

**EFEK ANTIBAKTERI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER
YANG DIPRODUKSI OLEH KAPANG ENDOFITIK AT 32
DARI *Artemisia annua***

Djadjat Tisnadjaja

Puslit Bioteknologi–LIPI F MIPA
Jl. Raya Bogor Km. 46 Kotak Pos 422 Cibinong Bogor 160044
email : dtisnadjaja@yahoo.com

ABSTRACT

***Antibacterial Effect of Secondary Metabolite Compound
Produced by Endophyte Mould AT 32
By. Djadjat Tisnadjaja***

*Infection diseases such as malaria, dengue hemorrhagic fever, and tuberculosis still counted as one of major health problem in Indonesia. On the other hand Indonesia has mega biodiversity including plant and microbes potentially used for the production of antibacterial or lead compound for antibiotic. One of a potential resources is *Artemisia annua*. This plant is already known as a secondary metabolite compound artemisinin producer, an active compound against malaria virus. This research work was aimed to study the possible used of endophyte microbe isolated from *Artemisia annua* to produce antibacterial active compound through a fermentation process. Research result shown that extract of fermentation broth, either fermentation was conducted in Erlenmeyer flask or two liters stirred tank reactor, gave antimicrobial activity. It is shown by the clearing zone formation on the dish inoculated with bacterial seed. Two bacterial strains *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* BCC 2210 were used for this study. The biggest clearing zone diameter formed was 20 mm for inhibition of *Staphylococcus aureus* and 9.5 mm for *Escherichia coli*, those were obtained by using extract of fermentation broth of two liters stirred tank reactor.*

Keywords : Artemisia annua, antimicrobial, endophyte, fermentation, secondary metabolite

ABSTRAK

Penyakit infeksi seperti malaria, demam berdarah dan tuberculosis (TBC) masih merupakan masalah kesehatan utama di Indonesia. Pada sisi lain Indonesia memiliki mega biodiversitas termasuk tanaman dan mikroba yang berpotensi untuk dimanfaatkan dalam produksi antibakteri atau senyawa aktif untuk antibiotik. Penelitian ini dilakukan untuk mempelajari kemungkinan pemanfaatan mikroba endofitik yang diisolasi dari tumbuhan *Artemisia annua* untuk memproduksi senyawa aktif antibakteri melalui proses fermentasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak dari cairan fermentasi, baik ketika fermentasi dilakukan dalam skala Erlenmeyer maupun fermentor *stirred tank* skala 2 liter, menunjukkan adanya aktivitas antimikroba. Aktivitas antimikroba ini ditunjukkan dengan terbentuknya zona jernih pada petri dish yang diinokulasi dengan bakteri. Dalam hal ini digunakan dua galur bakteri patogen yaitu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* BCC 2210. Diameter zona jernih terbesar yang terbentuk yaitu 20 mm untuk inhibisi dari *Staphylococcus aureus* dan 9,5 mm untuk penghambatan *Escherichia coli* keduanya diperoleh dengan pemberian ekstrak cairan fermentasi yang dilakukan dengan fermentor *stirred tank* skala 2 liter.

Kata kunci : *Artemisia annua*, anti mikroba, *endophyte*, fermentasi, metabolit sekunder

PENDAHULUAN

Sampai saat ini, penyakit infeksi seperti malaria, demam berdarah dengue (DBD), diare dan tuberculosis (TB) masih merupakan masalah kesehatan utama di Indonesia. Perkembangan resistensi

bakteri penyebab penyakit infeksi terhadap beberapa antibiotik tertentu menyebabkan permasalahan dalam mengatasi penyakit infeksi menjadi semakin sulit (Sardjoko, 1991; Smith, 1995). Kondisi ini mendorong terus dilakukannya penelitian mengenai

pencarian antibiotik baru (Sardjoko, 1991).

