

**BIOTRANSFORMASI SENYAWA ALKALOID KINKONA OLEH
KAPANG *Xylaria* sp. MENJADI ALKALOID KINKONA N-OKSIDA
[Studi Mikroba Endofit Tanaman *Cinchona* spp. (5)]**

**BIOTRANSFORMATION OF CINCHONA ALKALOID COMPOUNDS BY MOLD
Xylaria sp. TO CINCHONA N-OXIDE ALKALOIDS
[Studies on Endophytic Microbes of *Cinchona* spp. plants (5)]**

**Partomuan Simanjuntak¹⁾, Bustanussalam¹⁾, Titik K.Prana¹⁾, K. Ohashi²⁾ dan
Hirotaka Shibuya²⁾**

¹⁾Puslit Bioteknologi-LIPI, Jalan Raya Bogor Km 46 Cibinong 16911

²⁾Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University, Japan

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang biotransformasi senyawa alkaloid kinkona (kuinin, kuinidin, sinkonidin dan sinkonin) dengan menggunakan mikroba endofit dari tumbuhan *Cinchona succirubra* Pav. Hasil biotransformasi selama 2 hari setelah prakultur memberikan senyawa alkaloid kinkona N-oksida (kuinin N-oksida, kuinidin N-oksida, sinkonidin N-oksida dan sinkonin N-oksida) dan hasil bioesainya juga menunjukkan efektivitas sebagai antimalaria. Pemurnian senyawa hasil biotransformasi dilakukan dengan analisis kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dan penentuan struktur kimia berdasarkan interpretasi data resonansi magnetik inti (RMI) karbon.

Kata kunci : Biotransformasi, mikroba endofit, *Xylaria* sp. *Cinchona succirubra* Pav., alkaloid kinkona, kuinin, kuinin N-oksida

ABSTRACT

A biotransformation study on alkaloid chinchona compounds (quinine, quinidine, cinchonidine, cinchonine) by endophytic microbe from *Cinchona succirubra* have been done. The biotransformation for 2 days after preculture yielded cinchona N-oxide compounds (quinine N-oxide, quinidine N-oxide, cinchonidine N-oxide, cinchonine N-oxide) alkaloids and the bioassay of the compounds also showed effectiveness as antimalaria. Purification the biotransformed compound was conducted by a high performance liquid chromatograph (HPLC) and determination of chemical structure was done based on carbon nuclear magnetic resonance (NMR).

Key words : Biotransformation, endophyte microbe, *Xylaria* sp., *Cinchona succirubra* Pav., cinchona alkaloid, quinine, quinine N-oxide

PENDAHULUAN

Senyawa alkaloid kinkona atau juga disebut sebagai alkaloid kuinin seperti kuinin (1), kuinidin (2), sinkonidin (3) dan sinkonin (4) adalah senyawa kimia alkaloid yang banyak terdapat dan diisolasi dari tumbuhan Kina (*Cinchona* spp.), (Gambar 2). Tumbuhan ini banyak digunakan sebagai sumber senyawa kimia bioaktif untuk pembuatan obat-obatan khususnya senyawa kuinin yang sangat populer sebagai antimalaria untuk melawan parasit yang mendiami darah eritrosit manusia, walaupun demikian senyawa ini masih menunjukkan efek yang serius terhadap pasien sebagai efek samping.

Banyak peneliti-peneliti telah melakukan biotransformasi dengan menggunakan mikroorganisme untuk memperoleh suatu senyawa yang berupa turunan senyawa dari prekursornya. Senyawa ini diperkirakan

mempunyai daya aktivitas yang lebih tinggi dan tidak mempunyai efek samping, maupun dengan tujuan untuk memperoleh sumber obat-obatan alternatif yang lebih murah dan mudah didapat.

