

BAB II

LANDASAN TEORI

2.1 Tanaman Yakon

2.1.1 Klasifikasi Tanaman Yakon

Smallanthus sonchifolius, yang umum disebut Yakon, termasuk dalam keluarga Asteraceae. Tanaman ini berupa umbi dan berasal dari Andes, tetapi telah diperkenalkan di Jepang, Selandia Baru, Eropa (terutama di Republik Ceko), dan Amerika Serikat. Yakon adalah tanaman herbal tahunan dengan daun hijau tua yang besar dan dua jenis bagian bawah tanah, akar umbi yang dapat dimakan, digunakan oleh tanaman untuk penyimpanan makanan, dan akar serat yang digunakan untuk reproduksi vegetatif. Setiap tanaman menghasilkan 4 hingga 20 umbi yang dapat dimakan yang dapat mencapai berat 20 kg (Russo, *et al.*, 2015).

Tanaman Yakon dapat hidup pada rentang iklim yang luas (suhu 0-24 C dan ketinggian 800-2000 mdpl) dan tipe tanah yang bervariasi (Countreras & Alviz, 2020). Tanaman ini juga dapat ditemukan di Indonesia. Di sebagian wilayah di Indonesia, tanaman ini dikenal dengan sebutan daun insulin karena dianggap bermanfaat bagi penurunan gula darah pada penderita diabetes mellitus (Utami & Lena, 2022).

Berdasarkan klasifikasi filogenetik, Yakon (*Smallanthus sonchifolius*) termasuk ke dalam:

Kingdom : *Plantae*
Divisi : *Magnoliophyta*
Kelas : *Magnoliopsida*
Famili : *Asteraceae*

Genus : *Smallanthus*

Species : *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robin

(Lebeda, *et al.*, 2011).



Gambar 1. Daun *Smallanthus Sonchifolius*

(Laredo, *et al.*, 2022)

2.1.2 Nama Daerah

Menurut Zardini (1991), nama umum Yakon antara lain *arboloco* (Kolombia); *aricoma* (Peru dan Bolivia; nama dalam bahasa Aymara); *jiquima* dan *jiquimilla* (Venezuela dan Kolombia); *yacón*, *llacon*, *llacjon*, *llag'on* (Peru, Bolivia, dan Argentina). Istilah *yacón* juga digunakan di Argentina dan Paraguay untuk *Jacaratia hassleriana* Chod., dari keluarga *Caricaceae*, yang memiliki akar berair hingga 60 kg dan digunakan sebagai sumber air di hutan kering tempat tanaman ini tumbuh); *poire de terre* (Prancis); dan *yacon strawberry* (Amerika Serikat). Di sebagian wilayah di Indonesia, tanaman ini dikenal dengan sebutan daun insulin karena dianggap bermanfaat bagi penurunan gula darah pada penderita diabetes mellitus (Sari, *et al.*, 2015)

2.1.3 Morfologi Tanaman Yakon

Smallanthus sonchifolius adalah tanaman herba tahunan yang tumbuh hingga mencapai 1,5 m – 3 m dengan batang yang berbentuk silindris hingga agak bersudut, bergaris, berongga saat matang, dan memiliki rambut padat di bagian ujungnya. Sistem akar terbentuk oleh susunan akar adventif yang cukup bercabang dan hingga dua puluh akar penyimpanan yang berdaging dan berbentuk umbi. Akar penyimpanan tersebut berkembang dari sistem akar rimpang bawah tanah, umumnya berbentuk napiform, dapat tumbuh hingga 25 cm panjang dan 10 cm lebar, serta memiliki berat antara 0,2 kg – 2,0 kg. Warna kulit akar dan jaringan penyimpanan bervariasi tergantung klon: putih, krem, merah muda (beralur), ungu, dan bahkan coklat (Dostert, *et al.*, 2011).

Daunnya berlawanan dengan helaian daun yang merambat ke arah tangkai. Helaian daun berbentuk bulat telur lebar dan berbentuk seperti anak panah, tersambung atau aurikular di pangkal; daun atas berbentuk bulat telur memanjang; permukaan atas daun berbulu dan bagian bawahnya berbulu halus. Perbungaan bersifat terminal, terdiri dari 1 – 5 sumbu, masing-masing dengan 3 kapitulum; tangkai bunga berbulu padat (Dostert, *et al.*, 2011).

Filari (daun pembalut bunga) tersusun dalam satu baris dan berbentuk bulat telur, hingga 15 mm panjang dan 10 mm lebar. Perbungaannya (kepala bunga) berwarna kuning hingga oranye dengan sekitar 15 bunga pita, yang bersifat betina, memiliki 2 atau 3 gigi, dan tumbuh hingga 12 mm x 7 mm; bunga cakram bersifat jantan, sekitar 7 mm panjangnya. Buah akene rata-rata berukuran antara 3,7 mm – 2,2 mm, berbentuk elips, berwarna coklat tua, dengan epidermis

halus dan endokarp yang padat serta mudah terkelupas dengan sedikit gosokan pada perikarp. Beberapa ekotipe tidak menghasilkan buah, dan jika pun ada, buahnya tidak layak tumbuh (Dostert, *et al.*, 2011).

2.1.4 Kandungan Kimia Daun Yakon

Smallanthus sonchifolius, atau yang dikenal sebagai Yakon, adalah tanaman dari spesies *Smallanthus* dalam keluarga Asteraceae. Tanaman ini memiliki beberapa bagian, termasuk umbi, daun, dan bunga, yang semuanya memberikan manfaat beragam, khususnya daunnya. Daun Yakon mengandung berbagai senyawa fenolik, seperti asam organik bebas, asam klorogenat (bersama asam kafeat dan turunannya), flavonoid, diterpen, serta seskuiterpen lakton. Kualitas senyawa fenolik pada daun ini dipengaruhi oleh faktor eksternal dan internal. Salah satu faktor yang berperan dalam perubahan senyawa fenolik adalah waktu panen, di mana panen yang tepat adalah saat akumulasi senyawa fenolik dalam daun mencapai tingkat tertinggi (Elawati & Yuanita, 2021).

Tabel 1. Kandungan senyawa daun Yakon

Sumber: Padilla, *et al.*, (2020)

Nama Senyawa	Golongan	Nama Senyawa	Golongan
Disakarida	Asam organik bebas	Rutin	Flavonoid
Asam kuinat		Kuersetin-3-O-galaktosida	
Asam altratrat		Pentahidroksi-metoksiflavon glikosida	
Asam asetoksi glukoronat		Kuersetin-O-pentosida	
Isomer Asam		Trihidroksi	

monokafeoilaltrarat	Asam klorogenat (dan derivat asam kafeat lain)	trimetoksiflavon	Sesquiterpen lakton
Asam 1-O-(E)-kafeoilkuinat		Trihidroksi dimetoksiflavon	
Asam 5-O-(E)-kafeoilkuinat		Enhidrin	
Isomer Asam dikafeoilaltrarat		Polimatin A	
Asam dikafeoilaltrarat glukoronat		Fluktuadin	
Isomer Asam dikafeoilaltrarat		Uvedalin	
Asam 3,4-di-O-(E)-kafeoil kuinat		Epoksi angeloiloksi-etoksi-okso-akantosermodida	
Asam 3,5-di-O-(E)-kafeoil kuinat		Uvedalin aldehid	
Asam 4,5-di-O-(E)-kafeoil kuinat		Asam epoksi-germakra-trinolida-14-at	
Isomer Asam trikafeoilaltrarat		Iongpilin asetat	
Asam smaditerpenat C	Diterpen	Polimatin B aldehid	
Asam smaditerpenat E		Polimatin B	
Asam smaditerpenat F			

2.1.5 Bioaktivitas Tanaman Yakon (*Smallanthus sonchifolius*)

Tanaman Yakon mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder yang berperan dalam menurunkan kadar glukosa darah. Beberapa di antaranya meliputi enhidrin, derivat o-kuinon, asam smallanthaditerpenat, 5,7-dihidroksi-4'-metoksiflavonol, 5,7,3'-dihidroksi-3,5'-dimetoksiflavon, asam ent-kaurenat, ent-kauran-3 β ,16 β ,17,19-tertol, ent-kauran-16 β ,17,18,19-tertol, serta 4,5-di-o-CQA, 3,5-di-o-CQA, dan trihidroksi-4'-metoksiflavonol, 7,4' (Contreas & Alviz, 2020).

Dalam daun Yakon, telah ditemukan berbagai senyawa seperti terpen yang diisolasi (lakton seskuiterpena), katekol, flavonoid, dan senyawa fenolik dengan kandungan tinggi. Senyawa-senyawa ini meliputi molekul yang memiliki aktivitas antioksidan dan antidiabetes, seperti asam galat, asam kafeat, asam rosmarinat, asam ferulat, asam p-kumarat, asam klorogenat, asam protokatekuat, serta kuersetin (Contreas & Alviz, 2020).

