

## Identifikasi Molekuler dan Uji Aktivitas Inhibitor Alfa Glukosidase dari Bakteri Endofit Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*)

Siti Nurfajriah, Maulin Inggraini, Noor Andryan Ilsan

Program Studi D-III Teknologi Laboratorium Medis, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Mitra Keluarga, Margahayu Bekasi Timur – 17113 Indonesia

\*Penulis korespondensi: [fajriah.sn@gmail.com](mailto:fajriah.sn@gmail.com)

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v9.n3.36773>

**Abstrak:** Diabetes Mellitus (DM) adalah penyakit gangguan metabolik yang ditandai dengan tingginya kadar glukosa darah postprandial atau hiperglikemia. Hal ini disebabkan oleh sel  $\beta$  pankreas tidak dapat menghasilkan insulin yang cukup atau tubuh tidak dapat menggunakan insulin yang dihasilkan secara efektif. Pengendalian hiperglikemia merupakan hal penting dalam terapi pengobatan DM tipe 2. Salah satu caranya yaitu memberikan terapi inhibitor alfa glukosidase. Daun afrika (*Vernonia amygdalina*) merupakan tanaman yang berpotensi sebagai penghasil senyawa inhibitor alfa glukosidase. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menguji aktivitas inhibitor alfa glukosidase dari bakteri endofit daun afrika serta identifikasi molekuler bakteri yang menghasilkan inhibitor alfa glukosidase. Metode penelitian ini dilakukan dengan mengisolasi bakteri endofit *V. amygdalina*, bakteri yang didapatkan diproduksi, kemudian dilakukan ekstraksi senyawa inhibitor dan uji inhibitor alfa glukosidase. Bakteri yang didapatkan diidentifikasi secara molekuler. Hasil penelitian menunjukkan bakteri endofit dari daun afrika yang berhasil diisolasi hanya berjumlah satu isolat, yaitu *Bacillus circulans* dan memiliki aktivitas inhibitor alfa glukosidase sebesar  $8,5 \pm 1,32\%$  penghambatan pada konsentrasi ekstrak  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  dibandingkan dengan akarbosa (kontrol) yaitu sebesar  $8,41 \pm 0,43\%$ .

**Kata kunci:** bakteri endofit, daun Afrika, inhibitor alfa glukosidase, diabetes mellitus

**Abstract:** Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disorder characterized by high levels of postprandial blood glucose or hyperglycemia. This is because pancreatic  $\beta$  cells cannot produce enough insulin or the body cannot use the insulin effectively. Control of hyperglycemia is important in the treatment of the patient with type 2 DM. One of the treatments is therapy using alpha-glucosidase inhibitor. African leaves (*Vernonia amygdalina*) are plants that have a high potential to produce alpha-glucosidase inhibitor compounds. The study aimed to isolate and measure the activity of alpha-glucosidase inhibitors from bacterial endophytes isolated from *V. amygdalina* leaves as well as molecular identification of bacteria that produce alpha-glucosidase inhibitors. This study was performed by isolating the bacterial endophyte from *V. amygdalina*. Isolated bacteria then were performed extraction of alpha-glucosidase inhibitor compounds and measure those activities. The isolated bacteria was molecularly identified. The results showed that only one isolate of bacterial endophyte from *V. amygdalina* was successfully isolated, namely *Bacillus circulans*. This isolate had an alpha-glucosidase inhibitor activity of  $8,5 \pm 1.32\%$  inhibition at extract concentrations of  $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$  compared to acarbose (control) of  $8,41 \pm 0.43\%$ .

**Keywords:** Endophytic Bacteria, African Leaf, Alpha Glucosidase inhibitor, Diabetes Mellitus

### PENDAHULUAN

Glukosa darah merupakan hasil akhir metabolisme karbohidrat yang berada di dalam darah. Pengaturan kadar glukosa darah dilakukan oleh hormon insulin dan glukagon yang berasal dari pancreas (Siregar *et al.* 2020). Diabetes Mellitus (DM) adalah penyakit gangguan metabolik yang ditandai dengan tingginya kadar glukosa darah postprandial atau hiperglikemia (Shubrook *et al.* 2017). Hal ini disebabkan oleh sel  $\beta$  pankreas tidak dapat menghasilkan insulin yang cukup atau tubuh tidak dapat menggunakan insulin yang dihasilkan

secara efektif. Berdasarkan data International Diabetes Federation (IDF) tahun 2019, Indonesia berada di posisi ke-7 dari 10 negara di dunia dengan jumlah penderita DM sebanyak 10,7 juta orang. Indonesia juga menjadi satu-satunya negara di Asia Tenggara yang berada dalam daftar tersebut (Pangribovo 2020).

