

Seleksi Mikroba Endofit *Curcuma zedoaria* dalam Memproduksi Senyawa Kimia Antimikroba

VOICE SRIKANDACE, YATRI HAPSARI, PARTOMUAN SIMANJUNTA*

Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI
Jalan Raya Bogor Km 46 Cibinong 16911, Indonesia

Diterima 13 Juli 2007, Disetujui 28 Agustus 2007

Abstract: It is well known, that temu putih (*Curcuma zedoaria* Berg.), a rhizome of the Zingiberaceae, is oftenly used as medicine. In this connection, the potential secondary metabolites as anticancer and antimicrobes are produced by endophytic microbes in the plant. In this research, five endophytic microbes from the *Curcuma zedoaria*'s rhizome were fermented to produce compounds as antimicrobes.

Keywords: *Curcuma zedoaria*, Zingiberaceae, endophytic microbe, antimicrobial.

PENDAHULUAN

Alam Indonesia kaya akan tumbuhan obat, salah satu di antaranya ialah temu putih dari marga *Curcuma* yang tergolong ke dalam suku temu-temuan Zingiberaceae. Temu putih merupakan jenis rimpang yang secara sepintas memiliki bentuk sebagaimana layaknya rimpang yang lain seperti jahe, kunyit, dan lain-lain. Temu putih, *Curcuma zedoaria* dikenal luas sebagai antikanker dan antimikroba. Berbagai manfaat dari temu putih dapat ditemukan dari seluruh bagian tanamannya, mulai dari daun, bunga, rimpang muda, maupun rimpang tua. Rimpang merupakan bagian tanaman yang banyak digunakan dari tanaman ini⁽¹⁾. Senyawa kurkumol dan kurdion yang terdapat dalam temu putih memiliki sifat antikanker. Sementara itu, senyawa kurkuminoid dan flavonoid berfungsi sebagai zat antioksidan yang akan melindungi tubuh dari kerusakan sel⁽²⁾.

Hampir semua produk-produk antikanker pada saat ini mengandalkan tumbuh-tumbuhan, sehingga membutuhkan biaya yang tinggi dan banyak mengalami kendala ketika akan dikembangkan dalam skala industri. Di samping itu, peraturan pemerintah maupun internasional yang melindungi kelestarian alam, menyebabkan pengambilan tumbuhan maupun usaha pengembangan kultivar tumbuhan keluar dari daerah asalnya mengalami hambatan. Oleh karena itu, diperlukan alternatif pencarian bahan bioaktif lain yang lebih murah dan tidak mengganggu lingkungan. Salah satunya adalah

dengan cara memanfaatkan mikroorganisme yang ada dalam tumbuhan yang disebut sebagai mikroba endofit⁽³⁾.

Belakangan ini diketahui bahwa di dalam tumbuhan terdapat banyak mikroorganisme yang dapat melakukan proses metabolisme tertentu dan memainkan peranan penting dalam menghasilkan senyawa bioaktif yang potensial untuk dikembangkan. Penelitian terhadap taksol (antikanker yang bernilai tinggi) membuktikan bahwa sintesis senyawa tersebut di dalam tanaman *Taxus brevifolia* dilakukan dengan bantuan sejenis kapang endofit yang tumbuh di dalam tanaman^(4,5,6). Selain itu, telah dilakukan juga penelitian yang membuktikan bahwa kapang endofit *Phomopsis* sp. dari tanaman benalu teh, *Dendrophthoe pentandra* dapat melakukan sintesis senyawa (+)-catechin. Mikroba endofit diisolasi dari jaringan tanaman dan ditumbuhkan pada medium fermentasi dengan komposisi tertentu. Mikroba endofit di dalam medium fermentasi akan menghasilkan senyawa sejenis yang terkandung pada tanaman inang dengan bantuan aktivitas enzim⁽⁷⁾.

