

BIOPRODUKSI (+)-EPIEPOKSIDON OLEH JAMUR ENDOFIT
Diaporthe sp. E YANG DIISOLASIDARITANAMAN TEH
[Bioproduction of (+)-Epiepoxydon by the Endophytic Fungus *Diaporthe* sp. E
Isolated from a Tea Plant]

AndriaAgusta

Laboratorium Fitokimia, Bidang Botani, Puslit Biologi LIPI
Jl. Ir. H. Juanda 18 Bogor. E-mail: bislunatin@yahoo.com

ABSTRACT

Six kinds of the endophytic fungi have been isolated from a tea plant. One of them identified as *Diaporthe* sp. E based on their morphological characters and rDNA sequens. By the cultivation in liquid medium, the endophytic fungus produced (+)-epiepoxydon besides gentisyl alcohol and toluquinol.

Kata Kunci: *Diaporthe* sp., (+)-epiepoksidon, gentisil alkohol, jamur endofit, tanaman teh, toluquinol.

PENDAHULUAN

Dalam dua dasawarsa belakangan ini, eksplorasi potensi mikroba endofit sebagai salah satu sumber senyawa aktif biologi semakin mencuat ke permukaan. Fenomena ini berawal dari publikasi dari Stierle dan Strobel (1993) yang melaporkan bahwa jamur endofit *Taxomyces andreanae* yang diisolasi dari tumbuhan *Taxus brevifolia* memperlihatkan karakter yang unik dengan kemampuan untuk memproduksi senyawa antikanker, taxol di dalam medium semi sintetik. Baru-baru ini juga telah dilaporkan bahwa jamur endofit yang diisolasi dari tumbuhan *Nothapodytes foetida* menghasilkan kamtotesin di laboratorium (Puri *et al.*, 2005).

Pada tulisan terdahulu (Agusta *et al.*, 2006) telah dilaporkan isolasi dan karakterisasi 6 jenis jamur endofit dari tanaman teh berdasarkan sekuens 18S rDNA, ITS 1, 5.8D rDNA dan ITS2. Salah satu di antara jamur endofit tersebut, yaitu *Diaporthe* sp. E (DDBJ accession no. AB245446) memiliki kemampuan yang unik untuk melakukan transformasi beberapa jenis senyawa flavan yang terkandung pada tanaman teh menjadi turunan *cis*-3,4-dihidroksiflavan (Agusta *et al.*, 2005, Shibuya *et al.*, 2005). Pada tulisan ini akan dilaporkan karakter morfologi dan produksi metabolit sekunder oleh jamur endofit *Diaporthe* sp. E.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan Tumbuhan

Bahan tumbuhan berupa ranting muda tanaman

teh [*Camellia sinensis* (L.) O.K.] dikoleksi dari daerah Puncak, Kecamatan Ciawi, Kabupaten Bogor, Jawa Barat pada bulan Agustus 2003. Identifikasi jenisnya dilakukan di Herbarium Bogoriense, Puslit Biologi, LIPI.

Isolasi jamur endofit

Ranting muda tanaman teh dicuci dengan air sampai bersih, lalu dipotong-potong dengan ukuran panjang sekitar 1 cm. Permukaan ranting yang telah dipotong, selanjutnya disterilisasi dengan cara merendamnya dalam 75% etanol selama 2 menit, 5.3% natrium hipoklorit selama 5 menit dan kembali dengan 75% etanol selama setengah menit. Ranting yang telah disterilkan permukaannya tersebut kemudian dibelah dua dengan *cutter* steril, lalu ditaruh di atas medium *corn-meal malt agar* (CMMA) yang mengandung kloramfenikol dengan konsentrasi 0.05 mg/ml. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 27 °C selama 3-7 hari. Setelah tumbuh, setiap koloni jamur selanjutnya ditransfer beberapa kali ke medium *potato dextrose agar* (PDA) sampai diperoleh koloni tunggal.

Pengamatan morfologi

Untuk tujuan pengamatan morfologi, jamur endofit *Diaporthe* sp. E ditumbuhkan masing-masing di atas medium PDA dan ranting tanaman teh yang telah disterilkan dengan *autoclave*, lalu diinkubasi pada temperatur ruang. Pembentukan *peritechia* yang merupakan ciri khas jamur genus *Diaporthe* diamati dengan menggunakan *phase contrast microscope* (Nikon Eclipse 80i, Nikon).

