

STUDI PENDAHULUAN MIKROBA ENDOFITIK PENGHASIL SENYAWA TERPEN DARI TANAMAN *Artemisia annua*

Titi Parwati¹⁾, Bustanussalam¹⁾, Partomuan Simanjuntak^{1,2)}

¹⁾Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI)
Jalan Raya Bogor Km 46 Cibinong 16911, Telp. (021)-875-4587; Fax. (021)-875-4588;
E-mail : tomujtk@indo.net.id

²⁾Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Srengsengsawah, Jagakarsa, Jakarta 12640

Abstract

Some endophytic microbes were isolated from medicinal plant Artemisia annua collected of Tawangmangu and Cibinong. Microbe isolate were made on corn meal malt agar supplemented with chloramphenicol and nutrient agar supplemented with nystatin from tissue subjected after the triple surface sterilization procedure.

The potencies of these isolates to produce-terpene compounds were screened by phytochemistry analysis, thin layer chromatography (tlc) and high performance liquid chromatography (hplc) after fermentation in four different medium. The results showed that 6 isolates from 17 microbe isolates can produce terpene compounds.

Keywords : *Artemisia annua, fermentation, endophytic, terpene*

PENGANTAR

Dewasa ini telah ditemukan suatu metode untuk memperoleh senyawa bioaktif tanaman dengan menggunakan medium dan mikroba endofitik. Mikroba endofitik adalah mikroba yang hidup di dalam jaringan tumbuhan. Penemuan mikroba endofitik ini telah dimulai oleh pakar-pakar biologi dan mikrobiologi yang telah berusaha untuk mendefinisikan istilah mikroba endofitik. De bary (1886) adalah orang pertama yang mendefinisikan endofitik sebagai mikroba yang berada dalam jaringan tanaman, dan berbeda dengan epifit yang ada di permukaan tanaman. Kemudian Corroll (1986) memberikan suatu definisi yaitu bahwa endofit adalah mikroba yang berkolonisasi pada bagian aerial jaringan tanaman yang tidak menyebabkan adanya tanda-tanda penyakit (termasuk mikroba patogenik dan mikoriza) yang hidup secara laten dalam tanaman inangnya (1,2).

Sedangkan Petrini (1991) menyatakan endofit adalah mikroba yang hidup di dalam jaringan tanaman, minimal selama periode tertentu dalam siklus hidupnya dan berkolonisasi dalam jaringan tersebut tanpa menyebabkan kerugian bagi inangnya (3).

Pada tahun 1991, Strobel memperluas definisi endofitik tersebut dengan membuat pernyataan bahwa endofit adalah mikroba yang berasosiasi dengan jaringan tanaman dan terjadi interaksi yang saling menguntungkan (*mutualistic symbiosis*). Tanaman memberikan nutrisi untuk mikroba, sedangkan mikroba mentransformasikan dan menghasilkan senyawa kimia (4).

Banyak publikasi yang melaporkan tentang mikroba-mikroba endofitik yang patogen dan endofit mikoriza, tetapi hanya sedikit sekali informasi tentang mikroba endofitik berguna yang dapat menghasilkan senyawa kimia yang berpotensi.

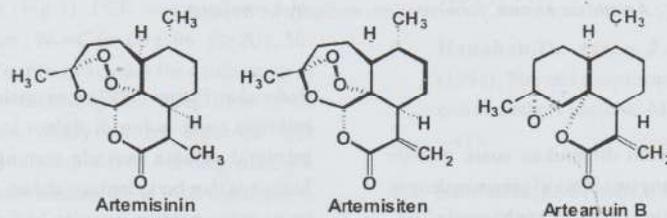
Strobel *dkk.* (1993) telah menemukan mikroba endofitik *Taxomyces andreanea* dari tanaman *Taxus brevifolia*, yang diketahui dapat menghasilkan senyawa kimia taksol sebagai anti kanker pada medium cair dalam waktu singkat (4.5).

Simanjuntak, *dkk.* (2002) telah berhasil mengisolasi beberapa mikroba endofitik dari tumbuhan Kina (*Cinchona* spp.), kemudian menginkubasikan dalam suatu kultur cair, dan dapat menghasilkan senyawa kimia alkaloid kuinin dan turunannya (6.7).

Indonesia adalah merupakan negara tropis yang kaya akan flora dan fauna yang dapat menjadi sumber mikroba endofitik yang masih belum tereksplorasi. Sangat diperlukan untuk mempelajari mikroba-mikroba yang unik ini seperti taksonomi, fisiologi dan sifat biokimiawinya untuk membuktikan keanekaragaman multifungsi dari kelompok mikroba

dan memungkinkan penemuan senyawa bioaktif baru yang sangat berguna untuk industri obat-obatan.