Pada penelitian ini dilakukan seleksi mikroba endofit *Curcuma zedoaria* dalam memproduksi senyawa kimia antimikroba.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan yang digunakan adalah 5 jenis mikroba endofit koleksi laboratorium Biofarmaka hasil isolasi dari rimpang *C. zedoaria* asal Parung, Jawa Barat dengan kode CZ.I.(0)-1F sampai dengan CZ.I.(0)-5F; *Potatoes Dextrose Agar* (PDA), *Potatoes Dextrose Broth* (PDB), *Nutrient Agar* (NA)

* Penulis korespondensi, Tlp. 021-875-4586,
e-mail: tomujtk@indo.net.id

Nutrient Broth (NB), kloramfenikol, nistatin, etil asetat, metanol, n-heksan, kloroform, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, perangkat laboratorium mikrobiologi, *Laminar air flow* (LAF) cabinet, kertas cakram diameter 5 mm (merek Advantec) dan perangkat alat-alat gelas.

METODE. Seleksi kapang endofit untuk bioproduksi senyawa kimia dalam media PDB. Lima isolat kapang (CZ-1.(O)-1F sampai dengan CZ-1.(O)-5F) diambil dengan ukuran 0,5 x 0,5 cm dan diinokulasi ke dalam media PDB (100 ml). Kemudian isolat tersebut diinkubasi selama 21 hari, di atas *shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 20-25°C. Untuk pengukuran pH, biakan diambil sebanyak 5 ml setiap 3 hari, kemudian diekstraksi dengan etilasetat. Fase etil asetat dikumpulkan, diuapkan, dan dilakukan analisis kromatografi lapis tipis (KLT) untuk melihat pola senyawa kimia hasil bioproduksi kelima isolat.

Pembuatan kurva pertumbuhan. Isolat kapang yang terpilih diinokulasi ke dalam media PDB diinkubasi dengan kecepatan 120 rpm di atas *shaker* pada suhu 25°C selama 20 hari. Kemudian dilakukan pengambilan sampel setiap 2 hari sekali untuk mengetahui pertumbuhan dari isolat kapang tersebut. Hasil fermentasi kapang disaring dan ditimbang biomasanya kemudian dibuat kurva pertumbuhan antara waktu pengambilan sampel dengan bobot biomassa.

Produksi, dan fraksinasi hasil bioproduksi mikroba endofit terpilih. Isolat kapang terpilih diinokulasi ke dalam 2 l media PDB dan diinkubasi selama 21 hari dengan kecepatan 120 rpm di atas *shaker* pada suhu 20-25°C. Kemudian diekstraksi dengan etilasetat sebanyak 3 kali dan diuapkan sehingga diperoleh ekstrak etilasetat untuk proses fraksinasi dengan kromatografi kolom.

Uji aktivitas antimikroba dengan metode difusi agar menggunakan cakram sebagai pencadang. Fraksi hasil kromatografi kolom diuji aktivitas antimikrobanya dengan metode difusi agar menggunakan cakram sebagai pencadang dengan mikroba uji *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Saccharomyces cerevisiae*.

Uji aktivitas antibakteri. Kloramfenikol (antibakteri) dibuat dalam 3 konsentrasi yaitu 500, 1000, dan 1500 bpj sebagai kontrol positif. Fraksi hasil kromatografi kolom (fraksi I-IV) juga dibuat dalam 3 konsentrasi yang sama. Mikroba uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang telah diremajakan dalam media *Nutrient Agar* (NA) diinokulasi 1 ose dalam 25 ml media *Nutrient Broth* (NB) dan diinkubasi selama 1 hari pada suhu 25°C. Setelah bakteri uji tumbuh, diambil 1

ml untuk dicampurkan ke dalam 300 ml media NA yang masih dalam keadaan cair (suhu 45°C), dikocok homogen, kemudian dipindahkan sebanyak 20 ml ke setiap cawan Petri. Kertas cakram yang telah dicelupkan dalam kontrol positif maupun fraksi hasil kromatografi kolom pada berbagai konsentrasi masing-masing diletakkan pada media yang telah memadat dan diinkubasi pada suhu 25°C. Pengamatan dilakukan selama 3 hari dengan menghitung diameter daerah hambat (mm).