Ekstraksi Yakon menggunakan dekoksi, menghasilkan kestrak yang banyak mengandung asam fenolat dan asam kafeat, sedangkan ekstrak etanol Yakon banyak mengandung luteolin 3',7-O-diglukosida dan luteolin 7-O-glukosida (Russo, *et al.*, 2015). Senyawa polifenol yang terkandung dalam Yakon inilah yang dapat memperbaiki metabolisme glukosa dan aktivitas antihiperglikemia sehingga Yakon dapat berperan sebagai agen antidiabetes (Choque, *et al.*, 2013).

Menurut Russo, *et al.*, (2015) daun Yakon memiliki efek sebagai antidiabetes melalui mekanisme sebagai agen perbaikan sel pankreas guna

pembentukan insulin serta mampu meredam radikal bebas yang menyebabkan perusakan pada sel pankreas. Flavonoid dan senyawa fenolik daun Yakon menurunkan aktivitas radikal penyebab stres oksidatif dengan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan (katalase, superoksida dismutase, dan glutathione peroksidase) serta menghambat kinerja enzim α -amilase dan α -glukosidase sehingga metabolisme glukosa dapat menuju normal kembali. Asam trikafeoilaladarat telah terbukti memiliki aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase yang kuat.

2.2 Jamur Endofit

2.2.1 Definisi Jamur Endofit

Endofit pertama kali dilaporkan pada tahun 1904 oleh Darnel dan rekan-rekannya. Mikroba endofit diartikan sebagai mikroba yang hidup di dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan efek negatif langsung yang jelas. Hal ini mengindikasikan adanya kemungkinan hubungan simbiosis mutualisme antara mikroba endofit dan tanaman inangnya. Namun, terdapat pula endofit yang berperan sebagai saprofit agresif atau patogen oportunistis. Mikroba endofit umumnya terdiri dari bakteri dan kapang, meskipun jenis kapang lebih sering berhasil diisolasi (Kuncoro & Sugijanto, 2011).

Mikroba endofit adalah mikroorganisme yang hidup dan berkoloni dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan bahaya bagi tanaman inangnya. Setiap tanaman tingkat tinggi mungkin memiliki beberapa mikroba endofit yang menghasilkan metabolit sekunder, yang diyakini sebagai hasil dari koevolusi atau transfer genetik dari inangnya ke mikroba tersebut. Kemampuan mikroba endofit

untuk memproduksi senyawa fitokimia yang juga dihasilkan oleh inangnya mungkin terkait dengan rekombinasi genetik antara mikroba dan inangnya selama proses evolusi. Teori ini sebelumnya diusulkan untuk menjelaskan mengapa *Taxomyces andreanae*, mikroba yang diisolasi dari *Taxus brevifolia*, dapat memproduksi senyawa taxol serupa dengan yang dihasilkan oleh tanaman inang tersebut (Tan & Zou, 2001).

Kemampuan mikroba endofit untuk menghasilkan metabolit sekunder yang sama dengan tanaman inangnya membuka peluang besar untuk memanfaatkan mikroba ini sebagai sumber alternatif metabolit sekunder. Jika mikroba endofit dapat memproduksi senyawa bioaktif langka dan bernilai tinggi seperti yang terdapat pada tanaman inangnya, maka ketergantungan pada bahan baku dari tanaman tersebut bisa dikurangi, yang pada gilirannya membantu menjaga keanekaragaman hayati. Selain itu, penggunaan mikroba sebagai sumber senyawa metabolit sekunder memiliki keunggulan karena dapat diproduksi dengan proses yang lebih sederhana dan ekonomis, menghasilkan produk yang lebih terjangkau (Tan & Zou, 2001).

Jamur endofit adalah jenis jamur yang hidup di dalam jaringan tanaman sepanjang atau sebagian dari siklus hidupnya, membentuk hubungan simbiosis yang saling menguntungkan dengan tanaman inang tanpa menyebabkan efek buruk atau penyakit. Mereka merupakan bagian alami dari mikro-ekosistem tanaman yang memberikan manfaat pada aktivitas fisiologis tanaman inang melalui berbagai cara, seperti menghasilkan hormon indolasetat, membantu dalam biosintesis dan penyerapan nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan dan

perkembangan tanaman, menghasilkan metabolit adaptif terhadap stres untuk melindungi tanaman inang dari serangan herbivora dan patogen, serta meningkatkan kemampuan adaptasi tanaman terhadap stres lingkungan. Sebagai timbal baliknya, tanaman menyediakan habitat dan nutrisi bagi jamur endofit (Wen, *et al.*, 2022).

2.2.2 Potensi Jamur Endofit

Jamur endofit memiliki kemampuan untuk menghasilkan berbagai zat bioaktif dan dapat memproduksi senyawa yang identik atau mirip dengan aktivitas farmakologis yang ditemukan pada tanaman. Mereka menghasilkan berbagai jenis metabolit dari beragam kelas kimia, termasuk alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid, dan senyawa fenolik. Beberapa di antaranya memiliki aktivitas farmakologis yang beragam dan menarik, seperti antimikroba, antioksidan, anti-diabetes, anti-malaria, serta antitumor. Penemuan senyawa aktif dengan struktur yang baru dan beragam ini memberikan sumber berharga untuk penelitian produk obat alami dari mikrobioma (Wen, *et al.*, 2022).

2.3 Diabetes Mellitus

2.3.1 Definisi Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) merupakan gangguan metabolik yang ditandai dengan kadar glukosa darah yang tinggi secara kronis. Selain hiperglikemia, DM juga berhubungan dengan gangguan metabolisme lemak dan protein. Tanpa penanganan yang memadai, DM dapat memicu komplikasi akut seperti ketoasidosis diabetik (DKA) dan sindrom hiperglikemik hiperosmolar (HHS). Hiperglikemia yang berlangsung lama dapat mengakibatkan kerusakan pada

pembuluh darah dan saraf, yang berujung pada komplikasi mikrovascular, makrovascular, serta neuropatik. DM menjadi masalah kesehatan global yang berdampak signifikan pada masyarakat dan sistem kesehatan di berbagai negara, baik yang berpenghasilan rendah, menengah, maupun tinggi (Dipiro, J, T. 2021).

2.3.2 Klasifikasi Diabetes Mellitus

Sebagian besar pasien DM diklasifikasikan ke dalam dua kategori utama: DM tipe 1 dan DM tipe 2. Pada DM tipe 1, pasien mengalami kekurangan insulin secara absolut. Sementara itu, DM tipe 2 ditandai dengan disfungsi sel β yang tingkatannya bervariasi, sering kali disertai resistensi insulin. Wanita yang mengalami diabetes selama masa kehamilan dikategorikan sebagai diabetes gestasional (GDM). Jenis diabetes yang lebih jarang dapat disebabkan oleh kelainan genetik, kerusakan pada pankreas, gangguan endokrin, atau penggunaan obat-obatan tertentu (Dipiro, J, T. 2021).

DM tipe 1 menyumbang 5% hingga 10% dari seluruh kasus DM dan umumnya disebabkan oleh kerusakan autoimun pada sel β pankreas. Prevalensi autoimunitas sel β dalam suatu populasi berhubungan langsung dengan insiden DM tipe 1. Sebagai contoh, di Swedia dan Finlandia, 3% hingga 4,5% dari populasi memiliki antibodi autoimun terhadap sel pulau pankreas (ICA), yang terkait dengan insiden DM tipe 1 tertinggi di dunia, yakni 22 hingga 35 kasus per 100.000 orang. Meskipun prevalensi DM tipe 1 global semakin meningkat, penyebab pastinya masih belum sepenuhnya dipahami (Dipiro, J, T. 2021).

Penanda autoimunitas sel β dapat ditemukan pada banyak orang dewasa yang menderita diabetes. Salah satu varian DM tipe 1 adalah diabetes autoimun

laten pada orang dewasa (LADA). Pasien dengan LADA cenderung memiliki respons yang kurang baik terhadap obat oral dan memerlukan terapi insulin lebih cepat dibandingkan dengan kebanyakan pasien DM tipe 2. DM tipe 1 idiopatik adalah bentuk diabetes nonautoimun yang sering dijumpai pada pasien keturunan Afrika dan Asia, yang mengalami hiperglikemia secara periodik dan hanya memerlukan terapi insulin sesekali (Dipiro, J, T. 2021).

