

BIOTRANSFORMASI 2E-6E-FARNESOL OLEH KHAMIR ENDOFIT CA1C-4

Andria Agusta dan Yuliasri Jamal

Laboratorium Biosains, Bidang Botani, Puslit Biologi-LIPI
Jl. Raya Bogor Km. 46, Cibinong 169011. Telp. 021-8765066 ext. 1104
E-mail: bislunatin@yahoo.com

ABSTRACT

The microbial transformation of 2E-6E-farnesol by the endophytic yeast CA1C-4 isolated from temu hitam (Curcuma aeruginosa Roxb.) has been investigated. Incubation of the 2E-6E-farnesol in cultivated endophytic yeast CA1C-4 in PDB at room temperature (25–32° C) under shaking condition at 120 rpm for eight days, produce a biotransformed product. Chemical structure elucidation based on ¹H- and ¹³C-NMR analysis and comparison with published data showed that the biotransformed product is 2E,6E-3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-carboxylic acid.

Key words: Biotransformation, *Curcuma aeruginosa*, 2E,6E-farnesol, endophytic yeast, 2E,6E-3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-carboxylic acid.

PENGANTAR

Salah satu kelompok mikroba di alam adalah mereka yang hidup di dalam jaringan sehat tumbuhan yang dikenal dengan nama mikroba endofit (Backer and White, 2000). Di samping sebagai produser senyawa kimia dengan spektrum yang luas (Zang *et al.* 2006, Tan and Zou, 2001), mikroba endofit juga memiliki kapabilitas untuk melakukan transformasi komponen kimia tumbuhan inangnya (Shibuya *et al.*, 2003; Agusta *et al.*, 2005).

Temu-temuan (tumbuhan *Curcuma*) adalah salah satu tumbuhan obat penting di Indonesia sebagai bahan baku pembuatan jamu. Salah satunya adalah temu hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb.). Sejauh ini, potensi fungi endofit yang hidup berasosiasi dengan jaringan sehat tumbuhan temu hitam belum diungkap sama sekali. Rimpang segar temu hitam dilaporkan mengandung beberapa senyawa dari golongan seskiterpena (Kitamura *et al.*, 2007). Dalam jalur biosintesis senyawa seskiterpena secara umum, seskiterpena alifatik 2E,6E-farnesol dikenal sebagai senyawa intermediet kunci (dalam bentuk turunan pirofosfat) untuk pembentukan seskiterpena siklik di dalam jaringan tumbuhan (Dewick, 1997; 2002; Croteau *et al.*, 2000), termasuk di dalam jaringan tumbuhan temu hitam. Berdasarkan hal tersebut, diduga fungi endofit yang diisolasi dari rimpang segar temu hitam memiliki kemampuan untuk melakukan biotransformasi senyawa 2E,6E-farnesol menjadi turunannya dalam medium semi sintetik di laboratorium.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan Tumbuhan

Bahan tumbuhan berupa rimpang segar temu hitam, *Curcuma aeruginosa* ROXB. (Zingiberaceae) dikoleksi dari daerah Jasinga, Bogor, Jawa Barat pada Maret 2001. Identifikasi jenis dilakukan di Herbarium Bogoriense, Puslit Biologi, LIPI.

Isolasi Fungi Endofit

Rimpang segar temu hitam dicuci dengan air sampai bersih. Kemudian disterilisasi permukaannya dengan cara merendam dalam 75% etanol selama 2 menit, 5,3% natrium hipoklorit selama 5 menit dan kemudian dengan 75% etanol selama setengah menit. Rimpang yang telah disterilkan permukaannya tersebut kemudian dipotong dengan ketebalan sekitar 0,25 cm, dan selanjutnya ditaruh di atas medium *corn-meal malt agar* (CMMA) yang mengandung kloramfenikol (0,05 mg/ml), lalu diinkubasi pada suhu 27° C selama beberapa hari. Setelah tumbuh, setiap koloni fungi selanjutnya ditransfer beberapa kali ke medium *potato dextrose agar* (PDA) sampai diperoleh koloni tunggal (Agusta *et al.*, 2006).