Pengendalian hiperglikemia merupakan hal penting dalam terapi pengobatan DM tipe 2. Salah satu caranya yaitu memberikan terapi inhibitor alfa glukosidase. Alfa glukosidase (EC 3.2.1.20) adalah enzim yang menghidrolisis ikatan glikosida alfa 1 →

4 karbohidrat menjadi glukosa di usus halus. Inhibitor alfa glukosidase menjadi agen antidiabetes jenis baru. Inhibitor ini bekerja dengan memperlambat pemecahan karbohidrat dan penyerapan glukosa di usus halus agar kadar glukosa darah terjaga (Simamora *et al.* 2019). Akarbosa, voglibosa, dan miglitol termasuk jenis inhibitor alfa glukosidase yang tersedia secara komersial. Inhibitor ini dapat memberikan efek samping seperti diare dan perut kembung (Kumar *et al.* 2018; Nyenwe *et al.* 2011). Hal ini membuka peluang untuk mencari inhibitor alfa glukosidase jenis baru.

Daun afrika (*Vernonia amygdalina*) merupakan tanaman yang berpotensi menghasilkan senyawa inhibitor alfa glukosidase. Daun ini sudah lama digunakan sebagai obat antidiabetes di Negara Nigeria, Malaysia, dan Indonesia. Daun afrika menghasilkan metabolit sekunder antara lain flavonoid, poliphenol, saponin, tanin, terpenoid, luteolin, dan steroid (Alara *et al.* 2019). Senyawa fitokimia ini yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antidiabetes, anti inflamasi, dan antibakteri (Alara *et al.* 2017; Yazid *et al.* 2020). Pemanfaatan tanaman sebagai alternatif obat antidiabetes membutuhkan area lahan yang cukup luas. Salah satu cara yang bisa dilakukan yaitu mengisolasi senyawa inhibitor alfa glukosidase dari bakteri endofit yang bersimbiosis dengan tumbuhan.

Mikroba endofit adalah mikroba yang hidup di dalam jaringan tumbuhan dan dapat membentuk koloni pada tumbuhan jaringan yang tidak membahayakan inangnya (Pujiyanto *et al.* 2012; Yuan *et al.* 2017). Hubungan antara bakteri endofit dengan tanaman inangnya adalah simbiosis mutualisme, sehingga bakteri endofit dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang sama dengan yang dihasilkan inangnya (Ek-Ramos *et al.* 2019; Pujiyanto *et al.* 2012). Penelitian mengenai bakteri endofit dari jaringan daun masih sangat sedikit padahal daun merupakan habitat bakteri yang paling luas. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menguji aktivitas inhibitor alfa glukosidase dari bakteri endofit daun afrika serta identifikasi molekuler bakteri yang menghasilkan inhibitor alfa glukosidase.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun afrika (*Vernonia amygdalina*) yang diperoleh dari sekitar Rawamangun, Jakarta, Indonesia, alkohol 70% teknis, sodium hipoklorit (*Merck*), akuades steril, larutan buffer fosfat (*Merck*), media *Humic Acid Vitamin* (HV) (*Sigma-Aldrich*), sikloheksimid (*Sigma-Aldrich*), asam nalidiksat (*Sigma-Aldrich*), media *Yeast Malt Extract Agar* (YMA) (*Himedia*), *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) (*Merck*),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (*Merck*), buffer *Sodium Chloride-Tris-EDTA* (STE) (*Sigma-Aldrich*), fenol (*Merck*), kloroform (*Sigma-*

*aldrich*), kristal violet (*Sigma-Aldrich*), lugol's iodine (*Sigma-Aldrich*), safranin (*Sigma-Aldrich*).

### Isolasi Bakteri Endofit Daun Afrika

Pengambilan sampel daun afrika di sekitar Rawamangun, Jakarta, Indonesia. Tahap isolasi diawali dengan sterilisasi permukaan daun dengan cara direndam dalam alkohol 70% selama 1 menit, sodium hipoklorit 1% selama 5 menit, alkohol 70% selama 1 menit, kemudian daun dibilas dengan akuades steril. Sampel daun yang telah disterilisasi, selanjutnya dihaluskan dan ditambahkan dengan larutan buffer fosfat 12,5 mM steril sebanyak 4 mL. Suspensi sampel diambil sebanyak 100  $\mu\text{l}$  dan disebar ke medium *Humic Acid Vitamin Agar* (HV) yang telah ditambahkan sikloheksimid 50 ppm dan asam nalidiksat 30 ppm (Hayakawa & Nonomura 1987). Suspensi sampel dalam medium agar tersebut diinkubasi pada suhu 25°C selama 2 minggu. Koloni bakteri yang tumbuh dimurnikan ke medium *Yeast Malt Extract Agar* (YMA) secara aseptik (Pujiyanto *et al.* 2012). Isolat bakteri yang tumbuh selanjutnya dilakukan pewarnaan gram.

