgrabe, 2014).

Ekstraksi Soxhlet yang digunakan sebagai metode isolasi umbi bengkuang (*Pachyrhizus erosus)*, dengan eter petroleum sebagai pelarut dan diikuti dengan fraksinasi menggunakan etil asetat untuk mendapatkan tiga isoflavonoid yaitu daidzein, daidzein-7-O-ß-glukopiranosa, 5-hidroksi-daidzein-7-O-ß-glukopiranosa, dan sebuah pterokarpan baru yaitu 8,9-furanyl-pterocarpan-3-ol, yang aktivitas antioksidannya (nilai SC50%) masing-masing adalah 2,11; 11,86; 0,69 dan 7,86. Semua senyawa yang ditemukan menunjukkan aktivitas penghambatan tirosinase dengan nilai $IC_{50}$ masing-masing 4,38; 5,35; 7,49 dan 22,20 mM, untuk senyawa 4, 2, 1 dan 3. Senyawa-senyawa ini dapat digunakan sebagai bahan antioksidan dan pemutih kulit Empat senyawa yang berhasil diidentifikasi senyawa 1, 2, 3, dan 4 dianggap sebagai kandidat potensial untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai agen pencerah kulit alami. Struktur kimia keempat senyawa tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.2, yang diadaptasi dari (Lukitaningsih & Holzgrabe, 2014).




**Gambar 2.3** Struktur Kimia Senyawa Terisolasi dalam Ekstrak Etil Asetat
Sumber : Lee *et al* (2017)

Ekstrak dan senyawa yang terkandung di dalamnya menunjukkan potensi aktivitas yang mendukung penggunaannya dalam formulasi kosmetik, khususnya untuk efek pencerah kulit dan anti-penuaan. Selanjutnya, penelitian juga menilai aktivitas antioksidan dari ekstrak umbi tanaman bengkuang berbasis air dan 18omogen menggunakan metode uji DPPH serta ABTS (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat asam)), yang membuktikan potensi ekstrak tersebut sebagai bahan kosmetik dengan aktivitas antioksidan dan anti-melanogenik. Penelitian terbaru melaporkan bahwa ekstrak etanol 70% dari kulit umbi bengkuang (PPE) dan ekstrak etil asetat (PTE) juga memiliki aktivitas antioksidan berdasarkan uji DPPH, serta menunjukkan efek pemutihan kulit melalui penghambatan enzim tirosinase, yang kembali menegaskan potensi umbi tanaman bengkuang sebagai agen anti-penuaan dan pencerah kulit (Lee *et al*., 2017 ; Siregar *et al.*, 2019)

Umbi Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) memiliki keuntungan untuk menjaga kesehatan kulit dan menghilangkan sel kulit mati. Bengkuang juga mengandung vitamin C yang dapat menutrisi kulit dan berfungsi untuk

pembentukan kolagen dan proses pigmentasi, vitamin C dapat diabsorpsi oleh kulit . Bengkuang saat ini seringkali digunakan sebagai bahan *skincare* yang befungsi untuk menyegarkan wajah dan mencerahkan kulit (Fitrah, *et. Al*., 2015; Yuniarsih, *et al.*, 2021).

## 2.3 Jamur Endofit

### 2.3.1 Definisi Jamur Endofit

Mikroba Endofit, berupa bakteri dan jamur, merupakan mikroorganisme yang sebgaian besar hidupnya berada dalam jarigan tumbuhan tanpa menimbulkan bahaya bagi inangnya. Beberapa jamur endofit mampu menghasilkan metabolit sekunder dan senyawa bioaktif yang serupa dengan yang dihasilkan oleh tumbuhan inangnya. Jamur endofit mampu melakukan kolonisasi di ruang antar sel atau di dalam sel tanaman, dengan akar menjadi lokasi utama kolonisasi yang lebih sistematis dan dibandingngkan dengan daun dan batangnya. Pada stomatanya, kolonisasi ini lebih bergantung pada cairan apoplastik inang sebagai sumber nutrisinya. Selama prosen ini, jamur endofit dapat membentuk hubungan mutualistik (menguntungkan), komensalistik (tidak menguntungkan akan tetapi juga tidak merufikan), atau bahkan patogenik (tidak merugikan inang), tergantung pada kandungan fisiolofis suatu tanaman (Schluz *et al*., 2002 ; Maheswari *et al*., 2002).

Jamur endofit merupakan mikroorganisme yang hidup di dalam jaringan tanaman sehat tanpa menimbulkan gejala penyakit ataupun perubahan morfologi pada tanaman tersebut, baik selama sebagian maupun sepanjang siklus hidupnya. Hubungan antara jamur endofit dan tanaman telah berlangsung sangat lama,

bahkan diperkirakan mencapai lebih dari 400 juta tahun. Dalam kehidupannya, jamur endofitik biasanya tumbuh dalam bentuk miselium yang berasosiasi secara biologis dengan tanaman inangnya. Kehadirannya tidak terbatas pada jenis tanaman tertentu, karena jamur endofit dapat ditemukan pada berbagai kelompok tumbuhan seperti pepohonan, rumput, tanaman herba, hingga umbi bengkuang hingga dapat diisolasi dengan metode pada tabel 2 (Maheswari *et al*., 2017).

**Tabel 2.2** Teknik Isolasi Jamur Endofit

| No | Nama Metode | Deskripsi | Kondisi Penggunaan |
|---|---|---|---|
| 1. | Metode Tanam Langsung (Direct Tissue Plating) | Jaringan tanaman (akar, batang, daun, umbi) disterilisasi permukaannya lalu diletakkan langsung ke media agar, seperti SDA PDA dan MEA. | Metode yang paling sering dipakai untuk isolasi semua tanaman. |
| 2. | Metode Tuang (Pour Plate / Spread Plate) | Jaringan dihancurkan atau dibuat homogen, lalu cairan sampel dituang atau dioleskan di permukaan agar. | Isolat endofit yang dicari berada di jaringan bagian dalam dan ingin mendapatkan banyak variasi. |
| 3. | Metode Pengenceran Bertingkat (Serial Dilution) | Sampel jaringan dihancurkan, lalu diencerkan 10x, 100x, 1000x, kemudian tiap pengenceran ditanam ke media agar. | Untuk mengurangi koloni terlalu padat. |
| 4. | Isolasi Hifa Ujung (Hyphal Tip Isolation) | Ujung hifa tunggal yang tumbuh dari jaringan atau koloni diambil menggunakan jarum inokulasi. | Digunakan jika tumbuh campuran jamur dan dapat digunakan untuk mendapatkan kultur murni. |
| 5. | Metode Seleksi Media | Menggunakan media yang | Untuk |

| No | Nama Metode | Deskripsi | Kondisi Penggunaan |
|---|---|---|---|
| | Khusus (Selective Media) | ditambahkan pewarna (Rose Bengal, chloramphenicol). | menghambat bakteri atau jamur permukaan agar endofit 21omo muncul. |
| 6. | Metode Kultur Cair (Liquid Culture / Fermentasi) | Isolat dimasukkan ke media cair untuk memperbanyak hifa dan metabolit. | Tidak digunakan untuk isolasi tahap awal, tapi digunakan setelah isolasi untuk produksi metabolit. |
| 7. | Metode Baiting (Teknik Umpan) | Potongan daun atau akar digunakan sebagai umpan untuk menarik jamur tertentu dalam kondisi lembab. | Digunakan untuk endofit yang sulit tumbuh dengan cara biasa. |
| 8. | Isolasi Spora Tunggal (Single Spore Isolation) | Suspensi spora jamur disiapkan terlebih dahulu, kemudian spora yang terpisah (spora tunggal) diamati di bawah mikroskop stereo, lalu dipindahkan ke medium kultur steril untuk mendapatkan koloni jamur murni (monospora). | Digunakan ketika penelitian membutuhkan jamur yang benar-benar homogen dan murni, misalnya untuk identifikasi spesies atau uji aktivitas metabolit sekunder. |

Sumber : Maheswari *et al*., (2017).

