

## NEROLIDOL, KOMPONEN KIMIA AROMATIK TANAMAN TEH YANG JUGA DIPRODUKSI OLEH JAMUR ENDOFIT *Schizophyllum* sp. D\* [Nerolidol, an Aromatic Chemical Constituent of Tea Plant that Produce by an Endophytic Fungi *Schizophyllum* sp. D]

Andria Agusta

Laboratorium Fitokimia, Bidang Botani, Puslit Biologi LIPI, Jl. Raya Bogor Km. 46, Cibinong 16911.

E-mail: bislunatin@yahoo.com.

### ABSTRACT

Cultivation of an endophytic fungus *Schizophyllum* sp.D, isolated from a tea plant *Camellia sinensis* (L.) O.K. in liquid medium PDB, on a rotary shaker at 100 rpm at room temperature (26 – 30 °C) produced a major metabolite with a production capacity of 56.7 mg/L. Structure elucidation based on MS, NMR spectra and published data showed that metabolite is nerolidol. This chemical compounds is one of important aromatic chemical constituent that contribute to tea aroma and defense system in a tea plant.

**Key Words:** Tea plant, *Camellia sinensis*, endophytic fungus, *Schizophyllum* sp., nerolidol.

### ABSTRAK

Kultivasi jamur endofit *Schizophyllum* sp. D yang diisolasi dari tanaman teh, *Camellia sinensis* (L.) O.K. dalam medium cair PDB, pada sebuah *rotary shaker* dengan kecepatan agitasi 100 rpm pada suhu ruang (26 – 30 °C) menghasilkan satu metabolit utama dengan kapasitas produksi 56,7 mg/L. Elusidasi struktur kimia berdasarkan data MS, RMI dan data terpublikasi memperlihatkan bahwa metabolit tersebut adalah nerolidol. Senyawa nerolidol merupakan salah satu komponen kimia aromatik yang berkontribusi terhadap aroma teh dan sekaligus terhadap sistem pertahanan tanaman teh.

**Kata kunci:** Tanaman teh, *Camellia sinensis*, jamur endofit, *Schizophyllum* sp., nerolidol.

### PENDAHULUAN

Jamur endofit, yaitu jamur yang hidup berasosiasi dengan jaringan tumbuhan sehat (Bacon dan White, 2000) telah dikenal sebagai produsen metabolit sekunder dengan aktivitas biologi yang variatif (Tan dan Zou, 2001; Zhang *et al.*, 2006). Berbagai golongan senyawa kimia seperti terpena, alkaloid, kuinona dan lain sebagainya telah dilaporkan sebagai metabolit dari kultur berbagai jenis jamur endofit (Zhang *et al.*, 2006).

Beberapa jenis mikroba endofit, terutama jamur endofit dilaporkan memiliki kemampuan untuk memproduksi komponen kimia yang dikenal sebagai metabolit sekunder pada tumbuhan inangnya. Jamur endofit *Taxomyces andreanae* yang berasosiasi dengan tumbuhan *Taxus brevifolia* memiliki kemampuan untuk memproduksi senyawa taxol pada medium semisintetik di laboratorium (Stierle *et al.*, 1993). Senyawa antikanker podofilotoksin yang merupakan metabolit sekunder tumbuhan *Podophyllum peltatum* belakangan juga diidentifikasi sebagai metabolit yang dapat diproduksi oleh jamur endofit *Phialocephala fortinii*

yang diisolasi dari tumbuhan tersebut (Eyberger *et al.*, 2006). Salah satu jamur endofit yang tidak teridentifikasi yang diisolasi dari tumbuhan *Nothapodytes foetida* juga telah diinvestigasi di laboratorium untuk produksi senyawa antikanker kamtotesin (Puri *et al.*, 2005). Baru-baru ini dilaporkan bahwa jamur endofit *Xylaria* sp. yang berasosiasi dengan tumbuhan *Cinchona ledgeriana* juga memiliki kemampuan untuk memproduksi keempat alkaloid *Cinchona*, yaitu kuinin, kuinidin, sinkonidin dan sinkonin (Maehara *et al.*, 2011, 2012). Lebih mengejutkan lagi, ternyata sebanyak 21 jenis jamur endofit dari tumbuhan *C. ledgeriana* ini juga memiliki kemampuan dalam memproduksi alkaloid *Cinchona* tersebut (Maehara *et al.*, 2013).

