

UJI SENYAWA BIOAKTIF ANTIOKSIDAN/ANTIKANKER HASIL BIOPRODUKSI KAPANG ENDOFIT DARI TANAMAN *Curcuma* sp.

Arif Soeksmanto, Partomuan Simanjuntak, Titik K. Prana, Yatri Hapsari, Fauzy Rachman, Bustanussalam, dan Yoice Srikandace

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

ABSTRAK

Mikroba endofit hidup intraseluler di dalam jaringan tanaman yang sehat dan diduga memiliki potensi yang tidak terbatas sebagai sumber antibakteri, antijamur, hormon pertumbuhan, insektisida, immuno suppressant, enzim dan senyawa-senyawa lainnya. Selain itu pemanfaatan mikroba endofit diharapkan dapat mencegah kelestarian tanaman yang menjadi komponen utama dalam pembuatan jamu-jamuan. Kegiatan penelitian produksi senyawa bioaktif (antioksidan/antikanker) hasil bioproduksi kapang endofit dari tanaman *Curcuma* spp. dilakukan dengan mengkolleksi 71 isolat kapang endofit. Rincian dari kapang-kapang endofit tersebut terdiri dari 6 isolat kapang dari *C. longa* asal Anyer, 5 isolat kapang dari *C. longa* asal Bogor, 5 isolat kapang dari *C. longa* asal Cibinong, 7 isolat kapang dari *C. longa* asal Yogyakarta, 14 isolat kapang dari *C. longa* asal Serang, 5 isolat kapang dari *C. longa*, 5 isolat kapang dari *C. xanthorrhiza*, 10 isolat kapang dari *C. zedoary* dan 7 isolat kapang dari *C. aeruginosa* yang seluruhnya didapatkan dari Serang, serta 4 isolat kapang dari *C. longa*, 1 isolat kapang dari *C. aeruginosa*, 1 isolat kapang dari *C. xanthorrhiza*, 1 isolat kapang dari *C. zedoary* dan 2 isolat kapang dari *C. mangga* yang seluruhnya berasal dari Jawa Tengah. Hasil analisis pola kromatografi lapis tipis (KLT) terhadap isolat-isolat kapang endofit, diketahui bahwa terdapat 31 isolat kapang endofit dari *C. longa* serta masing masing 1 isolat isolat kapang endofit dari *C. xanthorrhiza*, *C. zedoary* dan *C. aeruginosa* yang menunjukkan aktivitas bioproduksi. Sementara hasil uji aktivitas antimikroba yang dilakukan mendapatkan 6 isolat kapang endofit.

Kata kunci :Kapang endofit, *Curcuma* spp.. Bioproduksi, Kromatografi Lapis Tipis, antimikroba

PENDAHULUAN

Kapang endofit hidup intraseluler di dalam jaringan tanaman sehat, sehingga kemungkinan terjadi rekombinasi genetik dengan inangnya. Oleh karena itu kapang endofit berpotensi untuk dikembangkan sebagai alat untuk memproduksi senyawa kimia alami yang tidak terbatas, sebagai sumber antibakteri, antifungi, hormon pertumbuhan tanaman, insektisida, immuno suppressant, dsb (Tan & Zou, 2001). Beberapa kapang endofit telah terbukti menghasilkan senyawa alami yang memiliki karakteristik seperti inangnya. Contohnya adalah kapang endofit *Taxomyces andreanae* yang diisolasi dari *Taxus brevifolia* (Stierle *et al.*, 1993; 1995a). Bahkan jenis kapang endofit *Taxomyces wallachiana* dapat menghasilkan taxol dalam jumlah yang layak untuk diproduksi secara komersial (Stierle *et al.*, 1995b).

