Metileugenol, metabolit utama pada kultur jamur endofit yang diisolasi dari tumbuhan pandan wangi

Methyleugenol, a major metabolite on culture of endophytic fungi isolated from pandan wangi plant

Yuliasri Jamal, Praptiwi dan Andria Agusta[*)]
Laboratorium Fitokimia, Bidang Botani, Puslit Biologi LIPI

Abstrak

Dua jenis jamur endofit, yaitu *Colletotricum* sp. PWD2 dan *Coelomycetes* PWA1 yang diisolasi dari tumbuhan pandang wangi (*Pandanus amarylifolius*) telah dikultivasi pada medium cair GYP selama 3 minggu pada suhu ruang tanpa pengadukan. Ekstrak etil asetat dari kultur kedua jamur endofit tersebut memperlihatkan aktivitas menghambat pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*. Hasil analisis GC-MS memperlihatkan bahwa metileugenol adalah metabolit utama pada ekstrak etil asetat dari kultur kedua jenis jamur endofit tersebut.
Kata kunci: pandan wangi, *Pandanus amarylifolius*, jamur endofit, aktivitas antijamur, metileugenol

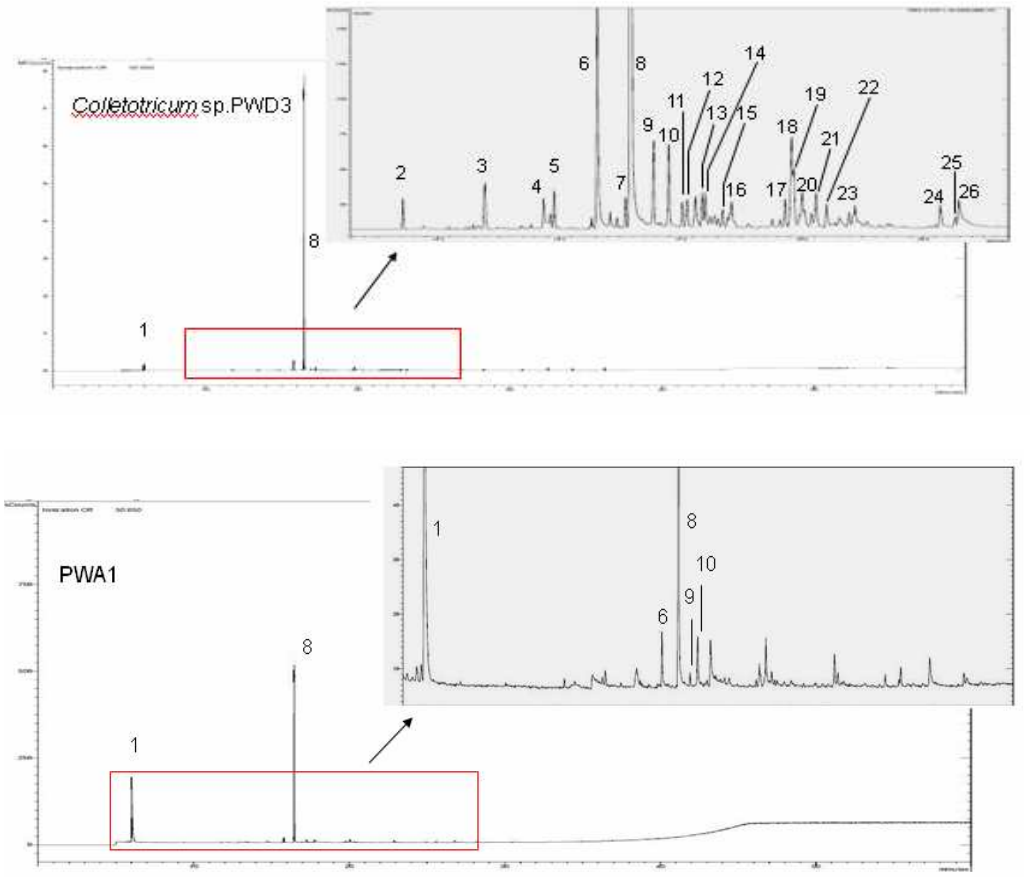
Abstract

Two kinds of endophytic fungi i.e. *Colletotricum* sp. PWD2 and *Coelomycetes* PWA1 isolated from pandan wangi (*Pandanus amarylifolius*) have been cultivated in a liquid medium, GYP for 3 weeks at room temperature without agitation. The ethyl acetate extracts derived from liquid cultures showed antifungal activity against *Saccharomyces cerevisiae*. The GC-MS analysis results showed methyleugenol as main metabolite in the ethyl acetate extract of both fungi cultures.
Key words: pandan wangi, *Pandanus amarylifolius*, endophytic fungi, antifungal, methyleugenol