### Pewarnaan Gram Bakteri

Koloni diambil 1 ose dan diletakkan di atas object glass dan difiksasi. Koloni ditetesi dengan kristal violet dan dibilas dengan air mengalir, kemudian ditetesi dengan lugol's iodine dan dibilas dengan air mengalir. Koloni selanjutnya ditetesi dengan alkohol sampai tetesannya menjadi bening. Selanjutnya koloni ditetesi dengan safranin kemudian dibilas dengan air mengalir (Pommerville 2018).

### Produksi Senyawa Inhibitor

Koloni tunggal isolat bakteri dari media YMA dipindahkan dengan menggunakan kawat ose ke media *Yeast Malt Extract* (YME) secara aseptik. Kultur diinkubasi dalam shaker incubator selama 2 minggu dengan kecepatan 1200 rpm pada suhu 25°C. Kultur dipanen dengan cara disentrifugasi pada kecepatan 1980  $\times g$  selama 30 menit pada suhu 25°C. Supernatan diambil untuk selanjutnya dilakukan proses ekstraksi.

### Ekstraksi Senyawa Inhibitor

Supernatan yang telah diperoleh dari kultur bakteri, kemudian diekstraksi dengan menggunakan etil asetat. Tahap ekstraksi dilakukan dengan menambahkan etil asetat ke dalam supernatan dengan perbandingan 1:6 (etil asetat: supernatan). Fraksi etil asetat ditampung dalam botol bertutup. Supernatan ditambahkan kembali dengan etil asetat untuk proses ekstraksi kembali. Proses ekstraksi ini dilakukan sebanyak 3 kali. Seluruh fraksi etil asetat dikumpulkan ke dalam botol bertutup (Pujiyanto *et al.* 2012).

### Uji Inhibitor Alfa Glukosidase

Ekstrak kering kultur bakteri dilarutkan dengan Dimethyl Sulfoxide (DMSO) hingga konsentrasi mencapai 10.000 µg/mL sebagai larutan stok sampel. Stok ekstrak sampel dilarutkan hingga konsentrasi 0,01; 0,05; 1; 5; dan 10 µg/mL. Larutan stok enzim dilarutkan pada 100 mM bufer fosfat pH 7 yang berisi BSA. Larutan enzim yang digunakan memiliki konsentrasi 0,015 u/mL. Larutan substrat terdiri dari 20 mM *p*-NPG yang dilarutkan pada 100 mM bufer fosfat pH 7. Sampel sebanyak 20 µL direaksikan dengan 100 µL 100 mM bufer fosfat pH 7, dan 100 µL 20 mM *p*-NPG. Campuran diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Campuran ditambahkan enzim sebanyak 100 µL dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1600 µL 200 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Nilai absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 400 nm. Aktivitas inhibisi alfa glukosidase ditentukan dengan persamaan (1).

$$\% \text{ Inhibisi} = [(C-S)/C] \times 100\% \dots (1)$$

Dengan C adalah selisih absorbansi kontrol dengan blanko, dan S adalah selisih absorbansi sampel S1 dengan S0 (Pujiyanto *et al.* 2012). Akarbosa digunakan sebagai kontrol positif dalam pengujian ini.

### Isolasi DNA Genom Isolat Bakteri

Isolat bakteri dimasukkan ke dalam medium YME cair secara aseptik, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 25°C. Inokulum bakteri diambil dimasukkan ke dalam tabung mikro sebanyak 1,5 mL. Tabung mikro disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Pelet dicuci dengan larutan buffer Sodium Chloride-Tris-EDTA (STE) (komposisi: 0,3 M sukrosa; 25 mM Tris-HCL; 25 mM EDTA.2Na pH 8), kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 8000 rpm. Pelet dicuci dengan perlakuan yang sama sebanyak 3 kali. Pelet ditambahkan buffer STE sebanyak 200 µL dan lisozim konsentrasi 20 mg/mL sebanyak 45 µL, kemudian dihomogenkan. Campuran diinkubasi pada suhu 55°C selama 1 jam. Campuran ditambahkan proteinase-K (20 mg/mL) sebanyak 20 µL, kemudian diinkubasi pada suhu 55°C selama 1 jam. Campuran ditambahkan 400 µL CTAB 10% dalam larutan NaCl 0,7 M, lalu diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit. Campuran ditambahkan 1 kali volume fenol:kloroform (25:24), kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 10 menit. Pelet dicuci menggunakan alkohol 70% sebanyak 1 mL. Pelet DNA dikeringkan selama 1 jam, kemudian dilarutkan dalam 50 µL ddH<sub>2</sub>O steril. DNA disimpan pada 4°C atau -20°C (Sambrook & Russel 2001).