Istilah endofit dan jamur endofitik sering digunakan secara bergantian untuk menggambarkan keberadaan mikota yang hidup di dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan efek merugikan. Saat ini, endofit dianggap sebagai bagian penting dari keanekaragaman hayati global karena perannya yang signifikan dalam menjaga keseimbangan ekosistem tanaman dan potensinya dalam menghasilkan senyawa bioaktif. Jamur endofitik memiliki keragaman yang sangat

tinggi, dengan sebagian besar yang telah diidentifikasi termasuk dalam kelompok ascomycetes, meskipun banyak di antaranya belum diketahui bentuk teleomorfiknya. Berdasarkan hasil penelitian, diperkirakan terdapat lebih dari satu juta spesies jamur endofit di alam. Keanekaragaman ini menjadikan jamur endofit sebagai sumber potensial bagi penemuan berbagai metabolit baru yang memiliki aktivitas biologis penting dan berpotensi dikembangkan untuk aplikasi di bidang pertanian, farmasi, maupun bioteknologi. (Maheswari *et al*., 2017).

### 2.3.2 Interaksi Jamur Endofit dengan Inangnya

1. Mutualisme

Hubungan Mutualisme antara jamur dengan tanaman inangnya saling menguntungkan. Dalam hal ini, jamur membantu tanaman meningkatkan toleransi terhadap kekeringan, ligam berat, dan serangan patogen. Selain itu, jamur endofit juga mendukung pertumbuhan tanaman, efisiensi penyerapan nutrisi, serta system pertahanan terhadap serangan hama dan hewan pengganggu seperti herbivora. Dalam hal ini tanaman menyediakan tempat tinggal, perlindungan, dan nutrisi yang dapat mendukung siklus hidup jamur. Interaksi ini juga dapat membantu meningkatkan system kekebalan tanaman dengan mengubah fisiologisnya untuk dapat merespons infeksi atau ancaman eksternal (Alam *et al*., 2021).

2. Komensalisme

Dalam hubungan komensalisme, jamur endofit ini dapat hidup di dalam jaringan tanaman tanpa memberikan dampak yang besar kepada kesehatan tanaman. Dalam kondisi yang normal jamur endofit ini sama sekali tidak pernah menimbulkan gejala apapun (Alam *et al*., 2021).

3. Patogenisme

Patogenisme dalam jamur endofit (EF) dan tanaman inang terjadi ketika EF bertransisi dari fase dormansi menjadi patogen aktif. Perubahan ini sering dipicu oleh stres lingkungan, seperti kekeringan, kekurangan nutrisi, atau perubahan fisiologi tanaman, seperti penuaan atau gangguan ontogenetik. Dalam kondisi ini, EF dapat menyebabkan gejala penyakit pada tanaman, seperti nekrosis, klorosis, dan perubahan morfologi (Alam *et al*., 2021).

Beberapa jenis jamur, seperti *Cladosporium*, *Fusarium*, dan *Colletotrichum*, dapat hidup secara laten di dalam jaringan tanaman. Namun, ketika berubah menjadi fase patogen aktif, jamur-jamur tersebut mampu memengaruhi morfologi dan fungsi tanaman, sehingga menimbulkan kerugian signifikan. Fase dormansi ini memiliki peran penting karena menentukan saat jamur tersebut bersifat tidak berbahaya dan kapan berubah menjadi organisme patogen yang merusak (Alam *et al*., 2021).

### 2.3.3 Klasifikasi dan Interaksi Umum Jamur Endofit

Jamur endofit dapat diklasifikasikan berdasarkan aspek ekologi, keragaman, serta fungsinya. Dari segi reproduksi, jamur ini dibedakan menjadi jenis seksual dan aseksual, tergantung pada cara pembentukan sporanya. Selain itu, pengelompokan juga dapat dilakukan berdasarkan pola transmisinya, yaitu secara horizontal atau vertikal. Transmisi horizontal terjadi ketika spora atau propagul vegetatif yang dihasilkan endofit menyebar melalui udara atau vektor tertentu ke tanaman lain. Sebaliknya, transmisi vertikal berlangsung ketika jamur

berpindah dari tanaman induk ke keturunan melalui biji (Bamisile *et al*., 2018 ; Lugtenberg *et al*., 2016).

Dari sisi infeksi dan interaksi dengan inang, jamur endofit juga diklasifikasikan sebagai simptomatik atau asimptomatik, tergantung pada ada tidaknya gejala yang ditimbulkan pada tanaman. Berdasarkan lokasi kolonisasi, mereka dapat dikelompokkan sebagai endofit akar atau daun. Selain itu, klasifikasi juga mencakup cara memperoleh nutrisi, yaitu menjadi jamur biotrofik yang mengambil nutrisi dari jaringan hidup tanpa merusaknya, atau jamur nekrotrofik yang menimbulkan nekrosis dan memanfaatkan jaringan tanaman yang telah mati untuk pertumbuhannya (Noemi & Efrelon, 2021).

### 2.3.4 Identifikasi Jamur Endofit

Ciri-ciri makroskopis jamur endofit dapat diamati berdasarkan warna, bentuk, serta pola pertumbuhan koloninya menggunakan metode yang dijelaskan oleh Dosch et al., (1980). Selain pengamatan secara makroskopis, identifikasi yang lebih mendalam dilakukan melalui pengamatan mikroskopis. Pemeriksaan ini mencakup penilaian terhadap bentuk konidiofor (bercabang atau tidak), struktur fialid, serta morfologi konidia yang dapat berbentuk bulat, lonjong, elips, maupun memanjang. Warna konidia juga bervariasi, mulai dari terang, hijau muda, gelap, hitam, hingga cokelat. Pengamatan mikroskopis dilakukan pada hari kelima setelah isolasi menggunakan mikroskop binokuler. Untuk menyiapkan preparat, hifa jamur endofit diambil dengan jarum ose, diletakkan di atas kaca objek, lalu ditutup dengan kaca penutup steril. Preparat tersebut kemudian diamati

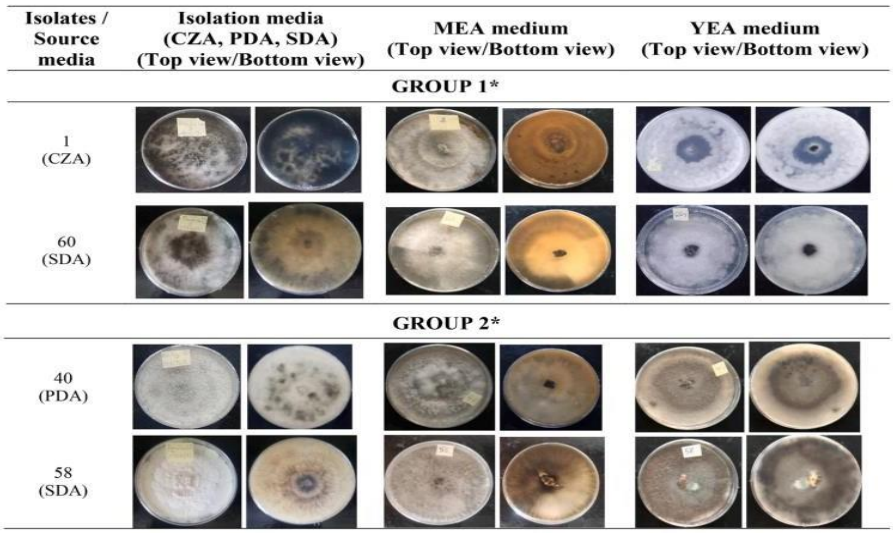
di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 4×10 untuk memperoleh visualisasi struktur jamur secara lebih detail.