Skrining Biotransformasi 2E,6E-Farnesol

Keseluruhan fungi endofit yang telah diisolasi ditumbuhkan di dalam Erlenmeyer berukuran 500 ml yang berisikan 200 ml medium *potato dextrose broth* (PDB) pada *rotary shaker* dengan kecepatan agitasi 120

rpm. Setelah diinkubasi selama 5 hari pada suhu ruang (25–32°C), 20 ml larutan steril 2E,6E-farnesol (96%, Sigma) dalam metanol (1 mg/ml) ditambahkan ke dalam medium tumbuh. Selanjutnya diinkubasi kembali pada suhu ruang (25–32°C), 120 rpm. Jalannya reaksi biotransformasi dimonitor dengan melakukan sampling 5 ml medium tumbuh pada hari pertama, kedua, ketiga sampai hari ke-14 (2 minggu) setelah penambahan substrat, dan diekstraksi dengan kloroform. Selanjutnya sampel dianalisis dengan teknik KLT (SiO₂, *n*-heksana:etil asetat, 8:1) dengan penampak noda 1% CeSO₄/10% H₂SO₄.

Scaling-up Reaksi Biotransformasi oleh Khamir Endofit CA1C-4

Khamir endofit CA1C-4 ditumbuhkan di dalam 5 buah Erlenmeyer berukuran 500 ml yang masing-masing berisikan 200 ml medium PDB, dan diinkubasi dengan kondisi yang sama dengan di atas. Setelah 5 hari, 400 µl larutan steril 2E,6E-farnesol (96%, Sigma) dalam etanol (10 mg/ml) ditambahkan ke dalam medium tumbuh. Selanjutnya diinkubasi kembali pada suhu ruang (25–32°C), 120 rpm selama 8 hari.

Isolasi dan Penentuan Struktur Kimia Produk Utama

Seluruh medium tumbuh berikut miselia diekstraksi dengan kloroform dan kemudian dipekatkan dengan penguap putar, dan diperoleh 217,3 mg ekstrak. Pemisahan dilakukan dengan teknik kromatografi kolom menggunakan silika gel (70–230 mesh) sebagai fasa diam dan *n*-heksana:etil asetat (5:1) sebagai fasa gerak.

Struktur kimia produk utama ditentukan berdasarkan analisis ¹H-, ¹³C-RMI dan data terpublikasi. 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 *d*₆-CHCl₃. Geseran kimia diberikan dalam skala δ (ppm) yang relatif terhadap tetrametilsilana (TMS, δ = 0) sebagai internal standar, dan konstanta kopling diberikan dalam satuan Hertz.

HASIL

Dari proses isolasi diperoleh 11 isolat fungi endofit yang terdiri atas 3 isolat fungi berbentuk filamen dan 8 isolat khamir. Ke-11 isolat fungi endofit yang diperoleh selanjutnya diskriminasi kemampuannya untuk melakukan proses biotransformasi 2E,6E-farnesol di dalam medium PDB. Dari hasil skrining diketahui bahwa salah satu khamir endofit CA1C-4 memiliki kemampuan untuk melakukan proses biotransformasi 2E,6E-farnesol.

Untuk tujuan isolasi dan karakterisasi produk biotransformasi 2E,6E-farnesol oleh khamir endofit CA1C-4, maka dilakukan *scaling-up* reaksi biotransformasi menjadi 5×200 ml. Setelah substrat diinkubasi selama dua hari, maka seluruh medium berikut biomasa diekstraksi dengan CHCl₃ dan kemudian dipisahkan dengan teknik kromatografi kolom. Dari hasil pemisahan tersebut diperoleh sebanyak 102,6 mg produk utama (51,3%). Spektrum ¹H-RMI produk biotransformasi memperlihatkan adanya 11 sinyal seperti terlihat pada Tabel 1. Sedangkan spektrum ¹³C-RMI memperlihatkan terdapatnya 15 sinyal atom karbon seperti terlihat pada Tabel 2.

Tabel 1. ¹H-RMI produk biotransformasi dari 2E,6E-farnesol (CDCl₃, 500 MHz)

Atom H	2E,6E-farnesol*	10,11-dihidroksi-2E,6E-farnesol**	Produk Biotransformasi
1	4.15 (d, J=7Hz)	-	-
2	5.42 (t, J=7 Hz)	5.70 (s)	5.72 (s)
4	1.95–2.15 (m)	2.20 (m)	2.22 (m)
5	1.95–2.15 (m)	2.20 (m)	2.22 (m)
6	5.15 (m)	5.08 (m)	5.08 (m)
8	1.95–2.15 (m)	2.05 (m)	2.05 (m)
9	1.95–2.15 (m)	1.98 (m)	1.98 (m)
10	5.09 (m)	5.08 (m)	5.08 (m)
12	1.68 (s)	1.68 (s)	1.68 (s)
13	1.68 (s)	1.60 (s)	1.60 (s)
14	1.68 (s)	1.60 (s)	1.60 (s)
15	1.68 (s)	2.18 (d, J=1.5 Hz)	2.17 (d, J=1.5 Hz)