DM tipe 2 menyumbang 90% hingga 95% dari seluruh kasus DM. Prevalensi DM tipe 2 di Amerika Serikat mencapai sekitar 12,1% pada orang dewasa dan terus meningkat. Risiko mengembangkan DM tipe 2 meningkat seiring bertambahnya usia dan bervariasi antar kelompok ras dan etnis. Dibandingkan dengan orang keturunan Eropa, penduduk asli Amerika, Amerika Latin/Hispanik, Afrika-Amerika, Asia-Amerika, dan Penduduk Kepulauan Pasifik lebih rentan mengembangkan DM tipe 2. Meskipun prevalensinya meningkat dengan bertambahnya usia, gangguan ini juga semakin sering terdiagnosis pada remaja dan dewasa muda, kemungkinan besar akibat meningkatnya angka obesitas dan kurangnya aktivitas fisik yang teratur. Faktor genetik memainkan peran penting dalam perkembangan DM tipe 2, di mana sebagian besar kasus tampaknya bersifat poligenik. Insiden diabetes gestasional (GDM) juga meningkat, dengan perkiraan 9% dari seluruh kehamilan di Amerika Serikat antara tahun 2007 hingga 2010. Sebagian besar wanita kembali ke kadar glukosa normal setelah kehamilan, tetapi hingga 50% dari mereka berisiko mengembangkan DM tipe 2 di kemudian hari (Dipiro, J, T. 2021).

Jenis diabetes lainnya yang lebih jarang (1%-2%) muncul melalui berbagai mekanisme. Diabetes onset-dewasa pada usia muda (MODY) dan diabetes neonatal adalah bentuk DM yang diwariskan, yang disebabkan oleh mutasi gen tunggal tertentu. Gangguan endokrin, seperti akromegali dan sindrom Cushing, sering menyebabkan hiperglikemia. Penyakit yang merusak atau menghancurkan pankreas, seperti fibrosis kistik, pankreatitis, dan kanker pankreas, dapat merusak sel β dan mengganggu sekresi insulin. Beberapa obat juga dapat menyebabkan hiperglikemia dengan mengganggu sekresi insulin, meningkatkan resistensi insulin, atau keduanya (Dipiro, J,T. 2021).

2.3.3 Terapi Diabetes

1. Sulfonilurea

Sulfonilurea adalah obat yang bekerja sebagai secretagogue insulin dengan meningkatkan pelepasan insulin dari sel beta pankreas. Mekanismenya melibatkan pengikatan sulfonilurea pada reseptor khusus yang menghambat saluran kalium peka ATP, menyebabkan depolarisasi sel beta, masuknya ion kalsium, dan pelepasan insulin. Selain itu, sulfonilurea juga dapat menurunkan kadar glukagon serum secara tidak langsung melalui peningkatan insulin dan somatostatin, yang menghambat sekresi sel alfa pankreas (Katzung, 2018).

Sulfonilurea terbagi menjadi dua generasi. Generasi pertama meliputi tolbutamid, klorpropamid, dan tolazamid, yang umumnya memiliki waktu paruh lebih panjang, efek samping lebih sering, dan interaksi obat yang lebih kompleks. Misalnya, tolbutamid dengan waktu paruh 4-5 jam aman untuk pasien usia lanjut, sementara klorpropamid dengan waktu paruh 32 jam lebih lama dan berisiko

hipoglikemia berkepanjangan pada lansia, serta memiliki potensi reaksi flush hiperemis dengan alkohol. Tolazamid memiliki waktu paruh sekitar 7 jam dengan efek hipoglikemik bertahan lama (Katzung, 2018).

Generasi kedua sulfonilurea, yang lebih sering digunakan karena potensi lebih tinggi dan efek samping lebih sedikit, termasuk gliburid, glipizid, dan glimepirid. Gliburid memiliki dosis rendah dan risiko hipoglikemia tinggi, serta dikontraindikasikan pada gangguan hati dan ginjal. Glipizid dengan waktu paruh 2-4 jam harus dikonsumsi sebelum makan dan tersedia juga dalam bentuk extended release; lebih aman dibandingkan gliburid dalam hal risiko hipoglikemia. Glimepirid efektif dalam dosis rendah, masa kerja lama sehingga cukup satu kali sehari, dan memiliki metabolit yang hampir tidak aktif, membuatnya lebih mudah dipakai dan dapat digunakan sebagai monoterapi atau kombinasi dengan insulin (Katzung, 2018).

Catatan keamanan penting adalah sulfonilurea harus digunakan hati-hati pada pasien usia lanjut dan penderita penyakit kardiovaskular karena risiko hipoglikemia yang serius, serta kontraindikasi pada gangguan hati atau ginjal berat. Studi terbesar hingga kini tidak menunjukkan peningkatan risiko kardiovaskular akibat penggunaan sulfonilurea (Katzung, 2018).

2. Biguanid

Biguanid, terutama metformin, menurunkan kadar glukosa darah dengan mengurangi produksi glukosa di hati melalui aktivasi AMPK. Efek lain termasuk menghambat glukoneogenesis di ginjal, memperlambat penyerapan glukosa usus, meningkatkan glikolisis jaringan, menurunkan glukagon, dan tidak tergantung

pada fungsi sel beta pankreas. Tidak menyebabkan hipoglikemia, sehingga disebut sebagai obat *euglikemik*. Metformin tidak terikat protein plasma, tidak dimetabolisme, dan diekskresikan utuh melalui ginjal. Waktu paruh 1,5–3 jam. Akumulasi pada pasien dengan gangguan ginjal dapat meningkatkan risiko **asidosis laktat** (Katzung, 2018).

Metformin adalah **terapi lini pertama untuk diabetes tipe 2**, terutama karena tidak meningkatkan berat badan dan tidak menyebabkan hipoglikemia. Berdasarkan UKPDS, metformin menurunkan risiko komplikasi mikro dan makrovaskular. Digunakan juga sebagai kombinasi pada pasien yang tidak respons terhadap monoterapi, dan terbukti efektif mencegah diabetes tipe 2 pada pasien obesitas dengan gangguan toleransi glukosa. Kurang efektif pada pasien yang lebih tua dan kurus (Katzung, 2018).

Dosis berkisar antara **500 mg hingga 2.550 mg per hari**, dimulai dari dosis terendah yang efektif dan ditingkatkan perlahan untuk mengurangi efek samping pencernaan. Dosis lebih dari 1.000 mg sekaligus sebaiknya dihindari karena bisa menyebabkan gangguan gastrointestinal. Efek samping paling umum adalah gangguan saluran cerna (hingga 20% pasien). Sekitar 3–5% pasien harus menghentikan obat karena diare persisten. Penggunaan jangka panjang dapat menurunkan penyerapan vitamin B12, sehingga disarankan pemantauan rutin. Risiko asidosis laktat meningkat pada pasien dengan penyakit ginjal, hati, alkoholisme, atau kondisi hipoksia jaringan. Karena itu, biguanid **dikontraindikasikan** pada kondisi-kondisi tersebut (Katzung, 2018).

3. Tiazolidinedion

Tiazolidinedion (TZD) bekerja dengan menurunkan resistensi insulin melalui aktivasi reseptor nuklir PPAR- γ yang berperan dalam regulasi gen-gen metabolisme glukosa dan lemak, diferensiasi sel lemak, serta sensitivitas terhadap insulin. Efek utamanya terjadi pada jaringan lemak, namun TZD juga memengaruhi otot, hati, endotel, ovarium, sistem imun, dan bahkan sel tumor. Saat ini tersedia dua jenis TZD, yaitu pioglitazon dan rosiglitazon. Pioglitazon memiliki aktivitas terhadap PPAR- α dan PPAR- γ , dimetabolisme oleh enzim CYP2C8 dan CYP3A4, dan diberikan dengan dosis 15–45 mg per hari. Obat ini efektif menurunkan kadar trigliserida dan digunakan sebagai monoterapi maupun dalam kombinasi dengan metformin, sulfonilurea, atau insulin. Namun, penggunaan dosis tinggi pioglitazon dikaitkan dengan peningkatan risiko kanker kandung kemih. Rosiglitazon bekerja terutama pada PPAR- γ , dimetabolisme di hati oleh CYP2C8 dan CYP2C9, dengan dosis harian 2–8 mg. Meskipun efektivitasnya mirip dengan TZD lain, rosiglitazon dikaitkan dengan risiko kardiovaskular lebih tinggi, sehingga penggunaannya kini dibatasi oleh FDA untuk pasien tertentu (Katzung, 2018).

Secara umum, TZD dianggap sebagai obat euglikemik dan efektif pada sekitar 70% pasien diabetes tipe 2, baik sebagai monoterapi maupun sebagai tambahan pada pasien yang gagal merespons obat oral lain. Namun, karena mekanismenya berbasis regulasi gen, TZD memiliki onset kerja yang lambat (beberapa minggu hingga bulan). Efek samping yang umum meliputi retensi cairan yang dapat menyebabkan edema perifer dan anemia ringan, serta

peningkatan risiko gagal jantung, khususnya jika digunakan bersama insulin (Katzung, 2018).

