

**PRODUKSI ALKALOID KUININA OLEH BEBERAPA
MIKROBA ENDOFIT DENGAN PENAMBAHAN ZAT INDUSER
(Studi Mikroba Endofit Tanaman *Cinchona* sp. (2))**

**PRODUCTION OF QUININE ALKALOID BY SOME ENDOPHYTIC
MICROBES WITH ADDITION OF INDUCER SUBSTANCES
(Studies on Endophytic Microbes of *Cinchona* sp. plants (2))**

Partomuan Simanjuntak*, Titi Parwati*, Bustanussalam*, Titik K. Prana*
dan Hirota Shibuya**

*Pusat Penelitian Bioteknologi-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI),
Jalan Raya Bogor Km 46, Cibinong 16911

**Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University, Fukuyama, Japan

ABSTRAK

Mikroba endofit diketahui berpotensi sebagai sumber senyawa aktif untuk bahan obat-obatan. Optimisasi medium fermentasi termasuk dengan cara penambahan zat induser diperlukan untuk mendapatkan hasil produksi yang optimum. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh penam bahan serbuk kayu tanaman *Cinchona succirubra* terhadap produksi senyawa kuinina oleh mikroba endofit yang ditumbuhkan dalam dua jenis medium cair yang berbeda.

Mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman *Cinchona* sp. yang diinkubasikan dalam medium Potato Dextrose Broth (PDB) dan medium Phoma yang telah ditambah serbuk kayu *C. succirubra* selama 3 hari pada mesin penggojog (*shaker*) dan produksi kuinina dianalisis dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).

Hasil menunjukkan bahwa ada peningkatan produksi kuinina yang bervariasi untuk tiap jenis mikroba. Peningkatan produksi tertinggi sebesar 2,2 kali lipat dicapai oleh isolat kapang J3P1 yang ditumbuhkan dalam medium PDB.

Kata kunci : zat induser, kuinina; mikroba endofit; *Cinchona succirubra*

ABSTRACT

Endophytic microbes have been known to be potential as the sources of active compound for medicines. Optimization of medium, including of inducer addition, is necessary to obtain optimum products. This study, therefore, was aimed to investigate the effect of *Cinchona succirubra* bark powder addition in the production of quinine compound by endophytic microbe growing in two different liquid media.

Endophytic microbe isolated from *Cinchona* sp. were shaker incubated in Potato Dextrose Broth (PDB) and Phoma media with the addition of bark powder of *C. succirubra* for 3 days. Quinine production was analyzed with High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

The result showed an increasing of quinine production for each microbes. Highest increasing of quinine production (2.2 folds) was yielded by mold culture (J3P1) grown in PDB medium.

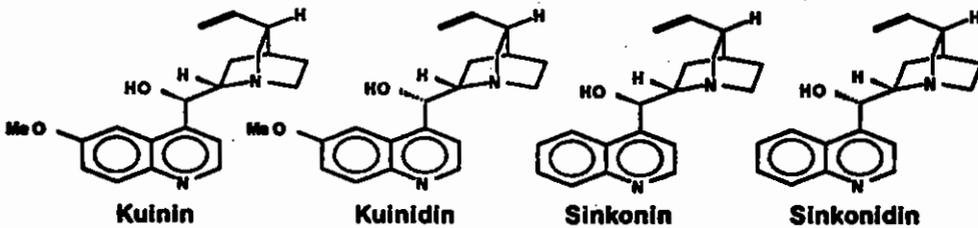
Keywords: inducer, quinine, endophytic microbe, *Cinchona succirubra*

PENDAHULUAN

Tumbuhan Kina (*Cinchona* sp.) merupakan bahan baku farmasi yang sangat bernilai dan dikenal luas sebagai salah satu jenis tanaman obat-obatan berkhasiat dan sudah lama digunakan sebagai obat antimalaria. Khasiat tanaman ini, sebagai antimalaria berasal dari senyawa alkaloid kuinina (alkaloid cinchona) terutama senyawa kuinina ($C_{20}H_{24}N_2O_2$), kuinidina (isomer dari kuinina), sinkonina ($C_{19}H_{22}N_2O$), dan sinkonidina (isomer dari sinkonina) (gambar 1). Hampir keseluruhan bagian tanaman kina (akar, batang, daun dan kulit) mengandung senyawa alkaloid kuinina tersebut tetapi dalam persentase yang berbeda (Musalam, dkk., 1980).