Skrining metabolit sekunder dari jamur endofit *Diaporthe* sp. E

Jamur endofit *Diaporthe* sp. E ditumbuhkan di dalam Erlenmeyer ukuran 500 ml yang berisikan 200 ml medium cair GYP (komposisi: 20 g glukosa, 1 g ekstrak yeast, 5 g pepton, 0,5 g K_2HPO_4 , 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,0 g $CaCO_3$, 1 liter H_2O , pH 6.44) dengan kecepatan agitasi 90 rpm pada suhu 27 °C. Produksi metabolit sekunder di monitor setiap 24 jam (1 hari) dengan cara melakukan sampling 5 ml medium tumbuh, lalu diekstraksi dengan etilasetat dan dianalisis dengan KLT (SiO_2 , $CHCl_3$: MeOH = 5 : 1) dan HPLC (CAPCELL PAK C18 UG120, 250 x 4.6 mm, 10 % CH_3CN).

Produksi dan isolasi metabolit sekunder

Jamur endofit *Diaporthe* sp. E ditumbuhkan di dalam 3 buah Erlenmeyer ukuran 500 ml yang masing-masing berisikan 200 ml medium GYP dan diinkubasi pada suhu 27 °C dengan kecepatan agitasi 90 rpm. Selanjutnya, masing-masing kultur medium diekstraksi dengan etilasetat pada hari ke 3,5 dan hari ke 7. Lapisan etilasetat kemudian di pekatkan dengan penguap putar dan selanjutnya dipisahkan dengan metoda kromatografi kolom silica gel (SiO_2 , 230-400 mesh, 10 g, $CHCl_3$:MeOH=10:1) sehingga diperoleh metabolit sekunder 1,2 dan 3 dengan jumlah seperti tertera pada Tabell.

Metabolit 1: Merupakan serbuk putih. MS (EI): m/z124, IR(KBr) cm^{-1} :3350, 1H dan ^{13}C -RMI(Tabel2).

Metabolit 2: Merupakan serbuk putih. MS (EI): m/z 140, IR(KBr) cm^{-1} : 3300,1662, 1H dan ^{13}C -RMI (Tabel2).

Metabolit 3: Merupakan minyak berwarna kekuningan, $[a]_D^{+197}$ (c = 0.29, dalam EtOH pada 26 °C). Data fisikokimia, MS (EI): 156, IR (KBr) cm^{-1} : 3300, 1678, 1H - and ^{13}C -RMI (Tabel 2). *Optical purity* dikonfirmasi dengan analisis HPLC yang menggunakan *chiral adsorbent* (CHIRALCEL OC, Daicel Chemical Ind. Lit.) dan dielusi dengan M-hexana: 2-propanol (8 : 2) pada 254 nm.

HASIL

Jamur endofit *Diaporthe* sp. E yang ditumbuhkan di atas PDA berwarna putih dan membentuk *pycnidia* yang berbentuk seperti jantung

dan berwarna hitam setelah 21 hari seperti terlihat pada Foto 1 A. Jumlah dan ukuran *pycnidia* akan bertambah besar sejalan dengan perpanjangan waktu inkubasi. Sedangkan jamur endofit yang ditumbuhkan di atas potongan ranting tanaman teh yang telah disterilkan membentuk *peritechia* yang berbentuk seperti tiang berwarna hitam setelah 30 hari (Foto 1C), dan juga akan mengalami perkembangan jumlah dan ukurannya sejalan dengan bertambahnya waktu.

Kultivasi jamur endofit *Diaporthe* sp. E dalam medium GYP pada 27 °C dengan kecepatan agitasi 90 rpm selama 2 hari belum memperlihatkan adanya produksi metabolit sekunder pada kondisi analisis. Selanjutnya, pada hari ke-tiga terjadi perubahan yang sangat mencolok pada kromatogram hasil analisis dengan HPLC (data tidak ditampilkan) yang mengindikasikan telah berlangsungnya produksi metabolit sekunder 1, 2 dan 3 oleh jamur *Diaporthe* sp. Produksi ke-tiga jenis metabolit sekunder 1, 2 dan 3 terus meningkat sampai pada hari ke-empat. Pada 24 jam berikutnya (hari ke-lima) produksi metabolit 1 mulai menurun, dan sebaliknya produksi metabolit 2 dan 3 tetap meningkat. Produksi metabolit 2 paling tinggi terjadi pada hari ke-enam waktu inkubasi dan metabolit 3 pada hari ke-tujuh (Tabel 1).