### Amplifikasi Gen 16S rRNA Isolat Bakteri

Gen 16S rRNA dari DNA genom diamplifikasi dengan mesin *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (SimpliAmp™ Thermal Cycler, Applied Biosystems) dan primer spesifik prokariot (Marchesi *et al.* 1998), yaitu primer forward 63f (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') and primer reverse 1387r (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3'). Komposisi reaksi PCR antara lain enzim *Taq* DNA polimerase 0,5 µL, 2× bufer GC 25 µL, dNTP mixture 8 µL, masing-masing primer (10 pmol) 1,5 µL, ddH<sub>2</sub>O 9,5 µL, dan DNA template 4 µL. Kondisi PCR yang digunakan yaitu pre-denaturasi (94°C, 4 menit), denaturasi (94°C, 45 detik), annealing (55°C, 1 menit), elongasi (72°C, 1 menit 10 detik), dan post PCR (72°C, 7 menit) selama 30 siklus. Pemisahan DNA produk PCR dilakukan pada mesin elektroforesis mini-gel menggunakan agarosa 1% pada tegangan listrik 75 Volt selama 45 menit. Visualisasi DNA dilakukan di atas UV transluminator menggunakan pewarna Ethidium Bromida (EtBr).

Hasil amplikon disekuensing menggunakan jasa First Base. Data hasil sekuensing di trimming dan di assembling menggunakan program ChromasPro version 1.5. Data yang telah di assembling selanjutnya di BLAST dengan data genom yang telah didaftarkan NCBI/National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Beberapa data sekuen hasil BLAST yang merupakan spesies terdekat dan merupakan type strain dari masing-masing spesies tersebut diambil dari data GenBank di NCBI. Data dianalisis kembali dengan mensejajarkan sekuen tersebut dengan menggunakan program MEGA 6.1 (Tamura *et al.* 2011), kemudian dilakukan konstruksi pohon filogenetik untuk menunjukkan tingkat kekerabatan isolat VV1 dengan mikroba lain menggunakan metode Neighbor Joining Tree dengan bootstrap yang digunakan adalah 1000 ulangan (Felsenstein 1985).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi Bakteri Endofit Daun Afrika

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun afrika yang segar. Hal ini bertujuan agar diperoleh bakteri endofit dalam keadaan hidup. Daun disterilisasi terlebih dahulu agar hanya memperoleh bakteri endofit yang berasal dari daun afrika. Tahap isolasi bakteri endofit diperoleh dengan menggunakan media HV dan YMA. Komposisi media HV adalah asam humat dan vitamin B. Asam humat berperan sebagai sumber karbon (Hayakawa & Nonomura 1987; Kang *et al.* 2010; Nurkanto 2017). Media ini merupakan media selektif aktinomisetes (Hayakawa & Nonomura 1987). Media YMA berfungsi sebagai media purnian dan peremajaan koloni bakteri endofit yang tumbuh dalam media HV (Pujiyanto *et al.* 2015). Komposisi media ini adalah yeast extract, malt extract, dekstrosa, dan agar. Sumber karbon berasal dari dekstrosa dan malt

extract dan sumber nitrogen berasal dari yeast extract (Sarjono *et al.* 2020).