Uji aktivitas antifungi. Nistatin (antifungi) dibuat dalam 3 konsentrasi yaitu 2500, 5000, dan 10000 bpj sebagai kontrol positif. Fraksi hasil kromatografi kolom (fraksi I-IV) juga dibuat dalam 3 konsentrasi yang sama. *Saccharomyces cerevisiae* yang telah diremajakan dalam media *Potatoes Dextrose Agar* (PDA) diinokulasi 1 ose dalam 25 ml media *Potatoes Dextrose Broth* (PDB) dan diinkubasi selama 1 hari pada suhu 25°C. Setelah itu, diambil 1 ml untuk ditanamkan ke dalam 300 ml media PDA yang masih dalam keadaan cair (suhu 45°C), dikocok homogen, kemudian dipindahkan sebanyak 20 ml ke dalam setiap cawan Petri. Kertas cakram yang telah dicelupkan dalam kontrol positif maupun fraksi hasil kromatografi kolom pada berbagai konsentrasi masing-masing diletakkan pada media yang telah memadat dan diinkubasi pada suhu 25°C. Pengamatan dilakukan selama 3 hari dengan menghitung diameter daerah hambat (mm).

HASIL DAN PEMBAHASAN

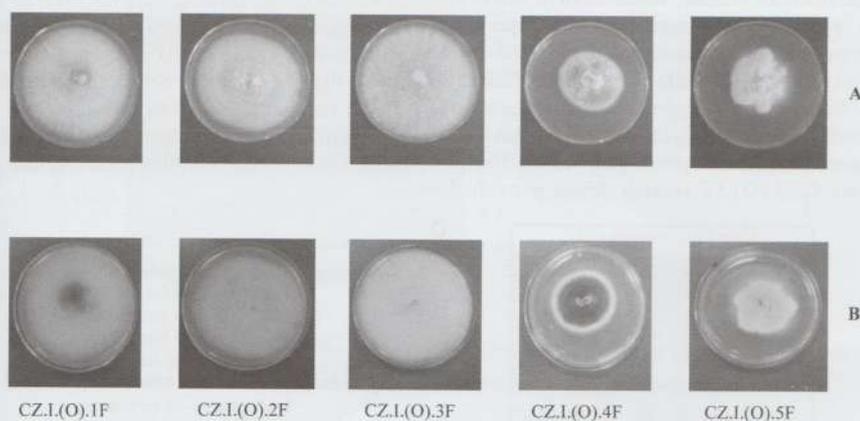
Karakteristik morfologi isolat kapang endofit. Isolat kapang endofit diremajakan di dalam media PDA, diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari, dilakukan pengamatan secara makroskopis untuk mengetahui karakteristik morfologi isolat kapang endofit tersebut, yang meliputi diameter dan permukaan koloni, terbentuknya zonasi, dan warna miselium. Karakteristik morfologi 5 kapang endofit ditunjukkan pada Tabel 1.

Seleksi kapang endofit yang menghasilkan senyawa kimia antimikroba. Penyeleksian kapang endofit yang berpotensi menghasilkan senyawa kimia antimikroba dilakukan dengan uji pendahuluan yang meliputi pengukuran pH dan analisis KLT (kromatografi lapis tipis) dan uji anti mikroba terhadap produk fermentasi kapang. Hasil pengukuran pH media cair untuk fermentasi kelima jenis isolat kapang endofit selama 21 hari disajikan pada Tabel 2.

Pengukuran pH dilakukan untuk mengetahui perubahan suasana pH media yang telah ditumbuhi kapang selama proses fermentasi. Perubahan pH

Tabel 1. Karakteristik morfologi kapang endofit secara makroskopis pada media PDA.

Isolat	Permukaan bagian atas	Warna sebalik
CZ.I.(O).1F	Diameter koloni: 9 cm. Konidia/spora: tidak ada. Warna miselium: bagian tengah ungu, bagian pinggir krem, kasar. Permukaan miselium: datar, kasar dan tersebar di permukaan agar.	Warna miselium: bagian tengah coklat; bagian pinggir kuning. Zonasi: tidak ada. Permukaan miselium menyebar.
CZ.I.(O).2F	Diameter koloni: 8 cm. Konidia/spora: tidak ada. Warna miselium: krem. Permukaan miselium: datar, kasar dan miselium putih tersebar di permukaan agar.	Warna miselium: kuning. Zonasi: ada. Permukaan miselium menyebar.
CZ.I.(O).3F	Diameter koloni: 8 cm. Konidia/spora: tidak ada. Warna miselium: krem. Permukaan miselium: datar, kasar dan miselium putih tersebar di permukaan agar	Warna miselium: kuning muda. Zonasi: tidak ada. Permukaan miselium: menyebar.
CZ.I.(O).4F	Diameter koloni: 4,5 cm. Konidia/spora: tidak ada. Warna miselium: hijau. Permukaan miselium: tidak datar, kasar dan miselium muda tersebar di permukaan agar.	Warna miselium: hijau tua. Zonasi: tidak ada. Permukaan miselium: miselium tua menumpuk di tengah.
CZ.I.(O).5F	Diameter koloni: 5 cm. Konidia/spora: tidak ada. Warna miselium: putih, halus seperti kapas. Permukaan miselium: tidak datar, miselium muda tersebar di permukaan agar.	Warna miselium: coklat muda. Zonasi: tidak ada. Permukaan miselium: miselium tua menumpuk di tengah.