Salah satu tanaman obat yang dijumpai sebagai obat antimalaria adalah tanaman *Artemisia annua*. Tanaman ini sudah sangat terkenal di Cina pada ribuan tahun lalu. Dan banyak peneliti yang telah melakukan studi kimia dan farmakologi terhadap tanaman ini, seperti ditemukannya senyawa artemisinin (1) yang sangat efektif untuk mengobati pasien yang kena malaria, demikian juga beberapa senyawa lain yang merupakan turunan artemisinin, seperti artemisiten (2), artenuin (3) yang juga memberikan keaktifan sebagai antimalaria (8). Dikarenakan pembuatan preparasi senyawa artemisinin ini sangat sulit dan mahal, penelitian tentang mikroba endofitik dari tanaman ini sangat diperlukan.



Isolasi endofitik. Bagian aerial tanaman *A. annua* dipotong lebih kurang 1 cm panjangnya. Potongan selanjutnya dicuci dibawah air mengalir selama 10 menit. Setiap potongan selanjutnya disterilisasi dengan mencelupkannya ke dalam etanol 75% selama 1 menit, sodium hipoklorit 5,3% selama 5 menit, dan etanol 75% selama 1 menit. Potongan batang ditiriskan di atas kertas tissue steril lalu dibelah dengan bantuan pinset dan pisau steril. Belahan diletakkan di atas Corn Meal Malt Agar (CMM) yang mengandung kloramfenikol untuk mengisolasi kapang. Nutrient Agar (NA) yang mengandung nistatin untuk mengisolasi bakteri, dan Water Agar (WA) untuk mengisolasi bakteri dan kapang secara umum (9). Bagian dalam batang diletakkan menempel pada permukaan agar dan inkubasi dilakukan selama beberapa hari pada suhu ruang (30°C). Koloni kapang yang tumbuh selanjutnya dipindahkan ke dalam agar padat Sabouraud Dektrosa Agar (SDA), sedangkan koloni bakteri dipindahkan ke dalam agar padat NA. Pemurnian isolat dilakukan beberapa kali sampai diperoleh isolat murni dengan memindahkan isolat ke agar padat SDA atau NA yang baru. Isolat yang sudah murni dapat disimpan di dalam lemari pendingin bersuhu 5°C.

Kultur Cair Mikroba. Mikroba ditumbuhkan dalam Erlenmeyer berisi 100 ml medium cair. Ada empat jenis media yang digunakan dalam penelitian ini yaitu (i) medium cair Phoma (ii). Medium cair Soybean yeast ekstrak (iii). Medium cair Sabouraud Dextrose Broth (SDB) dan (iv). Media cair Fructose Dextrose Yeast (FDY) (5,10). Secara terpisah keempat jenis medium diinkubasi, pada suhu kamar dan kecepatan shaker 60 rpm selama 7 hari. Filtrat kemudian

diekstraksi dengan kloroform sebanyak 3 kali, dan fasa organiknya diuapkan pada penguap berpusing hingga membentuk krud (ekstrak).

Skrining mikroba endofitik yang memproduksi senyawa terpen dengan uji fitokimia.

0,05 g ekstrak dimaserasi dengan 10 mL eter selama 1 jam, dan kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh diuapkan, dan kemudian ditambahkan dengan 2 tetes asam asetat anhidrid dan beberapa tetes asam klorida. Jika larutan berwarna merah gelap menunjukkan adanya senyawa terpen, dan jika berwarna biru gelap menunjukkan senyawa steroid.

Analisis kromatografi lapis tipis (KLT). Ekstrak filtrat lainnya dilarutkan dalam 2-3 tetes kloroform, kemudian diuji pada analisis KLT (larutan pengembang *n*-heksan-etilasetat (2 : 1) dan dibandingkan dengan nilai R_f senyawa artemisinine standar. Sampel yang memberikan spot pada pola KLT, dilanjutkan dengan analisis kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan kondisi kolom : Spherisorb (3,9 mm x 300 mm); pelarut : *n*-heksan-etilasetat (5 : 1); Kecepatan alir : 1 µL/menit. Tekanan : 147-151 kg/cm³; panjang gelombang : 254 nm; dan vol. injeksi : 20 µL.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat mikroba endofitik

Hasil isolasi dan pemurnian mikroba endofitik dari tanaman *Artemisia annua* diperoleh 10 bakteri dan 7 kapang, dan tidak menunjukkan adanya khamir (Tabel 1).