Produk kapang endofit juga dapat berperan sebagai biotransformator yang mengubah senyawa-senyawa prekursor menjadi bentuk derivat yang lebih aktif dari senyawa asalnya. Contohnya kapang endofit dari tanaman teh (*Diaporthe* sp.) yang mengubah senyawa (+)-katehin dan (-)-epikatehin menjadi senyawa derivat 3,4 dihidroksiflavan yang memiliki aktivitas yang lebih tinggi terhadap sel kanker dibandingkan dengan katehin yang dihasilkan tanaman inangnya (Agusta *et al.*, 2005). Selain itu kapang endofit *Xylaria* sp. tanaman kina (*Cinchona succirubra*). yang mentransformasi senyawa alkaloid kinkona (kuinin, kuinidin, sinkonidin dan sinkonin) menjadi derivatnya (kuinin N-oksida, kuinidin N-oksida, sinkonidin N-oksida, sinkonin N-oksida) menghasilkan produk yang lebih tinggi secara kuantitas

dibanding kinkona hasil tanaman inangnya (Simanjuntak *et al.*, 2002).

Selain itu, kapang endofit dapat juga dimanfaatkan untuk upaya pelestarian tanaman, khususnya tanaman yang sering dijadikan komponen utama pembuatan jamu. Misalnya tanaman *Aglaiia* sp. yang mengandung senyawa cyclopentatetrahydrobenzofuran rhamnosida, derivat rocaglaol dan rocaglamida untuk pestisida dan antijamur (Xu, 2000); *Alyxia reindwardii* (pulasari) yang mengandung pinoresinol, yang merupakan prekursor obat anti kanker podophylotoxin (Lucy *et al.*, 1998; Leuscher 1998, Hartini 2003). Kedua jenis tanaman tersebut nyaris punah bila terus menerus harus dieksplorasi tanpa upaya pelestarian yang layak.

Penelitian ini difokuskan pada kapang endofit tanaman *Curcuma* spp, mengingat *Curcuma* spp. khususnya *Curcuma longa* secara tradisional dikenal memiliki banyak manfaat seperti untuk zat pewarna, bahan aromatika, stimulant, penghasil senyawa kurkuminoid yang telah dikomersilkan sebagai minuman sehat, antioksidan, hepatoprotektor, obat untuk mengatasi gangguan hormonal, pencernaan, peredaran darah, anti inflamasi, anti pembekuan darah, metabolisme lipida, antibakteri, antijamur. antikanker dsb.

Temu-temuan (*Curcuma* spp.) merupakan salah satu jenis tumbuhan yang sudah sangat luas digunakan untuk pengobatan tradisional di Indonesia. Tanaman ini mengandung senyawa kurkuminoid yang terdiri atas senyawa kurkumin dan turunannya seperti deksmetoksikurkumin dan bisdesmetoksikurkumin

(Rasmussen *et al.*, 2000). Senyawa tersebut termasuk dalam kategori GRAS (General Recognition of Safety) yang aman untuk dikonsumsi dan tanpa memiliki efek samping meski dikonsumsi hingga 8 gr per hari.

Beberapa jenis temu-temuan seperti kunyit putih (*Curcuma zedoaria* (Berg) Rose), kunyit (*Curcuma longa*), temulawak (*Cucurma xanthorrhiza* Roxb), temu putih (*Cucurma alba*), dan temu mangga (*Cucurma mangga*) dilaporkan dapat mengatasi berbagai penyakit seperti gangguan hormonal, pencernaan, peredaran darah, hepatoprotektif, anti inflamasi, anti pembekuan darah, anti mikroba, antioksidan sampai antikanker (Ammon, 1991; Sari & Wigati, 2000). Bahkan *Curcuma* spp. khususnya *C. longa* sudah sejak lama digunakan secara tradisional sebagai zat pewarna, bahan pengharum makanan serta telah dikomersilkan sebagai minuman kesehatan.

Menurut Kuttan (1985) pemberian 0.4 mg/ml ekstrak etanol dan 1-4 µg/ml senyawa kurkuminoid *C.*

longa dapat menghambat pertumbuhan kultur sel tumor, melalui mekanisme yang mirip taksol. Senyawa kurkuminoid juga memiliki efek antikarsinogenik (Mukundan *et al.*, 1993), menghambat pertumbuhan *Helicobacter pylori* dan kanker usus besar dengan memblok ikatan NF-Kappa β pada sel epitelial yang terinfeksi *H. pylori* (Mahady, 2002), menaikkan imunitas tubuh dan menghentikan angiogenesis (Mitchell, 2002)