Selain itu, obat ini dapat menyebabkan peningkatan berat badan yang bergantung pada dosis, dan berpotensi menimbulkan atau memperburuk edema makula. Penggunaan jangka panjang juga dikaitkan dengan berkurangnya densitas mineral tulang dan peningkatan risiko fraktur, terutama pada wanita, yang mungkin disebabkan oleh penurunan aktivitas osteoblas. Karena efek ini, studi lanjutan sedang dilakukan untuk mengevaluasi risiko pada pria. Terkait toksisitas hati, meskipun pioglitazon dan rosiglitazon belum terbukti menyebabkan hepatotoksitas, pemantauan fungsi hati tetap diperlukan karena kasus sebelumnya pada troglitazon. Wanita dengan anovulasi dapat kembali mengalami ovulasi selama pengobatan, sehingga perlu mendapat informasi tentang kemungkinan kehamilan (Katzung, 2018).

TZD juga memiliki potensi dalam mencegah diabetes tipe 2. Beberapa studi, termasuk Diabetes Prevention Trial, menunjukkan bahwa obat ini menurunkan risiko kejadian diabetes baru pada individu dengan pradiabetes, khususnya pada kelompok berisiko tinggi seperti wanita dengan riwayat diabetes gestasional. Namun, efektivitas tinggi TZD dibayangi oleh sejumlah efek samping serius seperti gagal jantung, penambahan berat badan, fraktur tulang, serta risiko onkogenik yang belum jelas, yang dapat membatasi penggunaannya di masa depan. Obat ini dikontraindikasikan pada wanita hamil, pasien dengan gangguan fungsi hati berat, atau dengan diagnosis gagal jantung, serta tidak boleh digunakan

bersamaan dengan insulin atau nitrat (khususnya untuk rosiglitazon) karena risiko infark miokard (Katzung, 2018).

4. Inhibitor α -glukosidase

Akarbosa dan miglitol adalah inhibitor kompetitif enzim α -glukosidase di usus yang bekerja dengan menunda pencernaan dan penyerapan karbohidrat kompleks, sehingga mengurangi lonjakan glukosa darah pasca-makan dan menciptakan efek hemat-insulin. Obat ini menargetkan berbagai enzim pencernaan karbohidrat seperti sukrase, maltase, glucoamilase, dan dekstranase; miglitol juga menghambat isomaltase dan β -glukosidase, sedangkan akarbosa memiliki sedikit efek pada α -amilase. Monoterapi dengan keduanya dapat menurunkan kadar glukosa darah puasa sekitar 20–25 mg/dL dan kadar HbA1c sebesar 0,5–1%, serta bisa dikombinasikan dengan sulfonilurea. Dosis diberikan 25–100 mg sebelum makan, dimulai dari dosis rendah dan ditingkatkan secara bertahap (Katzung, 2018).

Efek samping yang umum meliputi perut kembung, diare, dan nyeri abdomen akibat fermentasi karbohidrat tak tercerna di kolon, namun gejala ini cenderung berkurang seiring waktu. Hipoglikemia dapat terjadi jika dikombinasikan dengan sulfonilurea, dan harus diatasi dengan glukosa, bukan sukrosa. Obat ini dikontraindikasikan pada pasien dengan gangguan pencernaan seperti IBD dan gangguan ginjal, serta harus digunakan hati-hati pada pasien penyakit hati karena risiko peningkatan enzim hati. Studi seperti STOP-NIDDM menunjukkan bahwa akarbosa dapat mencegah timbulnya diabetes tipe 2,

memperbaiki fungsi sel beta, serta menurunkan risiko penyakit kardiovaskular dan hipertensi. Meskipun efektif, inhibitor α -glukosidase jarang digunakan di AS karena efek samping pencernaannya (Katzung, 2018).

4. Agonis Reseptor Polipeptida Mirip-Glukagon-1 (GLP-1)

Pada diabetes tipe 2, terjadi penurunan pelepasan polipeptida mirip glukagon (GLP-1) setelah makan, yang menyebabkan tidak ter kendalinya sekresi glukagon dan peningkatan produksi glukosa oleh hati. Untuk mengatasi hal ini, tersedia dua analog sintetik GLP-1, yaitu eksenatid dan liraglutid, yang bekerja memperkuat sekresi insulin bergantung glukosa, menekan pelepasan glukagon, memperlambat pengosongan lambung, dan menurunkan nafsu makan. Eksenatid, turunan eksendin-4 dari bisa monster Gila, disuntikkan dua kali sehari sebelum makan dan ditujukan bagi pasien yang belum mencapai kontrol glikemik optimal dengan metformin atau metformin plus sulfonilurea. Obat ini menurunkan HbA1c sebesar 0,2–1,2% dan berat badan 2–3 kg, namun efek samping utamanya adalah mual, muntah, diare, dan dalam kasus jarang, pankreatitis nekrotikans (Katzung, 2018).

Liraglutid adalah analog GLP-1 kerja panjang yang disuntikkan sekali sehari, memberikan penurunan HbA1c sebesar 0,8–1,5% dan penurunan berat hingga 3,2 kg. Liraglutid juga menimbulkan efek samping seperti mual, sakit kepala, diare, pembentukan antibodi, dan risiko pankreatitis. Obat ini dikontraindikasikan pada pasien dengan riwayat pankreatitis atau kanker medula tiroid, serta pada penderita neoplasia endokrin multipel tipe 2. Meskipun

merupakan obat suntik, popularitas agonis reseptor GLP-1 meningkat karena manfaatnya terhadap kontrol glukosa dan penurunan berat badan, namun risiko efek samping serius dapat membatasi penggunaannya di masa depan (Katzung, 2018).

5. Inhibitor Dipeptidil Peptidase-4 (DPP-4)

Sitagliptin, saksagliptin, dan linagliptin adalah inhibitor DPP-4 yang bekerja dengan meningkatkan kadar hormon inkretin seperti GLP-1 dan GIP, sehingga meningkatkan sekresi insulin dan menekan glukagon untuk mengontrol kadar glukosa pasca-makan. Obat-obat ini disetujui sebagai terapi tambahan pada pasien diabetes tipe 2 yang tidak mencapai kontrol glikemik dengan diet dan olahraga. Sitagliptin memiliki bioavailabilitas tinggi, diekskresikan terutama melalui urin, dan umumnya digunakan dengan dosis 100 mg sekali sehari, menghasilkan penurunan HbA1c sebesar 0,5–1,0% (Katzung, 2018).

Efek sampingnya termasuk infeksi saluran napas atas, nyeri kepala, dan risiko pankreatitis atau reaksi alergi berat. Saksagliptin diberikan 2,5–5 mg per hari dan dimetabolisme di hati dengan waktu paruh 2,5–3,1 jam, serta menghasilkan penurunan HbA1c sebesar 0,4–0,9%. Efek samping yang mungkin terjadi meliputi infeksi, edema, hipoglikemia, dan reaksi hipersensitivitas. Linagliptin merupakan anggota terbaru dari golongan ini dan memiliki karakteristik mirip dengan dua pendahulunya; telah disetujui untuk digunakan sebagai monoterapi atau dikombinasikan dengan metformin, glimepirid, dan pioglitazone (Katzung, 2018).

6. Insulin

Insulin pada manusia adalah protein kecil dengan berat molekul sekitar 5808 dalton, terdiri dari 51 asam amino yang tersusun dalam dua rantai (A dan B) yang dihubungkan oleh jembatan disulfida. Insulin berasal dari proinsulin, rantai tunggal panjang yang diproses di dalam sel beta pankreas menjadi insulin dan peptida-C, yang disekresikan secara ekuimolar sebagai respons terhadap rangsangan, terutama glukosa. Sekresi insulin diatur melalui mekanisme depolarisasi sel beta dan masuknya ion kalsium yang memicu pelepasan hormon. Insulin dipecah terutama oleh hati dan ginjal dengan waktu paruh sekitar 3-5 menit. Di darah, kadar insulin basal manusia normal berkisar 5-15 $\mu\text{U/mL}$ dan meningkat saat makan (Katzung, 2018).

Insulin bekerja dengan mengikat reseptor spesifik pada membran sel berbagai jaringan sasaran utama seperti hati, otot, dan jaringan lemak, memicu jalur sinyal melalui fosforilasi protein substrat dan mengatur proses metabolik, termasuk penyerapan glukosa melalui transport GLUT4. Gangguan pada sinyal ini dapat menyebabkan resistensi insulin. Berbagai jenis sediaan insulin komersial tersedia dengan perbedaan dalam waktu kerja dan awitan, mulai dari insulin kerja-cepat (lispro, aspart, glulisin) yang memiliki awitan sangat cepat dan durasi singkat, hingga insulin kerja-lama (glargin, detemir) yang memberikan suplai insulin basal dengan efek lebih stabil dan tahan lama. Insulin reguler adalah insulin kerja-singkat dengan awitan lebih lambat dibandingkan analog kerja-cepat, sering diberikan 30-45 menit sebelum makan. Insulin NPH adalah insulin kerja-sedang dengan profil kerja yang lebih lama namun variabilitas tinggi. Campuran

insulin antara kerja-cepat dan kerja-intermediat tersedia untuk kemudahan terapi (Katzung, 2018).