Saat ini kuinina dapat disintesis, tetapi cara pembuatannya demikian sulit dan mahal, bila menggunakan senyawa antimalaria sintetik dapat terjadi resistensi pada *Plasmodium* terhadap obat-obatan tersebut, sehingga sumber alam masih tetap dipertahankan. Sejauh ini pemanfaatan sumber daya hayati terutama tanaman obat-obatan dilakukan dengan cara mengeksplorasi secara fitokimia, cara ini dapat dilakukan dengan mengekstraksi bagian tanaman secara fisik dan kimia (Hostettmann, dkk., 1991).

Upaya untuk mempertahankan kelestarian tanaman obat dan pemanfaatannya, yang seiring dengan perkembangan ilmu bioteknologi dicoba satu cara terbaru dalam memproduksi senyawa alkaloid sinkona dan turunannya dengan memanfaatkan mikroba endofit yang hidup di dalam jaringan tanaman tersebut. Mikroba endofit adalah mikroba yang hidup di dalam jaringan tanaman sekurangnya selama periode tertentu dari siklus hidupnya dapat membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya (Song, 1998).



Gambar 1. Struktur kimia alkaloid kuinina hasil isolasi dari tanaman *Cinchona* sp.

Walaupun penelitian mengenai endofitik telah dimulai sejak lama, tetapi penggunaan mikroba endofit untuk memproduksi senyawa bioaktif masih sedikit. Mikroba endofit diisolasi dari jaringan tanaman dan ditumbuhkan pada medium fermentasi dengan komposisi tertentu. Di dalam medium fermentasi tersebut mikroba endofit menghasilkan senyawa sejenis seperti yang terkandung pada tanaman inang dengan bantuan aktivitas enzim (Petrini, dkk., 1992). Mikroba endofitik tumbuh dan memproduksi senyawa metabolit sekunder lebih lambat pada medium buatan daripada medium di dalam tanaman inangnya, oleh karena itu sangat penting untuk merancang media isolasi maupun pertumbuhannya yang sesuai (Song, 1998).

Beberapa peneliti telah berhasil mengisolasi mikroba endofit dari tanaman inangnya, membiakkan mikroba endofit tersebut ke dalam media sintetik dan menghasilkan metabolit sekunder sesuai dengan kandungan senyawa kimia di dalam tanaman inangnya tersebut. Salah satunya adalah Strobel dkk. (1993) yang berhasil mengisolasi mikroba kapang *Taxomyces andreae* dari tumbuhan *Taxus brevifolia*, kemudian membiakkannya secara *in vitro* dan dapat memproduksi senyawa kimia diterpen taksol (Strobel, 1993; Stierle, dkk., 1993).

Simanjuntak dkk. (2002) berhasil mengisolasi beberapa mikroba dari tanaman *Cinchona* sp. Skrining dan identifikasi hasil fermentasi dalam media sintetik menunjukkan bahwa mikroba endofit tersebut dapat memproduksi senyawa alkaloid sinkona (Simanjuntak, dkk., 2002). Hasil ini menunjukkan bahwa peranan mikroba endofit untuk memproduksi senyawa metabolit sesuai dengan tanaman inangnya dapat diandalkan untuk dilanjutkan dalam produksi skala industri. Namun hasil ini masih dalam jumlah yang

sangat kecil, sehingga untuk itu perlu dilakukan penelitian dalam peningkatan produksi senyawa metabolit sekunder tersebut.