1. Karakteristik Makroskopis

Koloni jamur endofit umumnya diamati melalui sejumlah parameter yang mencakup warna, tekstur, bentuk permukaan, pola pertumbuhan, serta struktur tepi koloni. Warna koloni, baik pada permukaan (*surface*) maupun bagian bawah media (reverse), sering kali berbeda antar isolate misalnya putih, krem, hijau, abu-abu, atau warna gelap lainnya dan perbedaan ini dapat menjadi indikator penting dalam membedakan genus atau spesies tertentu. Tekstur koloni juga menunjukkan variasi yang besar, mulai dari *cottony/woolly* dengan miselium yang tampak tebal menyerupai kapas, velvety dengan permukaan seperti beludru, granular/*powdery* yang tampak berbutir, hingga *slimy*/mucilaginous yang berlendir. Pada beberapa jenis seperti Trichoderma, tekstur *wol-like* atau *woolly* sering mencerminkan keberadaan aerial mycelium yang kuat (Demeni *et al*., 2025).

Selain itu, topografi koloni berkontribusi pada diferensiasi antar isolat, dengan bentuk seperti umbonate (pusat menonjol), rugose (berkerut), verrucose (berbenjol kecil), plane/flat, atau convex. Banyak isolat juga menampilkan pola *zoning* atau *concentric rings*, yaitu cincin-cincin konsentris berupa perbedaan warna atau kerapatan miselium yang biasanya terbentuk akibat perubahan laju pertumbuhan atau produksi spora. Pola lain berupa radial lines atau striations, yaitu garis-garis yang memancar dari pusat koloni menuju tepi, yang berbeda dari zonasi melingkar dan dapat menjadi tanda karakteristik suatu kelompok jamur (Demeni *et al*., 2025).

Tepi koloni (colony margin) pun menjadi parameter penting untuk identifikasi, karena bentuk tepi dapat bervariasi dari entire (rata), undulate (bergelombang), lobate (berlobus), fimbriate (berserabut atau berumbai), hingga erose (tampak robek tidak beraturan). Sementara itu, keberadaan aerial mycelium-miselium yang tumbuh menjulang di atas permukaan media juga dicatat, karena mempengaruhi tekstur dan tampilan koloni secara keseluruhan, termasuk menimbulkan efek fluffy atau villous. Beberapa isolat menghasilkan eksudat, berupa tetesan cairan atau pigmen pada permukaan media, yang merupakan ciri tambahan yang relevan untuk keperluan identifikasi (Demeni *et al*., 2025).




**Gambar 2.4** Karakteristik Makroskopik Jamur Endofit Murni
Sumber : Demeni *et al.*, (2025)

2. Karakteristik Mikroskopis

a) Struktur Miselium (Hifa)

Pengamatan terhadap miselium atau hifa jamur endofit dilakukan untuk menilai beberapa aspek penting seperti keberadaan septa (sekat), pola percabangan, serta karakteristik warna hifa apakah hialin (transparan) atau berpigmen. Secara keseluruhan, parameter miselium memiliki peranan penting

karena perbedaan pola pertumbuhan hifa dapat mencerminkan adaptasi jamur terhadap tanaman inang atau media pertumbuhan, sekaligus memberikan petunjuk mengenai posisi taksonomi dari isolat jamur tersebut (Sonia *et al*., 2025).

b) Spora / Konidia

Spora atau konidia menjadi salah satu parameter mikroskopis yang paling sering digunakan dalam identifikasi jamur endofit. Aspek yang diamati mencakup bentuk, ukuran, orientasi konidia pada konidiofor, serta tingkat dan kepadatan sporulasi. Selain itu, deskripsi morfologi konidia pada berbagai penelitian sering kali dilengkapi dengan tabel karakter mikroskopis yang mempermudah perbandingan dengan referensi taksonomi klasik, sehingga identifikasi bisa dilakukan dengan lebih akurat (Sonia *et al*., 2025).

c) Septasi dan Cabang Hifa

Septasi, yaitu ada tidaknya sekat pada hifa, serta pola percabangan merupakan parameter mikroskopis yang sangat penting dalam membedakan kelompok jamur difokuskan pada keberadaan septa, bentuk percabangan hifa, dan warna hifa. Informasi mengenai septasi dan percabangan hifa sangat relevan karena karakter ini membantu menentukan apakah suatu jamur termasuk ke dalam kelompok Ascomycota, Zygomycota, atau kelompok lain yang memiliki ciri khas hifa tertentu (Sonia *et al*., 2025).

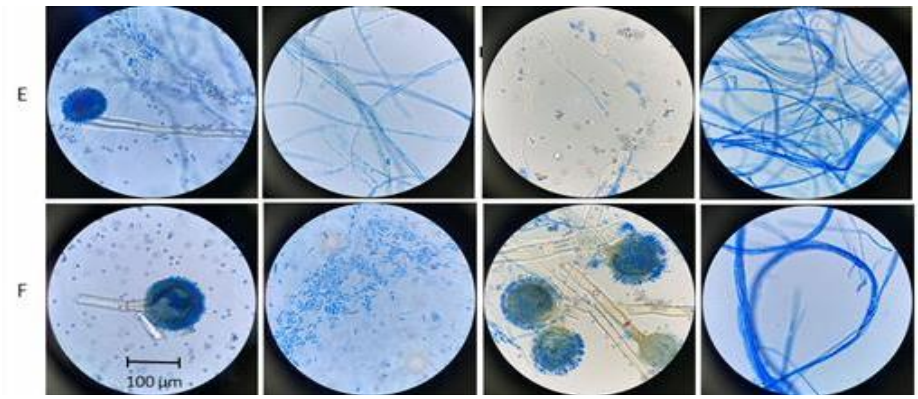
d) Bentuk dan Tipe Konidiofor / Struktur Reproduktif

Konidiofor sebagai struktur yang menghasilkan konidia turut menjadi parameter penting dalam kajian mikroskopis. Beberapa ciri yang diperhatikan meliputi apakah konidiofor bercabang atau tidak, panjang atau pendek, serta

apakah strukturnya berpigmen atau hialin. Keunikan bentuk dan struktur konidiofor pada setiap genus membuat parameter ini sangat berguna dalam membedakan jamur endofit satu dengan yang lain (Sonia *et al*., 2025).

e) Warna dan Pigmentasi Spora / Hifa

Warna atau pigmentasi pada spora dan hifa turut diperhatikan dalam identifikasi mikroskopis.Pigmentasi merupakan karakter penting karena dapat mencerminkan adaptasi fisiologis jamur terhadap lingkungannya serta membantu memperkuat informasi taksonomis ketika dipadukan dengan parameter mikroskopis lainnya (Sonia *et al*., 2025).




**Gambar 2.5** Makroskopis berupa Hifa generatif dan miselium (E) serta konidiofor dan konidia (F). Sampel diwarnai dengan Lactophenol blue, diamati di bawah mikroskop LRI-Olympus pada perbesaran 100×/0,65, dengan skala 1:200.
Sumber : Demeni *et al.*, (2025)

Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh jamur endofit berperan penting dalam mendukung ketahanan tanaman inang terhadap berbagai tekanan lingkungan, baik yang bersifat biotik seperti serangan patogen dan hama, maupun abiotik seperti kekeringan, suhu ekstrem, dan kekurangan nutrisi. Kehadiran senyawa-senyawa ini membantu tanaman beradaptasi dan bertahan hidup di lingkungan yang kurang menguntungkan. Meskipun beberapa tanaman memiliki

keterbatasan dalam merespons patogen tertentu secara imunologis, keberadaan endofit di dalam jaringan tanaman mampu memperkuat sistem pertahanan alami tanaman tersebut (Maheswari *et al*., 2017).