Pada penelitian ini akan dilakukan koleksi dan isolasi kapang endofit dari tanaman *Curcuma* spp. untuk diuji kemampuan bioproduksi senyawa metabolitnya. Hal tersebut mengingat akan kapang endofit yang berdasarkan studi literature berpotensi menghasilkan senyawa metabolit (Tan & Zou, 2001), kebutuhan mediana lebih sederhana, murah dan penanganannya relatif lebih mudah dibandingkan bakteri.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan penelitian yang digunakan adalah rimpang akar tanaman *Curcuma* spp. (*C. longa*, *C. aeruginosa*, *C. xanthorrhiza*, *C. zedoary* dan *C. mangga*) yang koleksi dari beberapa daerah seperti Anyer, Bogor, Cibinong, Yogyakarta, Serang, Parung dan Jawa Tengah. Rimpang akar tanaman tersebut selanjutnya dicuci dengan hingga bersih dan dibilas dengan air suling. Sampel rimpang akar tanaman dipotong 2-3 cm kemudian direndam dalam alkohol 70% v/v selama 10 menit, dibilas air steril dan direndam dalam larutan chlorox 75 % v/v selama 60 menit. Selanjutnya sampel potongan tanaman tersebut dibilas tiga kali dengan air steril dan ditanam pada media potato dekstrose broth (PDB) untuk diinkubasi selama 3-14 hari. Sampel potongan tanaman yang tidak terkontaminasi, secara aseptis dipotong bagian tengahnya dan dipindahkan ke dalam media PDB baru.

Miselium yang tumbuh dari potongan tanaman sampel, selanjutnya dipindahkan ke media PDB baru. Menurut Pulici *et al.*, (1997) subkulturasi dan pemisahan kapang dilakukan setelah kultur kapang endofit berumur 28 hari. Sedangkan komposisi media yang digunakan terdiri atas 15 g agar, 15 g PDB, 15 g serbuk tanaman inang, 0.2 g kloramfenikol dan ditambahkan air suling hingga 1 liter.

Isolat kapang endofit diidentifikasi (secara makroskopis dan mikroskopis) untuk mendapatkan

kultur murni dan digunakan sebagai kultur induk untuk kultivasi in vitro. Kultivasi kapang endofit pada kultur in vitro dilakukan sebagai berikut. Media PDA steril disiapkan dalam bentuk agar miring dan media cair (40 ml) dalam erlenmeyer 300 ml yang telah sterilisasi dengan autoclave pada suhu 121 °C selama 20 menit serta diinkubasi 3 hari untuk membuktikan sterilitasnya. Kapang endofit hasil isolasi (kultur induk) ditumbuhkan dalam media agar miring PDA diinkubasi selama 3 sampai 7 hari, untuk digunakan sebagai inokulum kultivasi pada media cair. Selanjutnya inokulum kapang diambil menggunakan “ose” dan ditumbuhkan pada 40 ml media cair PDB dalam labu Erlenmeyer 300 ml. Kultur dilakukan dengan cara kultur permukaan dengan suhu kamar dan dalam kondisi gelap selama 14 sampai 56 hari.

Kultur endofit dipanen setelah berumur 30 hari dan disaring menggunakan corong Buhner. Selanjutnya miselia dicuci menggunakan air suling sebanyak dua kali. Media dan air bilasan miselia diekstraksi dengan etil asetat pada volume yang sama dan digoyang selama 4 jam dengan rotary shaker (modifikasi). Proses ekstraksi ini dilakukan sebanyak 3 kali untuk mendapatkan fase etilasetat yang akan diamati kandungan senyawa kimianya menggunakan KLT.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi dan pemurnian kapang endofit dari *Curcuma* spp. (*C. longa*, *C. aeruginosa*, *C. xanthorrhiza*, *C. zedoary* dan *C. mangga*) dari beberapa daerah (Anyer, Bogor, Cibinong Yogyakarta, Serang, Parung dan Jawa Tengah) diperoleh sebanyak 71 isolat kapang endofit.