Senyawa kuinidin telah dapat dikonversikan menjadi (3S)-3-hidroksi kuinidin (Brodie *et al*, 1951); menjadi 2'-kuinidin (Palmer *et al*, 1969) dan menjadi *Orto*-desmetilkuinidin (Carol *et al*, 1974). Senyawa dihidrokuinidin dapat dioksidasi selama metabolisme dalam tubuh manusia dan hewan menjadi senyawa 10-hidroksi-10,11-dihidroksi kuinidin (Diaz-Aurauzo and Cook, 1990). Walaupun biotransformasi tersebut sangat berguna untuk membuat suatu model metabolisme manusia, tetapi hasil yang diperoleh masih merupakan suatu reaksi hidrosilasi, pembentukan suatu keton dan pemecahan ikatan *Orto*-metoksil yang umum terjadi pada reaksi biotransformasi.

Siebers Wolff *dkk* (1993) telah melakukan biotransformasi senyawa alkaloid kinkona (kuinin, kuinidin, sinkonidin dan sinkonin) dengan menggunakan 146 jenis mikroorganisme komersial (bukan merupakan mikroba endofit) pada 5 jenis media sintetik terseleksi dan diketahui mempunyai aktivitas enzim untuk suatu reaksi oksidasi. Dari hasil yang mereka laporan bahwa hanya 10% dari jumlah mikroorganisme tersebut dapat menghasilkan senyawa alkaloid kinkona N-oksida seperti kuinin N-oksida (**1a**), kuinidin N-oksida (**2a**) dan sinkonidin N-oksida (**3a**) (Siebers-Wolff *et al*, 1993).

Dalam tulisan ini akan dilaporkan hasil biotransformasi senyawa alkaloid kinkona (kuinin, kuinidin, sinkonidin, dan sinkonin) dengan menggunakan mikroba endofit hasil isolasi dari *Cinchona succirubra* dengan menggunakan media cair modifikasi S7 (Stierle *et al*, 1993).

METODOLOGI

Bahan Kimia dan Media

Bahan untuk penelitian ini adalah ranting *Cinchona succirubra* yang dikoleksi dari Kebun Raya Cibodas, Jawa Barat. Identifikasi tanaman dilakukan di Herbarium Bogoriensis, Pusat Penelitian Botani-LIPI Bogor dan spesiemen disimpan di Herbarium tersebut. Substrat yang digunakan adalah kuinin HCl, kuinidin HCl, sinkonidin HCl, dan sinkonin HCl yang berupa senyawa murni standar merk Nacalai, Japan. Pelarut yang digunakan adalah kloroform, asetonitril yang mempunyai standard PA grade. Media yang digunakan adalah media Nutrien Agar (NA) yang mengandung nystatin 0,1 mg/mL; media Corn Meal Malt Agar (CMM) yang mengandung kloramfenikol 0,05 mg/mL; media cair modifikasi S7 (Stierle *et al*, 1993).

Alat

Shaker, otoklaf, pHmeter, incubator, Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT jenis JASCO) dan Resonansi Magnetik Inti (RMI Jeol GX-500, 500 MHz)

Cara kerja

Isolasi mikroba endofit dari Cinchona succirubra. Ranting muda *C. succirubra* dipotong dengan ukuran lebih kurang 1 cm dan dicuci dengan air, kemudian direndam dalam 70% etanol selama 1 menit, 5,3% natriumhipoklorit selama 5 menit dan terakhir dengan 70% etanol yang bertujuan untuk sterilisasi bagian permukaan ranting. Lalu ranting dibelah dua dan ditempatkan pada medium plate NA dan belahan lainnya pada medium plate CMM. Diinkubasi pada suhu kamar, dan setelah beberapa hari setiap koloni dimurnikan dan ditransfer ke media PDA untuk kapang, dan koloni bakteri ditransfer ke media NA, diinkubasi pada suhu kamar dan setiap 5 hari secara periodik diperiksa kemurniannya hingga diperoleh isolat mikroba endofit murni.

Transformasi mikroba senyawa alkaloid kinkona oleh mikroba endofit.