Salah satu cara yang banyak dilakukan adalah penambahan zat induser yang diinokulasikan secara bersama-sama dengan mediumnya. Zat induser adalah suatu zat yang memiliki komponen nutrisi yang serupa dengan tanaman inangnya dan dapat menstimulasi pertumbuhan mikroba endofit dalam memproduksi senyawa bioaktif sebagai hasil metabolisme sekunder (Gumbira, 1987).

Pada penelitian ini digunakan delapan isolat mikroba hasil isolasi dari tanaman Kina (*Cinchona* sp.) yaitu jenis kapang dan khamir (Simanjuntak, dkk., 2002). Masing-masing difermentasikan ke dalam medium yang berbeda komposisinya dan pengamatan produksi kuinina dilakukan dengan cara sampling setiap hari.

Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat sejauh mana pengaruh penambahan zat induser (serbuk batang *Cinchona succirubra*) pada medium dalam meningkatkan produksi senyawa kuinina oleh mikroba endofit.

METODOLOGI

Preparasi Sumber Mikroba

Delapan jenis mikroba endofit yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroba endofit murni yang terdiri dari isolat A12, D132, isolat J3P1 (kapang) dan B12, D12, F11, F12, dan H12 (khamir) yang merupakan koleksi Laboratorium Kimia Bahan Alam, Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Cibinong (Simanjuntak, dkk., 2002)

Kultur Cair Mikroba

Kedelapan jenis mikroba ditumbuhkan dalam Erlenmeyer (50 mL) yang berisi 10 mL medium cair dan 5,0 mg serbuk kayu *C. succirubra* yang telah steril. Medium cair terdiri dari medium Potato Dextrose Broth (PDB) dan medium modifikasi Phoma. Kemudian ke-16 kultur mikroba tersebut ditempatkan dalam pengaduk (shaker) pada suhu kamar selama 3 hari. Pengujian adanya produksi senyawa metabolit kuinina dilakukan dengan cara sampling setiap hari.

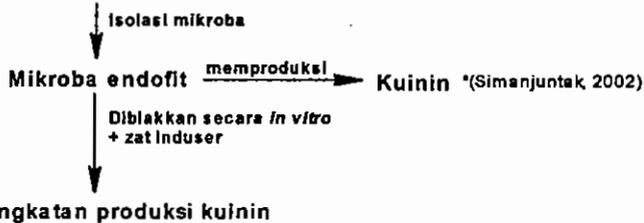
Ekstraksi dan Analisis Kuantitatif

Sampel sebanyak 1 mL yang diperoleh pada 3 hari pengamatan disaring dengan kapas. Filtrat diekstraksi dengan kloroform. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya diuapkan dengan penguap berpusing (*rotavapor*) dan dianalisis dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) pada pelat aluminium berlapis silika Gel Merck Kieselgel 60 F₂₅₄, dengan ketebalan 0,25 mm. Larutan pengembang yang digunakan adalah campuran kloroform-metanol-air = 7 : 3 : 1, dideteksi dengan pereaksi Dragendorff dan senyawa kuinina standar digunakan sebagai pembanding. Hasil analisis KLT yang merupakan analisis kualitatif ini dilanjutkan dengan analisis kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) sebagai analisis kuantitatif dengan perhitungan sebagai berikut.

$$\text{Produktivitas relatif} = \frac{\text{Luas (area) sampel}}{\text{Luas (area) pembanding}}$$