Salah satu jamur endofit yang diisolasi dari tanaman teh telah diidentifikasi sebagai *Schizophyllum* sp. D berdasarkan sekuens 18S- dan ITS rDNA (Agusta *et al.*, 2006). Dalam penelitian lanjutan tentang metabolit jamur endofit yang berasosiasi dengan tumbuhan teh, ditemukan bahwa jamur endofit *Schizophyllum* sp. D memproduksi suatu metabolit utama jika dikultivasi pada medium

PDB. Pada tulisan ini akan dilaporkan isolasi dan karakterisasi metabolit utama pada kultur *Schizophyllum* sp. D.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Isolat Jamur Endofit

Isolat jamur endofit *Schizophyllum* sp. D yang telah diisolasi dari batang muda tanaman teh (Agusta *et al.*, 2006) ditumbuhkan pada medium potato dextrose agar (PDA) dan kemudian disimpan pada suhu - 80 °C dalam bentuk agar blok.

### Skrining Produksi Metabolit Sekunder

Untuk skrining metabolit sekunder yang diproduksi oleh jamur endofit *Schizophyllum* sp. D digunakan 5 jenis medium semi sintetik dengan komposisi seperti terlihat pada Tabel 1. Selanjutnya jamur endofit *Schizophyllum* sp. D ditumbuhkan di dalam Erlenmeyer ukuran 100 ml yang berisikan 30 ml untuk setiap jenis medium pada suhu ruang (26-30 °C) dengan kecepatan agitasi 100 rpm. Produksi metabolit sekunder di monitor setiap 24 jam dengan cara melakukan sampling 5 ml medium tumbuh, lalu diekstraksi dengan etilasetat dan dianalisis dengan KLT (SiO<sub>2</sub> GF254, CHCl<sub>3</sub>:MeOH=5:1) dengan pereaksi penampak noda 5 % vanillin/10 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### Produksi dan Isolasi Metabolit Utama

Jamur endofit *Schizophyllum* sp. D ditumbuhkan di dalam 40 buah tabung reaksi ukuran 100 ml yang berisikan 30 ml medium cair *potato dextrose broth* (PDB) pada suhu ruang (25-33 °C). Setelah 45 hari, seluruh medium tumbuh berikut biomasa diekstraksi dengan etil asetat dan selanjutnya dipekatkan dengan penguap putar sehingga diperoleh 380 mg ekstrak etil asetat. Ekstrak kasar yang diperoleh tersebut selanjutnya dipisahkan dengan metoda kromatografi kolom yang menggunakan silika gel (70 – 230 mesh) sebagai fasa diam dan CHCl<sub>3</sub> - MeOH (20 : 1) sebagai fasa bergerak sehingga diperoleh 107 mg fraksi utama F1. Selanjutnya F1 dimurnikan dengan kromatografi kolom (silika gel 230 - 400 mesh) dan dielusi dengan pelarut campuran *n*-heksana-etilasetat (10:1) sehingga diperoleh 68 mg senyawa utama.

### Karakterisasi Metabolit Utama

Struktur kimia metabolit utama ditentukan berdasarkan karakter fisikokimianya yang dilakukan dengan batuan peralatan sebagai berikut. FAB-MS diukur dengan menggunakan alat spektrometer masa JMS SX-102 A. Spektrum infra merah (IR) diukur