Endofit jamur umumnya juga diidentifikasi berdasarkan ciri morfologisnya, mereka dapat diisolasi dari jaringan tanaman inang mereka dan dikulturkan dalam media pertumbuhan yang paling sesuai untuk identifikasi dan klasifikasi morfologis menurut Clark et al., (1983). Namun, selain karakterisasi morfologis, ada disarankan bahwa isolasi dan karakterisasi molekuler endofit entomopatogen sangat penting untuk memperluas data yang ada mengenai jamur entomopatogen. Klasifikasi filogenetik molekuler untuk mengidentifikasi endofit dapat dilakukan melalui amplifikasi dan pengurutan fragmen kecil DNA jamur. Praktik ini melibatkan analisis asam nukleat dan protein untuk mempelajari hubungan evolusioner endofit jamur (Bamisope *et al*., 2018).

Jamur endofit bertindak sebagai pelindung internal yang dapat menstimulasi mekanisme pertahanan inang melalui produksi senyawa antimikroba, enzim protektif, dan metabolit sekunder lainnya. Menariknya, banyak Jamur endofit yang mampu menghasilkan senyawa yang secara struktural maupun fungsional mirip dengan metabolit yang dihasilkan oleh tanaman inangnya, sehingga memberikan kontribusi tambahan terhadap resistensi dan ketahanan tanaman terhadap berbagai tekanan eksternal (Maheswari, *et al*.,2017).

Selain itu, komunitas jamur endofit pada tanaman memiliki keragaman yang sangat luas dan kompleks. Setiap spesies endofit dapat menunjukkan perbedaan dalam hal preferensi terhadap jenis tanaman inang, jaringan tempat

kolonisasi, hingga kemampuan dalam mensintesis poliketida dan senyawa bioaktif lainnya. Distribusi jamur endofit juga bervariasi di berbagai wilayah geografis, tergantung pada kondisi lingkungan, iklim, dan jenis tanaman yang menjadi inangnya. Dalam dekade terakhir, penelitian mengenai biologi dan ekologi mikroorganisme endofitik semakin berkembang pesat. Studi-studi tersebut memberikan pemahaman mendalam tentang bagaimana keanekaragaman hayati dan aktivitas biokimia endofit berperan penting dalam meningkatkan kebugaran serta produktivitas tanaman. Walaupun banyak bukti menunjukkan bahwa endofit dapat meningkatkan biomassa tanaman di bawah kondisi stres, mekanisme seluler dan molekuler yang mendasari peningkatan toleransi terhadap stres dan pertumbuhan tersebut masih belum sepenuhnya dipahami, sehingga menjadi fokus penelitian yang menarik bagi para ilmuwan di bidang mikrobiologi dan bioteknologi pertanian (Maheswari *et al*., 2017).

Jamur endofit adalah mikroorganisme yang berkoloni di bagian dalam jaringan tumbuhan yaitu pada akar, batang, daun, bunga atau biji tanpa menimbulkan efek yang merugikan pada tumbuhan inangnya. Jamur endofit memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa aktif secara biologis yang mempunyai kemiripan atau sama dengan tanaman inangnya. Selain itu bioaktif yang dihasilkan oleh jamur endofit juga berguna dalam industri pertanian, farmasi dan bidang kedokteran (Andreozzi, *et al*., 2019; Rashmi, 2019).

Jamur endofit hidup di dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan penyakit maupun kerusakan pada inangnya, serta menjalin interaksi yang sangat kompleks dengan tanaman tersebut. Selain memproduksi hormon yang dapat

merangsang pertumbuhan tanaman dan meningkatkan ketahanannya terhadap stres abiotik, jamur endofit juga mampu menghasilkan berbagai metabolit sekunder bioaktif, termasuk senyawa yang serupa dengan yang dihasilkan oleh tanaman inangnya (Du *et al*., 2020 ; Gupta *et al.*, 2020).

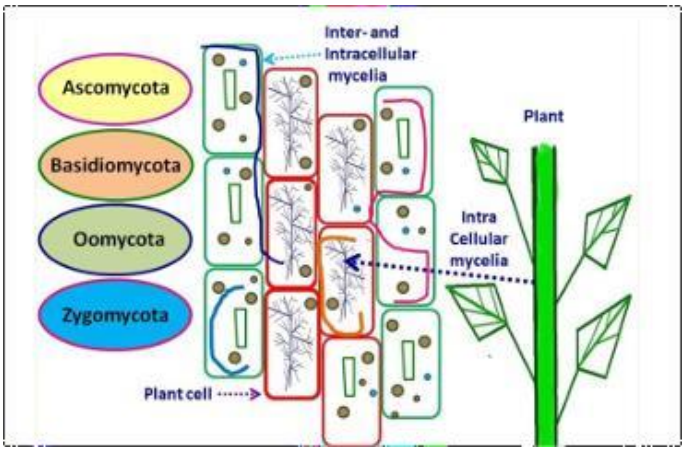
Secara umum, kelompok jamur endofit cenderung memiliki spesifisitas terhadap satu jenis inang pada tingkat spesies, yang dapat dipengaruhi oleh faktor mikroklimat dan mikrohabitat. Interaksi ini terutama dimediasi oleh jamur endofit itu sendiri, yang mampu memproduksi berbagai senyawa alami dalam jumlah berlebih ketika dikultur di luar lingkungan inang alaminya atau dalam kondisi uji in vitro (Deng & Cao, 2017).

**2.4 Interaksi Tanaman dengan Jamur Endofit**

Interaksi antara tanaman dan jamur endofit merupakan hubungan biologis yang sangat kompleks dan terkontrol dengan baik. Endofit mampu hidup dan berkembang di dalam jaringan tanaman tanpa menyebabkan gejala penyakit apa pun karena terdapat keseimbangan halus antara aktivitas mikroba dan respons pertahanan tanaman inang. Hubungan ini terbentuk melalui mekanisme fisiologis dan molekuler yang saling menyesuaikan antara kedua organisme, sehingga keduanya dapat memperoleh manfaat tanpa merugikan satu sama lain. Dalam konteks ekologis, simbiosis antara endofit dan tanaman mencakup rentang interaksi yang luas, mulai dari bentuk antagonisme yang kuat hingga mutualisme yang sangat erat (Maheswari *et al*., 2017).

Hubungan mutualistik ini diyakini berevolusi dari interaksi yang awalnya bersifat antagonistik, khususnya parasitisme, sebagaimana yang juga diasumsikan

terjadi pada jamur endofitik yang hidup di dalam rumput dan tanaman berkayu. Variasi dalam hubungan antara dua spesies yang berinteraksi dipengaruhi oleh banyak faktor, termasuk keterbatasan filogenetik, sejarah hidup organisme, kondisi geografis, serta interaksi dengan spesies lain dalam komunitas ekosistem. Selain itu, faktor lingkungan non-hayati seperti suhu, kelembapan, dan ketersediaan nutrisi turut memengaruhi arah dan intensitas hubungan tersebut. Oleh karena itu, simbiosis mikroba dengan tanaman inang dapat berada di sepanjang spektrum dari hubungan yang bersifat patogenik hingga mutualistik, bahkan dalam satu siklus hidup yang sama, menunjukkan betapa dinamis dan adaptifnya interaksi endofit-tanaman di alam (Maheswari *et al*., 2017).