Malaria merupakan salah satu contoh klasik dari penyakit yang diakibatkan oleh infeksi, yaitu oleh parasit *Plasmodium falciparum*. Pada awalnya pengobatan malaria bisa dilakukan dengan menggunakan senyawa quinin yang diekstraksi dari tanaman kina (*Chincona spp*) sampai *P. falciparum* melakukan adaptasi dan menjadi resisten terhadap senyawa ini. Alternatif obat antimalaria yang tersedia adalah *chloroquin* yang merupakan hasil sintesa yang pada akhirnya *P. falciparum* juga resisten terhadap senyawa ini. Dengan meningkatnya resistensi *P. falciparum* terhadap *chloroquin* menyebabkan para peneliti memfokuskan perhatiannya pada senyawa *Artemisinin* yang ditemukan pada tumbuhan *Artemisia annua* dan dalam jumlah yang lebih sedikit pada *Artemisia apiacea* (Namdeo, *et al* 2006)

Mikroba merupakan salah satu sumber penghasil senyawa antibiotik, bahkan saat ini hampir semua antibiotik yang ditemukan berasal dari mikroba, yaitu dari bakteri, jamur dan *Actinomycetes* (Akmal & Romita, 1996). Belakangan diketahui mikroba endofitik dari berbagai tanaman mampu menghasilkan metabolit sekunder yang memiliki aktifitas antibakteri. Dimana metabolit sekunder terbentuk karena adanya hubungan simbiosis antara mikroba endofit dengan tanaman sebagai hostnya. Rosana (2001) melaporkan bahwa dari 19 isolat jamur endofitik yang diisolasinya dari tanaman belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) 5,3% dari isolat berpotensi menghasilkan metabolit sekunder dengan aktivitas antibakteri, dan 15,8% lainnya berpotensi menghasilkan antijamur. Sedangkan dari 54 isolat bakteri endofitik yang terisolasi 1,9% diantaranya menunjukkan potensi sebagai penghasil antibakteri dan 5,6% berpotensi menghasilkan antijamur.

Keuntungan memanfaatkan mikroba melalui proses fermentasi untuk memproduksi metabolit sekunder dengan aktivitas tertentu adalah kecepatan pertumbuhan yang jauh lebih tinggi

dibandingkan tanaman serta kemudahan dalam penggandaan skala.

Artemisia L tergolong dalam famili *compositae* dan beberapa species diantaranya telah lama digunakan sebagai obat tradisional di Cina. Tanaman ini tumbuh di dataran menengah sampai pegunungan atau pada ketinggian 800 m sampai 2.300 m di atas permukaan laut. Salah satu sumber potensial adalah *Artemisia annua*. Tumbuhan yang berasal dari daratan Cina ini sudah diketahui sebagai penghasil senyawa artemisinin, suatu senyawa aktif untuk melawan malaria. Di Cina tumbuhan ini sudah dimanfaatkan secara tradisional untuk pengobatan demam sejak lebih dari 2000 tahun lalu (Namdeo, *et al* 2006) Di Indonesia *Artemisia annua* dapat ditemukan pada daerah-daerah berhawa dingin, seperti Tawangmangu dan dataran tinggi di wilayah Irian Jaya. Secara tradisional tanaman ini biasa digunakan sebagai obat flu, demam, rematik, bisul, disentri, radang tenggorokan, dan antimalaria (Djumidi & Sutjipto, 1999). Sedangkan komponen senyawa kimia yang telah diisolasi dari *Artemisia annua* lebih menunjukkan aktivitas sebagai antimalaria, antibakteri dan antiinflamasi (Tan, dkk, 1998). Daun dan seluruh bagian tanaman *A. Annua* mengandung saponin, seskuiterpen, sterol, acetylen, fenilpropan, flavonoid, kumarin, polyfenol dan minyak atsiri (Keys, 1976; Tan, dkk, 1998). Golongan seskuiterpen yang terkandung antara lain adalah artemisinin, artemisinol, artemisiten dan asam artemisinat (Tan, dkk, 1998).

Liu, *et al* (2001) melalui hasil penelitiannya menunjukkan bahwa dari 39 isolat mikroba endofitik yang diisolasi dari tanaman *Artemisia annua*, 21 isolat diantaranya mampu menghasilkan senyawa dengan aktivitas anti jamur patogen untuk tanaman (*Phytopathogenic fungi*). Dalam hal ini digunakan beberapa jamur patogen yang sering mengganggu panen yaitu, *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, *Rhizoctonia cerealis*, *Helminthosporium sativum*, *Fusarium graminearum*, *Gerlachia nivalis* and *Phytophthora capsici*.

Pada penelitian ini telah dipelajari aktivitas antibakteri dari metabolit sekunder yang dihasilkan isolat kapang endofitik AT₃₂ yang diisolasi dari tanaman *Artemisia annua* asal Tawangmangu.

