

Produksi Metabolit Utama (-)-Citrinin, pada Kultur Jamur Endofit *Penicillium* sp dari Tanaman Teh

Production a Major Metabolite (-)-Citrinin in the Culture of the Endophytic Fungus *Penicillium* sp from a Tea Plant

Andria Agusta* dan Yuliasri Jamal

Laboratorium Fitokimia, Bidang Botani, Puslit Biologi, LIPI, Jl. Raya Jakarta-Bogor Km 46 Cibinong 16119
E-mail: bislunatin@yahoo.com *Penulis untuk korespondensi

Abstract

Endophytic fungi have been recognized as source of broad range biological active metabolites with high chemical structure diversity. The purpose of this research is to isolate and characterize major metabolite produce by the endophytic fungi *Penicillium* sp isolated from a tea plant. Cultivation of endophytic fungus *Penicillium* sp (AB2245443) in liquid medium PDB on a rotary shaker at 100 rpm, temperature 25 – 30°C for 7 days, produced a yellow metabolite. Separation of metabolite through chromatography technique and followed by chemical structure elucidation based on MS, IR, NMR spectra and published data showed that the yellow metabolite is (-)-citrinin.

Key words: tea plant, *Camellia sinensis*, endophytic fungus, *Penicillium* sp, (-)-citrinin

Diterima: 22 Januari 2008, disetujui: 20 September 2008

Pendahuluan

Mikroba endofit adalah salah satu golongan mikroba di alam yang hidup berasosiasi dengan tumbuhan tanpa menimbulkan efek merugikan bagi tumbuhannya (Bacon dan White, 2000). Mikroba endofit, terutama jamur endofit, merupakan sumber yang kaya akan metabolit sekunder bioaktif (Tan dan Zou, 2001; Zhang *et al.*, 2006), sehingga Owen dan Hundley (2004) menyebutnya sebagai *the chemical synthesizer inside plant*.

Dalam kurun waktu sepuluh tahun belakangan, berbagai jenis jamur endofit telah dilaporkan dapat memproduksi berbagai jenis metabolit sekunder dengan aktivitas biologi yang beragam. Horn *et al.*, (1995) melaporkan mengisolasi fomopsikalasin dari kultur jamur endofit *Phomopsis* sp yang berasosiasi dengan tumbuhan *Salix gracilostyla* var. *melanostachys*. Metabolit ini secara *in-vitro* memperlihatkan aktivitas biologi sebagai

antibakteri melawan *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella gallinarum*, di samping juga aktif sebagai antijamur melawan *Candida albicans*. Dari kultur jamur endofit *Cryptosporiopsis* cf. *quercina* yang berasosiasi dengan tumbuhan *Tripterigium wilfordii* juga telah dilaporkan keberadaan suatu analog asam tetramat, kriptosin yang bersifat sebagai antimikotik yang potensial melawan *Pyricularia oryzae* (Li *et al.*, 2000).

Tahun 1996, Krohn *et al.*, melaporkan isolasi dan karakterisasi tiga metabolit fenolik dari kultur jamur endofit *Phomopsis* sp yang berasosiasi dengan tumbuhan *Teucrium scorodonia* (Lamiaceae), yaitu fomopsin A dan C memperlihatkan aktivitas sebagai antibakteri melawan *Bacillus megaterium*. Di pihak lain, *Pestalotiopsis microspora* yang berasosiasi dengan tumbuhan *Terminalia morobensis* menghasilkan pestasin dan isopestasin yang aktif sebagai antibakteri dan antioksidan. Brady *et al.*, (2000) melaporkan isolasi karakterisasi

turunan senyawa fenolik, sitosporon D dan E dari jamur endofit *Cytospora* sp CR 200 dan *Diaporthe* sp CR 146 yang memperlihatkan aktivitas biologi sebagai antibakteri yang potensial melawan *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* dan juga terhadap jamur *Candida albicans*. Hal yang lebih menarik, kedua metabolit ini juga aktif melawan bakteri yang telah resisten terhadap antibiotik yang beredar di pasar global saat ini.