Proton RMI spektrum dari metabolit 1 memperlihatkan adanya 3 buah sinyal proton aromatik pada geseran kimia 6.47 (dd, J=3.1,8.5 Hz, H-3), 6.59 (d, 7=3.1 Hz, H-5) dan 6.62 (d, J=8.5 Hz, H-2) serta satu sinyal metil singlet pada geseran kimia 2.13 (CH₃). Pada spektrum ^{13}C -RMI (Tabel 2) memperlihatkan bahwa kerangka molekul metabolit 1 terdiri dari 7 atom karbon, yang terdiri dari 3 karbon metin, 3 karbon kuarterner dan satu karbon metil yang diketahui berdasarkan interpretasi spectrum DEPT. Elusidasi struktur selanjutnya yang didasarkan pada HH-COSY, HMQC dan HMBC memperlihatkan bahwa metabolit 1 adalah senyawa yang telah diketahui, toluksinol.

Spektrum 1H -RMI dari metabolit 2 memiliki pola yang mirip dengan metabolit 1, dengan 3 buah sinyal proton aromatik pada geseran kimia 6.57 (dd, J=3.0,8.5 HZ, H-3), 6.64 (d, J=8.5 Hz, H-2) dan 6.78 (d, J=3.0 Hz, H-5). Sedangkan sinyal proton metil tidak terdeteksi pada metabolit 2, dan sebagai gantinya muncul sinyal metilen singlet pada geseran kimia 4.67. Keberadaan

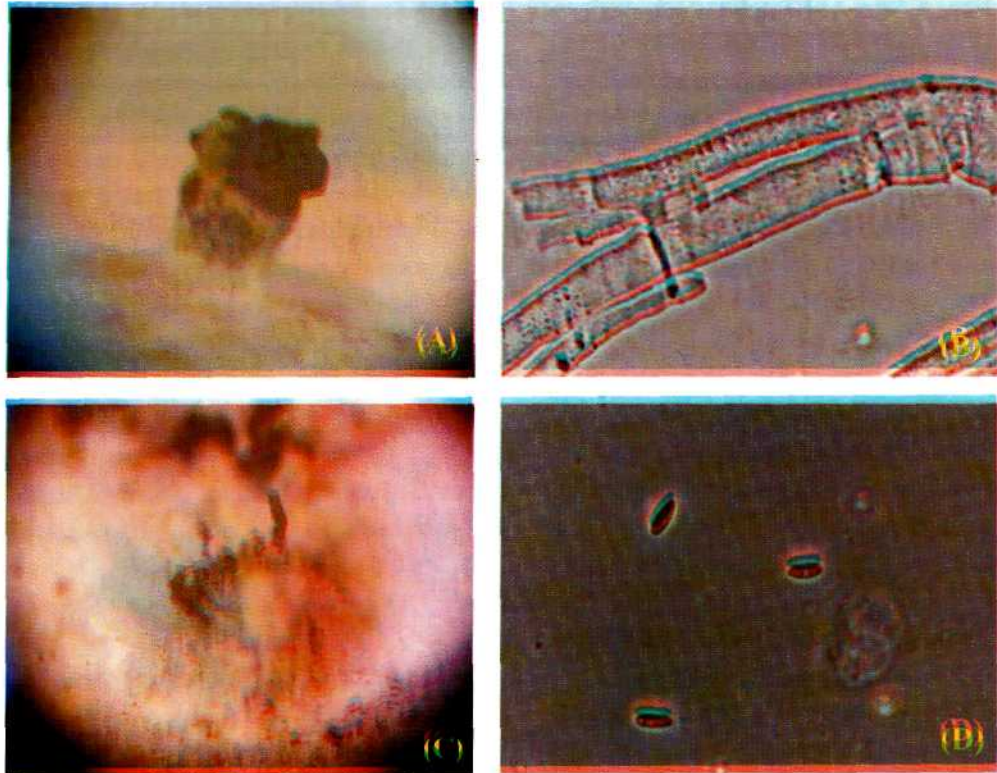


Foto 1. A: *Pycnidia* dari jamur endofit *Diaporthe* sp. E yang ditumbuhkan di atas PDA selama 35 hari pada temperatur ruang, (20x). B: *Septate hypha* (1000x). C: *Perithecia* dari jamur yang ditumbuhkan pada ranting teh yang telah disterilkan selama 45 hari pada temperatur ruang (20x). D: *Bicellular ascospore* (1000x).