BAHAN DAN METODA

Bahan

Mikroorganisme : kapang endofitik AT 32 adalah kapang endofitik hasil isolasi dari tanaman *Artemisia annua* yang dikoleksi dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah. Kapang ini merupakan koleksi dari Laboratorium Fitofarmaka, Puslit Bioteknologi-LIPI. Sementara itu uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, yang diperoleh dari Balai Penelitian Veteriner (Balitvet), Bogor dan *Escherichia coli* BCC 2210, yang diperoleh dari Puslit Bioteknologi-LIPI, Cibinong.

Media : media pemeliharaan kapang digunakan SDA (Sobourant Dextrose Agar), sementara media pemeliharaan untuk bakteri uji digunakan media NA (Nutrien Agar). Untuk menguji aktivitas antibakteri dari metabolit sekunder yang dihasilkan kapang AT 32, bakteri ditumbuhkan dalam media agar lunak NA (Tabel 1). Sedangkan proses fermentasi dilakukan dengan menggunakan media Sucrose Yeast Pepton (SYP) (Tabel 2).

Tabel 1. Komposisi media agar lunak

Bahan	Kandungan (g/100 ml)
Nutrien Broth	0,8
Bacto pepton	0,5
Natrium klorida	0,5
Bacto agar	1,0

Tabel 2. Komposisi media SYP

Bahan	Kandungan/ 100 ml
Sukrosa	1,0 g
Gliserol	1,0 ml
Yeast Extract	1,0 g
Bacto pepton	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
NaCl	0,5 g

Metode

Pengamatan morfologi kapang :

Pengamatan morfologi kapang endofitik dilakukan pada media SDA serta pengamatan secara mikroskopik. Pengamatan morfologi ini dilakukan setelah kapang dibiarkan tumbuh dalam media SDA selama 5 hari, dimana pengamatan dilakukan terhadap bentuk dan warna kapang. Sementara pengamatan mikroskopik dilakukan dengan mengambil dan meletakkan hifa dari kapang pada kaca objek yang telah dibasahi aquadest steril. Pengamatan dilakukan dengan pembesaran 40 kali.

Fermentasi :

Pada tahap pendahuluan proses fermentasi dilakukan dengan menggunakan labu Erlenmeyer 100 ml dengan menggunakan media SYP sebanyak 20 ml dan inkubasi dilakukan pada shaker dengan kecepatan 100 rpm dan suhu ruang. Sementara inokulum atau prekulturr dari kapang AT 32 ditumbuhkan dalam tabung reaksi selama 2 hari. Pada tahap selanjutnya proses fermentasi dilakukan dengan menggunakan *stirred tank* fermentor 2 L, dimana media yang digunakan sebanyak 1500 ml.

Ekstraksi

Ekstraksi terhadap hasil fermentasi dilakukan dengan pelarut kloroform, dimana jumlah kloroform yang digunakan sebanding dengan jumlah cairan hasil fermentasi yang diekstraksi atau (1:1), dan dilakukan dengan menggunakan corong pisah. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Selanjutnya fasa kloroform dari hasil ekstraksi dikumpulkan dan dipekatkan dengan menggunakan evaporator vakum.

Pengamatan laju pertumbuhan

Laju pertumbuhan kapang AT 32 diamati dengan cara menimbang bobot kering dari biomasa yang diambil dari beberapa umur fermentasi

Pengujian aktifitas

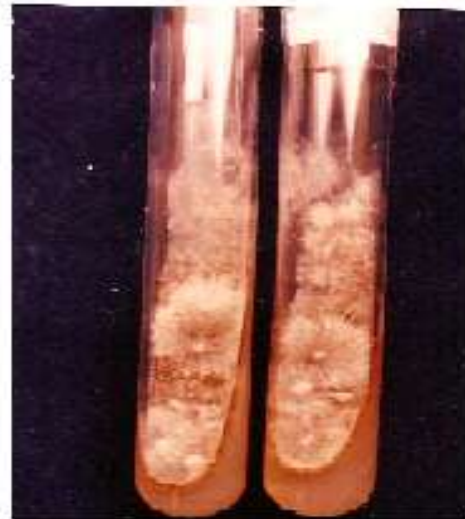
Pengujian aktifitas antibakteri metabolit sekunder dilakukan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* BCC 2210. Uji aktivitas ini dilakukan dengan metode difusi cakram, dimana senyawa uji dimasukkan kedalam kertas cakram yang kemudian diletakkan diatas media agar padat yang telah diinokulasi bakteri uji dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18–24 jam. Besarnya aktivitas akan ditunjukkan oleh besarnya zona hambat atau zona jernih yang terbentuk disekeliling cakram.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan morfologi kapang