Hasil isolasi bakteri endofit *Vernonia amygdalina* menggunakan media HV dan YMA hanya fokus pada satu isolat dengan penamaan kode *Vernonia VI* (VVI) karena pada penelitian sebelumnya dicurigai sebagai isolat aktinomiset (Ilsan *et al.* 2018). Isolat bakteri endofit kemudian dilakukan pewarnaan Gram. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa isolat VVI berbentuk batang dan merupakan bakteri Gram positif.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa beberapa bakteri endofit mampu memproduksi senyawa aktif yang mirip dengan inangnya. Hasil penelitian Anwar & Futra (2019) menunjukkan bahwa bakteri endofit dari tumbuhan laban (*Vitex pubescens* vahl) memiliki aktivitas antikanker. Tumbuhan tersebut diketahui mengandung andrograpolidin dan asam betulinat yang berpotensi sebagai senyawa antikanker (Luo *et al.* 2014). Hasil penelitian Pratama dkk. (2015) menunjukkan adanya aktivitas antidiabetes dari bakteri endofit daun mimba (*Azadirachta indica*) menghasilkan metabolit sekunder berupa saponin, flavonoid, triterpenoid, steroid, tannin, alkaloid, dan kuinon. Hasil penelitian Sarjono *et al.* (2020) menunjukkan bahwa bakteri endofit kulit kayu manis menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang sama dengan inangnya yaitu flavonoid, kuinon, saponin, dan tanin. Senyawa saponin, tannin, dan flavonoid berperan sebagai antidiabetes. Luteolin memiliki kemampuan untuk menghambat kerja enzim alfa glukosidase dan alfa amilase sehingga berperan dalam menurunkan hiperglikemia post prandial. Tanin berfungsi memperlambat penyerapan glukosa di usus kecil. Saponin berfungsi untuk menurunkan kadar glukosa dengan merangsang sekresi insulin dan regenerasi sel  $\beta$ -pankreas (Alara *et al.* 2019; Yazid *et al.* 2020). Flavonoid dapat menghambat kerja alfa glukosidase (Şöhretoğlu & Sari 2019).

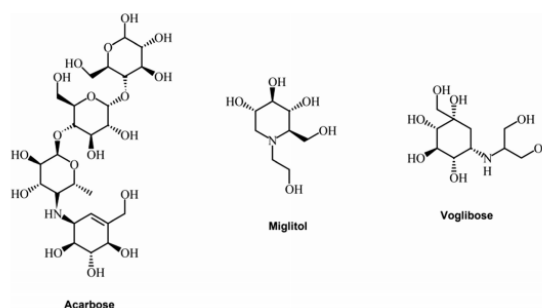
### Produksi dan Ekstraksi Senyawa Inhibitor Alfa Glukosidase Isolasi Bakteri Endofit VVI

Produksi senyawa inhibitor alfa glukosidase isolat VVI dilakukan dalam media YSB yang diinkubasi selama 2 minggu pada suhu ruang. Tahap ekstraksi pada penelitian ini menggunakan pelarut etil asetat yang bersifat semi polar. Pelarut tersebut digunakan untuk menarik senyawa metabolit sekunder pada supernatan. Tujuan tahap ekstraksi adalah memperoleh senyawa inhibitor alfa glukosidase yaitu metabolit sekunder seperti flavonoid dan terpenoid. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan pelarut etil asetat memberikan hasil terbaik dibandingkan dengan kloroform dan metanol (Pujianto *et al.* 2015).

### Uji Inhibitor Alfa Glukosidase

Inhibitor alfa glukosidase bertindak sebagai inhibitor kompetitif bagi enzim yang berperan dalam

proses pencernaan karbohidrat, khususnya alfa glukosidase. Mekanisme kerja inhibitor alfa glukosidase adalah memperlambat proses pemecahan karbohidrat (oligosakarida dan disakarida) menjadi monosakarida, akibatnya glukosa yang diserap oleh tubuh lebih sedikit dan menurunkan kadar glukosa darah post prandial (Simamora *et al.* 2019). Inhibitor alfa glukosidase yang saat ini digunakan untuk pengobatan DM tipe 2 adalah akarbose, voglibosa, dan miglitol (Gambar 1). Akarbose adalah pseudotetrasakarida. Voglibosa yang merupakan validamine dan 1,3-propanediol. Miglitol adalah pseudomonosakarida (Dirir *et al.* 2021).



**Gambar 1.** Struktur kimia akarbose, miglitol, dan voglibosa (Dirir *et al.* 2021)

Ekstrak kultur VVI diuji aktivitas inhibisi terhadap enzim alfa glukosidase. Pengukuran daya inhibisi dilakukan secara *in vitro* melalui mekanisme hidrolisis *p*-nitrofenil alfa-D-glukopiranosida oleh alfa glukosidase membentuk *p*-nitrofenol dan alfa-D-glukosa. Ekstrak kultur VVI berperan sebagai inhibitor alfa glukosidase. Semakin besar aktivitas inhibisi ekstrak maka jumlah *p*-nitrofenol semakin sedikit, sehingga warna kuning *p*-nitrofenol yang terbentuk akan berkurang (Margono & Sumiati, 2019). Intensitas warna kuning *p*-nitrofenol berbanding terbalik dengan aktivitas inhibisi ekstrak.

Tabel 1 menunjukkan bahwa isolat VVI memiliki aktivitas inhibisi alfa glukosidase tertinggi 8,52±1,329% pada konsentrasi 0,1 µg/ mL. Aktivitas inhibisi alfa glukosidase dari isolat VVI sangat rendah dibandingkan dengan akarbose. Hal ini dapat disebabkan ekstrak kasar yang diperoleh masih berupa senyawa campuran yang belum murni sehingga kemampuan inhibisinya belum optimal.