Tabel 1. Produksi metabolit sekunder oleh *Diaporthe* sp. E

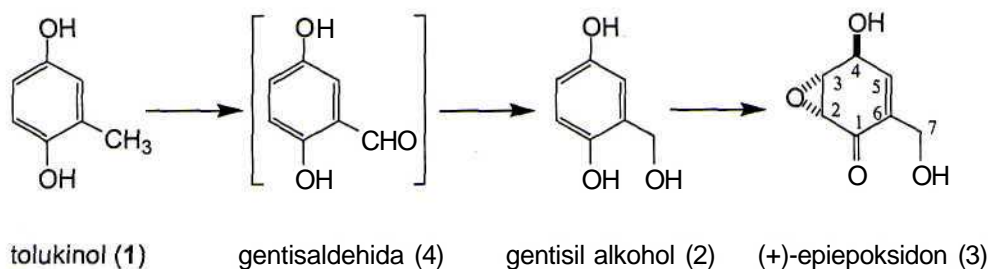
Produk	Hasil isolasi (mg/l)		
	Hari ke-3	Hari ke-5	Hari ke-7
Ekstrak etilasetat	237,6	372,3	542,0
Tolukuinol (1)	6,7	5,8	Tidak terdeteksi
Gentisilalkohol (2)	19,3	53,3	12,0
(+)-epiepoksidon (3)	9,1	34,0	70,2

gugus metilen pada metabolit 2 ini ditegaskan dengan adanya sinyal pada geseran kimia 61.6 pada spektrum ^{13}C -RMI nya (Tabel 2) dan mengindikasikan bahwa gugus metilen tersebut berikatan dengan gugus hidroksi. Berdasarkan elusidasi di atas dengan mudah dapat diketahui bahwa metabolit 2 adalah produk reaksi oksidasi dari tolukuinol (metabolit 1) pada gugus metil mejadi gentisil alkohol (Gambar 1).

Berbeda dengan kedua metabolit di atas, spektrum proton RMI metabolit 3 memperlihatkan adanya 3 proton metin pada geseran kimia 3.40 (dd, $J=3.7, 0.6$ Hz, H-2), 3.78 - 3.79 (m, H-3), 4.66 (d, $J=4.3$ Hz, H-4), satu proton olefin pada geseran kimia 6.71 (ddd, $J=1.8, 4.2, 1.4$ Hz, H-5), dua gugus hidroksi pada geseran kimia 4.11 (7-OH) dan 4.88 (4-OH), serta sinyal proton metilen ABX pada geseran kimia 4.16 dan 4.27

Tabel 2. Data ¹³C- dan ¹H-RMI dalam aseton-*rf*.; untuk tolukinol (1), gentisil alkohol (2) dan (+)-epiepoksidon (3).

tolukinol (1)		gentisil alkohol (2)		(+)-epiepoksidon (3)	
¹³ C-NMR	¹ H-NMR	¹³ C-NMR	¹ H-NMR	¹³ C-NMEL	¹ H-NMR
1-C	125.8	129.1		194.4	
2-C	116.1	116.5	6.64 (1H, d, 7=8.5 Hz)	54.1	3.40 (1H, dd, 7=3.7, 0.6 Hz)
3-C	113.6	114.9	6.57 (1H, dd, 7=3.1, 8.5 Hz)	58.8	3.78-3.79 (1H, m)
4-C	151.1	151.0		63.3	4.66 (1H, d, 7=4.3 Hz)
4-OH					4.88 (1H, brs)
5-C	116.1	115.0	6.78 (1H, d, 7=2.7 Hz)	139.3	6.71 (1H, ddd, 7=1.8, 4.2, 1.4 Hz)
6-C	149.1	148.7		137.1	
7-C	16.4	61.6	4.67 (2H, s)	59.1	4.16 (1H, d, 7=15.6 Hz)
					4.27 (1H, d, 7=15.6 Hz)
7-OH					4.11 (1H, brs)



Gambari. Kemungkinan jalur biosintesis (+)-epiepoksidon (1) dari tolukinol (2) pada jamur endofit *Diaporthe* sp. E.

ppm (J=15.6 Hz). Spektrum ¹³C-RMI dan DEPT memperlihatkan bahwa metabolit 3 terdiri dari 7 atom karbon dengan satu alkohol primer dan satu gugus karbonil (Tabel 2). Elusidasi struktur kimia berdasarkan data di atas dan data 2D-RMI (HH-COSY, HMQC, HMBC) beserta data terpublikasi pada literatur (Klemke *et al.*, 2004), dengan mudah dapat diidentifikasi bahwa metabolit 3 adalah (+)-epiepoksidon. Sebagai tambahan, *optical purity* dari metabolit 3 ([α]_D +197° dalam EtOH, 26 °C) telah dikonfirmasi dengan analisis HPLC yang menggunakan kolom kiral (CHIRALCEL OC).