Jamur marga *Penicillium* merupakan salah satu kelompok jamur yang kosmopolit dan umum ditemukan di berbagai habitat (Samson *et al.*, 1995). Pada tumbuhan tingkat tinggi, umumnya jamur dari marga *Penicillium* bersifat saprofit dan/atau bersifat parasit. Namun beberapa jenis jamur *Penicillium* juga telah dilaporkan sebagai endofit yang berasosiasi dengan beberapa tumbuhan tinggi, seperti *P. janthinellum* dari tumbuhan *Melia azedarach* (Marinho *et al.*, 2005), *Penicillium* sp dari tumbuhan *Taxus brevifolia* (Stierle *et al.*, 1999).

Salah satu jamur endofit yang diisolasi dari tanaman teh juga diidentifikasi sebagai *Penicillium* sp (AB2245443; Agusta *et al.*, 2006). Jamur endofit ini jika ditumbuhkan di atas medium agar miring (PDA) akan mensekresikan suatu metabolit yang memiliki sifat berfluoresensi jika dipaparkan dengan sinar UV 365 nm. Untuk itu, pada tulisan ini akan dilaporkan kultivasi jamur endofit pada berbagai medium tumbuh, isolasi dan karakterisasi metabolit utama dengan sifat berfluoresensi pada kultur jamur endofit tersebut.

Metode Penelitian

Skrining produksi metabolit sekunder

Untuk skirining metabolit sekunder yang diproduksi oleh jamur endofit *Penicillium* sp digunakan 5 jenis medium semi sintetik dengan komposisi seperti terlihat pada Tabel 1. Selanjutnya jamur endofit *Penicillium* sp di tumbuhkan di dalam Erlenmeyer ukuran 100 ml yang berisikan 30 ml untuk setiap jenis medium pada suhu ruang (25-33°C) dengan kecepatan agitasi 90 rpm. Produksi metabolit sekunder dimonitor setiap 24 jam dengan cara

melakukan sampling 5 ml medium tumbuh, lalu diekstraksi dengan etilasetat dan dianalisis dengan KLT (SiO₂ GF254, CHCl₃:MeOH= 5:1) dengan penampak noda 5% vanillin/10% H₂SO₄. Atau dengan cara memaparkan sinar UV 365 nm ke medium tumbuh.

Produksi dan isolasi metabolit utama

Jamur endofit *Penicillium* sp ditumbuhkan di dalam 5 buah Erlenmeyer ukuran 500 ml yang berisikan 200 ml medium cair *potato dextrose broth* (PDB) dengan kecepatan agitasi 100 rpm pada suhu ruang (25-33°C). Setelah 7 hari, seluruh medium tumbuh berikut *biomass* diekstraksi dengan etilasetat dan selanjutnya dipekatkan dengan penguap putar sehingga diperoleh 495 mg ekstrak etilasetat. Ekstrak kasar yang diperoleh tersebut selanjutnya dipisahkan dengan metoda kolom kromatografi yang menggunakan silika gel sebagai fasa diam dan CHCl₃-MeOH (4:1) sebagai fasa bergerak sehingga diperoleh 68.3 mg produk metabolit sekunder berupa serbuk berwarna kuning.

Karakterisasi metabolit utama

Struktur kimia metabolit utama ditentukan berdasarkan sifat karakter fisikokimianya yang dilakukan dengan batuan peralatan sebagai berikut. Rotasi optik diukur dengan alat polarimeter digital (Jasco DIP-360) dengan konsentrasi 1.1 mg/ml di dalam etanol pada temperatur 24°C dan panjang sel 50 mm. FAB-MS diukur dengan menggunakan alat spektrometer masa JMS SX-102 A. Spektrum IR diukur dengan alat spektrofotometer Shimadzu FT-IR 8500 dengan plat KBr. Sedangkan spektrum ¹H- dan ¹³C-RMI diukur dengan spektrometer JEOL JNM-Lambda 500 yang dioperasikan pada 500 MHz untuk ¹H dan 125 MHz untuk ¹³C di dalam pelarut CDCl₃. Geseran kimia diberikan dalam skala δ (ppm) yang relatif terhadap tetrametilsilana (TMS, $\delta=0$) sebagai internal standar, dan konstanta kopling diberikan dalam satuan Herzt.