Gambar 1. Morfologi isolat kapang endofit secara makroskopis pada media PDA berumur 7 hari.

A. Permukaan bagian atas

B. Permukaan bagian bawah

Keterangan: CZ: *Curcuma zedoaria*
I: IndonesiaO: *Old rhizoma*
F: *Fungi* (kapang)

Tabel 2. Pengukuran pH 5 isolat kapang endofit CZ.I.(O) dalam media PDB.

Jenis kapang	pH					
	Hari ke-4	Hari ke-7	Hari ke-11	Hari ke-14	Hari ke-18	Hari ke-21
CZ.I.(O).1F	6	6	7	7	7	7
CZ.I.(O).2F	5	5	5	6	6	7
CZ.I.(O).3F	7	7	7	8	8	8
CZ.I.(O).4F	4	4	4	5	5	5
CZ.I.(O).5F	5	5	6	6	6	6

pH Media PDB : 6

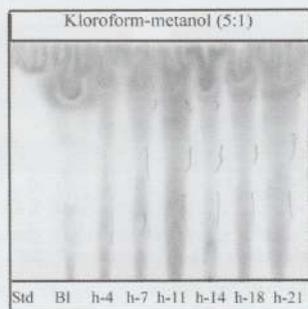
pada media fermentasi disebabkan oleh aktivitas metabolisme isolat kapang. Pada penelitian digunakan media PDB yang mempunyai pH sekitar 6. Dari pengamatan selama proses fermentasi, pH media dari hari ke-4 hingga hari ke-21 pada kelima isolat kapang berkisar antara 4-8, yang merupakan pH optimum untuk pertumbuhan kapang. Perubahan pH yang terjadi menunjukkan terjadinya pertumbuhan kapang dan menghasilkan suatu senyawa yang bersifat asam atau basa. Pengambilan sampel untuk analisis KLT dilakukan terhadap kelima isolat kapang setiap tiga hari dari hari ke-4 sampai hari ke-21 untuk mengetahui isolat kapang yang berpotensi menghasilkan senyawa kimia dengan membandingkan senyawa kimia dari ekstrak etil asetat media PDB yang digunakan sebagai blanko. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada hari ke-4 sampai hari ke-7 dari kelima ekstrak belum memperlihatkan bercak, tanda adanya senyawa kimia, yang dapat diamati dengan adanya pola bercak yang sama dengan ekstrak media PDB. Pada hari ke-11 kapang CZ.I.(O).5F telah menghasilkan metabolit berupa bercak berwarna hijau kekuningan yang berfluoresensi pada 254 dan 366 nm dan tanpa menggunakan pereaksi penampak bercak. Bercak senyawa CZ.I.(O).5F setelah diberi penampak

bercak serum sulfat memberikan intensitas warna yang lebih pekat. Sedangkan untuk isolat kapang CZ.I.(O).1F sampai dengan CZ.I.(O).4F tidak menunjukkan telah terbentuknya suatu metabolit, bercak yang terlihat tidak berbeda dengan bercak dari media PDB.

Pada hari ke-14, ekstrak kapang CZ.I.(O).5F memberikan pola bercak yang sama dengan hari ke-11, namun dengan intensitas warna yang sudah agak berkurang. Sedangkan pada ekstrak kapang yang lain bercak tidak terlihat jelas sama sekali. Pengamatan dilanjutkan sampai hari ke-21 dimana pada ekstrak kapang CZ.I.(O).5F masih terlihat bercak yang sama dengan intensitas warna yang semakin lemah, sedangkan pada ekstrak kapang yang lain bercak tidak terlihat lagi baik pada λ 254/365 nm maupun dengan pereaksi penampak bercak serum sulfat.