Mikroba endofit murni hasil isolasi dari tumbuhan *C. succirubra* dikulturkan dalam Erlenmeyer (500 mL) yang berisi media cair modifikasi S7 (Stierle *et al*, 1993) selama 4 hari pada suhu kamar dan kecepatan penggojog 120 rpm. Kemudian pada hari kelima setiap Erlenmeyer ditambahkan masing-masing dengan 20 mg kuinin HCl, kuinidin HCl, sinkonin HCl dan sinkonidin HCl. Inkubasi dilakukan selama 7 hari dengan kecepatan penggojog (shaker) 120 rpm pada suhu kamar.

Ekstraksi dan Isolasi senyawa hasil transformasi. Setelah perlakuan inkubasi selama 7 hari, kultur cair yang diperoleh pada setiap hari disaring dan filtratnya diekstraksi dengan pelarut kloroform sebanyak 3 kali. Kemudian ekstrak tersebut dianalisis dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) untuk mengetahui terjadinya biotransformasi atau belum dari senyawa alkaloid kinkona menjadi senyawa lain. Kondisi KCKT yang digunakan adalah HPLC Jasco, jenis kolom CAPCELL PAK C18 UG120; fasa mobil

dapar posfat 20 mM (pH 2,5) : asetonitril = 9 : 1, kecepatan alir 1,0 mL/menit, panjang gelombang UV = 230 nm.

Hasil biotransformasi yang diperoleh dapat ditampung pada suatu tabung reaksi, kemudian diuapkan dan hasilnya dapat digunakan untuk analisis struktur kimia dengan interpretasi data spektra resonansi magnet inti karbon.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Mikroba

Hasil isolasi dan pemurnian mikroba endofit dari tumbuhan *C. succirubra* diperoleh 10 jenis kapang (CYPC-1 ~ CYPY-10) dan 7 jenis bakteri (NYPC-1~NYPC-7) yang dibedakan berdasarkan morfologinya. Dari semua mikroba endofit yang difermentasikan dalam media cair modifikasi S7, hanya kapang CYPC-1 yang dapat mentransformasikan senyawa alkaloid kinkona (**1**, **2**, **3** dan **4**) menjadi senyawa alkaloid kinkona N-oksida (**1a**, **2a**, **3a** dan **4a**). Hasil identifikasi kapang CYPC-1 yang dilakukan di *Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University, Fukuyama Japan* dengan nama spesies *Xylaria* sp.

Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Identifikasi hasil biotransformasi untuk senyawa **1** dengan analisis KCKT diperoleh bahwa inkubasi selama 1 hari setelah 4 hari prakultur menunjukkan bahwa terdapat 2 puncak kromatogram pada waktu retensi (Rt) 12,2 menit dan 14,7 menit (Gambar1). Dengan membandingkan kromatogram terhadap kromatogram standar kuinin diperoleh bahwa kromatogram I (Rt 12,2 menit) merupakan senyawa hasil biotransformasi (**1a**) dan kromatogram II (Rt 14,7) adalah senyawa kuinin standar. Pengamatan analisis KCKT untuk hasil biotransformasi pada hari kedua menunjukkan bahwa kromatogram senyawa dengan Rt 12,2 menit intensitasnya semakin tinggi, sedangkan senyawa dengan Rt 14,7 menit intensitasnya menurun (Gambar 1). Sedangkan pengambilan sampel pada hari ke3 sampai hari ke7 diperoleh bahwa intensitas puncak kromatogram tidak mengalami perubahan.