**Tabel 1.** Komposisi media tumbuh untuk skrining produksi metabolit sekunder.

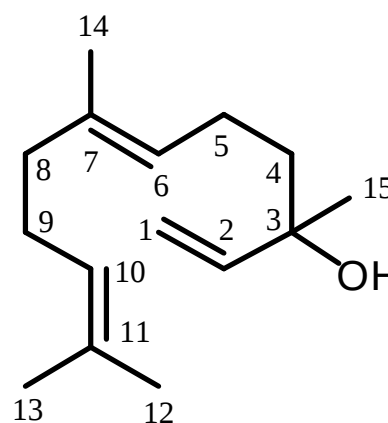
| Media           | Komposisi         |         | Media                            | Komposisi                                          |         |
|-----------------|-------------------|---------|----------------------------------|----------------------------------------------------|---------|
| MY20            | pepton            | 5.0 g   | Nutrient broth<br>dengan 5% NaCl | pepton                                             | 5.0 g   |
|                 | ekstrak yeast     | 3.0 g   |                                  | ekstrak <i>beef</i>                                | 3.0 g   |
|                 | ekstrak malt      | 3.0 g   |                                  | NaCl                                               | 5.0 g   |
|                 | glukosa           | 200.0 g |                                  | air PAM                                            | 1000 ml |
|                 | air PAM           | 1000 ml | GYP                              | glukosa                                            | 20.0 g  |
| Triptik glukosa | tryptic soy broth | 30.0 g  |                                  | ekstrak <i>yeast</i>                               | 1.0 g   |
|                 | ekstrak yeast     | 3.0 g   |                                  | pepton                                             | 5.0 g   |
|                 | glukosa           | 5.0 g   |                                  | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                    | 0.5 g   |
|                 | air PAM           | 1000 ml |                                  | Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0.5 g   |
| PDB             | potato strach     | 4.0 g   |                                  | FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O               | 0.01 g  |
|                 | dekstroza         | 20.0 g  |                                  | CaCO <sub>3</sub>                                  | 1.0 g   |
|                 | air PAM           | 1000 ml |                                  | air PAM                                            | 1000 ml |

dengan alat spektrofotometer Shimadzu FT-IR 8500 dengan plat KBr. Sedangkan spektrum  $^1\text{H}$ - dan  $^{13}\text{C}$ -RMI diukur dengan spektrometer JEOL JNM-Lambda 500 yang dioperasikan pada 500 MHz untuk  $^1\text{H}$  dan 125 MHz untuk  $^{13}\text{C}$  di dalam pelarut  $\text{CDCl}_3$ . Geseran kimia diberikan dalam skala  $\delta$  (ppm) yang relatif terhadap tetrametilsilana (TMS,  $\delta = 0$ ) sebagai internal standar, dan konstanta periodohan (*coupling constants*) diberikan dalam satuan Herzt.

## HASIL

Kultivasi jamur endofit *Schizophyllum* sp. D dalam medium PDB selama 45 hari mampu memproduksi 56.7 mg/L metabolit utama. Spektrum IR memperlihatkan bahwa metabolit ini memiliki gugus hidroksi (OH) yang ditandai dengan vibrasi kuat pada panjang gelombang  $3300\text{ nm}^{-1}$ . Spektrum  $^1\text{H}$ -NMR memperlihatkan bahwa metabolit utama dari kultur jamur endofit ini memiliki 2 buah gugus metin (1H) multiplet, 1 gugus metin doublet doublet, 5 gugus metilen multiplet dan 4 gugus metil singlet seperti terlihat pada Tabel 1. Sedangkan spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR memperlihatkan bahwa metabolit utama

ini memiliki 15 atom karbon (Tabel 1). Sinyal-sinyal proton pada spektrum  $^1\text{H}$ -NMR dan karbon pada spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR metabolit ini identik dengan spektrum  $^1\text{H}$ -NMR dan  $^{13}\text{C}$ -NMR senyawa nerolidol (Gambar 1) seperti yang dilaporkan oleh Soares *et al.* (2002). Analisis HR-MS memperlihatkan ion molekul pada  $m/z$  223 yang mengindikasikan rumus molekul  $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{O}$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Berdasarkan hal tersebut di atas maka metabolit utama yang diisolasi dari kultur