**Gambar 2.6** Klasifikasi Jamur Endofit dan Keberadaannya di Sel Tanaman
Sumber : Yamamoto *et al*., (2017)

Keseimbangan antara patogen jamur dan tanaman inangnya terjadi ketika keduanya mencapai kondisi stabil, di mana patogen hidup berdampingan dengan jaringan inang tanpa menimbulkan kerusakan yang berarti keadaan ini dikenal

sebagai bentuk patogen yang paling minimal. Tingkat virulensi patogen sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan spesifik dari inangnya. Ketika patogen tersebut diisolasi dari tanaman yang tidak menunjukkan gejala dan kemudian diinokulasikan ke inang baru, dapat muncul respons patogen yang lebih kuat. Secara umum, jamur endofit memiliki peran yang bervariasi, mulai dari patogen laten hingga simbion mutualistik. Berdasarkan tipe genom inangnya, beberapa endofit jamur dapat berubah menjadi patogen pada tanaman yang mengalami stres, namun dalam kondisi lain justru memberikan manfaat karena sifat patogennya yang bersifat kondisional (Yamamoto *et al.*, 2017).

## 2.5 Interaksi Antar Jamur Endofit

Interaksi antara sesama jamur endofit merupakan aspek penting yang kini banyak mendapat perhatian dalam penelitian mikrobiologi modern. Berbagai studi menunjukkan bahwa hubungan antarmikroba dapat berperan besar dalam memicu produksi metabolit sekunder pada jamur. Proses ini diduga melibatkan molekul-molekul isyarat berukuran kecil yang dapat berdifusi, seperti sinyal quorum sensing atau senyawa pemicu lain, yang berfungsi mengaktifkan jalur biosintesis tertentu yang sebelumnya tidak aktif. Dalam suatu komunitas mikroba, setiap metabolit atau produk alami yang dihasilkan oleh satu mikroorganisme dapat memengaruhi pola metabolisme mikroorganisme lain yang hidup berdampingan dalam habitat yang sama. Kondisi serupa juga terjadi pada komunitas endofitik, di mana hasil metabolik dari satu endofit dapat memicu perubahan fisiologis maupun biokimia pada endofit lainnya, sehingga terbentuk dinamika interaksi yang kompleks di dalam jaringan tanaman inang (Maheswari *et al*., 2017).

## 2.6 Inhibitor Enzim Tirosinase

Tirosinase adalah enzim yang mengatur pembentukan melanin dalam proses melanogenesis. Enzim ini mengubah L-tirosin menjadi L-DOPA, lalu menjadi dopaquinon yang kemudian membentuk melanin. Aktivitas tirosinase meningkat oleh sinar UV, sehingga produksi melanin bertambah. Inhibitor tirosinase dapat mengurangi melanin dan mencegah hiperpigmentasi (Himawan, 2016).

Tirosinase merupakan enzim logam yang termasuk dalam keluarga protein tembaga tipe-3, yang memiliki dua ion tembaga pada daerah aktifnya. Enzim ini terdapat pada berbagai organisme, baik prokariot maupun eukariot, seperti tumbuhan, jamur, arthropoda, dan mamalia. Fungsinya berkaitan dengan proses pembentukan pigmen, penyembuhan luka, perlindungan terhadap radiasi, serta respons imun awal. Tirosinase berperan dalam dua reaksi enzimatik berturut-turut, yaitu hidroksilasi monophenol dan oksidasi diphenol menjadi quinon, yang kemudian mengalami polimerisasi spontan membentuk melanin. Dua anggota lain dari kelompok protein ini adalah katekol oksidase, yang biasanya terdapat pada tumbuhan dan hanya mengkatalisis tahap oksidasi kedua, serta hemocyanin, yang tidak bersifat enzimatik dan berperan sebagai pengangkut oksigen. Dalam beberapa tahun terakhir, sejumlah struktur tirosinase dari tumbuhan dan bakteri telah berhasil diidentifikasi, termasuk kompleksnya dengan substrat atau inhibitor, sehingga memberikan pemahaman mengenai residu dan fitur penting dalam pengikatan tembaga serta proses katalitiknya (Margarita *et al*., 2015).

## 2.7 Struktur Enzim Tirosinase

Tirosinase merupakan metaloenzim yang termasuk dalam keluarga protein tembaga tipe-3 (*type-3 copper proteins*), bersama dengan *catechol oxidase* (CO) dan *hemocyanin* (Hc). Enzim ini memiliki dua ion tembaga (CuA dan CuB) pada pusat aktifnya yang masing-masing berikatan dengan tiga residu histidin. Kedua ion tembaga ini berperan penting dalam proses oksidasi substrat fenolik.

Secara umum, struktur tirosinase terbagi menjadi tiga domain utama, yaitu:

1. Domain tengah (central domain)

   Mengandung enam residu histidin yang terkonservasi dan membentuk situs aktif dengan dua ion tembaga pengoksidasi (CuA dan CuB).

2. Domain terminal N (N-terminal domain)

   Berfungsi sebagai peptida transit yang menentukan lokasi akhir enzim. Pada tumbuhan, mengarahkan enzim ke kloroplas; pada mamalia, berperan dalam transfer ke melanosom; dan pada bakteri, mengandung peptida sinyal TAT untuk sekresi protein.

3. Domain terminal C (C-terminal domain)

   Berperan sebagai penutup (placeholder) pada bentuk tidak aktif (*pro-tyrosinase*), yang akan dilepaskan melalui proteolisis agar enzim menjadi aktif.

Selain itu, beberapa spesies seperti *Aspergillus oryzae* dan moluska menunjukkan adanya ikatan tioseter antara residu histidin pengikat CuA dan

sistein di dekatnya, yang berfungsi menstabilkan struktur situs aktif (Kanteev *et al.*, 2015).

### 2.8 Mekanisme Kerja (Reaksi Katalitik)

Enzim tirosinase merupakan enzim yang berperan penting dalam proses biosintesis melanin melalui dua tahapan reaksi berurutan yang menggunakan oksigen molekuler ($O_2$) sebagai ko-substrat. Tahap pertama disebut sebagai aktivitas monophenolase (cresolase), yaitu reaksi hidroksilasi terhadap senyawa monofenol, seperti tirosin atau fenol, menjadi o-difenol. Pada tahap ini, gugus hidroksil (-OH) ditambahkan ke posisi orto dari cincin aromatik fenol, sehingga menghasilkan senyawa seperti L-DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin). Tahapan ini membutuhkan enzim tirosinase dalam bentuk oxy-tyrosinase, yang mengandung dua ion tembaga ($Cu^{2+}$) teroksidasi dan berikatan dengan molekul oksigen dalam bentuk peroksi ($Cu^{2+}$–$O_2^{2-}$–$Cu^{2+}$) (Kanteev *et al.*, 2015).

Selanjutnya, tahap kedua dikenal sebagai aktivitas diphenolase (atau catecholase), yaitu reaksi oksidasi o-difenol menjadi o-quinon. Dalam reaksi ini, substrat seperti L-DOPA diubah menjadi DOPAquinon melalui pelepasan dua elektron dan dua proton, sementara enzim mengalami reduksi dari bentuk aktif ($Cu^{2+}$) menjadi bentuk tereduksi ($Cu^{+}$). Produk o-quinon yang terbentuk sangat reaktif dan akan mengalami polimerisasi spontan di luar situs aktif enzim, membentuk pigmen melanin yang berperan dalam pewarnaan kulit, rambut, dan perlindungan terhadap radiasi ultraviolet. Kedua reaksi ini berlangsung secara berurutan dan saling bergantung, di mana hasil dari tahap pertama menjadi substrat bagi tahap berikutnya. Dengan demikian, tirosinase memiliki peran ganda

sebagai katalis dalam hidroksilasi dan oksidasi senyawa fenolik yang menjadi dasar dari proses melanogenesis (Kanteev *et al*., 2015).