* (Amano *et al.*, 1980)

** (Oh *et al.*, 2001)

Tabel 2. ¹³C-RMI farnesol dan produk biotransformasi (CDCl₃, 125 MHz)

Atom	2E,6E-farnesol*	Asam 2E,6E-farnesol**	Produk Biotransformasi
C-1	58.9	170.8	172.2
C-2	124.3	114.8	115.2
C-3	139.5	163.0	163.0
C-4	31.9	41.2	41.2
C-5	26.3	15.9	25.9
C-6	124.3	122.7	122.7
C-7	135.9	136.3	136.3
C-8	32.2	39.7	39.7
C-9	26.6	26.7	26.6
C-10	124.0	124.2	124.2
C-11	131.4	131.5	131.5
C-12	25.6	25.7	25.7
C-13	23.3	17.7	17.7
C-14	17.6	16.0	16.0
C-15	13.3	19.1	19.2

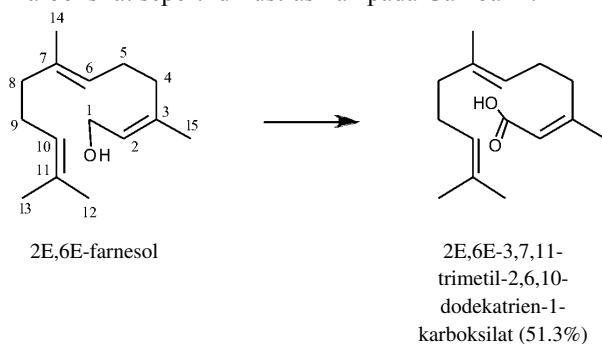
* (Amano *et al.*, 1980)

** (Oh *et al.*, 2001)

PEMBAHASAN

Dari hasil skrining diketahui bahwa salah satu isolat khamir endofit CA1C-4 mampu merubah *2E,6E*-farnesol di dalam medium PDB. Produk bitransformasi mulai terbentuk pada hari keempat setelah penambahan substrat yang ditandai dengan munculnya *spot* baru pada kromatogram KLT. Keberadaan *spot* yang baru tersebut semakin nyata dan bertambah besar sejalan dengan bertambah lamanya waktu inkubasi. Namun setelah hari kesembilan, terlihat terjadinya penurunan jumlah produk yang ditandai dengan semakin kecilnya *spot* produk pada kromatogram KLT yang berkorelasi dengan tidak terdeteksinya *spot* substrat *2E,6E*-farnesol. Fenomena ini mengindikasikan bahwa produk maksimal terjadi sebelum hari kesembilan, atau hari kedelapan setelah penambahan substrat.

Spektrum ^1H -RMI produk biotransformasi memperlihatkan pola yang hampir sama dengan substrat, yaitu *2E,6E*-farnesol kecuali hilangnya sinyal proton pada atom C-1. Sedangkan pada spektrum ^{13}C -RMI produk jelas terlihat terjadi pergeseran sinyal atom C-1 ke daerah *lowfield*, yaitu dari geseran kimia pada 58.9 menjadi 172.2. Hal ini mengindikasikan terjadinya perubahan gugus hidroksi pada posisi C-1 menjadi gugus karboksilat. Geseran kimia pada spektrum ^1H - dan ^{13}C -RMI produk biotransformasi dari *2E,6E*-farnesol oleh khamir endofit CA1C-4 ini identik dengan spektrum ^1H - dan ^{13}C -RMI asam *2E,6E*-3,7,11-trimetil-2,6,10-dodekatrien-1-karboksilat (Amano *et al.*, 1980; Oh *et al.*, 2001) seperti terlihat pada Tabel 1 dan 2. Berdasarkan data yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa produk biotransformasi *2E,6E*-farnesol oleh khamir endofit CA1C-4 adalah *2E,6E*-3,7,11-trimetil-2,6,10-dodekatrien-1-karboksilat seperti diilustrasikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Reaksi biotransformasi *2E,6E*-farnesol oleh Khamir CA1C-4

Produksi senyawa *2E,6E*-3,7,11-trimetil-2,6,10-dodekatrien-1-karboksilat dari farnesol dengan menggunakan kultur sel *Curcubita maxima* juga telah dilaporkan oleh

Nagaki *et al.* (2007). Namun hasil yang diperoleh sangat rendah (<5%) jika dibandingkan dengan hasil yang diperoleh dengan cara biotransformasi menggunakan khamir endofit CA1C-4 yang diperoleh dari temu hitam ini.