PEMBAHASAN

Kelompok jamur yang tergolong ke dalam genus *Diaporthe* adalah salah satu jamur yang sulit untuk diidentifikasi secara morfologi. Sampai saat ini klasifikasi dari genus ini masih tumpang tindih

dikarenakan jamur ini sangat rentan terhadap perubahan morfologinya. Salah satu kesukaran yang sering dihadapi dalam mengidentifikasi genus ini disebabkan susahnya untuk merangsang pembentukan *perithecia* yang merupakan parameter utama yang harus diamati dalam mengidentifikasi jamur *Diaporthe* secara konvensional. Dalam kondisi pertumbuhan jamur yang kurang mendukung, jarang sekali terbentuk, yang kerap muncul adalah *pycnidia* (Pioli *et al.*, 2003) yang merupakan ciri khas dari anamorf *Diaporthe*, yaitu jamur *Phomopsis*. Dengan arti kata, *Diaporthe* akan memperlihatkan morfologi sebagai *Phomopsis* pada kondisi pertumbuhan yang kurang mendukung untuk pembentukan organ seksual, atau bahkan sama sekali bisa berubah menjadi anamorf.

Diaporthe sp. E, yaitu jamur endofit yang diisolasi dari tanaman teh, *Camellia sinensis* (Agusta *et al.*, 2006) yang ditumbuhkan pada medium agar

potato dextrose agar (PDA) memperlihatkan adanya pembentukan pycnidia setelah berumur 3 minggu. Jika merujuk pada penampilan pycnidia tersebut seharusnya jamur ini dikelompokkan sebagai *Phomopsis*, bukan *Diaporthe*. Akan tetapi, kultivasi jamur ini di atas potongan ranting tumbuhan teh yang telah disterilkan selama 30 hari pada temperatur ruang memperlihatkan perkembangan peritecia yang berbentuk seperti tiang kecil yang berwarna hitam dan akan terus berkembang sejalan dengan bertambahnya waktu. Di samping itu, kultur dengan teknik ini juga menghasilkan ascospore. Adanya pembentukan peritecia dan ascospore ini menegaskan bahwa jamur tersebut adalah *Diaporthe*, bukan *Phomopsis*. Dan hal ini sesuai dengan hasil analisis filogenetik berdasarkan data sekuens 18S rDNA, ITS1, 5.8S rDNA dan ITS2 yang menempatkan jamur endofit tersebut dalam genus *Diaporthe*.

Adalah suatu hal yang menarik menemukan kenyataan bahwa jamur *Diaporthe* sp. E ini memiliki kemampuan untuk menghasilkan (+)-epiepoksidon (3) dengan tingkat produksi relatif tinggi. (+)-Epiepoksidon (3) dilaporkan dibiosintesis melalui senyawa perantara gentalaldehid [4] (Nagasawa *et al.*, 1978). Akan tetapi, keberadaan gentalaldehid pada medium kultur jamur endofit *Diaporthe* sp. E tidak terdeteksi sama sekali, sebagai gantinya dijumpai gental alkohol dalam jumlah yang cukup signifikan. Kemungkinan besar, pada kultur jamur endofit *Diaporthe* sp. E di dalam medium GYP, terjadi reaksi oksidasi tolukinol untuk membentuk gentalaldehid yang selanjutnya membentuk formasi yang lebih stabil menjadi alkohol (gental alkohol), dan setelah itu baru kemudian diikuti oleh reaksi epoksidasi untuk membentuk (+)-epiepoksidon (Gambar 1).

(+)-Epiepoksidon juga dilaporkan memiliki aktivitas biologi sebagai antigerminative (Nagasawa *et al.*, 1978), sitotoksik melawan P3 88 limfositik leukemia (Iwamoto *et al.*, 1999), adenokarsinoma, adenokarsinoma gastrik and karsinoma hepatoselular (Klemke *et al.*, 2004) *cell lines* dan sebagai antibiotik melawan *Bacillus subtilis* (Sekiguchi *et al.*, 1979), serta fitotoksik (Nagata *et al.*, 1992).