**Tabel 1.** Aktivitas inhibitor alfa glukosidase isolat VVI dibandingkan dengan akarbose

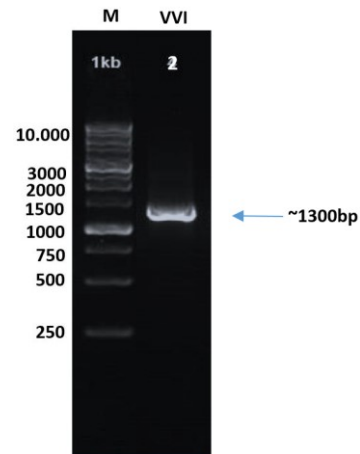
Konsentrasi (µg/ mL)	Inhibisi (%)	
	Akarbose	VVI
0,1	8,14 ± 0.430	8,52 ± 1.329
0,5	45,30 ± 0.036	5,36 ± 1.117
1	56,41 ± 0.012	6,39 ± 2.087
5	81,33 ± 0.056	7,28 ± 1.423
10	84,19 ± 0.006	4,63 ± 0.411

Tabel 1 juga menunjukkan bahwa aktivitas inhibisi standar yaitu akarbosa meningkat dengan semakin tingginya konsentrasi akarbosa. Hal ini menunjukkan bahwa nilai inhibisi dipengaruhi oleh besarnya konsentrasi senyawa inhibitor. Semakin tinggi konsentrasi inhibitor maka semakin besar inhibitor akan berikatan dengan sisi aktif enzim membentuk kompleks enzim-inhibitor (Sarjono *et al.* 2020). Aktivitas inhibisi dari metabolit sekunder isolat VVI tidak linear dengan peningkatan konsentrasi ekstrak kasarnya. Hal ini menunjukkan nilai inhibisi isolate VVI tidak dipengaruhi besarnya konsentrasi inhibitor.

**Identifikasi Molekuler Isolat Bakteri Endofit**

Hasil amplifikasi gen 16S rRNA isolat bakteri endofit VVI menunjukkan panjang pasang basa sesuai dengan target yaitu 1300 pb (Gambar 2). Sekuen parsial gen 16S rRNA isolat VVI hasil amplifikasi dan analisis pohon filogenetik memiliki kemiripan dan berkerabat dekat dengan gen 16S *Bacillus circulans* sebesar 99% (Tabel 2 dan Gambar 3). Penelitian terkait inhibitor alfa glukosidase dari *Bacillus circulans* belum ada sampai saat ini. Hal ini

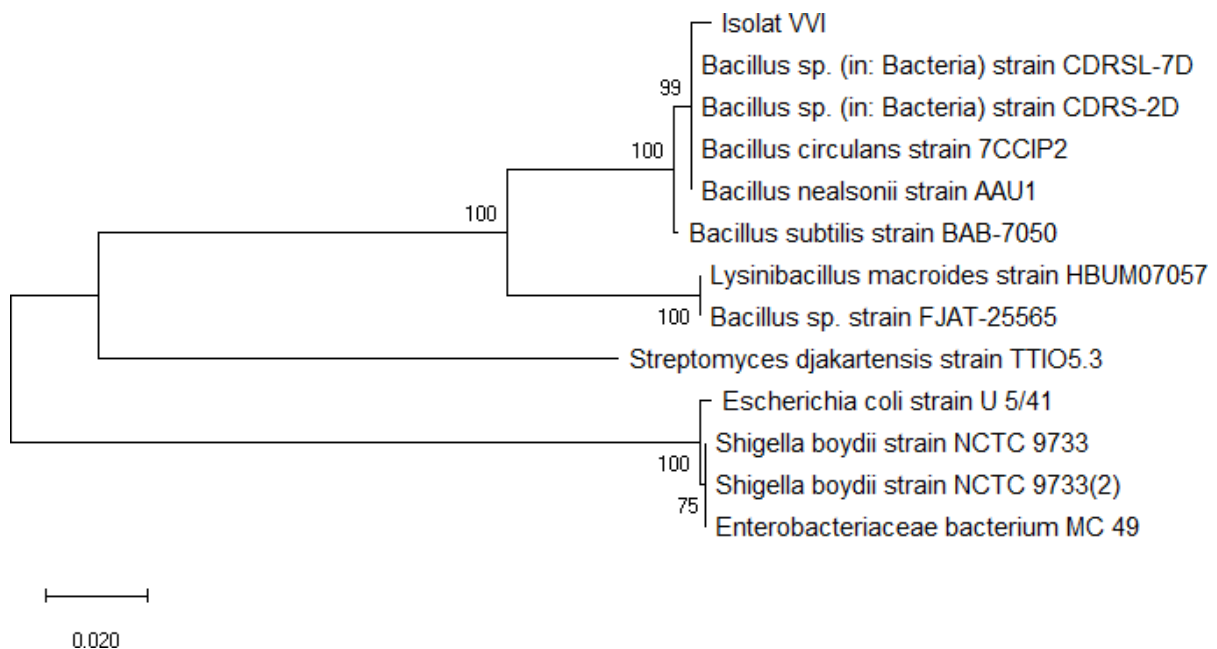
memungkinkan bahwa isolat VVI merupakan penemuan baru yang mendapat senyawa inhibitor alfa glukosidase.