Tabel 1. Beberapa mikroba endofit hasil isolasi dari *Artemisia annua*

No	Isolat mikroba	Morfologi	Uji fitokimia				Rf (KLT)			
			1	2	3	4	1	2	3	4
1	Bakteri AT11	Krem kecoklatan, bulat, tepi halus	+	-	-	-	0,88	-	-	-
2	AT12	Putih, bulat besar	+	-	-	-	0,88	-	-	-
3	AT13	Putih, bulat kecil, permukaan berbintik-bintik	-	-	-	-	-	-	-	-
4	AT14	Putih, bulat besar, permukaan berbintik-bintik	-	-	-	-	-	-	-	-
5	AT311	Putih, bulat besar	-	-	-	-	-	-	-	-
6	AT312	Putih, bulat besar	-	-	-	-	-	-	-	-
7	AT331	Putih krem, tepi tidak rata, berlendir	-	-	-	-	-	-	-	-
8	AC11	Putih, bulat kecil, tepi tidak rata	-	-	-	-	-	-	-	-
9	AC12	Putih, bulat kecil, tepi tidak rata	-	-	-	-	-	-	-	-
10	AC14	Putih, bulat kecil	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Kapang AT21	Putih, serabut, bergumpal	+	-	+	+	0,40	-	0,40	0,40
12	AT22	Putih, serabut halus	+	-	+	+	0,40	-	0,40	0,40
13	AT31	Merah mudah pucat, serabut bergumpal	-	-	+	+	-	-	0,40	0,40
14	AT32	Putih, serabut, bergumpal	-	+	+	+	-	0,40 0,70 0,80	0,40	0,40
15	AT33	Putih, serabut halus di tepi, tebal di pinggir	-	-	-	-	-	-	-	-
16	AC21	Putih, serabut halus	-	-	-	-	-	-	-	-
17	AC41	Putih, serabut halus	-	-	-	-	-	-	-	-
	Artemisinin standard							0,88		

AT : *Artemisia annua* dari Tawangmangu

AC : *Artemisia annua* dari Cibinong

1 : Ekstrak dari Phoma media

2 : Ekstrak dari SYP media

3 : Ekstrak dari SDB media

4 : Ekstrak dari FDY media

Rf artemisinin standar = 0,88

(+) : Positif untuk uji terpen

(-) : Negatif untuk uji terpen

Mikroba endofitik yang diperoleh, kemudian ditumbuhkan dalam agar miring SDA. Medium ini digunakan setelah pada penelitian sebelumnya mikroba menunjukkan pertumbuhan yang tidak baik pada medium PDA, yaitu suatu medium yang seringkali digunakan untuk mikroba golongan kapang. Berdasarkan komposisinya, medium PDA memang cenderung lebih sederhana dibandingkan dengan medium SDA. Ada kemungkinan medium dengan komposisi yang masih lebih banyak protein lebih sesuai untuk isolat mikroba endofitik yang diuji ini.

Dari seluruh mikroba endofitik yang berhasil diisolasi, hanya ditemukan bakteri dan kapang saja, sementara khamir tidak ditemukan. Penelitian lebih lanjut kiranya perlu dilakukan untuk mengetahui apakah habitus tanaman *A. annua* yang berupa herba kurang memungkinkan bagi golongan khamir yang biasanya hidup di lapisan *floem* atau *xylem* tanaman berbatang kayu untuk berkembang dengan baik. Kemungkinan lain yang perlu dicermati adalah kondisi dalam jaringan tanaman seperti keasaman, nutrisi dan lain-lain yang mungkin dapat menghambat pertumbuhan khamir.

Isolat yang diperoleh difermentasikan dalam 4 jenis medium yang berbeda untuk melihat potensi mikroba dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder terpen. Penggunaan keempat medium ini adalah berdasarkan pada penelusuran daftar pustaka, khusus medium yang dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder (4,10).

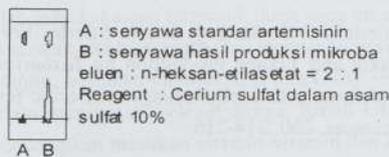
Mikroba yang menunjukkan hasil positif kebanyakan diisolasi dari tanaman *A. annua* yang berasal dari Tawangmangu Jawa Tengah, sementara isolat dari tanaman yang berasal dari daerah Cibinong tidak ada menunjukkan produksi senyawa terpen sebagai senyawa metabolit sekunder. Kondisi dan asal tanaman kemungkinan mempengaruhi isolat yang tumbuh, yang mana tanaman *A. annua* dari Cibinong berasal dari kalus hasil kultur jaringan, dan

ada kemungkinan besar bahwa tanaman tersebut telah mengalami sterilisasi. Tanaman ini baru terinfeksi dengan mikroba setelah ditanam di kebun percobaan sehingga kemungkinan terdapatnya mikroba endofitik menjadi berkurang dan mikroba yang diperoleh sangat berbeda dengan mikroba endofitik asal Tawangmangu. Kondisi tanah dan iklim yang sangat berbeda antara daerah Cibinong dan Tawangmangu juga dapat mempengaruhi adanya kemungkinan mikroba endofitik yang spesifik terdapat pada tanaman *A. annua* asal Tawangmangu.