Pendahuluan

Jamur endofit dilaporkan memiliki metabolit sekunder dengan diversitas yang tinggi. Berbagai golongan metabolit sekunder seperti alkaloid, terpenoid, kuinon, turunan isokumarin, fenilpropanoid, fenolik, dan senyawa alifatik telah diisolasi dari kultur *in-vitro* jamur endofit dalam kurun waktu 20 tahun terakhir (Tan and Zou, 2001; Zhou and Tan, 2003; Chang *et al*., 2006).

Pandan wangi (*Pandanus amarylifolius*) adalah salah satu tumbuhan yang akrab digunakan sebagai salah satu pewarna dan pewangi makanan. Sebanyak 9 jenis jamur endofit yang terdiri dari *Drechslera* sp. PWD1, *Colletotricum*sp. PWD2, *Coelomycetes* PWA1, *Coelomycetes* PWA2, *Fusarium* sp. PWA3, *Colletotricum* sp. PWA4, *Coelomycetes* PWA5, *Coelomycetes* PWA6 dan *Coelomycetes* PWA7 telah diisolasi dan dikarakterisasi dari tumbuhan pandan wangi. Salah satu di antaranya, yaitu *Coelomycetes* PWA2 telah dilaporkan memproduksi eugenol (Jamal, *et al*., 2009). Dari serangkaian penelitian lanjutan untuk mengungkapkan bio-prospeksi jamur endofit yang diisolasi dari pandan wangi ini, berhasil ditemukan dua jenis isolat jamur yaitu *Colletotricum* sp. PWD2 dan *Coelomycetes* PWA1 yang memiliki kemampuan untuk memproduksi metabolit dengan aktivitas biologi sebagai antifungal yang akan dilaporkan pada tulisan ini.



Gambar 1. Kromatogram hasil analisis *Colletotricum* sp. PWD3 (atas) dan Coelomycetes PWA1 (bawah) di dalam medium GYP selama 3 minggu pada temperatur ruang (26–28 °C).

Metodologi

Kultivasi isolat jamur endofit

Ke-sembilan isolat jamur endofit yang diisolasi dari pandan wangi, masing-masing ditumbuhkan di dalam 30 mL medium cair glukosa-ekstrak yeast-pepton (GYP) dengan komposisi 20 g glukosa, 1 g ekstrak yeast, 5 g peptone, 0,5 g $K_2HP\ O_4$, 0,5 g $MgSO_4.7H_2O$, 0,01 g $FeSO_4.7H_2O$ dan 1000 mL H_2O), kemudian diinkubasi pada temperatur ruang (26-29 °C). Setelah 21 hari, seluruh medium tumbuhan berikut biomassa diekstraksi dengan etil asetat, dan selanjutnya dipekatkan dengan penguap putar. Produksi metabolit sekunder oleh jamur endofit dianalisis dengan teknik kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan plat KLT GF_{254} (0.2 mm, Merck), dengan penampak noda sinar UV 254 nm, 1 % $CeSO_4$/10 % H_2SO_4 dan 10 % vanilin/H_2SO_4.

Uji aktivitas antijamur

Paper disc direndam dalam ekstrak etil asetat (konsentrasi 20 mg/mL dalam aseton) kultur jamur endofit di dalam medium GYP, setelah dikeringanginkan (15 menit) kemudian di taruh di atas medium PDA yang telah diinokulasi dengan *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium oxysporum* dan *Candida tropicalis*. Selanjutnya diinkubasi pada temperatur kamar (26-29 °C) selama seminggu. Aktivitas antijamur dari ekstrak ditandai dengan tebentuknya zona bening disekeliling *paper dish*.