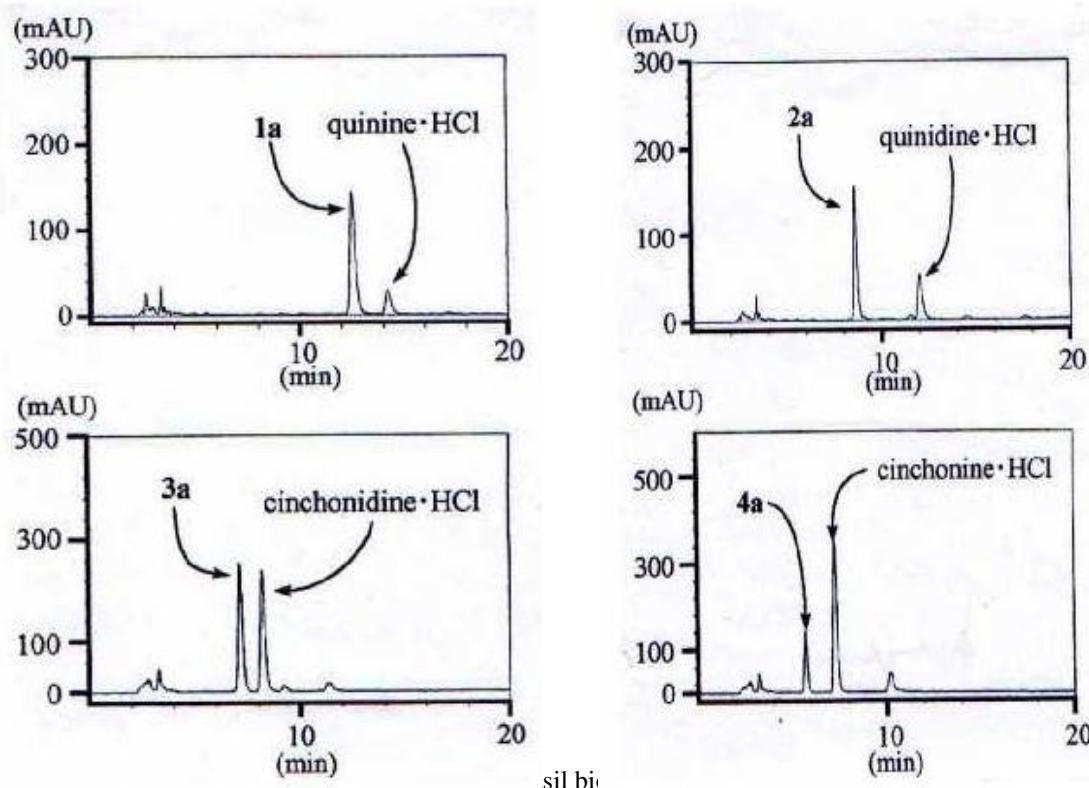
Biotransformasi (Gambar 2), untuk senyawa kuinidin (**2**) ditunjukkan bahwa pada hari ke2 senyawa kuinidin (Rt 12,5 menit) telah dikonversikan menjadi senyawa **2a** (Rt 8,7 menit), sedangkan senyawa sinkonidin (Rt 8,1 menit) menjadi senyawa **3a** (Rt 7,4 menit) dan sinkonin (Rt 7,5 menit) menjadi senyawa **4a** (Rt 6,1 menit). Kromatogram KCKT hasil biotransformasi senyawa **1**, **2**, **3**, dan **4** menjadi senyawa **1a**, **2a**, **3a**, dan **4a** (Gambar 1).

Kadar senyawa kimia hasil biotransformasi untuk senyawa **1a** adalah 51% (dihitung dari berat sample precursor 20 mg senyawa **1**), sedangkan untuk senyawa **2a**, **3a** dan **4a** masing-masing adalah 26%, 38% dan 14%. Hasil ini lebih banyak dibandingkan dengan hasil perolehan oleh Sieber-Wolff *dkk.* (1993) yaitu untuk senyawa **1a** (8,6%), **2a** (2%), **3a** (4,7%) dan tidak terjadinya konversi senyawa **4** menjadi **4a**.