**Gambar 2.** Amplifikasi PC isolat VVI menggunakan daerah gen 16S rRNA dengan primer 63f dan primer 1387r; M = marker 1 Kb ladder.

**Tabel 2.** Hasil BLAST sekuen gen 16S rRNA

Isolat	Deskripsi	Query cover (%)	E-value	Identity (%)	Accession No.
VVI	<i>Bacillus circulans</i> strain 7CCIP2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100	00.00	99	KM066000.1



**Gambar 3.** Pohon Filogenetik yang menggambarkan kedekatan isolat VVI terhadap bakteri lain dalam satu clade maupun terhadap clade lain. Konstruksi berdasarkan metode *Neighbor Joining Tree* dengan nilai bootstrap 1000x

## KESIMPULAN

Pada penelitian ini telah berhasil diperoleh 1 isolat bakteri endofit dari daun afrika dengan kode isolate VVI. Isolat tersebut memiliki kemampuan inhibisi alfa glukosidase. Aktivitas inhibisi alfa glukosidase dari isolat VVI tertinggi sebesar  $8,5 \pm 1,32\%$  pada konsentrasi ekstrak  $0,1 \mu\text{g/mL}$ . Isolat VVI telah berhasil diidentifikasi secara molekuler dan memiliki kekerabatan dekat dengan *Bacillus circulans*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alara, O.R., Abdurahman, N.H., Mudalip, S.K.A. & Olalere, O.A. (2017). Phytochemical and pharmacological properties of *Vernonia amygdalina*: A review. *Journal of Chemical Engineering and Industrial Biotechnology*. **2(1)**: 80-96.
- Alara, O.R., Abdurahman, N.H., Ukaegbu, C.I. & Kabbashi, N.A. (2019). Extraction and characterization of bioactive compounds in *Vernonia amygdalina* leaf ethanolic extract comparing Soxhlet and microwave-assisted extraction techniques. *Journal of Taibah University for Science*. **13(1)**: 414-422.
- Anwar, L. & Futra, D. (2019). Potensi metabolit sekunder produksi bakteri endofit dari tumbuhan laban (*Vitex pubescens* Vahl) sebagai antikanker. *Chempublish Journal*. **4(2)**: 71-80.
- Dirir, A.M., Daou, M., Yousef, A.F. & Yousef, L.F. (2021). A review of alpha-glucosidase inhibitors from plants as potential candidates for the treatment of type-2 diabetes. *Phytochemistry Reviews*.
- Ek-Ramos, M.J., Gomez-Flores, R., Orozco-Flores, A.A., Rodriguez-Padilla, C., González-Ochoa, G. & Tamez-Guerra, P. (2019). Bioactive products from plant-endophytic Gram-positive bacteria. *Frontiers in Microbiology*. **10**: 463.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *evolution*, **39(4)**: 783-791.
- Hayakawa, M. & Nonomura, H. (1987). Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology*. **65(5)**: 501-509.
- Ilsan, N.A., Nurfajriah, S. & Inggriani, M. (2018). Aktivitas inhibitor alfa glukosidase dari aktinomiset asal phylloplane kelor (*Moringa oleifera*). *Bioma*. **14(2)**. 49-59.
- Kang, M.J., Strap, J.L. & Crawford, D.L. (2010). Isolation and characterization of potent antifungal strains of the *Streptomyces violaceusniger* clade active against *Candida albicans*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **37(1)**: 35-41.
- Kumar, Y., Goyal, R.K. & Thakur, A.K. (2018). Pharmacotherapeutics of miglitol: an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*. **7(6)**: 617-619.
- Luo, X., Luo, W., Lin, C., Zhang, L. & Li, Y. (2014). Andrographolide inhibits proliferation of human lung cancer cells and the related mechanisms. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. **7(11)**: 4220.
- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J. & Wade, W.G. (1998). Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. **64(2)**: 795-799.
- Margono, R.S. & Sumiati, T. (2019). Potensi tanaman indonesia sebagai antidiabetes melalui mekanisme penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase. *Jurnal Farmamedika*. **4(2)**: 86-92.
- Nurkanto, A. (2017). Studi kelimpahan aktinomisetes tanah dan hubungannya terhadap enzim selulase, amilase, total karbon dan nitrogen hutan pasca kebakaran Bukit Bangkirai Kalimantan Timur. *Jurnal Biologi Indonesia*. **5(1)**: 81-89.
- Nyenwe, E.A., Jerkins, T.W., Umpierrez, G.E. & Kitabchi, A.E. (2011). Management of type 2 diabetes: evolving strategies for the treatment of patients with type 2 diabetes. *Metabolism*. **60(1)**: 1-23.
- Pangribowo, S. (2020). InfoDATIN: Tetap Produktif, Cegah, dan Atasi Diabetes Melitus. <https://pusdatin.kemkes.go.id/resources/download/pusdatin/infodatin/Infodatin-2020-Diabetes-Melitus.pdf>
- Pommerville, J.C. (2018). *Alcamo's Fundamentals of Microbiology*. 11<sup>th</sup> ed. Jones & Bartlett Learning. Burlington.
- Pratama, Y., Sarjono, P.R. & Mulyani, N.S. (2015). Skrining metabolit sekunder bakteri endofit yang berfungsi sebagai antidiabetes dari daun mimba (*Azadirachta indica*). *Jurnal Kimia dan Aplikasi Sains*. **18(2)**: 73-78.
- Pujiyanto, S., Ferniah, R.S. & Sunarno, S. (2015). Produksi dan ekstraksi inhibitor alfa glukosidase dari isolat aktinomiset Jp-3. *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*. **17(2)**: 122-128.
- Pujiyanto, S., Lestari, Y., Suwanto, A., Budiarti, S. & Darusman, L.K. (2012). Alpha-glucosidase inhibitor activity and characterization of endophytic actinomycetes isolated from some Indonesian diabetic medicinal plants. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **4(1)**: 327-333.
- Sambrook, J., & Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> ed.. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sarjono, P.R., Mahardika, H.D.R., Mulyani, N.S., Ngadiwiyana, N., Prasetyawibowo, N.B.A. & Ismiyanto, I. (2020). Aktivitas antidiabetes metabolit sekunder bakteri endofit asal kulit kayu manis. *Jurnal Penelitian Saintek*. **25(2)**: 143-156.