Enzim tirosinase bekerja melalui perubahan dinamis dari pusat aktif yang mengandung dua ion tembaga (CuA dan CuB). Kedua ion ini mengalami siklus oksidasi–reduksi selama proses katalitik berlangsung. Menurut model Ramsden & Riley (2014), terdapat empat keadaan oksidasi utama yang menentukan aktivitas enzim, yaitu met-tyrosinase, deoxy-tyrosinase, oxy-tyrosinase, dan deactivated form. Keempat bentuk ini berperan dalam reaksi berurutan yang mengubah monophenol menjadi o-difenol, kemudian menjadi o-quinon yang akhirnya membentuk melanin (Kanteev *et al*., 2015).

1. Met-tyrosinase (Cu(II)–Cu(II))

Bentuk ini merupakan keadaan dominan dan paling stabil dari tirosinase dalam kondisi fisiologis. Pada keadaan ini, kedua ion Cu berada dalam bentuk Cu(II) dan berikatan dengan molekul ion hidroksida ($OH^-$) di pusat aktif. Bentuk met-tyrosinase memiliki kemampuan untuk mengoksidasi o-difenol menjadi o-quinon, tetapi tidak dapat menghidroksilasi monophenol, karena konfigurasinya tidak memungkinkan pembentukan ikatan dengan molekul oksigen. Setelah mengoksidasi substrat diphenol, bentuk ini mengalami reduksi menjadi deoxy-tyrosinase.

2. Deoxy-tyrosinase (Cu(I)–Cu(I))

Merupakan hasil reduksi dari bentuk met setelah oksidasi diphenol. Pada keadaan ini, kedua ion Cu berada dalam bentuk Cu(I) dan tidak mengikat oksigen. Bentuk deoxy berperan penting sebagai perantara yang dapat menangkap oksigen

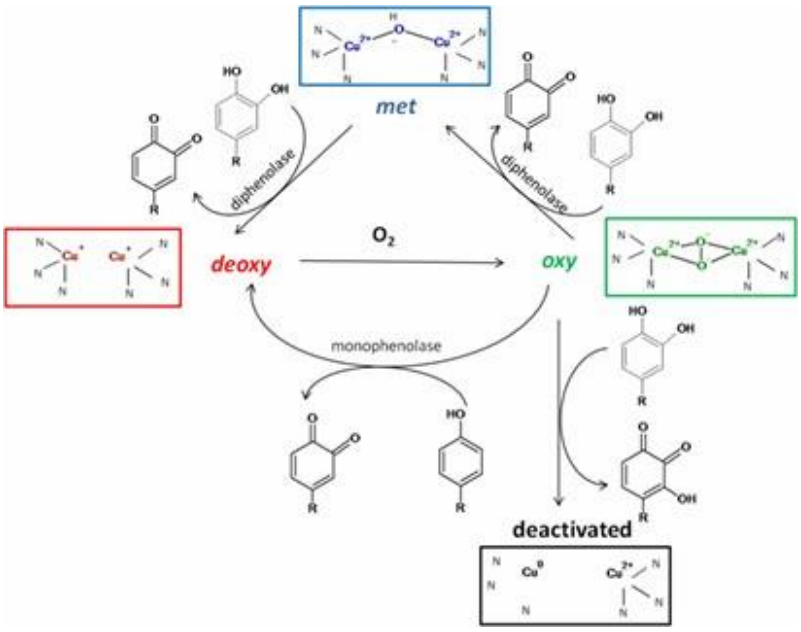
molekuler ($O_2$) dari lingkungan untuk membentuk bentuk aktif berikutnya, yaitu oxy-tyrosinase.

3. Oxy-tyrosinase (Cu(II)–$O_2^{2-}$–Cu(II))

Pada bentuk ini, molekul oksigen terikat di antara kedua ion Cu dalam konfigurasi μ-peroksi ($O_2^{2-}$). Inilah bentuk paling aktif secara katalitik, yang mampu melakukan hidroksilasi terhadap monophenol menjadi o-difenol. Oxy-tyrosinase memfasilitasi penambahan gugus hidroksil (-OH) pada cincin aromatik fenol melalui mekanisme serangan elektrofilik. Setelah reaksi berlangsung, oxy-tyrosinase melepaskan produk o-difenol dan kembali ke bentuk met atau deoxy, tergantung kondisi redoks sistem.

4. Deactivated form (Cu(0))

Bentuk ini muncul akibat reaksi “suicide inactivation”, yaitu kondisi di mana enzim kehilangan aktivitasnya akibat akumulasi substrat diphenol atau produk antara yang bereaksi dengan situs aktif. Dalam bentuk ini, pusat aktif mengalami reduksi penuh hingga Cu(0), sehingga tidak lagi mampu mengikat oksigen maupun mengkatalisis reaksi oksidasi. Fenomena ini menyebabkan penurunan efisiensi enzim dan berperan sebagai mekanisme pengendalian alami aktivitas tirosinase.




**Gambar 2.7** Tingkat oksidasi tirosinase sebelum membentuk pigmen melanin. Empat keadaan terpisah dari situs aktif tirosinase
Sumber : Ramsden dan Riley (2014)

Tirosinase merupakan enzim yang berperan penting dalam biosintesis melanin melalui dua tahap reaksi enzimatik yang berlangsung secara berurutan. Tahap pertama adalah hidroksilasi monophenol menjadi o-diphenol, yang dikenal sebagai aktivitas monophenolase, sedangkan tahap kedua adalah oksidasi o-diphenol menjadi o-quinon, yang disebut aktivitas diphenolase. Produk o-quinon yang dihasilkan kemudian mengalami polimerisasi spontan membentuk pigmen melanin. Mekanisme kerja tirosinase dikendalikan oleh empat keadaan oksidasi pada situs aktifnya, yaitu met-tyrosinase, deoxy-tyrosinase, oxy-tyrosinase, dan deactivated form. Bentuk met-tyrosinase merupakan bentuk paling umum, dengan dua ion tembaga ($Cu^{2+}$) yang berikatan dengan ion hidroksida. Deoxy-tyrosinase memiliki dua ion Cu dalam keadaan $Cu^{+}$ (Cu(I)) yang siap mengikat oksigen,

sementara oxy-tyrosinase adalah bentuk aktif dengan dua $Cu^{2+}$ yang berikatan dengan molekul $O_2$ dalam konfigurasi peroksi untuk melakukan oksidasi substrat. Bentuk deactivated form terjadi ketika enzim mengalami oksidasi berlebihan yang menyebabkan penurunan aktivitas, dikenal sebagai suicide inactivation. Dalam setiap siklus katalitik, terjadi perubahan redoks antara Cu(I) dan Cu(II) serta pembentukan ikatan sementara dengan substrat fenolik. Perbedaan utama antara tirosinase dan catechol oxidase terletak pada fleksibilitas struktur situs aktifnya; tirosinase memiliki ruang aktif yang lebih terbuka sehingga mampu mengakomodasi baik monophenol maupun diphenol sebagai substrat (Kanteev *et al.*, 2015).

## 2.9 Mekanisme Molekuler Katalisis Tirosinase hingga Pembentukan Melanin

Reaksi yang dikatalisis oleh enzim tirosinase berlangsung dalam beberapa tahapan yang melibatkan pengikatan substrat, deprotonasi, oksidasi atau hidroksilasi, dan pelepasan produk. Semua proses ini terjadi di pusat aktif enzim yang mengandung dua ion tembaga (CuA dan CuB) yang terkoordinasi oleh enam residu histidin dalam susunan heliks α.