Produksi (+)-epiepoksidon (3) oleh jamur endofit *Diaporthe* sp. E (70.5 mg/liter) setara dengan

produksi metabolit yang sama oleh *Penicillium urticae* (70 mg/liter, Sekiguchi and Gaucher, 1979). Di samping itu, beberapa jenis jamur lainnya juga telah dilaporkan sebagai penghasil (+)-epiepoksidon (3) yaitu *Poronia punctata* (181.1 mg/liter, Gloer and Truckenbrod, 1988), *Pestalotiopsis longiseta* (49.3 mg/liter, Nagata *et al.*, 1992), *Penicillium* sp. (8.25 mg/liter, Iwamoto *et al.*, 1999), dan jamur endofit *Apiospora montagnei* (17.8 mg/liter, Klemke *et al.*, 2004).

KESIMPULAN

Karakter morfologi dari jamur endofit *Diaporthe* sp. E mendukung pengelompokan jamur tersebut sebagai salah satu anggota genus *Diaporthe*. Jamur endofit ini memiliki kemampuan untuk memproduksi (+)-epiepoksidon 70.5 mg/liter di dalam medium GYP.

UCAPAN TEREKASIH

Diucapkan terimakasih kepada Natural Product Chemistry Laboratory, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University, Fukuyama, Hiroshima, Japan atas fasilitas peralatan yang digunakan dalam penelitian ini.

KEPUSTAKAAN

- Agusta A, Maehara S, Ohashi K, Simanjuntak P and Shibuya H. 2005.** Stereoselective oxidation at C-4 of flavans by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. isolated from a tea plant. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 53 (12), 1565-1569.
- Agusta A, Ohashi K and Shibuya H. 2006.** Composition of the endophytic filamentous fungi isolated from tea plant *Camellia sinensis*. *Journal of Natural Medicines* 60 (3), 268-272.
- Gloer JB and Truckenbrod SM. 1988.** Interference competition among coprophilous fungi: Production of (+)-isoepoxidon by *Puronia punctata*. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 861-864.
- Iwamoto C, Minoura K, Oka T, Ohta T, Higishita S and Numata A. 1999.** Absolute stereostructures of novel cytotoxic metabolites, penostatins A-E, from a *Penicillium* species separated from an *Enteromorpha* alga. *Tetrahedron* 55, 14353-14368.
- Klemke C, Kehraus S, Wright AD and König GM. 2004.** New secondary metabolites from the marine

- endophytic fungus *Apiospora montagnei*. *Journal of Natural Products* **67**, 1058-1063.
- Nagasawa H, Suzuki A and Tamura S. 1978.** Isolation and structure of (+)-Des-oxyepiepoxydon and (+)-Epi-epoxydon, phytotoxic fungal metabolites. *Agriculture and Biological Chemistry* **42**, 1303—1304.
- Nagata T, Ando Y and Hirota A. 1992.** Phytotoxins from tea gray blight fungi, *Pestalotiopsis longiseta* and *Pestalotiopsis theae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **56**, 810-811.
- Pioli RN, Morandi EN, Martinez MC, Lucca F, Tozzini A, Bisaro V and Hopp HE. 2003.** Morphologic, and pathogenic characterization of *Diaporthe phaseolorum* variability in the core soybean-producing area of Argentina. *Phytopathology* **93** (2), 136-146.
- Puri, SC, Verma V, Amna T, Qazi GN and Spiteller M. 2005.** An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camtotechin. *Journal of Natural Products* **68** (12), 1717-1719.
- Sekiguchi J and Gaucher GM. 1979.** Isoepoxydon, a new metabolite of the patulin pathway in *Penicillium urticae*. *Biochemical Journal* **182**,445—453.
- Shibuya H, Agusta A, Ohashi K, Maehara S and SimanjuntakP. 2005.** Biooxidation of(+)-Catechin and (-)-Epicatechin into 3,4-Dihydroxyflavan derivatives by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. isolated from a tea plant. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **53** (7), 866-867.
- Stierle A, Strobel GA and Stierle D. 1993.** Taxol and Taxane production by *Taxomyces andreanae*, Endophytic Fungus of Pacific Yew Science **260**,214—216.