Morfologi dari isolat kapang endofitik yang digunakan diamati secara mikroskopik, dalam hal ini digunakan media SDA untuk pertumbuhannya, dan pengamatan dilakukan setelah kapang diinkubasi selama 5 hari pada suhu 30°C. Pengamatan dibawah mikroskop dengan pembesaran 40 kali memperlihatkan bahwa sel kapang memiliki bentuk memanjang seperti benang. Sementara

pengamatan langsung terhadap morfologi kapang yang tumbuh pada media SDA menunjukkan bahwa kapang endofitik AT 32 ini berwarna putih dengan bentuk serabut keriting dan bergumpal (Gambar 1).

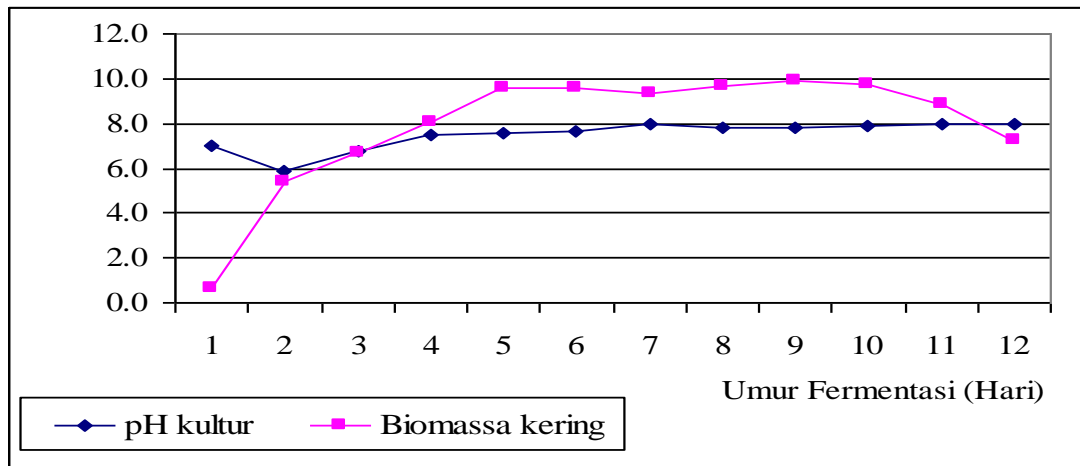


Gb. 1. Kapang AT₃₂

Pengamatan pertumbuhan kapang

Gambar 2 menunjukkan pola pertumbuhan dari kapang AT 32, dimana fase eksponensial mulai terjadi pada hari kedua yang ditandai dengan peningkatan bobot biomasa yang sangat nyata. Pada hari pertama bobot biomasa kering hanya 0,6375 mg/ml dan meningkat menjadi 5,3700 mg/ml pada hari kedua. Fase eksponensial ini berakhir pada hari kelima dimana pada awal fase stasioner (hari ke 5) bobot biomasa mencapai 9,6025 mg/ml. Sementara fase kematian, dimana bobot biomasa kering turun menjadi 8,8450 mg/ml, terjadi pada hari ke 11.

Pola pertumbuhan ini diikuti dengan perubahan pH kultur, dimana pada awal fermentasi terjadi penurunan nilai pH dari semula 7,38 dan turun menjadi 5,85 pada hari kedua. pH kemudian meningkat kembali pada proses fermentasi selanjutnya dengan mencapai nilai tertinggi pada hari ke tujuh, yaitu sebesar 7,99.