Hasil dan Pembahasan

Hasil skirining tes memperlihatkan bahwa medium tumbuh PDB dari jamur endofit

Penicillium sp memiliki karakteristik memancarkan sinar fluoresensi yang kuat jika diekspos dengan sinar UV pada panjang gelombang 365 nm setelah diinkubasi pada suhu ruang (25 – 33°C) selama beberapa hari, dan efek ini tidak terlihat pada medium tumbuh lainnya. Begitu juga dengan hasil analisis KLT memperlihatkan bahwa kultivasi *Penicillium sp* di dalam PDB memperlihatkan adanya produksi satu metabolit sekunder utama.

Kultivasi jamur endofit ini secara lebih intensif memperlihatkan bahwa sifat berfluoresensi dari medium tumbuh muncul setelah diinkubasi selama 3 hari, dan semakin kuat sejalan dengan perpanjangan waktu inkubasi. Hal tersebut di atas merupakan

indikator visual terhadap keberadaan dari metabolit sekunder dengan sifat fluoresensi yang kuat yang diproduksi oleh jamur endofit.

Penicillium sp

Ekstraksi medium tumbuh berikut biomassa dari jamur endofit *Penicillium sp* setelah ditumbuhkan di dalam PDB selama 7 hari dengan etil asetat, dan kemudian dipekatkan dengan penguap putar. Pemisahan ekstrak terlarut dalam etil asetat tersebut dengan kolom silika gel (SiO₂, CHCl₃:MeOH= 4:1) menghasilkan 68.3 mg serbuk berwarna kuning dengan nilai putaran optik ([α]_D) -25.5° (c=0.11, 28°C, EtOH).

Tabel 1. Komposisi medium tumbuh untuk skrining produksi metabolit sekunder.

Medium	Komposisi		Medium	Komposisi	
MY20	Pepton	5.0 g	Nutrient broth dengan 5% NaCl	Pepton	5.0 g
	Ekstrak yeast	3.0 g		Ekstrak beef	3.0 g
	Ekstrak malt	3.0 g		NaCl	5.0 g
	Glukosa	200.0 g		Air PAM	1000 ml
	Air PAM	1000 ml			
Triptik glukosa	Tryptic soy broth	30.0 g	GYP	Glukosa	20.0 g
	Ekstrak yeast	3.0 g		Ekstrak yeast	1.0 g
	Glukosa	5.0 g		Pepton	5.0 g
	Air PAM	1000 ml		K ₂ HPO ₄	0.5 g
PDB	Potato strach	4.0 g		Mg ₂ SO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
	Dekstroza	20.0 g		FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g
				CaCO ₃	1.0 g
				Air PAM	1000 ml

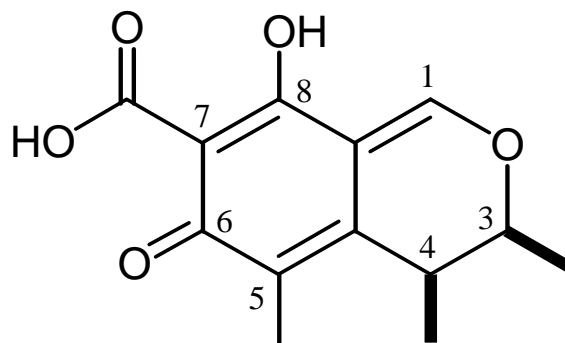
Tabel 2. ¹H- dan ¹³C-RMI Citrinin dari kultur *Penicillium sp*.