Produksi insulin manusia dan analog-nya kini dilakukan secara massal menggunakan teknologi DNA rekombinan dalam bakteri *Escherichia coli* atau sel yeast. Konsentrasi insulin komersial biasanya 100 unit/mL dengan opsi dosis tinggi (U500) untuk kasus resistensi insulin berat. Terapi insulin bertujuan meniru sekresi fisiologis insulin dengan kombinasi dosis basal dan bolus untuk mengendalikan kadar glukosa darah secara optimal dan mengurangi risiko hipoglikemia (Katzung, 2018).

2.3.4 Antidiabetes dari Jamur Endofit

Mengurangi hiperglikemia postprandial merupakan pengobatan yang paling penting untuk diabetes. Para peneliti menyadari bahwa penghambatan glukosidase dengan inhibitor dapat mengatur penyerapan karbohidrat dan mencegah hiperglikemia postprandial. Inhibitor tersebut dapat merangsang pelepasan GLP-1 dan menurunkan kadar hemoglobin terglikasi. Inhibitor glukosidase, seperti acarbose, voglibose, dan miglitol, merupakan agen lini pertama yang penting bagi pasien diabetes tipe 2. Selain itu, obat-obatan ini juga dapat digunakan sebagai agen lini kedua dalam kombinasi dengan metformin, yang dapat mengurangi dosis metformin dan meningkatkan keamanan penggunaannya (Wang, *et al.*, 2022).

Sharma, *et al.*, (2021) mengisolasi jamur endofit *Schizophyllum commune* Fr. dari Aloe vera, dan ekstraknya menunjukkan aktivitas penghambatan lebih dari 90% terhadap α -glukosidase. Perlakuan terhadap tikus diabetes yang

diinduksi STZ dengan ekstrak jamur ini menurunkan kadar glukosa darah. Fenol dan terpenoid diidentifikasi dalam ekstrak etil asetat, yang mungkin merupakan bahan aktifnya (Sharma, *et al.*, 2021; Wang, *et al.*, 2022)..

Saravanakumar, *et al.*, (2021) meneliti aktivitas penghambatan glikosidase dari endofit *Diaporthe eres* (SPEF004) yang berasal dari daun *Ligustrum obtusifolium*. Ekstrak etil asetat dari *D. eres* menunjukkan aktivitas penghambatan α -glukosidase sebesar $13,28 \pm 0,94\%$ dan aktivitas penghambatan α -amilase sebesar $41,11 \pm 1,52\%$ (Saravanakumar, *et al.*, 2021; Wang, *et al.*, 2022). Spesies jamur endofit *Colletotrichum* yang berasal dari *Salacia macrosperma* terdeteksi oleh Roopa, *et al.*, (2022). Ekstrak jamur tersebut menunjukkan efek penghambatan terhadap α -glukosidase dan α -amilase dengan nilai IC50 masing-masing sebesar 124,62 dan 106,11 $\mu\text{g/ml}$ (Roopa, *et al.*, 2022; Wang, *et al.*, 2022).

2.4 Enzim α -amilase dan α -glukosidase

Amilase diklasifikasikan sebagai saccharidase (enzim yang memotong polisakarida). Amilase merupakan enzim pencernaan, terutama dilakukan oleh pankreas dan kelenjar ludah. Fungsi utama dari enzim amilase adalah untuk memecah pati dalam makanan sehingga mereka dapat digunakan oleh tubuh. Amilase adalah enzim yang mengkatalisis hidrolisis dari alpha-1,4- glikosidik polisakarida untuk menghasilkan dekstrin, oligosakarida, maltosa, dan D-glukosa. Amilase bisa berasal dari hewan, jamur, dan sumber tanaman (Ariandi, 2016).

Enzim α -glukosidase, yang terletak di mikrovili enterosit pada jejunum, merupakan enzim yang mengkatalisis hidrolisis karbohidrat dari makanan dan

mengubahnya menjadi monosakarida, yang kemudian diserap di jejunum. Dengan demikian, inhibitor α -glukosidase memperlambat penyerapan glukosa dan mengurangi kadar glukosa darah serta insulin pasca makan, sehingga meringankan hiperglikemia. Miglitol, acarbose, dan voglibose adalah beberapa obat inhibitor α -glukosidase yang digunakan secara klinis (Sari, 2020).

2.4.1 Mekanisme Enzim α -amilase dan α -glukosidase

Mekanisme kerja enzim α -amilase terdiri dari dua tahap, yaitu: tahap pertama degadasi amilosa menjadi maltosa dan maltotriosa yang terjadi secara acak. Degadasi ini terjadi sangat cepat dan diikuti dengan menurunnya viskositas dengan cepat. Tahap kedua terjadi pembentukan glukosa dan maltosa sebagai hasil akhir dan tidak acak. Keduanya merupakan kerja enzim α -amilase pada molekul amilosa. Pada molekul amilopektin kerja α -amilase akan menghasilkan glukosa, maltosa dan satu seri α -limit dekstrin, serta oligosakarida yang terdiri dari empat atau lebih glukosa yang mengandung ikatan α -1,6-glikosidik (Ariandi, 2016).

Enzim α -glukosidase memiliki peran penting dalam meningkatkan kadar glukosa darah dalam tubuh. Enzim ini ditemukan di usus halus dan berfungsi dalam proses pencernaan dan penyerapan karbohidrat. α -glukosidase menghidrolisis polisakarida dan oligosakarida menjadi monomer, yang kemudian meningkatkan kadar glukosa dalam tubuh. Inhibitor α -glukosidase bekerja dengan memperlambat proses pencernaan dan penyerapan karbohidrat, sehingga mengurangi kadar glukosa darah pasca makan dan menurunkan kebutuhan insulin. Dengan demikian, lonjakan glukosa setelah makan dapat dikendalikan tanpa

bergantung pada insulin. Oleh karena itu, α -glukosidase dianggap sebagai target terapeutik yang penting untuk mengatasi penyakit yang disebabkan oleh karbohidrat. Seiring pemahaman mengenai peran α -glukosidase, agen farmakologis baru yang berasal dari sumber alami telah ditemukan (Abbas & Hussain, 2017).

2.4.1 Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -Amilase dan α -Glukosidase

A. Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -Amilase

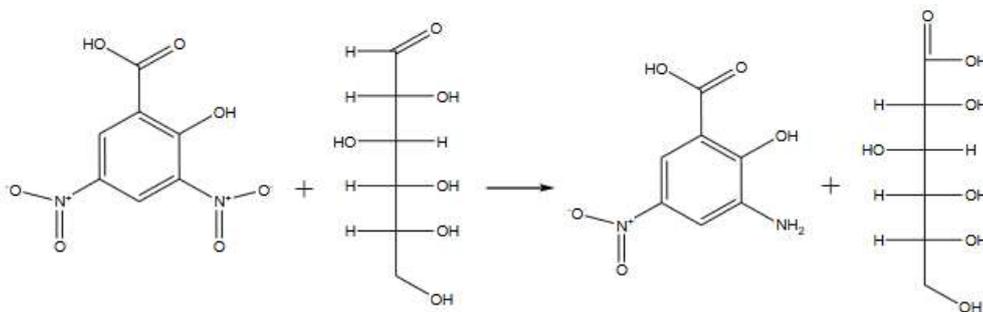
1. Metode Fuwa

Metode ini berdasarkan pada pembentukan kompleks antara sisa pati yang tidak terurai dengan iodin. Ketika iodin ditambahkan, pati dapat diperiksa dengan melihat apakah ada perubahan warna menjadi biru atau ungu. Hal ini dipengaruhi oleh jumlah residu glukosa (monomer) penyusun pati tersebut. Semakin besar aktivitas penghambatannya, maka jumlah pati yang terhidrolisis semakin sedikit sehingga kompleks iodin dengan pati yang terbentuk semakin banyak dan menghasilkan warna biru. Pengukuran menggunakan spektrofotometer dapat mengukur tingkat kekompleksan warna tersebut (Robyt, 1998).

2. Metode DNSA

Metode ini didasarkan pada gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis pati. Gula reduksi akan bereaksi dengan karbonil bebas pada DNSA (3,5 dinitrosalicic acid) yang berwarna kuning dalam suasana basa, lalu akan terbentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat menjadi warna jingga kemerahan. Senyawa inilah akan terserap pada spektrofotometri (Negrulescu *et al.*, 2012).