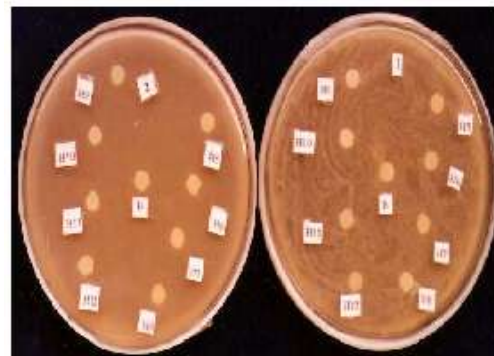


Gambar 2. Pertumbuhan kapang AT₃₂

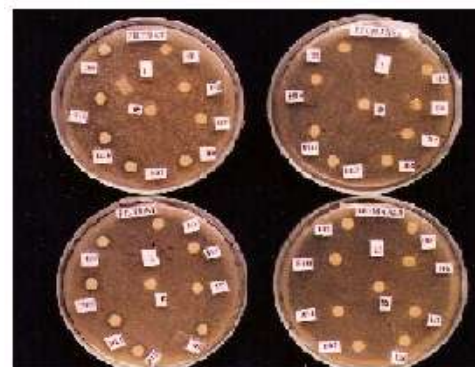
Perubahan pH kultur ini dapat disebabkan karena adanya senyawa-senyawa asam/basa yang dihasilkan oleh kapang selama proses fermentasi. Oleh karena itu perubahan pH kultur mencerminkan adanya pertumbuhan dan metabolisme selama proses fermentasi.

Uji aktivitas antibakteri dari hasil fermentasi.

Produksi senyawa metabolit sekunder melalui proses fermentasi umumnya terjadi setelah memasuki fase stasioner. Sehubungan dengan itu, pengambilan sampel untuk pengujian aktivitas antibakteri terhadap hasil fermentasi dilakukan pada hari ke 5 sampai ke 12, dimana hari ke 5 merupakan awal dari fase stasioner. Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa pengujian langsung terhadap cairan hasil fermentasi yang dilakukan dalam skala Erlenmeyer tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* BCC 2210 (Gambar 3). Sedangkan pengujian terhadap ekstrak kloroform dari cairan hasil fermentasi menunjukkan adanya aktivitas antibakteri baik terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 maupun *Escherichia coli* BCC 2210 (Gambar 4).



Gb. 3. Hasil uji cairan fermentasi



Gb 4. Sebelah kiri ekstrak cairan dan kanan ekstrak biomassa. Bagian atas zona hambat terhadap *S. aureus* dan bawah terhadap *E. coli*.

Aktivitas antibakteri dari ekstrak kloroform cairan hasil fermentasi ini diberikan oleh sampel yang diambil mulai pada hari ke 8 sampai hari ke 12

dengan diameter zona hambat rata-rata 10 mm. Sementara ekstrak dari sampel hari ke 5, 6 dan 7 tidak memberikan aktivitas antibakteri. Hal ini membuktikan bahwa pembentukan senyawa metabolit sekunder antibakteri ini terjadi pada fase stasioner, dan pada hari ke 5 sampai 7 konsentrasi senyawa tersebut kemungkinan masih sangat kecil.

Dari hasil pengujian terhadap cairan hasil fermentasi dan ekstrak kloroformnya tersebut dapat disimpulkan bahwa kapang endofitik AT₃₂ mampu memproduksi senyawa antibakteri. Tidak terbentuknya zona hambat ketika pengujian dilakukan terhadap cairan hasil fermentasi menunjukkan bahwa konsentrasi senyawa aktif antibakteri yang dihasilkan tidak terlalu besar dibandingkan dengan keberadaan senyawa-senyawa lain didalam cairan hasil fermentasi. Melalui proses ekstraksi dengan pelarut kloroform sebagian senyawa telah terpisahkan, khususnya senyawa-senyawa yang lebih cenderung larut dalam air, termasuk air yang merupakan pelarut dari media. Dengan terpisahkannya air dan beberapa senyawa yang larut didalamnya maka konsentrasi senyawa aktif antibakteri yang terdapat dalam ekstrak menjadi cukup tinggi.

Untuk mempelajari kemungkinan adanya senyawa antibakteri yang diproduksi dan tertahan didalam sel kapang (*intracellular*), telah dilakukan ekstraksi dan pengujian aktivitas terhadap biomassa sel. Dari pengujian ini tidak tampak pembentukan zona hambat. Ini berarti bahwa senyawa aktif antibakteri yang diproduksi bersifat ekstraselluler.

Produksi senyawa antibakteri dalam fermentor skala 2 liter.

