

Uji aktivitas senyawa antiplasmodium dari fungi endofit tanaman *Artemisia annua* L.

Testing of antiplasmodium activity substance from endophytic fungus of *Artemisia annua* L.

Wahyono*), Pudjono dan Widyati P.

Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Abstrak

Malaria adalah penyakit yang disebabkan parasit *Plasmodium* yang banyak mengancam kehidupan manusia. Penyebaran begitu cepat dari malaria yang resisten terhadap obat golongan kuinolin mendorong pencarian antimalaria baru. Tanaman *Artemisia annua* L. yang mengandung metabolit sekunder artemisinin sudah sejak lama digunakan untuk mengobati malaria. Salah satu sumber senyawa bioaktif adalah fungi endofit, yang juga mampu menghasilkan metabolit yang sama atau mirip dengan tanaman inangnya. Hasil kromatografi lapis tipis menunjukkan bahwa fungi endofit *A. annua* juga mengandung metabolit yang mirip dengan artemisinin. Metabolit ini tidak disekresikan ke dalam media fermentasi tetapi tersimpan di dalam miselia fungi. Hasil uji penghambatan polimerisasi hem menunjukkan bahwa metabolit tersebut mempunyai aktivitas penghambatan polimerisasi hem. Ekstrak etil asetat miselia fungi A, E dan F mempunyai nilai IC_{50} terhadap penghambatan polimerisasi hem berturut-turut sebesar $0,824 \pm 2,89 \mu\text{M}$; $0,861 \pm 2,43 \mu\text{M}$ dan $1,394 \pm 3,73 \mu\text{M}$.

Kata kunci : fungi endofit, antiplasmodium, polimerisasi hem, IC_{50}

Abstract

Malaria is a life-threatening disease caused by *Plasmodium* parasites. The rapid spread of malaria-quinoline resistance enforce to find of new antimalaria drug. *Artemisia annua* L having artemisinin as secondary metabolites, has been used as antimalaria agent for long time. One of source of bioactive compound is endophytic fungus. This fungus can produce similar bioactive compound to host plant. The thin layer chromatography result showed that endophytic fungus from *A.annua* had similar chromatogram profile with artemisinin. This metabolite was not secreted in the fermentation medium, but was kept in the fungus mycelium. The result of the haem polymerization inhibitory activity assay showed that this secondary metabolites inhibited the haem polymerization. Ethyl acetate extract of fungus A had IC_{50} value $0.824 \pm 2.89 \mu\text{M}$ to inhibit the haem polymerization; fungus E was $0.861 \pm 2.43 \mu\text{M}$; and fungus F was $1.394 \pm 3.73 \mu\text{M}$.

Key words : endophytic fungus, antiplasmodium, the haem polymerization, IC_{50}

Pendahuluan

Malaria adalah salah satu penyakit umum di negara tropis. Pada tahun 2008 dilaporkan bahwa jumlah penderita malaria di dunia adalah sekitar 243 juta orang, dan 1 juta diantaranya meninggal dunia (Shio, *et al.*, 2010). Saat ini, antimalaria baru yang lebih efektif perlu dicari kembali mengingat adanya penyebaran malaria yang cepat dan luas, terutama malaria yang

resisten terhadap obat golongan kuinolin (Huy, *et al.*, 2007). Salah satu usaha tersebut adalah melalui penelitian terhadap tanaman obat yang secara tradisional telah digunakan oleh masyarakat untuk mengobati malaria. Keberhasilan pengembangan tanaman obat sebagai antimalaria tersebut terbukti dengan ditemukannya obat baru, yaitu artemisinin dan derivatnya dari tanaman *Artemisia annua* L.

(Suwandi, *et al.*, 2008) yang sudah lama digunakan secara tradisional di Cina untuk mengobati malaria (Krishna, *et al.*, 2004). Artemisinin dan turunannya, yaitu artemeter, artesunat, arteeter, dan dihidroartemisinin, sukar untuk disintesis tetapi hanya diisolasi dari tanaman *A. annua*, sehingga untuk memenuhi kebutuhan artemisinin diperlukan tanaman *A. annua* dalam jumlah yang besar.