Tabel I. Komponen kimia ekstrak etil asetat kultur jamur endofit *Colletrottikum* sp. PWD 2 dan PWA 1 di dalam medium GYP

No.	waktu retensi	nama komponen	*Colletotricum* sp. PWD2	PWA1
1	6.01	3-oksobutiramida	+	+++
2	11.78	linalool	+	-
3	13.46	estragol	+	-
4	14.68	3-fenil 2-propenal	+	-
5	14.89	safrol	+	-
6	15.78	eugenol	+	+
7	16.36	b-elemena	+	-
8	16.39	metileugenol	+++++	++++
9	16.94	kariofilena	+	+
10	17.26	4,6-dihidroksi-1,1-dimetil-	+	+
		1,2,3,4-tetrahidroisokuinolin	+	-
11	17.52	a-humulena	+	-
12	17.53	asam 3-fenil etilester 2-propenat	+	-
13	17.86	germakrena D	+	-
14	17.88	pentadekana	+	-
15	18.33	isoeugenol	+	-
16	18.55	miristisin	+	-
17	19.65	spatulenol	+	-
18	19.78	kariofilena oksida	+	-
19	19.83	veridiflorol	+	-
20	20.00	guaiol	+	-
21	20.31	apiol	+	-
22	20.51	b-eudesmol	+	-
23	20.95	asam 3(4-metoksifenil) etilester	+	-
		2-propenat (isomer 1)	+	-
24	22.85	asam 3(4-metoksifenil) etilester	+	-
		2-propenat (isomer 2)	+	-
25	23.02	benzil benzoat	+	-
26	23.24	3(3,4-dimetoksifenil) 2-propenal	+	-

- = tidak terdeteksi

Analisis GC-MS

Ekstrak etil asetat dari kultur jamur endofit yang memperlihatkan aktivitas antijamur, selanjutnya dianalisis dengan teknik kromatografi gas dan tandem spektroskopi masa (GC-MS/MS Saturn 2000, Varian) yang menggunakan kolom VF-17ms (30 m x 0,25 mm, Varian). Untuk analisis ini diterapkan temperatur kolom yang terprogram dari 80 °C (3 menit) dinaikkan menjadi 150 °C dengan kecepatan kenaikan suhu 5 °C /menit, dan selanjutnya suhu kolom dinaikkan sampai 275 °C dengan kecepatan kenaikan suhu 3 °C /menit. Sedangkan temperatur injektor adalah 275 °C. Komponen kimia yang terdeteksi pada analisis ini diidentifikasi dengan membandingkan spektrum massa senyawa target dengan spektrum massa pada database (NIST, Wiley).

Hasil dan Pembahasan

Dari uji daya antijamur ektrak etil asetat memperlihatkan bahwa ekstrak kultur jamur isolat *Colletotricum* sp. PWD-2 dan PWA-1 di dalam medium GYP memperlihatkan biologi menghambat pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* yang ditandai dengan terbentuknya zona bening disekeliling *paper disc* yang mengandung ekstrak etil asetat kultur jamur endofit tersebut. Namun kedua ekstrak etil asetat ini tidak memperlihatkan aktivitas antifungal terhadap *Fusarium oxysporum* dan *Candida tropicalis*.

Ekstrak etil asetat dari kultur jamur endofit *Colletotricum* sp. PWD2 dan *Coelomycetes* PWA1 tersebut, selanjutnya dianalisis dengan kombinasi teknik kromatografi gas dan spektrometer masa (GC-MS). Hasil analisis GC-MS memperlihatkan bahwa kultur jamur isolat *Colletotricum* sp. PWD2 (Gambar 1) memiliki komponen utama metileugenol (**8**) dengan kandungan diatas 90 %. Metileugenol telah dikenal sebagai salah satu senyawa kimia alami yang bersifat sebagai penarik (*attractant*) terhadap lalat buah jantan dan telah diaplikasikan sebagai pengendali populasi lalat buah pada perkebunan (Shelly, 2000). Di samping itu, Dev *et al*. (2004) melaporkan bahwa metileugenol adalah salah satu senyawa yang memiliki efek toksik tinggi terhadap jamur *Drechslera sorokiniana* (Sacc.) Subram. Et Jain, *Phomopsis sojae* Leh., *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Colletotricum graminicola* (Ces.) Wilson dan *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid dengan nilai *minimum inhibitory concentration* (MIC) 306 ppm. Aktivitas antifungal metileugenol ini setara dengan aktivitas eugenol, namun jauh lebih aktif dibanding aktivitas antifungal isoeugenol. Namun pada penelitian ini, ekstrak etil asetat kultur jamur endofit *Colletotricum* sp. PWD2 tidak memperlihatkan aktivitas menghambat pertumbuhan *Fusarium oxysporum*. Kemungkinan hal ini disebabkan karena konsentrasi metileugenol yang terdapat pada ekstrak saat uji aktivitas biologi dilakukan berada dibawah nilai MIC.