1. Pengikatan Substrat

Tahapan awal diawali dengan masuknya substrat, berupa monofenol (misalnya tirosin) atau difenol (seperti L-DOPA) ke dalam situs aktif enzim. Substrat berinteraksi dengan ion CuA dan CuB melalui gugus hidroksil aromatiknya. Interaksi ini distabilkan oleh ikatan π–π antara cincin aromatik substrat dan residu histidin His208, serta interaksi elektrostatik dengan Arg209 yang berperan penting dalam pengaturan orientasi substrat agar tepat menghadap

pusat katalitik. Menurut hasil kristalografi pada Gambar 5 (hlm. 1367), baik tirosin maupun L-DOPA memiliki orientasi pengikatan yang hampir sama terhadap CuA dan CuB, menunjukkan bahwa lokasi pengikatan kedua jenis substrat berada pada posisi yang serupa.

2. Deprotonasi Substrat

Setelah pengikatan, proton dari gugus hidroksil substrat dilepaskan untuk membentuk bentuk anion fenolat yang lebih reaktif. Proses deprotonasi ini difasilitasi oleh molekul air yang terikat secara struktural di pusat aktif, yang diaktifkan oleh residu Glu195 dan Asn205. Dua residu ini berperan sebagai sistem katalitik penting yang menstabilkan air dan berfungsi sebagai akseptor proton. Dalam jurnal ini dijelaskan bahwa mekanisme ini merupakan jalur paling efisien secara energi (energetically feasible) untuk memulai reaksi oksidasi.

Deprotonasi ini tidak hanya mengaktifkan substrat, tetapi juga menyiapkan kondisi bagi oksigen terikat ($O_2^{2-}$) di antara CuA dan CuB untuk bertindak sebagai agen oksidasi atau hidroksilasi pada tahap selanjutnya.

3. Hidroksilasi dan Oksidasi

Tahap berikutnya adalah reaksi katalitik utama, yaitu penambahan gugus hidroksil atau oksidasi substrat.

a) Pada substrat monofenol, kompleks oksigen peroksi (Cu(II)–$O_2^{2-}$–Cu(II)) yang terbentuk pada bentuk oxy-tyrosinase menyerang posisi orto dari cincin aromatik, menambahkan gugus –OH dan menghasilkan o-difenol misalnya L-DOPA.

b) Pada substrat difenol, reaksi oksidasi berlangsung dengan pelepasan dua elektron dan dua proton, mengubah L-DOPA menjadi DOPAquinon (o-quinon), sementara situs aktif mengalami reduksi menjadi deoxy-tyrosinase (Cu(I)–Cu(I)).

Hasil penelitian Kanteev et al., (2015) menunjukkan bahwa mekanisme ini melibatkan rotasi histidin yang berkoordinasi dengan CuA dan distorsi kecil pada jembatan peroksi $Cu_2O_2$ untuk memungkinkan serangan elektrofilik terhadap substrat fenolik.

c) Pelepasan Produk dan Pembentukan Melanin

Setelah proses oksidasi, produk o-quinon yang terbentuk akan dilepaskan dari situs aktif enzim. O-quinon merupakan molekul yang sangat reaktif dan tidak stabil; setelah dilepaskan ke lingkungan, ia akan mengalami reaksi polimerisasi spontan melalui serangkaian reaksi non-enzimatik yang melibatkan tautan kovalen antar molekul o-quinon dan derivatifnya. Reaksi ini menghasilkan polimer kompleks berwarna gelap yang dikenal sebagai melanin.

## 2.7 Mekanisme Inhibitor Tirosinase

Melanogenesis dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk paparan sinar UV, konsumsi alkohol, kondisi emosional, pola makan, serta paparan nikotin, dengan sinar UV sebagai faktor utama. Proses pembentukan melanin, baik feomelanin maupun eumelanin, diawali dari oksidasi L-tirosin (L-tyr) dan/atau L-dihidroksifenilalanin (L-dopa) menjadi dopaquinone (DQ) oleh enzim tirosinase. Selanjutnya, DQ mengalami serangkaian reaksi radikal hingga terbentuk melanin.

Terdapat dua tahap yang menjadi penentu kecepatan sintesis melanin. Eumelanin menghasilkan warna cokelat hingga hitam dan memiliki kemampuan perlindungan yang lebih tinggi terhadap radiasi UV. Sebaliknya, feomelanin lebih mudah terurai oleh cahaya dan dikaitkan dengan peningkatan kerentanan terhadap kerusakan akibat UV (Yuqiong *et al*., 2022).

Sinar UVB dapat memicu stres oksidatif yang meningkatkan sensitivitas kulit terhadap kerusakan, sementara sinar UVA memiliki efek langsung terhadap struktur DNA. Secara fisiologis, melanogenesis berperan penting sebagai sistem pertahanan kulit dalam menyerap sinar UV untuk mencegah kerusakan akibat paparan matahari. Melanosit berada pada kondisi stres oksidatif tingkat rendah secara konstan, namun paparan UV yang berlebih dapat meningkatkan produksi radikal bebas seperti radikal hidroksil, superoksida, hidrogen peroksida, oksigen singlet, hipoklorit, radikal nitrogen oksida, dan peroksinitrit. Radikal bebas yang sangat reaktif ini dapat memicu kerusakan biomolekuler, termasuk gangguan pada DNA, pembentukan sel abnormal, dan respon inflamasi (Yuqiong *et al*., 2022).

Uji aktivitas penghambatan tirosinase dari ekstrak kasar dan senyawa hasil isolasi dilakukan berdasarkan metode Hearing (1987) dan Rangkadilok *et al*. (2006) dengan beberapa modifikasi. Enzim yang digunakan adalah tirosinase yang berasal dari jamur, dengan L-DOPA sebagai substrat dan asam kojat sebagai kontrol positif. Sebanyak 50 $\mu$L sampel dalam pelarut DMSO dicampurkan dengan 100 $\mu$L enzim tirosinase (200 IU/mL) dan 100 $\mu$L buffer fosfat pH 6,8, kemudian campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan 100 $\mu$L larutan L-DOPA (7,6 mM) dan reaksi diinkubasi

kembali selama 15 menit pada suhu yang sama. Pembentukan dopakrom diukur pada panjang gelombang 475 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Sebagai pembanding, digunakan DMSO sebagai blanko dan buffer fosfat tanpa enzim tirosinase sebagai kontrol warna. Persentase penghambatan tirosinase dinyatakan sebagai persentase penghambatan aktivitas tirosinase dan dihitung sebagai berikut:

$$\text{Penghambatan Tirosinase (\%)} = \frac{(B-(A-C)}{B} X\ 100\%$$

Asam kojik digunakan sebagai penghambat standar untuk tirosinase. Semua pengujian dilakukan secara triplikat (Lukitaningsih & Holzgrabe, 2014).

Penelitian yang dilakukan oleh Lukitaningsih dan Holzgrabe (2014) memaparkan bahwa dari ekstrak etil asetat bengkuang *(Pachyrhizus erosus)* berhasil diisolasi beberapa senyawa bioaktif yang tergolong dalam kelompok flavonoid. Proses isolasi senyawa aktif tersebut dilakukan melalui fraksinasi yang dipandu oleh uji bioaktivitas (bioassay-guided fractionation) menggunakan kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis (TLC) dengan reagen DPPH sebagai penanda aktivitas antioksidan. Fraksi-fraksi yang menunjukkan nilai Rf serupa dan memberikan respon positif terhadap reagen DPPH kemudian digabungkan dan dianalisis lebih lanjut untuk menilai aktivitas penghambatan enzim tirosinase dengan menggunakan tirosinase yang berasal dari jamur. Hasil pengujian menunjukkan bahwa beberapa fraksi yang aktif memiliki kemampuan ganda, yaitu sebagai antioksidan sekaligus penghambat tirosinase, yang

mengindikasikan potensinya sebagai bahan pencerah kulit dalam formulasi kosmetik. Berdasarkan hasil karakterisasi spektroskopi LC-MS dan $^1$H NMR, salah satu senyawa utama memiliki rumus molekul $C_{17}H_{12}O_4$ dengan puncak ion $[M+H]^+$ pada m/z 281,3, serta menunjukkan pola proton aromatik khas sistem flavonoid dengan gugus hidroksi dan furan yang dikonfirmasi melalui korelasi COSY (Lukitaningsih & Holzgrabe, 2014).