Penggunaan tanaman sebagai sumber obat dalam jumlah besar-besaran dapat membahayakan kelestarian tanaman tersebut sehingga perlu dicari sumber senyawa bioaktif lain yang lebih mudah dan efisien. Salah satu sumber penghasil senyawa bioaktif adalah fungi endofit. Fungi ini hidup di dalam jaringan tanaman dan merupakan sumber alam yang melimpah yang dapat dijadikan sumber penemuan obat baru. Endofit mampu memproduksi senyawa yang mirip atau sama dengan senyawa yang diproduksi inangnya karena telah terjadi rekombinasi genetik antara endofit dengan inang. Pertumbuhan endofit lebih cepat dari inangnya, sehingga eksplorasi endofit sebagai sumber penemuan obat baru sangat menguntungkan (Strobel and Daisy, 2003). Salah satu mekanisme aksi senyawa antiplasmodium (antimalaria) adalah melalui penghambatan polimerisasi hem menjadi hemozoin (Basilico, *et al.*, 1998)

Dalam penelitian ini dicari fungi endofit dari tanaman *A. annua* dan metabolit sekundernya yang mempunyai efek sebagai antiplasmodium dengan mengkaji aktivitas penghambatan polimerisasi hem menjadi hemozoin.

Metodologi

Bahan

Tanaman *A. annua* L. diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Tawangmangu, media *Potato Dextrose Agar* (PDA), media M102b, larutan natriumhipoklorida 5,25%, etanol 70%, etil asetat, klorokuin, hematin, asam asetat glasial, natrium hidroksida, dimetilsulfoksida, n-heksana.

Alat penelitian

Neraca analitik (BP 221 S), *Autoclave* (Sakura, Tokyo), *Laminar Air Flow cabinet* (FARR co), *hot plate* (Ikamag® RH), mesin *shaker* (Thermolyne),

ultrasonikator (Nihonseiki Kaisha US 5 Q), sentrifugator (Universal 32 R), inkubator (Lab Line), ELISA *reader* (Bio-Rad Benchmark Jepang), mikrokultur 96 sumuran steril (Nalgene Nunc International, Denmark), seperangkat mikropipet, lampu UV, densitometer (Shimadzu).

Jalannya penelitian

Isolasi fungi endofit dari *A. annua* L.

Eksplan tanaman dicuci dengan air mengalir guna menghilangkan tanah dan kotoran yang menempel dan kecilkan ukurannya menjadi ± 2 cm. Lakukan sterilisasi dengan etanol 70% selama 2 menit, dilanjutkan dengan larutan natrium hipoklorida 5,25% selama 2 menit. Bilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali, masing-masing selama 1 menit.

Tiriskan bahan-bahan tersebut dalam cawan petri steril. Potong-potong dengan pisau skalpel steril menjadi ukuran ± 1 cm. Tanam bagian-bagian tersebut dalam media PDA di dalam cawan petri steril pada suhu 25 °C selama 1 minggu atau sampai ada pertumbuhan fungi endofit. Sebagai kontrol, tanam air bilasan terakhir eksplan pada media PDA. Setelah terjadi pertumbuhan fungi, segera isolasi guna mendapatkan biakan murni. Biakan murni fungi endofit ditumbuhkan pada media PDA dalam cawan petri (Liu, *et al.*, 2001).

Fermentasi fungi endofit

Sebelum fermentasi, terlebih dahulu dibuat inokulum fungi endofit dengan cara menanam 2 irisan plug fungi endofit berdiameter 5 mm dalam 50 mL media M102b steril dan digojok dengan kecepatan 200 rpm selama 3 hari pada suhu kamar. Pertumbuhan fungi endofit ditandai dengan tumbuhnya miselium dalam media. Ambil 50 mL kultur tersebut, inokulasikan ke dalam 200 mL media M102b steril. Lakukan fermentasi selama 18 hari pada suhu 25 °C (Prihatiningtias, 2005).

Ekstraksi media fermentasi dan miselia fungi dengan etil asetat

Untuk media fermentasi, digunakan cairan penyari dengan jumlah sama banyak dengan jumlah media. Bagi cairan penyari menjadi 4 bagian dan lakukan ekstraksi 4 kali terhadap media fermentasi. Untuk miselia fungi, lakukan proses sonikasi dengan frekuensi 20 kHz dan daya 60 Watt selama 6 menit (Magnani, *et al.*, 2009) di dalam etil asetat sama banyak dengan bobot miselinya, kemudian saring dengan kertas saring. Uapkan sari etil asetat yang diperoleh di atas penangas air sampai diperoleh ekstrak kering atau tidak ada bagian yang menguap lagi.

Identifikasi senyawa aktif dengan kromatografi

Ekstrak etil asetat media fermentasi dan miselia fungi diuji selanjutnya keberadaan senyawanya dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Sistem yang digunakan adalah fase diam silika gel 60 F-254, dan fase gerak n-heksan- etil asetat = 7: 3. Untuk visualisasi bercak, dilakukan pengamatan pada sinar tampak, sinar UV254 dan 366 nm. Selain itu, bercak juga disemprot dengan anisaldehyd asam sulfat. Pengamatan bercak-bercak tersebut dibandingkan dengan artemisinin standar.