Selain mengandung metileugenol dalam jumlah yang tinggi, ekstrak etil asetat kultur *Colletotricum* sp. PWD2 juga mengandung senyawa monoterpena alkohol, seskiterpena, seskiterpena alkohol, turunan fenil propanoat, dan sejumlah komponen lainnya seperti terlihat pada Tabel I. Seperti telah diketahui bahwa monoterpena alkohol dan seskiterpena alkohol juga bersifat sebagai antifungal, namun dikarenakan kandungannya dalam ekstrak ini yang sangat rendah kemungkinan tidak memberikan kontribusi yang signifikan terhadap aktivitas biologinya terhadap *S. cerevisiae*.

Seperti ekstrak etil asetat kultur *Colletotricum* sp. PWD2, hasil analisis GC-MS (Gambar 1) memperlihatkan bahwa ekstrak etil asetat jamur endofit *Coelomycetes* PWA1 juga memiliki metileugenol sebagai komponen utama (Tabel I). Di samping metileugenol, senyawa 3-oksobutiramida juga merupakan salah satu komponen utama pada ekstrak kultur jamur *Coelomycetes* PWA1. Sedangkan komponen kimia minor yang teridentifikasi hanya eugenol, kariofilena dan 4,6-dihidroksi-1,1-dimetil-1,2,3,4-tetrahidroisokuinolin. Ada ekstrak kultur jamur endofit ini, senyawa metileugenol juga sebagai komponen kimia yang paling bertanggung jawab terhadap aktivitas sebagai antifungal melawan *C. cerevisiae*.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa komponen kimia utama pada ekstrak etil asetat kultur jamur endofit *Colletotricum* sp. PWD2 dan *Coelomycetes* PWA1 di dalam medium GYP adalah metileugenol. Senyawa ini adalah metabolit yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antifungal melawan *C. cerevisiae*.

Ucapan Terima Kasih

Sebagian penelitian ini didanai oleh DIPA Etnobiologi Pandanaceae, Puslit Biologi LIPI TA. 2006 dan 2008. Diucapkan terimakasih kepada Atit Kanti MSc., Laboratorium Biosistematika dan Kultur Koleksi Mikroba, Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi LIPI atas pemberian biak *S. cerevise*, *F. oxysporum* dan *C. tropicalis*.

Daftar Pustaka

Dev U., C. Devakumar, Mohan, J. and Agarwal, P. C. 2004. Antifungal activity of aroma chemical against seed-born fungi. *J. Ess. Oil Res*., Sep/Oct., 496-499.

Hawksworth D. L., 1991, The Fungal Dimension of Biodiversity: Magnitude, significance, and conservation, *Mycol. Res*., 95, 641-655.

Hawksworth, D. L. and Rossman, A. Y. 1997, Where are all the undescribed fungi, *Phytopathol*., 87, 888-891.

Jamal, Y., Ilyas, M., Kanti, A. dan Agusta, A. 2009. Keragaman jenis jamur endofit pada pandan wangi (*Pandanus amarylifolius*) dan aktivitas antijamur metabolit yang diproduksinya. *Biota*, 14(2): 81-86

Shelly, T.E. 2000. Trapping male oriental fruit flies (Diptera:Tephritidae): does feeding on a natural source of methyl eugenol reduce capture probability?. *Florida Entomologist*, 83, 109-111.

Strobel, G. and Daisy, B.2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67, 491–502.

Tan R. X. and Zou W. X., 2001, Endophytes: a Rich Source of Functional Metabolites, *Nat. Prod. Rep*., 18, 448-459.

Zhang H. W., Y. C. Song and Tan, R. X. 2006. Biology and Chemistry of Endophytes. *Nat. Prod. Rep*., 23, 753-771.

* koresponden : Andria Agusta
Laboratorium Fitokimia, Bidang Botani, Puslit Biologi LIPI
e-mail: bislunatin@yahoo.com