Atom	Citrinin dari kultur <i>Penicillium sp</i>			Citrinin	
	¹³ C-RMI	¹ H-RMI	¹³ C-RMI*	¹ H-RMI**	
C1	162.7	8.24 (1H,s)	162.9	8.25 (1H, s)	
C3	81.6	4.78 (1H, q, J=6.7 Hz)	81.8	4.80 (1H, q, J=6.7 Hz)	
C4	34.6	2.98 (1H, q, J=7.1 Hz)	34.7	2.98 (1H, q, J=7.1 Hz)	
C4a	139.0		139.2		
C5	123.1		123.2		
C6	183.8		183.9		
C7	100.3		100.4		
C8	177.2		177.3		
C8a	107.4		107.5		
C9	18.2	1.35 (3H, d, J=6.7 Hz)	18.2	1.35 (3H, d, J=6.7 Hz)	
C10	9.4	1.23 (3H, d, J=7.1 Hz)	9.6	1.23 (3H, d, J=7.1 Hz)	
C11	18.5	2.02 (3H, s)	18.4	2.02 (3H, s)	
C12	174.6		174.7		
OH		15.11 (1H, s)		15.13 (1H, s)	
OH		15.87 (1H, s)		15.90 (1H, s)	

*Hajjaj *et al.*, 1999 ** Marinho *et al.*, 2005

Spektrum massa (FAB-MS) metabolit sekunder dari jamur endofit *Penicillium* sp ini memperlihatkan ion molekul $[M+H]^+$ pada m/z 251 yang mengindikasikan rumus molekul $C_{13}H_{13}O_5$. Spektrum IR memperlihatkan serapan gugus karboksilat pada $3550-3100\text{ cm}^{-1}$. Interpretasi spektrum $^1\text{H-RMI}$ (dalam CDCl_3) dan spektrum $^{13}\text{C-RMI}$ memperlihatkan adanya sebuah sinyal proton olefinik terisolasi pada geseran kimia (δ) 8,24 (1-H), dua sinyal proton metin kuartet pada δ 2,98 ($J=7,1\text{ Hz}$, 4-H) dan δ 4,78 ($J=6,7\text{ Hz}$, 3-H), dua metil doubled pada δ 1,23 (4-CH₃) dan δ 1,35 (3-CH₃) serta satu sinyal metil terisolasi pada δ 2,02 (5-H) (Tabel 2). Di samping itu, dua sinyal karakteristik untuk gugus hidroksi yang membentuk kelat pada δ 15,11 dan δ 15,87 juga terdeteksi pada spektrum $^1\text{H-RMI}$ -nya. Spektrum DEPT memperlihatkan bahwa metabolit sekunder dari *Penicillium* sp ini terdiri dari 13 buah atom karbon dengan 4 buah karbon kuartener pada δ 100,3 (7-C), 107,3 (8a-C), 123 (5-C) dan 139,0 (4a-C) serta dua karbon karbonil pada δ 177,2 (7-COOH) dan pada δ 183,8 (6-C). Data spektroskopi massa RMI metabolit dari kultur jamur endofit *Penicillium* sp di atas identik dengan (-)-citrinin (Hajjaj *et al.*, 1999; Marinho *et al.*, 2005).

(-)-Citrinin (Gambar 1) pertama kali diisolasi dari kultur *Penicillium citrinum* (Hetherington dan Raistrick, 1931) yang belakangan ditemui pada kultur lebih dari selusin jenis *Penicillium*, beberapa jenis *Aspergillus* (Bennett dan Klich, 2003) dan juga pada kultur beberapa jenis *Monascus* (Hajjaj *et al.*, 1999). Baru-baru ini (-)-citrinin dilaporkan juga diproduksi oleh jamur endofit *Penicillium janthinellum* yang diisolasi dari buah *Melia azedarach* (Marinho *et al.*, 2005). Di samping itu, Marinho *et al.*, (2005) juga melaporkan bahwa citrinin memperlihatkan aktivitas biologi menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis*, namun tidak aktif sama sekali terhadap *Escherichia coli*. Sedangkan pertumbuhan *Leishmania Mexicana*, citrinin dihambat secara total dalam waktu 48 jam pada konsentrasi 40 $\mu\text{g/ml}$. Di lain pihak, citrinin dikenal sebagai salah satu mikotoksin yang mengakibatkan efek nefrotoksik pada manusia dan hewan (Fink-Gremmels, 1999). Baru-baru ini juga dilaporkan bahwa citrinin dapat mengakibatkan efek penekanan sistem imun yang berakibat peningkatan kapasitas infeksi sel oleh parasit *Toxoplasma gondii* (Herzog-Soares dan Freire, 2004).