Prinsip yang digunakan dalam pengujian metode DNS adalah mengamati respons yang terjadi antara maltosa dan glukosa dengan DNS. Hal ini akan menghasilkan perubahan warna kompleks pada larutan uji dan berfungsi sebagai indikator keberadaan gula. Pengukuran aktivitas penghambatan α -amilase dilakukan menggunakan panjang gelombang 540 nm (Gaspersz *et al.*, 2022).



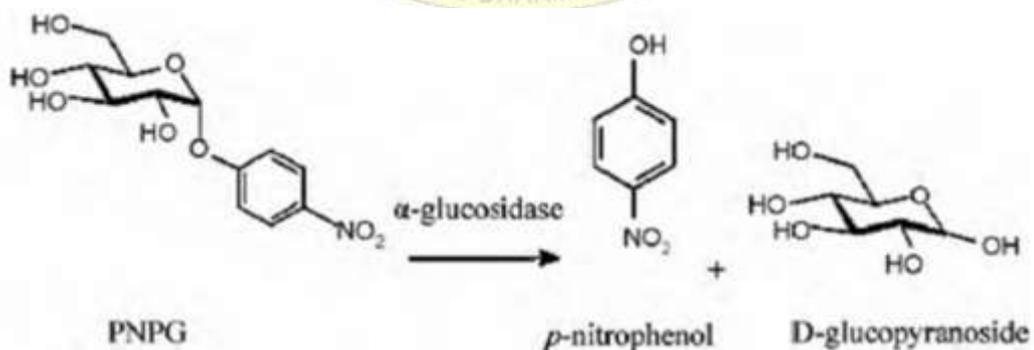
Gambar 2. Reaksi kimia glukosa dengan pereaksi DNS (Nurjanah, *et al.*, 2019)

Interpretasi dari pengujian penghambatan enzim α -amilase adalah dengan melihat nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi suatu zat yang dapat menghambat kerja enzim menjadi setengah kali dibandingkan dengan kontrolnya. Suatu senyawa dikatakan sebagai antidiabetes sangat kuat apabila nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, kuat apabila nilai IC_{50} antara 50-100 ppm, sedang apabila nilai IC_{50} berkisar antara 100-150 ppm, dan lemah apabila nilai IC_{50} berkisar antara 150-200 ppm (Arditiana *et al.*, 2015). Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin besar aktivitasnya dalam menghambat kerja enzim α -amilase, sedangkan semakin besar nilai IC_{50} maka semakin kecil kemampuan sampel dalam menghambat enzim (Alfiani, 2022).

B. Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -Glukosidase

Pada pengujian *in-vitro*, enzim α -glukosidase akan mengkatalisis reaksi pemecahan substrat *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida pada suhu 37°C menjadi *p*-nitrofenol (berwarna kuning) dan glukosa. Aktivitas enzim ini diukur dengan spektrofotometer berdasarkan serapan *p*-nitrofenol yang dihasilkan dengan panjang gelombang 405-410 nm. Jika sampel memiliki kemampuan menghambat aktivitas α -glukosidase, maka *p*-nitrofenol yang dihasilkan akan berkurang (Siguwati, *et al.*, 2009). Berikut ini merupakan reaksi enzimatik α -glukosidase yang menghidrolisis substrat *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida menjadi *p*-nitrofenol dan glukosa

Pengujian penghambatan aktivitas enzim α -glukosidase dilakukan dengan reaksi enzimatik menggunakan *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNGP) sebagai substrat. Pada uji ini, enzim α -glukosidase menghidrolisis *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (PNGP) menjadi D-glukopiranosida dan *p*-nitrofenol yang berwarna kuning. Mekanisme reaksi yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 2.7.



Gambar 3. Reaksi penghambatan enzim α -glukosidase (Sugiawati *et al.*, 2009)

2.5 Ekstraksi

2.5.1 Definisi Ekstraksi

Pengambilan senyawa-senyawa metabolit sekunder yang dimaksudkan untuk dipisahkan dari biomasa, ampas, atau bagian yang tidak diperlukan karena sifatnya yang mengganggu penyajian dan mengganggu efektivitas khasiat bahan aktifnya dikenal sebagai ekstraksi. Ada banyak cara untuk mengekstraksi bahan, mulai dari yang paling dasar dan kuno hingga yang paling canggih. Pilihan metode tergantung pada sifat bahan, kestabilan metabolit sekunder, rendemen, dan kualitas yang diinginkan, serta alasan waktu dan biaya (*efisiensi*) (Nugroho, 2019).

Prinsip proses ekstraksi dimulai dengan proses pembukaan jaringan atau dinding sel dengan perlakuan panas, yang dilanjutkan dengan proses penarikan senyawa target menggunakan pelarut organik yang sesuai, berdasarkan prinsip kedekatan sifat kepolaran/polaritas dari senyawa dan pelarut. Berbagai macam pelarut organik ataupun air dapat digunakan untuk ekstraksi. Selain itu juga ada metode ekstraksi tanpa pelarut yaitu dengan metode *Supercritical Fluid Extraction* (SFE). Melalui metode ini, fungsi pelarut sebagai *extractant* digantikan oleh gas. karbondioksida yang bersifat inert, sehingga metode ini lebih ramah lingkungan karena tidak menghasilkan limbah pelarut organik (Nugroho, 2019).

Pada proses ekstraksi, bahan yang akan diekstrak kontak secara langsung dengan pelarut. Selama itu akan terjadi proses yang berlangsung secara dinamik yang secara umum dapat dikelompokkan menjadi tiga fase, yaitu: pelarut akan merusak dinding sel dan jaringan, serta masuk ke dalam sel, setelah itu pelarut

akan melarutkan senyawa-senyawa metabolit, dan akhirnya pelarut bersama senyawa metabolit yang terlarut dikeluarkan atau dipisahkan dari bahan atau biomassa penghasilnya. Oleh karena itu penggilingan atau pengecilan ukuran dan juga peningkatan temperatur sangat diperlukan untuk mempercepat fase-fase tersebut. Selanjutnya pelarut harus dipisahkan dari senyawa metabolit yang terlarut di dalamnya melalui proses evaporasi untuk menghasilkan ekstrak kasar, baik dalam bentuk cairan kental atau padatan (*solid*) (Nugroho, 2019).

2.5.2 Metode Ekstraksi

2.5.2.1 Maserasi

Maserasi merupakan metode ekstraksi yang paling sederhana dan kuno. Meskipun demikian, metode ini masih secara luas digunakan karena beberapa kelebihan seperti biaya yang murah, peralatan yang sederhana, serta tanpa perlakuan panas sehingga menjadi pilihan tepat untuk ekstraksi senyawa-senyawa yang tidak tahan panas (*termolabile*) (Nugroho, 2019).

Proses maserasi dilakukan dengan merendam bahan baku yang telah dikeringkan dan digiling ke dalam pelarut yang sesuai dalam suatu wadah pada suhu ruang dan proses ini membutuhkan waktu tertentu. Untuk mempercepat ekstraksi, pengadukan dapat dilakukan secara terus-menerus atau secara berkala. Ekstraksi dianggap selesai ketika tercapai titik jenuh (kesetimbangan) antara konsentrasi senyawa metabolit dalam larutan ekstrak dan konsentrasi senyawa dalam bahan baku. Setelah selesai, larutan ekstrak dipisahkan dari bahan baku dengan penyaringan menggunakan kertas saring (Nugroho, 2019).

Untuk meningkatkan hasil ekstraksi (rendemen), langkah ini dapat diulangi dua hingga tiga kali dengan memanfaatkan sisa atau ampas bahan dari ekstraksi pertama. Hal ini memungkinkan karena pada tahap pertama, saat kesetimbangan konsentrasi tercapai, masih terdapat senyawa metabolit yang tertinggal dalam bahan. Senyawa ini masih dapat diekstraksi ulang, sehingga rendemen totalnya dapat ditingkatkan (Nugroho, 2019).

Metode maserasi memiliki kelemahan utama, yaitu kurang efisien dalam hal waktu dan hasil (rendemen). Proses ekstraksi memerlukan waktu cukup lama, berkisar antara 1 hari hingga 1 minggu, tergantung pada jenis bahan yang diekstrak. Bahan dengan jaringan dan dinding sel yang lebih kuat membutuhkan waktu lebih lama. Selain itu, metode ini juga memerlukan volume pelarut yang lebih besar. Selama proses, potensi kehilangan senyawa metabolit cukup tinggi, misalnya karena senyawa tersebut menempel pada bahan, kertas saring, atau wadah yang digunakan. Lamanya proses serta kontak berkepanjangan dengan air atau pelarut juga dapat menyebabkan perubahan struktur kimia pada senyawa metabolit yang tidak stabil (Nugroho, 2019).