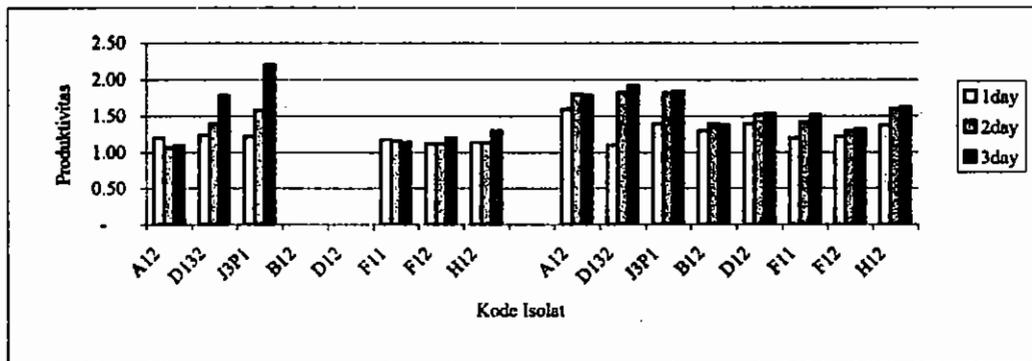
Instrumen KCKT adalah HPLC JASCO (3 dimensi) menggunakan kolom dengan fase diam μ -Bondapak C18 (3,9 x 30 mm), Kecepatan alir 1 mL/menit, tekanan alir 143-145 kg/cm², dan volume injeksi 50,0 μ L. Detektor yang digunakan adalah spektrofotometer UV-Vis *multiwavelength* dengan panjang gelombang 340 nm (untuk senyawa kuinina dan kuinidin), 312 nm (untuk senyawa sinkonin dan sinkonidin).

Tanaman *Cinchona* spp.



HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan terhadap kedua jenis media kultur yang digunakan (PDB dan modifikasi Phoma) menunjukkan bahwa hampir semua mikroba endofit yang diuji memacu peningkatan produksi kuinina, kecuali isolat khamir B12 dan D12 yang tidak dapat menunjukkan produksi kuinina sama sekali dalam medium PDB. Selain itu, mikroba yang ditumbuhkan dalam medium Phoma menunjukkan aktivitas produksi yang cukup baik dibandingkan mikroba yang ditumbuhkan dalam medium PDB walaupun isolat kapang J3P1 yang menampilkan peningkatan produksi tertinggi sebesar 2,2 kali yang ditumbuhkan dalam medium PDB, (Gambar 2).



Gambar 2. Diagram batang produktivitas senyawa kimia kuinina oleh beberapa mikroba endofit hasil isolasi dari tanaman *Cinchona* sp.

Tabel I. Produktivitas senyawa kuinina oleh beberapa mikroba endofit selama inkubasi 3 hari dalam media PDB.

No	Kode isolat	Jenis mikroba	Lama inkubasi (hari)		
			1 hari	2 hari	3 hari
1	A12	Kapang	1,20	1,10	1,10
2	D132	Kapang	1,24	1,40	1,78
3	J3P1	Kapang	1,22	1,58	2,20
4	B12	Khamir	-	-	-
5	D12	Khamir	-	-	-
6	F11	Khamir	1,18	1,16	1,14
7	F12	Khamir	1,12	1,12	1,20
8	H12	Khamir	1,14	1,14	1,30

Medium PDB yang merupakan medium umum bagi kapang yang komposisinya terdiri dari ekstrak kentang dan glukosa. Umbi kentang diketahui sebagian besar mengandung karbohidrat tinggi dalam bentuk polisakarida. Medium PDB adalah medium yang memiliki sumber karbon berkadar tinggi, hasilnya isolat khamir B12 dan D12 kemungkinan besar merupakan mikroba yang rentan terhadap kadar gula yang tinggi sehingga tidak menunjukkan peningkatan produksi alkaloid (Tabel I).