Hasil ini menunjukkan bahwa sistem enzim yang terdapat di dalam mikroba endofit *Xylaria* sp. lebih dapat mengaktifasi metabolisme alkaloid kinkona daripada mikroba komersial yang digunakan oleh Sioebers-Wolff, karena *Xylaria* sp. hasil isolasi adalah merupakan mikroba yang hidup di lingkungan ekosistem alkaloid sendiri

Analisis Resonansi Magnetik Inti Karbon

Hasil analisis spektra resonansi magnet inti (RMI) karbon untuk senyawa **1a** menunjukkan bahwa terdapat 20 sinyal karbon yang terdiri dari 1 karbon kuartet (q); 5 karbon triplet (t); 10 karbon doublet (d) dan 4 karbon singlet (s). Dengan membandingkan data RMI senyawa **1a** dengan RMI senyawa **1** (Tabel II) ditunjukkan bahwa hampir semua data pergeseran kimia kedua senyawa mempunyai kemiripan, kecuali pada atom karbon C-2, C-6 dan C-8. Perbedaan $\Delta\delta_C$ yang berkisar 13 ~ 15 ppm ini adalah akibat teroksidasi atom N yang berada di antara C-2, C-6 dan C-8 tersebut, hal ini sangat dipengaruhi oleh keselektronegatifan atom yang mengikat atom nitrogen yaitu oksigen. Peristiwa itu menyebabkan terjadinya penurunan kepadatan awan elektron di sekitar proton akibat pengaruh induksi atom N dan juga atom O. Sehingga gugus atau atom yang berada di sekitar N dan oksigen untuk senyawa **1a** akan menaikkan pergeseran kimia, dibandingkan gugus atau atom yang hanya dipengaruhi oleh atom N saja pada senyawa **1**.



kiri atas; kuinidin, kanan atas; kinkonidin, kiri bawah; dan kinkonin, kanan bawah).

Tabel I. Data pergeseran kimia RMI karbon untuk senyawa hasil biotransformasi
Dari kuinin, kuinin-oksida,kuinidin dan kuinidin N-oksida

No	Kuinin (1)	Kuinin N-oksida (1a)	Kuinidin (2)	Kuinidin N-oksida (2a)
N-1	-		-	-
C-2	57,69 (t)	71,08 (t)	64,73 (t)	50,45 (t)
C-3	40,98 (d)	42,38 (d)	42,54 (d)	41,43 (d)
C-4	29,23 (d)	28,77 (d)	29,14 (d)	29,77 (d)
C-5	28,24 (t)	27,64 (t)	27,42 (t)	27,24 (d)
C-6	44,11 (t)	59,98 (t)	66,19 (t)	50,90 (t)
C-7	21,78 (t)	20,90 (t)	21,21 (t)	21,45 (t)
C-8	61,08 (d)	74,95 (d)	73,69 (d)	60,87 (d)
C-9	72,28 (d)	64,14 (d)	64,54 (d)	72,53 (d)
C-10	142,80 (d)	139,54 (d)	141,84 (d)	121,48 (d)
C-11	114,88 (t)	116,85 (t)	117,14 (t)	115,13 (t)
N-1'	-	-	-	-
C-2'	148,13 (d)	148,09	149,21	148,25
C-3'	120,05 (d)	120,09	120,18	120,00
C-4'	150,68 (s)	149,31	149,21	150,72
C-4a'	128,10 (s)	127,56	127,58	128,19
C-5	102,44 (d)	102,92	102,74	102,48
C-6	159,64 (s)	159,88	159,94	159,08
C-7	123,33 (d)	123,57	123,57	123,37
C-8'	131,37 (d)	131,23	131,32	131,41
C-8a'	144,76 (s)	144,55	144,62	144,84
OMe	56,45 (q)	56,54	56,41	56,58

Interpretasi data spektra RMI karbon untuk senyawa **2a**, **3a** dan **4a** juga mempunyai karakteristik yang sama seperti pada senyawa **1a**. Hal ini dapat diketahui adanya perbedaan pergeseran kimia yang berbeda di antara atom C yang mengelilingi atom N₁ seperti C-2, C-6 dan C-8. Data pergeseran kimia RMI karbon untuk senyawa **1**, **1a**, **2**, **2a**, (Tabel I) dan untuk senyawa **3**, **3a**, **4**, dan **4a** dapat dilihat pada Tabel II