2.5.2.2 Perkolasi

Perkolasi dan maserasi memiliki kesamaan, yaitu keduanya merupakan metode ekstraksi yang tidak memerlukan panas. Peralatan utama yang digunakan dalam perkolasi adalah perkolator, yaitu sebuah wadah berbentuk silinder atau kerucut terbalik yang dilengkapi dengan lubang atau keran di bagian bawahnya (Nugroho, 2019).

Proses perkolasi dilakukan dengan melarutkan senyawa metabolit dari bahan yang akan diekstrak. Pelarut yang sesuai dialirkan melalui bahan atau sampel yang telah diatur atau dipadatkan di dalam perkolator. Senyawa metabolit larut bersama pelarut, kemudian mengalir keluar melalui lubang di bagian bawah perkolator dan ditampung untuk tahap selanjutnya. Prosedur ini dapat diulang beberapa kali hingga dianggap tidak lagi efisien, biasanya ditandai dengan semakin sedikitnya senyawa metabolit yang terlarut. Hal ini dapat dilihat dari perubahan warna larutan ekstrak atau melalui uji kimia menggunakan pereaksi tertentu untuk memastikan apakah masih ada senyawa yang terlarut. Pada metode ini, proses filtrasi tidak diperlukan karena ekstrak sudah tersaring langsung melalui perkolator (Nugroho, 2019).

Metode ini lebih efektif untuk bahan dengan tingkat kelarutan yang tinggi dalam pelarut yang digunakan. Dengan kata lain, perkolasi cocok jika senyawa metabolit dalam bahan mudah larut dalam pelarut yang dipilih, sehingga pemilihan jenis pelarut menjadi sangat penting. Perkolasi juga memungkinkan untuk diterapkan dalam skala besar, seperti dalam industri. Jika diperlukan proses yang lebih efisien dan menghasilkan rendemen lebih tinggi, penggunaan pelarut panas dapat dilakukan, selama tidak merusak senyawa, khususnya senyawa yang tidak stabil pada suhu tinggi (*thermolabile*) (Nugroho, 2019).

Selain itu, terdapat beberapa kelemahan mendasar dalam metode perkolasi. Kelemahan pertama adalah kebutuhan volume pelarut yang lebih besar, karena proses ini dilakukan secara terus-menerus tanpa waktu kontak yang lama. Selain itu, karena bahan sampel dipadatkan dalam perkolator, ada kemungkinan

bahan tersebut tidak homogen, dengan beberapa bagian yang lebih padat dan bagian lainnya kurang padat. Hal ini menyebabkan pelarut kesulitan melewati bagian yang lebih padat, sehingga senyawa metabolit yang tertinggal di bagian tersebut menjadi lebih banyak. Kelemahan lain yang perlu diatasi adalah masalah sumbatan pada perkolator, yang bisa disebabkan oleh terlarutnya resin tertentu yang menggumpal, serta sifat bahan tanaman yang mudah hancur dan larut, yang dapat menyumbat perkolator (Nugroho, 2019).

2.5.2.3 Reflux

Ekstraksi dengan metode reflux saat ini menjadi salah satu metode ekstraksi yang paling banyak digunakan. Metode ini dianggap murah, sederhana, dan menghasilkan rendemen yang cukup tinggi dibandingkan dengan metode maserasi atau perkolasi. Reflux mengacu pada proses pelarut yang diputar kembali atau didaur ulang secara terus-menerus melalui kondensasi berulang dalam alat kondensor (Nugroho, 2019).

Pada metode ini, bahan yang akan diekstrak direndam dalam pelarut di dalam bejana atau labu yang biasanya berbentuk bulat, kemudian ditempatkan pada pemanas, seperti *water bath*, *heating mantle*, atau *hot plate*. Bagian atas labu dilengkapi dengan lubang yang menghubungkannya dengan kondensor. Lubang tersebut juga digunakan untuk memasukkan atau mengeluarkan bahan, pelarut, serta hasil ekstrak (Nugroho, 2019).

Selama proses pemanasan, pelarut akan mendidih dan menguap. Pada tahap ini, pelarut panas akan merusak jaringan dan dinding sel, memungkinkan

pelarut untuk menembus bagian dalam sel dan melarutkan senyawa-senyawa metabolit, yang kemudian larut bersama pelarut. Ketika pelarut mendidih, senyawa yang terlarut akan tertinggal di dalam labu ekstraksi. Sementara itu, pelarut menguap dan mengalir ke atas menuju kondensor. Karena kondensor dialiri fluida dingin, suhunya jauh lebih rendah dari suhu uap pelarut, sehingga uap pelarut cepat mengembun (berubah menjadi cair) dan mengalir kembali ke labu ekstraksi. Proses ini berlangsung secara terus-menerus hingga pemanasan dihentikan (Nugroho, 2019).

Metode ini memungkinkan penghematan penggunaan pelarut, karena proses ekstraksi berlangsung secara berkelanjutan. Selain itu, rendemen ekstrak yang dihasilkan lebih tinggi, karena ekstraksi dilakukan pada suhu tinggi, yang mempercepat kerusakan sel dan jaringan tumbuhan serta mempercepat pelarutan senyawa. Namun, kelemahan metode ini adalah penggunaan suhu tinggi yang dapat menyebabkan degradasi senyawa yang tidak stabil pada temperatur tinggi. Selain itu, proses pemanasan dan pendinginan pada kondensor memerlukan energi lebih besar, sehingga meningkatkan biaya (Nugroho, 2019).

2.5.2.4 Soxhlet

Ekstraksi dengan metode Soxhlet merupakan salah satu metode yang paling sering digunakan karena tingkat kepraktisan dan kenyamanannya. Prinsip dasar dari ekstraksi ini adalah dengan mengekstrak bahan yang telah dihaluskan dan dibungkus dalam kertas saring, kemudian dimasukkan ke dalam alat Soxhlet yang sudah berisi pelarut dalam labu Soxhlet yang terletak di bagian bawah alat. Tepat di bawah labu, dipasang sebuah pemanas, seperti heating mantle atau hot

plate, untuk memanaskan labu tersebut. Ketika dipanaskan, pelarut dalam labu akan menguap dan terkondensasi kembali berkat sistem pendingin di bagian atas alat. Pelarut cair yang terkompresi ini kemudian akan menyiram dan merendam bahan dalam kertas saring. Proses ini memungkinkan pelarut untuk mengekstrak senyawa metabolit dari bahan tersebut. Setelah beberapa saat, volume larutan ekstrak akan mencapai jumlah tertentu, dan mekanisme Soxhlet akan memompa larutan tersebut ke bawah menuju labu. Pada saat yang sama, larutan akan menguap lagi, meninggalkan ekstrak di labu dan hanya pelarut yang menguap kembali untuk dikondensasi. Proses ini berlangsung secara berkelanjutan, sehingga bahan terus-menerus terpapar efek mekanik dan kimia pelarut, yang mempercepat dan meningkatkan efisiensi ekstraksi (Nugroho, 2019).

Kelebihan utama dari metode Soxhlet adalah proses yang berkelanjutan, yang memungkinkan ekstraksi dilakukan lebih cepat dan pelarut yang digunakan dapat diminimalisasi. Namun, kelemahan dari metode ini adalah penggunaan suhu tinggi, yaitu pemanasan hingga titik didih pelarut, yang meningkatkan risiko kerusakan senyawa metabolit yang sensitif terhadap panas (Nugroho, 2019).

2.6 Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)

Kromatografi adalah teknik pemisahan untuk memisahkan suatu senyawa dari suatu campuran menggunakan fase diam dan fase gerak. Kata "kromatografi" berasal dari bahasa Yunani, *chroma* yang berarti warna dan *graphein* yang berarti menulis, sehingga kromatografi berarti "penulisan warna". Kromatografi pertama kali dikembangkan oleh ahli botani Rusia, Mikhail Tswett, pada tahun 1903; ia memisahkan pigmen tumbuhan berwarna melalui kolom kalsium karbonat. Sistem

LC-MS yang khas adalah kombinasi antara HPLC dan MS yang menggunakan antarmuka (sumber ionisasi). Sampel dipisahkan oleh LC, dan spesies sampel yang telah dipisahkan disemprotkan ke sumber ionisasi pada tekanan atmosfer, di mana mereka diubah menjadi ion dalam fase gas (Uddin, 2023).

Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry atau dalam bahasa Indonesia disebut dengan Kromatografi Cair-Spektrometri Massa adalah suatu kombinasi metode analisis dari kromatografi cair dan spektrometri massa. Kromatografi cair adalah analisis identifikasi senyawa yang umunya memisahkan komponen campuran dengan melewati kolom kromatografi, spektrometri masa juga digunakan untuk analisis suatu senyawa yang tidak diketahui untuk menjelaskan nomor massa berdasarkan nilai m/z . LC-MS lebih sering digunakan untuk studi bioavailabilitas, disolusi, bioequivalen, dan farmakodinamik (Pratima & Gadikar, 2018). Kromatografi cair adalah pemisahan komponen campuran menggunakan fase gerak cair dan fase diam padat. Bagian yang ada pada kromatografi cair diantaranya adalah (Pratima & Gadikar, 2018):

a. Pompa

Pompa berisi bahan yang inert terhadap pelarut atau komposisi campuran buffer berair dan pelarut organik. Terdapat beberapa macam pompa diantaranya ialah pompa *reciprocating*, pompa *syringe*, dan pompa tekanan konstan.

b. Sampel injektor

Sampel injektor digunakan untuk memasukan volume sampel ke dalam sistem kromatografi. volume sampel yang dapat disuntikan sekitar 1 μ l hingga

100 μ l. Peningkatan volume injeksi menggunakan loop injektor hingga 2ml. Sampel injeksi dapat digunakan dengan dua cara yaitu otomatis dan manual. Sampel injektor otomatis lebih akurat dan presisi daripada sampel manual.

c. Kolom

Kolom merupakan fase diam yang terdiri dari gel silika dalam kombinasi rantai karbon. Panjang kolom berkisar antara 50 mm sampai 300 mm. Kolom digunakan berdasarkan sifat senyawa yang akan dipisahkan.

d. Detektor dan perekam

Ada banyak macam detektor yang dapat digunakan diantaranya detektor UV-vis, detektor PDA, detektor indeks bias, detektor fluoresensi, dan detektor konduktivitas. Data dari detektor dapat direkam sehingga menghasilkan diagram senyawa untuk dianalisis puncak data masing-masing dan dapat disimpan di komputer atau perangkat.

Spektrometri massa adalah teknik analisis yang didasarkan pada pengukuran rasio massa terhadap muatan spesies ion yang terkait dengan analit yang diteliti. MS digunakan untuk menentukan struktur kedalaman senyawa analit, masa molekul dan komposisi unsur analit. Komponen MS terdiri dari sumber ionisasi dan antarmuka serta penganalisis massa (Pratima & Gadikar, 2018). Kromatografi memisahkan campuran komponen yang berbentuk cair, cairan yang mengandung komponen tersebut dipindahkan ke sumber ion MS. Perbedaan tekanan membuat sulit menguapkan tetesan cairan tanpa kehilangan komponen. Oleh karena itu antarmuka digunakan untuk menyelesaikan masalah

ini, antarmuka yang dapat digunakan adalah DLI, API, ESI, APCI, TSPI, APPI, dan FAB (Pratima & Gadikar, 2018). Setelah ionisasi, ion-ion dipisahkan ke penganalisis masa dimana pemisahan ion dilakukan menurut rasio masa terhadap muatan. Pada umumnya penganalisis masa yang digunakan adalah pada kecepatan, waktu, laju dan reaksinya (Pratima & Gadikar, 2018).

Mekanisme kerja dari LC-MS sendiri adalah fase gerak dari pompa dialirkan menuju detektor kemudian sampel disuntikan ke dalam aliran fase gerak. Di dalam kolom terjadi pemisahan campuran, karena perbedaan kekuatan interaksi dengan fase diam. Larutan yang dapat berinteraksi akan keluar dari kolom dan menuju detektor kemudian selanjutnya direkam menjadi kromatogram (Mangurana dkk., 2019). Analisis hasil kromatogram berupa alur tinggi peak yang akan disertai keterangan mengenai bobot molekul dari senyawa di dalam ekstrak sehingga dapat diketahui jumlah senyawa yang terkandung pada sampel. Data dari LC-MS dapat memberikan informasi tentang berat molekul, struktur, identitas dan kuantitas komponen sampel tertentu.

Senyawa tersebut telah melalui pemisahan komponen dengan interaksi relatif dari lapisan kimia partikel-partikel pada fase diam dengan elusi pelarut melalui kolom atau fase gerak dari analisis LC-MS (Mangurana dkk., 2019). LCMS dapat menganalisis secara luas mulai dari senyawa volatil, senyawa berpolaritas tinggi, senyawa dengan masa molekul tinggi juga protein, namun, pengaplikasian analisis ini membutuhkan tim operasional khusus karena pengoperasiannya membutuhkan kompetensi khusus dan bersertifikasi (Mangurana dkk., 2019).

2.7 Identifikasi Molekuler Jamur Endofit

Fungi endofit berkoloni dan hidup di dalam jaringan tanaman yang sehat dan tanpa menimbulkan gejala penyakit, penetapan spesies dapat dilakukan dengan menggunakan identifikasi morfologi maupun molekuler. Identifikasi fungi dapat dilakukan dengan cara memisahkan koloni yang berbeda pada media baru, seperti berbeda dengan pada warna koloni, tekstur dan rata-rata waktu tumbuh koloni. Susunan dari taksonomi morfospesies tidak dapat menggambarkan filogeni hingga tingkat spesies dan oleh sebab itu diperlukan pendekatan identifikasi dapat dipelajari dalam biologi molekuler. Penemuan mengenai struktur DNA dikembangkanlah teknik identifikasi secara molekuler yang dilakukan untuk mengatasi masalah taksonomi fungi. Perbandingan sekuen pada gen penyandi ribosom DNA dapat digunakan sebagai karakter untuk identifikasi molekuler suatu organisme karena gen ini memiliki sekuen yang terkonservasi maupun variabel (Novaldi, *et al.*, 2018).

Satu juta spesies fungi yang berbeda yang hanya sebagian kecil sekitar 5% telah diidentifikasi sejauh ini. Sejumlah metabolit bioaktif telah diisolasi dari endofit yang memiliki berbagai jenis bioaktivitas seperti antibakteri, antijamur, antivirus, antioksidan, insektisida, anti diabetes. Identifikasi isolat fungi dilakukan secara molekuler berdasarkan analisis genetika secara parsial pada lokus *Internal Transcribed Spacer* (ITS) ribosomal DNA fungi. Isolasi DNA dan amplifikasi PCR pada daerah ITS rDNA merupakan tahap awal yang perlu dilakukan dalam identifikasi molekuler (Novaldi, *et al.*, 2018).

Sekuen DNA pada daerah ITS rDNA berevolusi lebih cepat dibandingkan daerah gen lainnya sehingga akan bervariasi pada setiap spesies. Hal ini akan mempermudah dalam identifikasi spesies dengan membandingkan tingkat kemiripan (homologi) sekuen DNA daerah ITS yang dimiliki suatu fungi dengan fungi lainnya. Identifikasi morfologi belum memberikan kepastian spesies maupun hubungan kekerabatan dengan spesies. Oleh karena itu perlu dilakukan suatu cara identifikasi yang lebih tepat berdasarkan sekuen DNA ribosomal (rDNA) pada daerah ITS. Secara ekstensif metode ini digunakan untuk mengetahui basa-basa nukleotida informasi total genom dalam suatu sel atau organisme. Daerah ITS tersebut harus diamplifikasikan terlebih dahulu sebelum dilakukan sekuen ITS rDNA untuk diidentifikasi spesies fungi (Novaldi, *et al.*, 2018).

Ada dua daerah ITS rDNA yang bersifat diagnostik yang dapat digunakan untuk identifikasi spesies fungi, karena memiliki keragaman tinggi, kedua daerah tersebut adalah ITS-1 dan ITS-2. Verifikasi hasil pemeriksaan morfologi dan identifikasi fungi di tingkat spesies dapat dilakukan dengan analisis filogenetika menggunakan sekuens ITS-1 dan ITS-2 gen DNA ribosomal (rDNA) lainnya. Dalam kebanyakan kasus data sekuens dan hubungan filogenetika memungkinkan identifikasi pada tingkat spesies. Isolasi DNA merupakan tahap pertama dari berbagai teknologi analisis DNA. Isolasi DNA diperlukan untuk mendapatkan DNA murni yang akan digunakan untuk amplifikasi Polimerase Chain Reaction (PCR). Amplifikasi DNA menggunakan PCR di daerah ITS rDNA dari templat DNA kromosomal diperlukan untuk memudahkan penentuan sekuens DNA ITS tersebut. Hal ini disebabkan bila tidak dilakukan amplifikasi maka sekuens ITS

rDNA. Daerah ITS rDNA hanya mencakup 0,0002 % dari keseluruhan kromosom jadi bila tidak dilakukan amplifikasi daerah DNA yang akan disekuens gangguan sekuens lain terlalu besar (Novaldi, *et al.*, 2018).