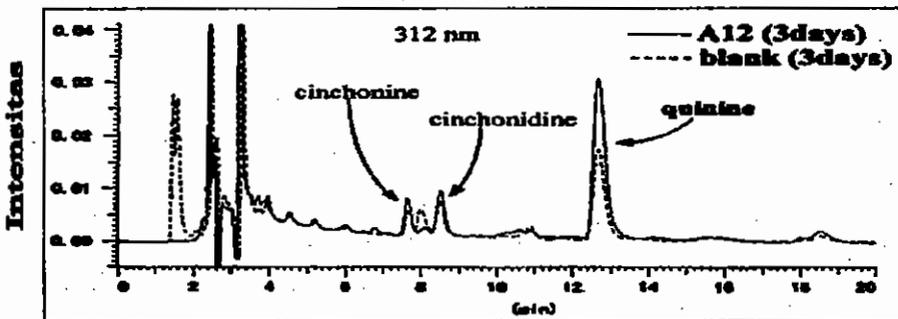
Gumbira (1987) menyatakan bahwa kadar gula yang tinggi dalam medium fermentasi dapat mengakibatkan terjadinya plasmoptysis. Plasmoptysis dapat mengakibatkan terhambatnya sintesa enzim-enzim pada rantai respirasi (Gumbira, 1987). Oleh karena pembentukan senyawa metabolit sekunder dalam

tubuh mikroba endofit terjadi dengan bantuan aktivitas enzim, maka senyawa kuinina tidak terbentuk dalam medium ini.

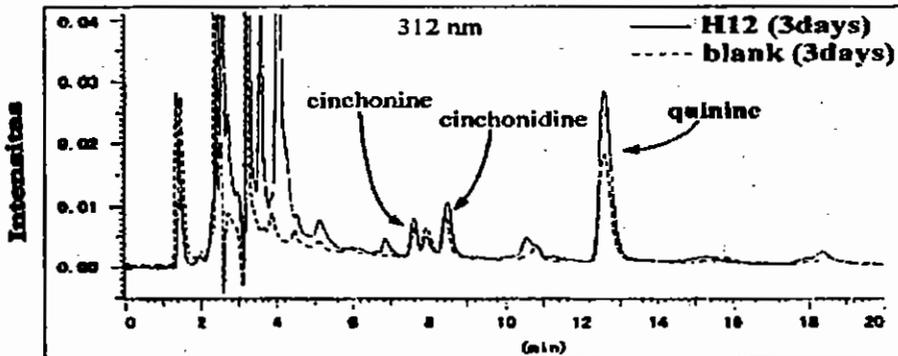
Sementara itu, medium Phoma yang asalnya adalah medium cair untuk produksi senyawa diterpen taksol oleh kapang endofit *Taxomyces andreana* (Strobel, dkk., 1993; Stierle, dkk., 1993) telah diatur sedemikian rupa komposisinya sehingga tampaknya sesuai untuk pertumbuhan dan pembentukan metabolit sekunder oleh mikroba endofit. Dan seluruh isolat yang diuji (kapang maupun khamir) terangsang untuk menghasilkan senyawa kuinina seperti yang terdeteksi dalam analisis KCKT (Tabel I dan Gambar 2).

Tabel II. Produktivitas senyawa kuinina oleh beberapa mikroba endofit selama inkubasi 3 hari dalam media modifikasi Rhoma

No	Kode isolat	Jenis mikroba	Lama inkubasi (hari)		
			1 hari	2 hari	3 hari
1	A12	Kapang	1,60	1,80	1,78
2	D132	Kapang	1,10	1,48	1,92
3	J3P1	Kapang	1,40	1,82	1,84
4	B12	Khamir	1,30	1,40	1,38
5	D12	Khamir	1,40	1,52	1,54
6	F11	Khamir	1,20	1,42	1,52
7	F12	Khamir	1,22	1,30	1,32
8	H12	Khamir	1,38	1,60	1,62



Gambar 3. Kromatogram KCKT untuk analisis kuantitatif oleh mikroba A12 dalam media modifikasi Phoma (catatan blank = tanpa mikroba)



Gambar 4. Kromatogram KCKT untuk analisis kuantitatif oleh mikroba H12 (blank = tanpa mikroba) dalam media modifikasi Phoma