Tabel II. Data pergeseran kimia RMI karbon untuk senyawa hasil biotransformasi

No	Sinkonidin (3)	Sinkonidin N-oksida (3a)	Sinkonin (4)	Sinkonin N-oksida (4a)
N-1	-	-	-	-
C-2	57,63 (t)	71,51 (t)	50,33 (t)	64,97 (t)
C-3	40,87 (d)	42,31 (d)	41,40 (d)	42,53 (d)
C-4	29,23 (d)	28,74 (d)	29,72 (d)	29,18 (d)
C-5	28,26 (t)	27,70 (t)	27,21 (t)	27,43 (t)
C-6	43,97 (t)	60,18 (t)	50,86 (t)	66,59 (t)
C-7	22,30 (t)	21,16 (t)	21,87 (t)	21,31 (t)
C-8	61,73 (d)	75,17 (d)	51,32 (d)	73,96 (d)
C-9	72,28 (d)	64,23 (d)	72,41 (d)	64,69 (d)
C-10	142,78 (d)	139,61 (d)	141,79 (d)	139,31 (d)
C-11	114,90 (t)	116,72 (t)	115,06 (t)	117,07 (t)
N-1'	-	-	-	-
C-2'	150,92	150,91	150,28	150,96
C-3'	119,95	120,15	119,95	120,29
C-4'	152,32	150,93	152,28	150,96
C-4a'	127,18	126,49	127,23	126,55
C-5	124,56	124,87	124,55	124,76
C-6	128,38	128,51	128,16	128,53
C-7	130,07	130,94	130,71	130,93
C-8'	130,68	129,96	130,06	130,01
C-8a'	148,85	148,63	148,85	148,68
OMe	-	-	-	-

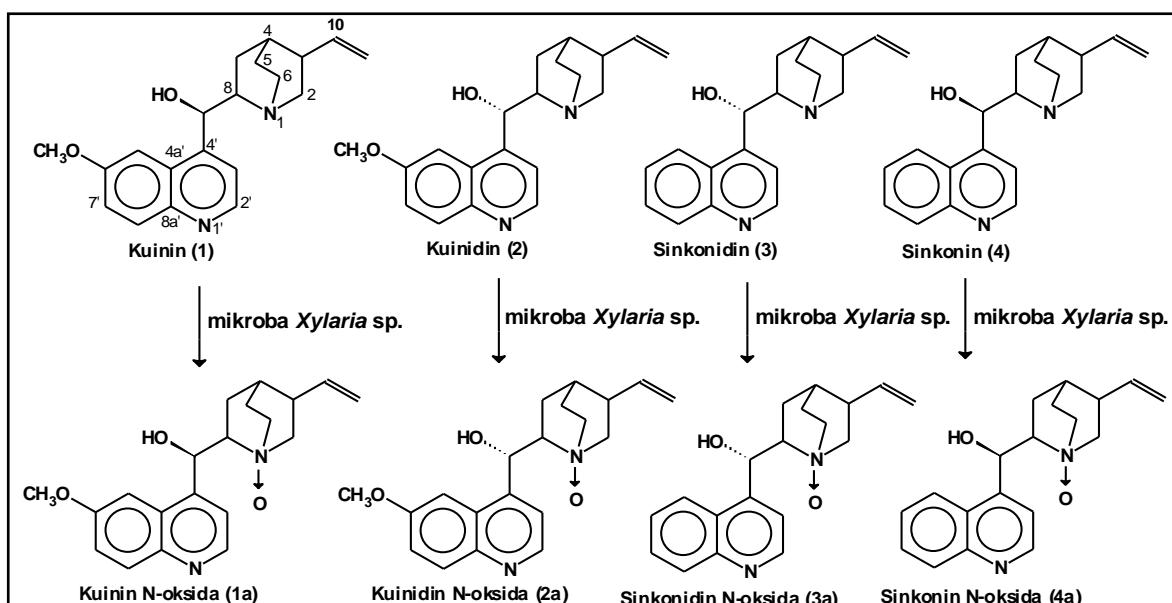
Hasil uji Bioaktivitas

Hasil uji bioaktivitas yang dilakukan di *Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University, Fukuyama Japan*, menunjukkan bahwa semua senyawa alkaloid hasil konversi ini mempunyai keefektifan sebagai penghambat proliferasi parasit malaria patogen *Plasmodium falcifarum* (suatu strain yang resistant terhadap klorokuin) (Tabel III).