Pada tahap selanjutnya, fermentasi dilakukan dengan menggunakan *stirred tank* reactor skala 2 liter. Seperti pada fermentasi dalam skala Erlenmeyer, selama proses fermentasi diamati laju perubahan pH dan pertumbuhan dari kapang. pH media awal ditetapkan 7,44 dan pH kultur pada akhir fermentasi turun menjadi 6,55. Penurunan

nilai pH sedikit lebih kecil dibandingkan pada saat fermentasi dilakukan dengan menggunakan Erlenmeyer. Hal ini kemungkinan disebabkan kondisi agitasi yang lebih baik. Sementara itu pengamatan laju pertumbuhan kapang yang dilakukan dengan cara pengambilan sampel setiap hari dan menghitung berat kering biomasanya sulit dilakukan dengan baik. Karena kapang tumbuh dalam bentuk benang-benang panjang yang menggumpal maka sampel biomassa yang terambil tidak bisa mewakili keadaan yang sebenarnya. Dapat diperkirakan bahwa konsentrasi biomassa yang terukur selalu jauh lebih rendah dibandingkan keadaan sebenarnya.

Pengujian aktifitas antibakteri dari hasil fermentasi dengan menggunakan fermentor ini dilakukan terhadap ekstrak pekat maupun ekstrak yang diencerkan sampai dengan 1000 µg/ml. Sementara pengambilan sampel hanya dilakukan pada hari ke 8. Dari hasil pengamatan (Gambar 5) terlihat bahwa ekstrak pekat memberikan zona hambatan rata-rata pada *Staphylococcus aureus* sebesar 20 mm, sedangkan dengan konsentrasi 1000 µg/ml zona hambatan yang terbentuk sebesar 9,5 mm. Sementara itu pada pengujian dengan menggunakan *Escherichia coli*, zona hambatan yang terbentuk dengan ekstrak pekat adalah sebesar 9,5 mm dan hasil pengencerannya memberikan zona hambat sebesar 7 mm.



Gb. 5. Sebelah kiri zona hambat terhadap *S. aureus* dan kanan terhadap *E. coli*.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kapang endofitik hasil isolasi dari tanaman *Artemisia annua* (AT₃₂) yang tumbuh didaerah Tawangmangu dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder dengan aktifitas antibakteri yang cukup kuat. Aktifitas antibakteri ini terlihat dari pembentukan zona hambatan baik yang diberikan oleh ekstrak pekat maupun setelah ekstrak pekat tersebut diencerkan sampai 1000 µg/ml. Sebagai mana kebanyakan senyawa metabolit sekunder, senyawa aktif antibakteri tersebut diproduksi pada fase eksponensial dari pertumbuhan kapang dan merupakan senyawa ekstraselluler.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih kami sampaikan pada Bapak Dr. Partomuan Simanjuntak, APU (Lab. Fitofarmaka, P2 Bioteknologi-LIPI), yang telah banyak membantu, baik dalam menyediakan isolat kapang endofitik AT₃₂ maupun pada saat pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Akmal, A. H. dan A. Romita., 1996. Isolasi mikroba tanah penghasil antibiotik dari sampel tanah pada lokasi penumpukan sampah. *Cermin Dunia Kedokteran, No.18. 1996.*
- Djumidi dan Sutjipto. 1999. *Inventaris tanaman obat. Jilid V.* Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Depkes. Jakarta. 1999.
- Keys, D. J., 1976, *Chinese herbs, their botany, chemistry and pharmacodynamics.* Swindow book Company, Ltd. Hongkong, 1976.
- Liu, C. H., W. X. Zou, H. Lu and R. X. Tan. 2001. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phythopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology ; 88 (3), Hal. 277 – 282.*
- Namdeo, A. G., Mahadik K. R. and Kadam S. S., 2006, Antimalarial drug – *Artemisia annua*, *Pharmacognosy Magazine Vol 2, Issue 6, Apr-Jun, 2006.*
- Sardjoko, 1991. *Bioteknologi, Latar belakang dan beberapa penerapan.* PT. Gramedia, Jakarta, 1991.
- Smith, E. J., 1995. *Bioteknologi, Ed. 2,* terjemahan Hartono, A., EGC. Jakarta. 1995.
- Rosana, Y., 2001, Isolasi dan seleksi mikroba endofit penghasil antimikroba dari tanaman belimbing wuluh (*Averhoa bilimbi* Lin). Kekhususan mikrobiologi kedokteran. PS Ilmu Biomedik-Program Pasca Sarjana, FK, UI. Jakarta.
- Tan, X. R., W. F. Zheng dan Q. H. Tang, 1998. Biological active substance from genus *Artemisia*, *Planta Medica*, No. 54.