Senyawa *2E,6E*-3,7,11-trimetil-2,6,10-dodekatrien-1-karboksilat telah dikenal dengan baik sebagai senyawa antara untuk biosintesis juvenil hormon III (Feyereisen *et al.*, 1981). Senyawa ini juga dilaporkan dapat menghambat proses transisi sel *Candida albicans* dari bentuk uni selular menjadi formasi hyfa dengan nilai IC_{50} 4,56 mg/ml (Kim *et al.*, 2002).

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa khamir endofit CA1C-4 yang diisolasi dari rimpang temu hitam dapat merubah *2E,6E*-farnesol menjadi *2E,6E*-3,7,11-trimetil-2,6,10-dodekatrien-1-karboksilat dengan hasil transformasi sebesar 51,3%.

UCAPAN TERIMAKASIH

Diucapkan terimakasih kepada Prof. Dr. Hirotaka Shibuya, Natural Product Chemistry Laboratory, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Science, Fukuyama University, Fukuyama, Hiroshima, Jepang atas bantuan pengukuran data ^1H - dan ^{13}C -RMI.

KEPUSTAKAAN

- Agusta A, S Maehara, K Ohashi, P Simanjuntak, dan H Shibuya, 2005. Stereoselective Oxidation at C-4 of Flavans by the Endophytic Fungus *Diaporthe* sp. Isolated from a Tea Plant. *Chem. Pharm. Bul.* 53(12): 1565–1569.
- Amano T, Kasahara F, and Terao S, 1980. *Takeda Kenkyusho Ho* 39:1.
- Backer CW and JF White, 2000. *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker. NY.
- Croteau R, Kutchan TM, and Lewis NG, 2000. *Natural Products (Secondary Metabolites)*, in *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B Buchanan, W Grisseem, R Jones, Eds. American Society of Plant Physiologists.
- Dewick PM, 1997. *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach*. John Wiley & Sons. New York.
- Dewick PM, 2002. The Biosynthesis of C5-C25 Terpenoid Compounds, *Nat. Prod. Rep.* 19: 181–222.
- Feyereisen R, T Friedel, and SS Tobe, 1981. Farnesoic acid stimulation of C16 juvenil hormone biosynthesis by corpora allata of adult female *Diploptera punctata*. *Insect Biochem* 11: 401–409.
- Kim S, E Kim, DS Shin, H Kangb, and KB Oh, 2002. Evaluation of morphogenic regulatory activity of farnesoic acid and its derivatives against *Candida albicans* dimorphism. *Bioorg. Med. Chem. Letters* 12: 895–898.

- Kitamura C, T Nagoe, MS Prana, A Agusta, K Ohashi, and H Shibuya, 2007. Comparison of *Curcuma* sp. In Yakushima with *C. aeruginosa* and *C. zedoaria* in Java by tnrK gene sequence, RAPD pattern and essential oil component. *J. Nat. Med.* 61: 239–243.
- Nagaki M, H Imaruoka, J Kawakami, K Saga, H Kitahara, H Sagami, R Oba, N Ohya, and T Koyama, 2007. Biotransformation of prenyl alcohols by cultured cells of *Cucurbita maxima*. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* 47: 33–36.
- Oh KB, H Miyazawa, T Naito, and H Matsuoka, 2001. Purification and characterization of an regulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. *PNAS* 98: 4664–4668.
- Shibuya H, C Kitamura, S Maehara, M Nagahata, H Winanarno, P Simanjuntak, HS Kim, Y Wataya and K Ohashi, 2003. Transformation of *Chincona* Alkaloids into 1-*N*-Oxide Derivatives by Endophytic *Xylaria* sp. Isolated from *Chincona pubescens*. *Chem. Pharm. Bull.* 51: 71–74.
- Tan RX and WX Zou, 2001. Endophytes: A rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 18: 448–459
- Zhang HW, YC Song, and RX Tan, 2006. Biology and Chemistry of the endophytes. *Nat. Prod. Rep.* 23: 753.