Gambar 1. Struktur kimia (-)-citrinin

Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa (-)-citrinin adalah metabolit utama yang dihasilkan oleh jamur endofit *Penicillium* sp yang diisolasi dari tanaman teh pada medium cair PDB.

Ucapan Terima Kasih

Diucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Hirotaka Shibuya, Natural Product Chemistry Laboratory, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University, Fukuyama, Hiroshima, Japan atas pengukuran data spektroskopi RMI dan FAB-MS.

Daftar Pustaka

- Agusta, A., Ohashi, K. and Shibuya, H. 2006. Composition of the endophytic filamentous fungi isolated from tea plant *Camellia sinensis*. *J. Nat. Med.* 60 (3): 268-272.
- Bacon, C.W. and White, J.F. 2000. *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker, NY.
- Bennett, J.W. and Klich, M. 2003. Mycotoxins, *Clin. Microbiol. Rev.* 16 (3): 497-516.
- Brady, S.F., Singh, M.P., Janso, J.E. and Clardy, J. 2000. Guanacastepene, a fungal-derived diterpene antibiotic with a new carbon skeleton. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 2116-2117.
- Fink, G. 1999. Mycotoxin: their implications for human and animal health. *Vet. Q. J.* 21: 115-120.
- Hajjaj, H., Klaebe, A., Loret, M.O., Goma, G., Blanc, P.J. and Francois, J. 1999. Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *Monascus rubber* as revealed by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1): 311-314.
- Herzog-Soares, J.D.A. and Freire, R.B. 2004. Effect citrinin and in association with aflatoxin B₁ on the infectivity and proliferation of *Toxoplasma gondii* in vitro. *Br. J. Infectious Diseases* 8 (1): 101-108.
- Hetherington, A.C. and Raistrick, H. 1931, Studies in the biochemistry of microorganisms. Part XIV. On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, produce from glucose by *Penicillium citrinum* Thom. *Phil. Trans. R. Soc. London Ser. B*, 220B: 269-295.
- Horn, W.S., Simmonds, S.J., Schwartz, R.E. and Blaney, W.M. 1995. Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. *Tetrahedron* 51: 3969-3978.
- Li, J.Y., Strobel, G.A., Harper, J., Lobkovsky, E. and Clardy, J. 2000. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Org. Lett.* 23: 767-770.
- Krohn, K., Michel, A., Bahramsari, R., Florke, U., Aust, H.J., Draeger, S., Schulz, B. and Wray, V. 1996. Biologically active metabolites from fungi 7; Aposphaerin A dan B two new chroman-4-ones from *Aposphaeria* sp. *Nat. Prod. Lett.* 8: 43-48.
- Marinho, A.M.do R., Rodrigues-Filho, E., Moitinho, M. da L.R. and Santos, L.S. 2005. Biological active polyketides produce by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. *J. Braz. Chem. Soc.* 16 (2): 280-283.
- Owen, N.L. and Hundley, N. 2004. Endophytes the chemical sintesizer inside plants. *Science Progress* 87: 79-99.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. and Filtenborg, O. 1995. *Introduction to food borne fungi*. 4th ed. Netherlands: Ponsen & Looyen.
- Stierle, D.B., Stierle, A.A. and Ganser, B.K. 1999. Isolation of two highly methylated polyketide derivatives from a yew-associated *Penicillium* species. *J. Nat. Prod.* 62: 1147-1150.
- Tan, R.X. and Zou, W.X. 2001. Endophytes: A rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 18: 448-459.
- Zhang, Y., Li, X.M., Wang, C.Y. and Wang, B.G. 2006. A new naphthoquinonemine derivative from the marine algal-derived andophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. *Chinese Chem. Lett.*, 18: 951-953.