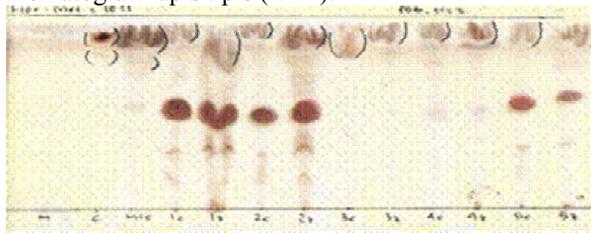
Rincian dari kapang-kapang endofit tersebut terdiri dari 6 isolat kapang dari *C. longa* asal Anyer, 5 isolat kapang dari *C. longa* asal Bogor, 5 isolat kapang dari *C. longa* asal Cibinong, 7 isolat kapang dari *C. longa* asal Yogyakarta, 14 isolat kapang dari *C. longa* asal Serang,

5 isolat kapang dari *C. longa*, 5 isolat kapang dari *C. xanthorriza*, 10 isolat kapang dari *C. zedoary* dan 7 isolat kapang dari *C. aeruginosa* yang seluruhnya didapatkan dari Serang, serta 4 isolat kapang dari *C. longa*, 1 isolat kapang dari *C. aeruginosa*, 1 isolat kapang dari *C. xanthorriza*, 1 isolat kapang dari *C. zedoary* dan 2 isolat kapang dari *C. mangga* yang seluruhnya berasal dari Jawa Tengah. Selanjutnya sebagian dari 71 isolat kapang yang berhasil dikoleksi tersebut telah diuji kemampuannya dalam bioproduksi dan antimikroba.

Hasil koleksi *C. longa* asal Anyer, diperoleh sebanyak 6 isolat kapang endofit yang diuji kemampuan bioproduksinya. Dari 6 isolat kapang tersebut, diketahui terdapat 2 isolat kapang (Cl.Ay.4F dan Cl.Ay.6F yang ditumbuhkan pada media Syp, Pdb dan Sln), 3 isolat kapang (Cl.Ay.1F; Cl.Ay.2F dan Cl.Ay.3F pada media Sabr. dan Sln) serta 1 isolat kapang (Cl.Ay.5F pada media Sln) menunjukkan adanya noda pada analisis kromatografi lapis tipis (KLT). Melalui pengujian antimikroba terhadap isolat kapang tersebut diketahui bahwa isolat Cl.Ay.4F (dengan media Pdb) dan isolat Cl.Ay.6 (dengan media Syp) menunjukkan adanya aktivitas antimikroba.

Hasil koleksi *C. longa* asal Bogor, diperoleh sebanyak 5 isolat kapang endofit. Terdapat 3 isolat kapang (Cl.Bg.2F; Cl.Bg.4F dan Cl.Bg.5F yang ditumbuhkan pada media Sabr. dan Sln) serta 1 isolat kapang (Cl.Bg.3F pada media Pdb dan Sln) menunjukkan adanya noda pada analisis kromatografi lapis tipis (KLT). Melalui pengujian antimikroba terhadap isolat kapang tersebut diketahui bahwa isolat Cl.Bg.3F (dengan media Pdb) menunjukkan adanya aktivitas antimikroba.

Hasil koleksi *C. longa* asal Cibinong, diperoleh sebanyak 5 isolat kapang endofit. Dari 5 isolat kapang tersebut terdapat 2 isolat kapang (Cl.Cb.2F dan Cl.Ay.5F yang ditumbuhkan pada media Pdb, Sabr, Sln dan Cz), 1 isolat kapang ((Cl.Cb.1F pada media Pdb dan Sln) serta 2 isolat kapang (Cl.Cb.3F dan Cl.Ay.4F pada media Sln) menunjukkan adanya noda pada analisis kromatografi lapis tipis (KLT).