Bila melihat tinggi puncak hasil analisis dengan KCKT peningkatan produksi senyawa metabolit di antara isolat khamir dan isolat kapang, diperoleh bahwa isolat kapang menunjukkan peningkatan produksi senyawa kuinina lebih baik daripada isolat khamir pada kedua jenis media. Isolat kapang yang memiliki spora (D132 dan J3P1) tampaknya menunjukkan aktivitas yang lebih baik dibandingkan isolat kapang yang tidak berspora (A12). (Tabel II, Gambar 3 dan 4) Isolat kapang juga menghasilkan metabolit mempunyai tinggi puncak yang berbeda karena di tanam pada kedua media yang berbeda. Produksi senyawa kuinina terdeteksi lebih tinggi pada medium Phoma sejak hari pertama (kecuali isolat D132) sampai hari ketiga dibandingkan pada medium PDB (kecuali J3P1), (Gambar 3 dan 4). Hal ini mungkin berhubungan dengan ketahanan spora terhadap perubahan lingkungan sekitarnya seperti pH (keasaman), dan suhu (Pelczar dan Chan, 1988).

Pengamatan peningkatan produksi senyawa alkaloid lainnya seperti kuinidin, sinkonina dan sinkonidina menunjukkan bahwa tidak terjadi peningkatan produksinya oleh medium yang ditambah dengan zat induser. Induser yang diberikan tampaknya hanya meningkatkan produksi senyawa kuinina dan tidak mempengaruhi pembentukan senyawa alkaloid yang lain. Induser biasanya bersifat spesifik pada spesies mikroba tertentu (Tanaka, 1992).

KESIMPULAN

Produksi kuinina dapat berlipat 2,2 kali lipat oleh isolat kapang J3P1 yang ditumbuhkan dalam medium PDB. Penggunaan induser hanya dapat bersifat spesifik pada mikroba tertentu, hal ini sesuai dengan percobaan Tanaka (1992).

DAFTAR PUSTAKA

- Gumbira, S.E., 1987. *Bioindustri Penerapan Teknologi Fermentasi*, edisi I, PT. Mediatayama Sarana Perkasa, Jakarta, 1987, 27
- Hostettmann, K., Hamburger M., Hostettmann M., dan Marston A., 1991. New Developments in Separation of Natural Product., Di dalam *Modern Phytochemical Methods*, (edit. N.H. Fischer *et al.*) Plenum Press, 1 – 31
- Musalam, Y., Sukasmono, Suhartika T., dan Supria. 1980. Alkaloid Kuinina di dalam Tanaman *Cinchona* sp., *WARTA BPTK*, 6, 85-93
- Pelczar, M. dan Chan. C.S. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi*, UI Press Jakarta, hal.70.
- Petrini, O., Sieber T.N., Toti L., dan Viret O., 1992. *Ecology, Metabolite Production and Utilization in Endophytic Fungi*, Wiley Liss Inc., 78
- Simanjuntak, P., Titi Parwati, Bustanussalam, Titik K. Prana, Ohashi K. dan Shibuya H., 2002. Biochemical Character of Endophyte Microbes Isolated from *Cinchona* plants, *Proceeding Seminar on JSPS-NCRT/DOST/LIPI/VCC Large Scale Cooperative Research in the Field of Biotechnology*, in Bangkok, Thailand Nov. 7 – 12, 2001 (In Press)
- Song, Y. 1998. *Isolation and Cultivation of Endophytic Fungi*, Asian Network on Microbial Reseach, Gadjah Mada university (GMU), Yogyakarta, 1998, 255 – 258
- Stierle, A., Strobel G., dan Stierle D., 1993. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreana*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew, *Sciences*, 260, 214-216
- Strobel, G.A., Stierle A., dan Hess W.M., 1993. Taxol Formation in Yew-Taxus, *Plant Sciences*, 92, 1 – 12
- Tanaka, Y., 1992, Fermentation Processes in Screening for new Bioactive Substances, in *The Search for Bioactive Compounds from Microorganism*, (editor Satoshi), Springer-Verlga Press., 303-325