Dari hasil analisis KLT sebagai skrining awal diperoleh bahwa isolat kapang CZ.I.(O).5F mampu menghasilkan suatu senyawa kimia tertentu (senyawa yang berbeda dari PDB) dengan menggunakan media PDB, sedangkan waktu optimasi produksinya diperkirakan adalah pada hari ke-11.

Hasil analisis KLT ekstrak EtOAc CZ.I.(O).5F pada hari ke-11 dapat dilihat pada Gambar 2.



Keterangan: Std : standar (kurkumin)
Bl : blanko (ekstrak PDB)
h-4 : hari ke-4 fermentasi
h-7 : hari ke-7 fermentasi
h-11: hari ke-11 fermentasi
h-14: hari ke-14 fermentasi
h-18: hari ke-18 fermentasi
h-21: hari ke-21 fermentasi

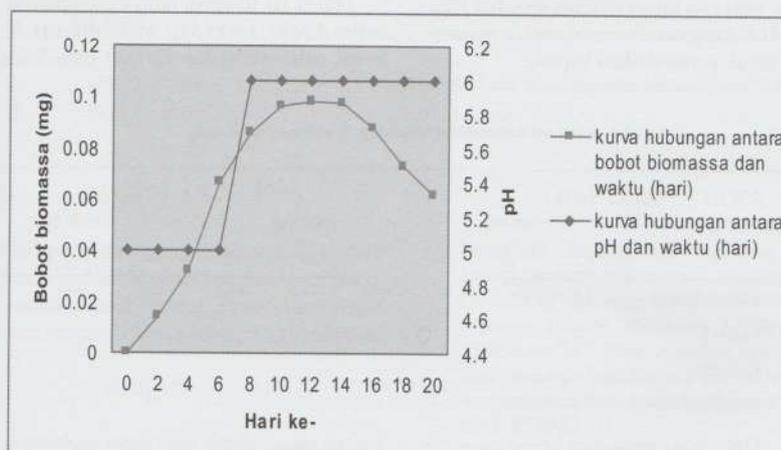
Gambar 2. Kromatogram lapis tipis ekstrak EtOAc kapang CZ.I.(O).5F.

Pengukuran pertumbuhan isolat kapang endofit CZ.I.(O).5F. Pertumbuhan isolat kapang endofit CZ.I.(O).5F diukur untuk mengetahui laju pertumbuhan kapang, yaitu dengan membuat kurva pertumbuhan sehingga dapat diketahui fase-fase pertumbuhan dari kapang CZ.I.(O).5F pada media biakan. Data kurva pertumbuhan ditunjukkan pada Tabel 3 dan kurva pertumbuhan kapang CZ.I.(O).5F dan pH-nya dapat dilihat pada Gambar 3.

Kurva pertumbuhan kapang menunjukkan bahwa waktu mempunyai hubungan yang erat dengan fase pertumbuhan kapang. Pada hari ke-1 sampai dengan hari ke-3, kapang mengalami fase lag, kapang beradaptasi dengan lingkungan. Sampai hari ke-4, kapang sudah menunjukkan adanya pertumbuhan. Hal ini berarti bahwa kapang mampu beradaptasi dan tumbuh pada media PDB. Kapang mengalami fase eksponensial dari hari

Tabel 3. Data kurva pertumbuhan CZ.I.(O).5F dalam 10 ml media PDB.

No.	Hari ke-	Bobot biomassa (mg)	pH
1	0	0	5
2	2	14,5	5
3	4	32,4	5
4	6	67,1	5
5	8	85,7	6
6	10	96,5	6
7	12	98,2	6
8	14	97,9	6
9	16	87,6	6
10	18	72,8	6
11	20	61,7	6



Gambar 3. Kurva pertumbuhan kapang CZ.I.(O).5F dalam 10 ml media PDB.