Gambar 1. Pola KLT senyawa kimia bioproduksi/ biotransformasi kapang endofit asal Cibinong yang menunjukkan aktivitas bioproduksi dalam media PDB

Keterangan :

System pelarut: CHCl₃-MeOH = 10 : 1

Penampak noda: Ce(SO₄)₂ dalam H₂SO₄

M : media PDB

C : kurkumin

p-3 : bioproduksi oleh endofit 3

b-3 : biotrans oleh endofit 3

p-1 : bioproduksi oleh endofit 1

b-1 : biotrans oleh endofit 1

p-2 : bioproduksi oleh endofit 2

b-2 : biotrans oleh endofit 2

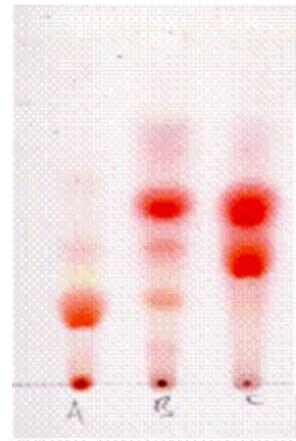
p-4 : bioproduksi oleh endofit 4

b-5 : biotrans oleh endofit 4

p-5 : bioproduksi oleh endofit 5

b-5 : biotrans oleh endofit 5

Hasil koleksi *C. longa*, *C. xanthorriza*, *C. zedoary* dan *C. aeruginosa* asal Parung, diperoleh sebanyak 27 isolat kapang endofit. Kapang tersebut selanjutnya ditumbuhkan pada media Pdb untuk diuji kemampuan bioproduksinya menggunakan KLT. 4 isolat kapang dari *C. Longa* (Cl.Pa.1F; Cl.Pa.2F; Cl.Pa.3F dan Cl.Pa.4F), 1 isolat kapang dari *C. xanthorriza* (Cx.Pa.1F), 1 isolat kapang dari *C. zedoary* (Cz.Pa.O.5F) dan 1 isolat kapang dari *C. aeruginosa* (Ca.Pa.3F) menunjukkan adanya noda pada analisis kromatografi lapis tipis (KLT). Melalui pengujian antimikroba terhadap sebagian dari isolat kapang tersebut diketahui bahwa isolat Cl.Pa.4F; Cz.Pa.O.3F dan Cz.Pa.O.5F (ditumbuhkan pada media PDB) menunjukkan adanya aktivitas antimikroba.



System pelarut: *n*-hek-etilasetat = 2 : 1
Penampak noda: Ce(SO₄)₂ dalam H₂SO₄

Gambar 2. Pola KLT senyawa kimia bioproduksi/biotransformasi kapang endofit asal Parung, Bogor yang menunjukkan aktivitas bioproduksi dalam media PDB

Hasil koleksi *C. longa* asal Yogyakarta, diperoleh sebanyak 7 isolat kapang endofit. Dari 7 isolat kapang tersebut terdapat 1 isolat kapang (Cl.Dg.4F yang ditumbuhkan pada media Pdb dan Sabr) serta 6 isolat kapang (Cl.Tg.1F; Cl.Tg.2F; Cl.Tg.3F; Cl.Dg.1F; Cl.Dg.2F dan Cl.Dg.3F pada media Sabr) menunjukkan adanya noda pada analisis kromatografi lapis tipis (KLT).

Hasil koleksi *C. longa* asal Serang, diperoleh sebanyak 14 isolat kapang endofit. Dari 14 isolat kapang tersebut terdapat 1 isolat kapang (Cl.Bk.5F yang ditumbuhkan pada media Pdb, Sabr dan Cz), 1 isolat kapang (Cl.Bel.2F pada media Pdb dan Cz) serta 3 isolat kapang (Cl.Bel.5F; Cl.Bel.7F dan Cl.Bk.6F pada media Sabr) menunjukkan adanya noda pada analisis kromatografi lapis tipis (KLT).

Hasil koleksi *C. longa* asal Jawa Tengah, diperoleh sebanyak 4 isolat kapang yang ditumbuhkan pada media Pdb untuk diuji kemampuan bioproduksinya

menggunakan KLT. Dari hasil tersebut diketahui 1 kapang (Cl.Ci.2F) menunjukkan adanya noda pada analisis kromatografi lapis tipis (KLT). Sedangkan koleksi *Curcuma* asal Jawa Tengah lainnya, diperoleh sebanyak 1 isolat (*C. xanthorriza*), 1 isolat (*C. zedoary*) dan 2 isolat (*C. mangga*) belum dilakukan pengujian

bioproduksi. Melalui pengujian antimikroba terhadap sebagian dari isolat kapang tersebut diketahui bahwa isolat Cl.Ci.2F; Ca.Pl.1F dan Cz.Pl.1F (ditumbuhkan pada media PDB) menunjukkan adanya aktivitas antimikroba.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Wida Trisanti, Yadi, Indra, Erik, Ferdian dan Sharil atas bantuannya selama penelitian ini berlangsung