Hasil Uji fitokimia dan KLT

Dari hasil uji fitokimia diperoleh bahwa reaksi untuk senyawa terpen yang memberikan warna merah gelap ditunjukkan oleh hasil fermentasi mikroba AT11, AT12, AT21, AT22, AT31 dan AT32 yang tergantung medium yang diberikan (Lihat Tabel 1). Kemudian berdasarkan analisis KLT (adsorben silica gel; pelarut *n*-heksan-etilasetat (2:1) yang dibandingkan dengan senyawa artemisinin standar ditunjukkan bahwa ada kemungkinan mikroba AT11 dan AT12 dapat memproduksi senyawa kimia seskuioterpen artemisinin yang mempunyai Rf yang sama yaitu 0,88.

Hasil analisis Kromatografi cair kinerja tinggi [(KCKT); pelarut asetonitril-air 1:1], kolom μ -Bondapak] untuk senyawa hasil fermentasi AT11 dan AT12 juga memberikan retensi waktu (R_t) yang sama dengan senyawa standar artemisinin pada 9,15 menit.



Gambar 2 : Analisis KLT untuk senyawa hasil produksi mikroba AT11 (atau AT12)

Kesimpulan

Dari 17 mikroba endofitik yang diisolasi dari tanaman *Artemisia* spp. hanya 6 mikroba dapat memproduksi senyawa terpen, dan kemudian 2 dari mikroba tersebut memberikan Rf (analisis KLT) dan Rt (analisis KCKT) yang sama dengan senyawa standar artemisinin.

Daftar Pustaka

1. Corroll, G.C., 1986. The biology of endophytes in plants with particular reference to woody perennials, dalam Fokkema N.J. Van den Hewel (Editor), *Mycrobiology of the phyllosphere*, Cambridge, Cambridge University Press, 205-222
2. Chapela, I., and L. Boddy, 1989. Fungal colonization of attached beech branch II. Spatial and temporal organization of communities arising from latent in vaders in and functional, under different moisture regions. *New Phytologist* 110, 44-57
3. Petrini, O., 1991. Fungal endophytes of the leaves, p. 173-197, dalam *Microbial ecology of leaves*, J.H. Andrens (editor), Springer-Verlag, New York
4. Strobel, G., A. Stierle, and W.M. Hess. 1993. Taxol formation in Yew-Taxus. *Plant Sciences*, 92, 1 - 12
5. Stierle, A., G. Strobel, dan A. Stierle, 1993. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreana*, an Endophytic fungus on Pacific Yew, *Sciences*, 260, 214-216
6. Simanjuntak, P., Titi Parwati, Bustanussalam, Titik K.Prana dan H. Shibuya. 2002

Ucapan Terima kasih

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Prof. Hirotaka Shibuya, Fac. of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University, Fukuyama-Hiroshima, Japan atas saran-saran dan bantuan dana yang diberikan untuk melakukan penelitian ini.

- Biochemical character of endophyte microbes isolated from *Cinchona* plants. *Proceeding in Biotechnology for sustainable utilization of biological resources in the tropics, JSPS-NCRT/ DOST/ LIPI/VCC Joint Seminar*, Bangkok Nov., 7-9, 2001, hal. 356-359
7. Simanjuntak, P., Titi Parwati, Bustanussalam, Titik K. Prana dan H. Shibuya. 2002. Produksi alkaloida kuinina oleh beberapa mikroba endofit dengan penambahan zat induser. *Majalah farmasi Indonesia* 13 (1), hal. 1 - 6
8. Tan, R.X., W.F. Zheng, and H.Q. Tang. 1998. Biologically active Substances from the genus *Artemisia*. *Planta Medica*, 64, 295 - 302
9. Ando, K., 2000. Isolation and Identification of tropical fungi imperfecti, dalam *Workshop Isolasi dan identifikasi fungi imperfekti daerah tropis*, Pusat Antar Universitas (PAU) Pangan dan Gizi, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta, hal. 1 - 85
10. Kobinata, K., and H. Osada. 2000. Exploitation and a rapid detection method of bioactive compounds from microorganism