ke-4 sampai hari ke-11, hal ini terlihat pada kurva pertumbuhan kapang yang menunjukkan terjadinya peningkatan jumlah sel. Setelah hari ke-11 sampai hari ke-14, kurva pertumbuhan menunjukkan bahwa kapang mulai memasuki fase stasioner. Pada fase ini sel menjadi tua, laju pembiakan berkurang dan

beberapa sel mati karena menyusutnya nutrisi dalam media. Akan tetapi metabolisme pada fase ini masih terus berlangsung, dapat terlihat pada melimpahnya produk metabolisme yang cenderung menumpuk. Metabolit sekunder pada umumnya terbentuk pada fase ini yaitu pada saat populasi sel

Hal ini menunjukkan bahwa fraksi tersebut hanya mempunyai aktivitas terhadap bakteri Gram positif dengan daya antimikroba lemah. Kondisi ini terjadi kemungkinan akibat adanya perbedaan kepekaan pada bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif terhadap zat antibakteri yang terkandung dalam fraksi III. Seperti dikatakan Jawetz (1986), perbedaan kepekaan pada bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif terhadap zat antibakteri kemungkinan karena perbedaan struktur dinding sel, seperti jumlah peptidoglikan, jumlah lipid, ikatan silang, dan aktivitas enzim yang menentukan penetrasi, pengikatan, dan aktivitas antibakteri. *Staphylococcus aureus* yang termasuk bakteri

Gram positif, mempunyai struktur dinding sel yang berlapis tunggal dan mempunyai kandungan lipid rendah (1-4%), sedangkan *E. coli* yang termasuk bakteri Gram negatif mempunyai dinding sel dengan kandungan lipid tinggi (11-12%) dan struktur dinding sel yang berlapis tiga (*multilayer*) yaitu lipoprotein, membran luar fosfolipid dan lipopolisakarida. Senyawa yang terdapat pada fraksi III mampu merusak dinding sel dan membran sel yang menyebabkan materi (isi) sel keluar dari sel dan dapat mengganggu sintesis protein dari *S. aureus*. Hasil uji aktivitas antimikroba berdasarkan pengukuran diameter daerah hambat (DDH) ditunjukkan pada Tabel 4 dan Tabel 5.

Tabel 5. Hasil uji antifungi terhadap *S. cerevisiae*.

Mikroba uji	DDH								
	2500 bpj			5000 bpj			10000 bpj		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Nistatin	**	**	**	***	***	***	****	****	****
Fraksi I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fraksi II	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fraksi III	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fraksi IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etil asetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan:

* : DDH \leq 10 mm

** : DDH 11-15 mm

*** : DDH 16-20 mm

**** : DDH 21-25 mm

diameter kertas cakram: 6 mm

SIMPULAN

Dari hasil penelitian yang dilakukan diperoleh bahwa mikroba endofit hasil isolasi dari temu putih, *Curcuma zedoaria* asal Parung, Jawa Barat dapat menghasilkan senyawa kimia sebagai antimikroba.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dalam pemurnian fraksi III tersebut untuk mendapatkan struktur senyawa kimianya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada sdr. Lystiani atas asistensinya dalam melakukan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Prana MS. Temu Lawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). Buletin Kebun Raya Indonesia, Botanical Gardens of Indonesia. 1978. 3(6):191.
2. Matsuda, Hisashi, Morikawa T, Ninomiya K, and Yoshikawa M. 2001. Absolute stereostructure of carabrane-type sesquiterpene and vasorelaxant-active sesquiterpenes from zedoariae rhizome. Tetrahedron. 2001. 57:8433-53.
3. Petrini OTN, Siebeer LT, Viret O. Ecology, metabolite production and substrate utilization and endophytic fungi. Natural Toxin. 1992. p.185-96.
4. Strobel GA, Hess WM, Fund E, Sidhu RS, and Yang X. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. J Industrial Microbiol. 1996a. 17:417-29.
5. Strobel GA, Yang X, Sears J, Kramer P, Sidhu RS, and Hess WM. Taxol from pestatiopsis microspore, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. Microbiology. 1996b. 142:435-40.

6. Stierle A, Strobel G, Stierle D, Grothans P, and Bigunami G. The research for taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. J of nat Prod. 1995a. 58(9):1315-24.
7. Shibuya H, Agusta A, Ohashi K, Maehara S, and Simanjuntak P. Biooxidation of (+)-catechin and (-)-epicatechin into 3,4-dihydroxy flavan derivatives by the endophytic fungus *Diaporthe sp.* isolated from a tea plant. Chem Pharm Bull. 2005. 53(7):866-7.