DAFTAR PUSTAKA

- Agusta A, Maehara S, Ohashi K, Simanjuntak P & Shibuya H. 2005. Stereoselective oxidation at C-4 of flavans by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. isolated from a tea plant. *Chem. Pharm. Bul.* 53 (12), p. 1565-1569
- Ammon HPT, & Wahl MA. 1991. Pharmacology of *Curcuma longa* *Planta Medica* 57, h. 1 – 7
- Hartini. 2003. Identifikasi dan analisis kuantitatif (+)-pinoresinol dari tanaman *Alyxiare indwarii* BL yang berasal dari Tawangmangu secara KLT Densitometri, Skripsi pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Kuttan R, Bhanumathy P, Nirmala K, & Gorge MC. 1985. Anticancer activity of turmeric, *Cancer Lett.*, 29, h. 197-202
- Lucy P, Meagher, Gary R, Beecher, Vincent P, Flanagan, & Libetty W. 1998. Isolation and characterization of the Lignans, Isolaricireionol and Pinoreresinol in Flaxseed Meal. *Tektran*, 1- 09-2003. <http://www.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/000009/53/0000095351.html>.
- Mahady GP, Pendland SL, Yun G & Lu ZZ. 2002. Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group I carcinogen, *Anticancer Res.* 6, 4179-4181
- Mitchell T, July 2002, *Le Magazine* A report on curcumin's <http://www.sciencedaily.com>
- Mukundan MA, Chacko MC, Annapurna VV & Krishnaswamy K. 1993. Effect of turmeric and curcumin on BP-DNA adducts. *Carcinogenesis* 14 (3), 493-496
- Pulici M, Sugawara F, Koshino H, Okada G, Esumi Y, Uzawa J, & Yoshida S. 1997. Metabolites of *Pestalotiopeis* spp. Endophytic fungi of *Taxus braevifolia*. *Phytochemistry*, 46, 2. 313-319.
- Rassmusen HB, Christiansen SB, Kvist LP & Karazmi A. 2000. A simple and efficient separation of the curcumins, the antiprotozoal constituents of *Curcuma longa*. *Planta Medica* 66, 396-397
- Sari IP & Wigati S. 2000. Uji Ketoksikan Akut Temu Putih (*Cucurma zedoaria*. Rose. Berg) dan Kunyit Putih (*Cucurma mangga*) pada Tikus Galur Wistar. Kongres Nasional Obat Tradisional Indonesia (Simposium Penelitian Bahan Obat Alami X). Surabaya, 20 – 22 Nopember. h176
- Simanjuntak P, Bustanussalam, Prana TK, Ohashi K, & Shibuya H. 2002. Biotransformasi senyawa alkaloid kinkona oleh kapang *Xylaria* sp. Menjadi alkaloid kinkona N-oksida. *Majalah farmasi Indonesia* 13 (2), h. 95-100
- Stierle A, Strobel G & Stierle D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* 260, 214-216.
- Stierle A, Strobel G, Stierle D, Grothans P & Bigunami G. 1995a. The research for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific Yew, *Taxus brevifolia*. *J. of Nat. Prod.*, 58, no 9, 1315-1324
- Stierle A, Stierle D, Strobel GA, Bignami G, & Grothaus P. 1995b. Bioactive metabolite of the endophytic fungi of pasific yew *Taxus brevifolia*. *American Chemical Society* 6, 81-96
- Tan RX & Zou WX. 2001. Endophytes a rich source of fungsional metabolites. *J. Nat. Prod. Rep.*, 18, 448-459.
- Xu YY. 2000. Flavonol Cynnamate cyclo adduct and diamede derivatives from *Aglaia laxiflora*. *J Nat Prod.* 63, 473-476.