Tabel III. Hasil Uji bioaktivitas senyawa biotransformasi terhadap parasit *Plasmodium falcifarum*

Senyawa kimia	IC ₅₀ terhadap <i>Plasmodium falcifarum</i>	Ratio pembiakan untuk sel FM3A (Breeding ratio for FM3A cells)
Kuinin 1-N-oksida (1a)	1,3 x 10 ⁻⁵ M	83% (4,1 x 10 ⁻⁵ M)
Kuinidin 1-N-oksida (2a)	1,2 x 10 ⁻⁵ M	71% (3,9 x 10 ⁻⁵ M)
Kinkonidin 1-N-oksida (3a)	-	100% (4,2 x 10 ⁻⁵ M)
Kinkonin 1-N-oksida (4a)	2,1 x 10 ⁻⁵ M	100% (4,6 x 10 ⁻⁵ M)
Kuinin	1,5 x 10 ⁻⁷ M	58% (4,7 x 10 ⁻⁵ M)

Walaupun keefektifan senyawa alkaloid ini masih lebih kecil dibandingkan dengan senyawa standar kuinin, pemakaian prosedur untuk produksi senyawa alkaloid kinkona N-oksida tersebut dapat dimanfaatkan untuk tujuan penyediaan bahan baku dalam mempelajari metabolisme farmakologinya. Hasil uji bioaktivitas senyawa biotransformasi dapat dilihat pada Tabel III..



Gambar 2. Mekanisme biotransformasi perubahan senyawa karena pengaruh *Xylaria* sp.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

Senyawa alkaloid kinkona dapat ditransformasikan menjadi senyawa alkaloid kinkona N-oksida oleh kapang *Xylaria* sp. Persentase kadar alkaloid kinkona N-oksida yang dihasilkan lebih besar bila dibandingkan dengan penggunaan mikroba bukan endofit. Walaupun hasil uji bioaktivitas yang diperoleh lebih kecil dibandingkan dengan senyawa kuinin, tetapi masih dapat diharapkan untuk penelitian lanjutan dalam mempelajari metabolit farmakologinya.

DAFTAR PUSTAKA

- Brodie, B.B., Baer, J.E., and Craig, L.C. 1951. Metabolic Products of the Cinchona Alkaloids in Human Urine. *J. Biol. Chem.* **188**, 567
- Caroll, F.I., Philip, A., and Coleman, M.C. 1976. Synthesis and Stereochemistry of a Metabolite Resulting from the Biotransformation of Quinidine in Man. *Tetrahedron Lett.* **21**, 1757 – 1760
- Diaz-Arauzo, H. and Cook, J.M. 1990. Synthesis of 10,11-Dihydroxydihydroquinidine N-oxide, a New Metabolite of Quinidine. Preparation and ¹H-NMR Spectroscopy of the Metabolites of Quinidine and Conformational Analysis via 2D COSY NMR Spectroscopy. *J. Nat. Prod.* **53**, 112-124
- Palmer, K.H., Martin, B., Baggett, B., and Wall, M.E. 1969. The Metabolic Fate of Orally Administered Quinidine Gluconate in Humans. *Biochem. Pharmacol.* **18**, 1845-1860.
- Siebers-Wolff, S., Arfmann, H.A., Abraham, W.R., and Kieslich, K. 1993. Microbiological Hydroxylation and N-oxidation of Cinchona Alkaloids, *Biocatalysis*, **8**, 47 – 58.
- Stierle, A., Strobel, G., and Stierle, D. 1993. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. *Science*, **260**, 214-216