### 2.8 Metoda Uji Aktivitas Inhibitor Tirosinase Secara In Vitro

Tirosinase merupakan enzim yang merubah substrat L-DOPA menjadi dopaquinon yang nantinya beurubah menjadi melanin. Dengan menghambat enzim tirosinase perubahan L-DOPA menjadi dopaquinon dapat dihambat dan pada tahapan berikutnya tidak terjadi pembentukan melanin. Inhibitor enzim tirosinase akan menghambat aktivitas enzim tirosinase tersebut sehingga LDOPA tidak berubah menjadi dopaquinon dan selanjutnya tidak terjadinya pembentukan melanin di dalam sel secara biologis di dalam tubuh. Prinsip kerja dari pengujian enzim tirosinase dengan melihat penurunan adsorban dari senyawa dopaquinon, yang nantinya menyerap sinar dengan panjang gelombang 490 nm (Fan, *et al*., 2021; Rasyad, *et al.*, 2016)

Uji penghambatan tirosinase didasarkan pada aktivitas katalitik enzim tirosinase yang mengubah tirosin dengan bantuan oksigen menjadi L-DOPA, yang kemudian dioksidasi lebih lanjut menjadi dopaquinon dan menghasilkan air sebagai produk samping. Selanjutnya, dopaquinon mengalami proses autooksidasi secara spontan sehingga terbentuk dopakrom, yaitu senyawa berwarna oranye hingga kemerahan. Pigmen tersebut memiliki serapan maksimum pada panjang

gelombang 475 nm. Ekstrak etil asetat menunjukkan hubungan yang kuat dan signifikan antara peningkatan konsentrasi dengan aktivitas penghambatan enzim tirosinase. Temuan ini mengindikasikan bahwa ekstrak etil asetat buah bengkuang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai bahan pencerah kulit alami dalam formulasi kosmetik (Lukitaningsih & Holzgrabe, 2014).

Perbandingan potensi penghambatan enzim tirosinase dari berbagai senyawa isoflavonoid menunjukkan bahwa 5-hidroksi-daidzein-7-O-β-glukopiranosa memiliki kemampuan inhibisi tertinggi, diikuti secara berurutan oleh 8,9-furanyl-pterocarpan-3-ol dan daidzein-7-O-β-glukopiranosa. Penurunan aktivitas dari daidzein ke turunannya yang terikat glukopiranosil diduga disebabkan oleh adanya gugus glukopiranosil yang menimbulkan hambatan sterik terhadap interaksi dengan enzim. Enzim tirosinase sendiri memiliki situs aktif yang mengandung dua atom tembaga yang berikatan dengan residu histidin. Senyawa yang mengandung gugus fenol atau difenol mampu berinteraksi dengan ion tembaga melalui pembentukan kompleks khelat, sehingga menonaktifkan enzim tersebut secara ireversibel. Dalam hal ini, daidzein-7-O-β-glukopiranosa hanya memiliki satu gugus fenol aktif karena gugus fenol lainnya berikatan dengan molekul glukosa, sehingga interaksi dengan enzim menjadi lebih lemah dan aktivitas penghambatannya menurun (Lukitaningsih & Holzgrabe, 2014).

## 2.9 Kelebihan dan Kekurangan Metoda Uji Aktivitas Inhibitor Tirosinase Secara In Vitro

Metode in vitro dalam bidang mikrobiologi merupakan pendekatan eksperimental yang dilakukan di luar organisme hidup, seperti pada media kultur,

tabung reaksi, atau sistem bioreaktor dengan kondisi yang terkontrol. Metode ini banyak digunakan untuk mempelajari metabolisme mikroba, interaksi antarspesies, serta respon mikroorganisme terhadap senyawa tertentu, baik dalam konteks penelitian dasar maupun aplikasi industri dan medis. Berdasarkan jurnal "Recent Advances in Microbial In Vitro Metabolism Modeling and Applications" Frontiers in Microbiology (2018), metode ini memungkinkan peneliti melakukan pengamatan yang lebih spesifik terhadap perilaku dan aktivitas mikroba dengan meminimalkan pengaruh variabel lingkungan yang sulit dikontrol dalam kondisi alami (Van der Ark *et al*., 2018).

Kelebihan utama metode in vitro terletak pada kemampuannya memberikan kontrol eksperimen yang tinggi, karena semua parameter seperti pH, suhu, waktu inkubasi, serta komposisi nutrien dapat diatur secara presisi. Selain itu, metode ini memiliki reproduksibilitas yang baik karena dilakukan dalam sistem tertutup, sehingga hasil penelitian dapat diulang dengan variasi yang minimal. Dari sisi efisiensi, uji in vitro relatif lebih cepat dan murah dibandingkan metode in vivo, menjadikannya alat penting untuk skrining awal aktivitas antimikroba atau identifikasi mikroorganisme. Pendekatan ini juga lebih etis, karena tidak memerlukan hewan percobaan, serta aman dan mudah dikombinasikan dengan teknik modern seperti metabolomik, genomik, dan pemodelan komputasi. Hal ini memungkinkan penelitian yang lebih mendalam mengenai aktivitas biokimia mikroba dan mekanisme interaksi antarspesies di lingkungan yang terkontrol (Van der Ark *et al*., 2018).

Namun, metode in vitro juga memiliki sejumlah keterbatasan signifikan. Salah satunya adalah bahwa sistem ini tidak sepenuhnya mampu merepresentasikan kompleksitas interaksi biologis alami, seperti hubungan antar mikroba dengan jaringan inang atau pengaruh sistem imun. Akibatnya, hasil eksperimen sering kali tidak dapat diekstrapolasi langsung ke kondisi fisiologis nyata. Selain itu, banyak mikroorganisme yang tidak dapat tumbuh di kondisi kultur buatan, sehingga hasil identifikasi hanya mencakup sebagian kecil komunitas mikroba yang dapat dikultur. Dalam konteks metabolisme mikroba, dinamika populasi juga sering berubah akibat keterbatasan nutrien dan akumulasi produk metabolit, yang membuat model in vitro sulit digunakan untuk pengamatan jangka panjang. Faktor fisiologis seperti aliran darah, distribusi oksigen, serta pengaruh imunologis juga tidak dapat disimulasikan secara akurat dalam sistem in vitro sederhana (Van der Ark *et al.*, 2018).

Dengan demikian, meskipun metode in vitro memberikan banyak keuntungan dalam hal efisiensi, kontrol, dan etika penelitian, hasil yang diperoleh tetap perlu divalidasi menggunakan pendekatan in vivo atau data lapangan untuk memastikan relevansinya terhadap kondisi biologis nyata. Oleh karena itu, jurnal ini merekomendasikan agar metode in vitro digunakan secara komplementer dengan model komputasi dan pendekatan multi-omik agar dapat memberikan gambaran menyeluruh tentang metabolisme dan perilaku mikroba (Van der Ark *et al.*, 2018).