**Gambar 1.** Struktur kimia senyawa nerolidol

**Tabel 2.**  $^1\text{H}$ - dan  $^{13}\text{C}$ -RMI nerolidol yang diisolasi dari kultur jamur endofit *Schizophyllum* sp. D

| Atom | hasil isolasi .     |                   | literatur*          |                  |
|------|---------------------|-------------------|---------------------|------------------|
|      | $^{13}\text{C}$ NMR | $^1\text{H}$ NMR  | $^{13}\text{C}$ NMR | $^1\text{H}$ NMR |
| C-1  | 114.8               | 5.07-5.17 (2H, m) | 111.6               | 5.04-5.24 (2H,m) |
| C-2  | 145.1               | 5.92 (1H, dd)     | 145.0               | 5.92 (1H, dd)    |
| C-3  | 73.6                | -                 | 73.5                | -                |
| C-4  | 41.8                | 1.61-1.65 (2H, m) | 42.0                | 1.62-1.45 (2H,m) |
| C-5  | 22.5                | 1.92-2.09 (2H, m) | 22.7                | 1.90-2.10 (2H,m) |
| C-6  | 124.3               | 5.07-5.17 (1H, m) | 124.2               | 5.04-5.24 (1H,m) |
| C-7  | 135.3               | -                 | 135.5               | -                |
| C-8  | 39.7                | 1.92-2.09 (2H, m) | 39.6                | 1.90-2.10 (2H,m) |
| C-9  | 26.7                | 1.92-2.09 (2H, m) | 26.6                | 1.90-2.10 (2H,m) |
| C-10 | 124.3               | 5.07-5.17 (1H, m) | 124.2               | 5.04-5.24 (1H,m) |
| C-11 | 131.3               | -                 | 131.4               | -                |
| C-12 | 17.7                | 1.68 (3H, s)      | 17.6                | 1.68 (3H, s)     |
| C-13 | 25.7                | 1.60 (3H, s)      | 25.7                | 1.60 (3H, s)     |
| C-14 | 16.0                | 1.58 (3H, s)      | 16.0                | 1.58 (3H, s)     |
| C-15 | 26.7                | 1.29 (3H, s)      | 27.8                | 1.29 (3H, s)     |

\*Suarez, L.E.C., Menichini, F. and Monache F.D., *J. Braz. Chem. Soc.*, **13**, 339-344 (2002)

jamur endofit *Schizophyllum* sp. D dari tanaman teh ini diidentifikasi sebagai nerolidol.

## PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini berhasil memperlihatkan bahwa mikroba endofit juga memiliki kemampuan untuk memproduksi senyawa kimia yang sama dengan tumbuhan inangnya. Dalam hal ini, jamur endofit *Schizophyllum* sp. D yang berasosiasi dengan tanaman teh dapat memproduksi senyawa nerolidol yang juga merupakan senyawa aromatik pada tumbuhan teh. Nerolidol adalah suatu senyawa seskiterpene alkohol yang dilaporkan sebagai salah satu komponen kimia volatil pada beberapa kultivar daun tanaman teh seperti kultivar Sofu, Yabukita, Shizu Insatsu 131 dan Fujikaori (Sawai *et al.*, 2004, Yamaguchi and Shibamoto, 1981). Tidak hanya pada daun, nerolidol dilaporkan juga sebagai salah satu komponen kimia aromatik pada batang dan bunga tumbuhan teh (Farano *et al.*, 2011; Joshi *et al.*, 2011).

Suatu fenomena yang menarik ketika tanaman teh diserang oleh ulat teh *Adoxophyes honmai*, maka daun tanaman teh akan memancarkan beberapa jenis senyawa kimia aromatik yang salah satunya adalah nerolidol (Dong *et al.*, 2011). Pengeluaran nerolidol oleh tanaman teh tersebut merupakan salah satu mekanisme pertahanan yang diterapkan oleh tanaman tersebut ketika terjadi serangan ulat *Adoxophyes honmai* tersebut. Penggunaan senyawa nerolidol untuk sistem pertahanan dari serangan herbivora dan serangga juga terjadi pada tanaman *Arabidopsis* yang telah dimodifikasi dengan penambahan gen nerolidol sintase dari strawberry untuk memproteksi diri dari serangan kutu *Phytoseiulus persimilis* (Kappers *et al.*, 2005).