- Shubrook, J., Butts, A., Chamberlain, J. J., Johnson, E. L., Leal, S., Rhinehart, A. S., Skolnik, N., Bradley, S., Jaffa, F. M., Herman, W. H., Kalyani, R. R., Cherrington, A. L., Coustan, D. R., De Boer, I., James, R., Feldman, H., Florez, H. J., Koliwad, S., Maryniuk, M., ... Ratner, R. (2017). Standards of Medical Care in Diabetes—2017 Abridged for Primary Care Providers. *Clinical Diabetes*. **35(1)**: 5–26.
- Simamora, A., Timotius, K.H. & Santoso, A.W. (2019). Antidiabetic, antibacterial and antioxidant activities of different extracts from *Brucea javanica* (L.) merr seeds. *Pharmacognosy Journal*. **11(3)**: 479–485.
- Siregar, R.A., Amahorseja, A.R., Adriani, A. & Andriana, J. (2020). Pemeriksaan kadar glukosa darah sewaktu, kadar asam urat dan kadar kolesterol pada masyarakat di Desa Eretan Wetan Kabupaten Indramayu Periode Februari 2020. *Jurnal Comunita Servizio*. **2(1)**: 291-300.
- Şöhretoğlu, D. & Sari, S. (2020). Flavonoids as alpha-glucosidase inhibitors: Mechanistic approaches merged with enzyme kinetics and molecular modelling. *Phytochemistry Reviews*. **19(5)**: 1081-1092.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. **28(10)**: 2731-2739.
- Yazid, F., Hasanah, N.B., Hanafi, M. & Prasasty, V.D. (2020). Antidiabetic and antioxidant potential of *Vernonia amygdalina* leaf extract in alloxan-induced Sprague-dawley rats. *OnLine Journal of Biological Sciences*. **20(4)**: 190-200.
- Yuan, Y., Feng, H., Wang, L., Li, Z., Shi, Y., Zhao, L., Feng, Z. & Zhu, H. (2017). Potential of endophytic fungi isolated from cotton roots for biological control against verticillium wilt disease. *PLoS One*. **12(1)**: e0170557.
-