## KESIMPULAN

Dengan telah diidentifikasinya senyawa nerolidol sebagai metabolit dari jamur endofit *Schizophyllum* sp. D yang berasosiasi dengan tanaman teh *Camellia sinensis* (L.) O.K. merupakan bukti bahwa jamur endofit yang berdiam di dalam

tanaman teh juga memiliki kontribusi dalam pembentukan aroma pada tanaman teh. Di samping itu jamur endofit ini kemungkinan besar juga ikut berperan dalam sistem pertahanan tanaman teh dari serangan predator dengan cara memproduksi senyawa nerolidol yang merupakan adanya indikasi simbiosis mutualisme diantara kedua organisme tersebut.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Diucapkan terimakasih kepada Prof. Dr. Hirotaka Shibuya, Fukuyama University, Japan atas bantuan pengambilan data <sup>1</sup>H- dan <sup>13</sup>C-NMR beserta data HR-MS.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agusta A, K Ohashi and H Shibuya. 2006, Composition of the endophytic filamentous fungi isolated from tea plant *Camellia sinensis*, *Natural Medicine*, **1** (3) (in press, published online: 14 April 2006).
- Bacon CW and JF White. 2000. *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker, NY.
- Dong F, Z Yang, S Baldermann, Y Sato, T Asai, N Watanabe. 2011, Herbivore-induced volatiles from tea (*Camellia sinensis*) plants and their involvement in intraplant communication and changes in endogenous nonvolatile metabolites. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 13131 – 131315.
- Eyberger AL, R Dondapati and JR Porter. 2006, Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *J. Nat. Prod.* **69**, 1121 – 1124.
- Fanaro GB, RC Duarte, MM Araujo, E Purgatto and Villavicencio ALCH. 2011. Evaluation of g-radiation on green tea odor volatiles, *Rad. Phys. Chem.*, **80**, 85 – 88.
- Joshi R, Poonam and A Gulati. 2011. Biochemical attributes of tea flowers (*Camellia sinensis*) at different developmental stages in the Kangra region of India, *Scientia Horticulturae*, **130**, 266–274.
- Kappers IF, A Aharoni, TWJM Van Herpen, LLP Luckerhoff, M Dicke and HJ Bouwmeester. 2005. Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*. *Science*, **309**, 2070 – 2072.
- Maehara S, P Simanjuntak, C Kitamura, K Ohashi and H Shibuya. 2011, Cinchona Alkaloids Are Also Produced by an Endophytic Filamentous Fungus Living in Cinchona Plant, *Chem. Pharm. Bull.*, **59**, 1073 – 1074.
- Maehara S, P Simanjuntak, C Kitamura, K Ohashi and Shibuya H. 2012, Bioproduction of Cinchona alkaloids by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. associated with *Cinchona ledgeriana*, *Chem. Pharm. Bull.*, **60**, 1301 – 1304.
- Maehara S, P Simanjuntak, Y Maetani, C Kitamura, K Ohashi and H Shibuya. 2013, Ability of endophytic filamentous fungi associated with *Cinchona ledgeriana* to produce Cinchona alkaloids, *J. Nat. Med.*, **67**, 421 – 423.
- Puri SC, V Verma, T Amna, GN Qazi and M Spiteller. 2005. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. *J. Nat. Prod.*, **68**, 1717–1719.
- Shibuya H, A Agusta, K Ohashi, S Maehara and P Simanjuntak. 2005, Biooxidation of (+)-catechin and (-)-

- epicatechin into 3,4-dihydroxyflavan derivatives by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. isolated from a tea plant, *Chem. Pharm. Bull.*, **53** (7), 866-867.
- Sawai Y, Y Yamaguchi and J Tanaka, 2004.** Methyl Anthranilate is the Cause of Cultivar-Specific Aroma in the Japanese Tea Cultivar 'Sofu', *JARQ* **38**, 271 – 274.
- Stierle A, GA Strobel and D Stierle. 1993.** Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, **260**, 214-216.
- Tan RX and WX Zou. 2001,** Endophytes: a Rich Source of Functional Metabolites, *Nat. Prod. Rep.*, **18**, 448-459.
- Yamaguchi K and T Shibamoto. 1981,** Volatile constituents of green tea, Gyokuro (*Camellia sinensis* L. var Yabukita). *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 366–370
- Zhang HW, YC Song and RX Tan. 2006.** Biology and Chemistry of Endophytes. *Nat. Prod. Rep.*, **23**, 753-771.