Uji aktivitas penghambatan polimerisasi hem

Efek antimalaria senyawa uji dilakukan secara *in vitro*, yaitu dengan metode uji aktivitas penghambatan polimerisasi hem. Uji dilakukan dengan metode Basilio, *et al.* (1998) yang dimodifikasi. Sebanyak 100 μ L larutan hematin 1 mM dalam larutan natrium hidroksida 0,2 M dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf*, kemudian ditambahkan 50 μ L bahan uji dengan berbagai tingkatan konsentrasi, yaitu 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,63; dan 0,31 mg/mL. Replikasi sebanyak 3 kali untuk masing-masing kadar. Untuk memudahkan pembuatan larutan ekstrak, proses pelarutannya ditambahkan dimetil sulfoksida hingga konsentrasi 25% (Guetzoyan, *et al.*, 2009). Untuk memulai reaksi polimerisasi hem, tambahkan 50 μ L larutan asam asetat glasial (pH 2,6) pada tabung *Eppendorf*, kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Sebagai kontrol adalah akuades dan larutan dimetil sulfoksida 25%.

Setelah inkubasi berakhir, tabung *Eppendorf* disentrifuse dengan kecepatan 8000 *rpm* selama 10 menit. Buang supernatannya, endapan dicuci sebanyak 6 kali dengan 200 μ L dimetil sulfoksida. Masing-masing pencucian dengan cara disentrifuse berkecepatan 8000 *rpm* selama 10 menit. Endapan yang diperoleh ditambah 200 μ L natrium hidroksida 0,1 M. Setiap 100 μ L larutan yang diperoleh dimasukkan ke dalam mikroplate 96 sumuran dan dibaca nilai OD dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 405 nm.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi fungi endofit dari *A. annua* L. Isolasi Fungi

Eksplan dari tanaman *A. annua* diambil pada saat umur tanaman 6 bulan karena masa panen *A.annua* adalah saat tanaman berumur lebih dari 5 bulan. Pada umur ini kandungan metabolit sekundernya sudah optimal sehingga diharapkan fungi endofit yang berada dalam jaringan tanaman pada waktu ini sudah mengalami rekombinasi genetik dan mampu

menghasilkan metabolit sekunder artemisinin. Pengambilan eksplan diutamakan pada daun karena bagian ini paling banyak mengandung artemisinin, yaitu mencapai 89% dari total artemisinin yang terdapat dalam tanaman (Kardinan, 2008). Bagian daun yang diambil adalah daun yang sudah tua karena fungi endofit banyak tumbuh dalam jaringan daun yang sudah tua (Suryanarayanan and Thennarasan, 2004).

Kontrol akuades steril bilasan eksplan yang ditanam dalam media PDA tidak terdapat pertumbuhan fungi. Hal ini menunjukkan bahwa fungi-fungi yang tumbuh pada eksplan adalah fungi yang berasal dari dalam jaringan tanaman tersebut, bukan fungi yang berasal dari spora yang menempel di permukaan eksplan tersebut.

Fermentasi fungi endofit

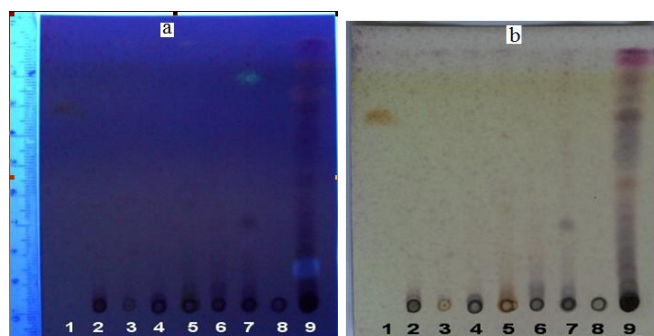
Selama proses fermentasi, media digojok agar konsentrasi nutrisi dalam media dapat dipertahankan homogenitasnya. Fermentasi dilakukan dengan 2 tahap, yaitu 3 hari pertama untuk mempercepat fase adaptasi fungi, sehingga segera memasuki fase logaritma, sedangkan tahap kedua, yaitu fermentasi selama 18 hari, di dalamnya termasuk fase logaritma dan fase stasioner. Selama fase stasioner ini metabolit sekunder akan dibentuk dan pada akhir tahap ini proses fermentasi dihentikan.

Ekstraksi media fermentasi dan miselia fungi dengan etil asetat

Penyarian media dilakukan dengan etil asetat sama banyak dengan jumlah media dan dibagi menjadi 4 kali replikasi guna meningkatkan efisiensi ekstraksi. Gelombang ultrasonik menghasilkan getaran kuat yang menyebabkan gelombang kejut dan radikal bebas reaktif (radikal hidroksil dan hidrogen peroksida). Akibatnya adalah sel menjadi pecah dan inaktivasi struktur mikrobia. Material sel akan pecah dan masuk ke dalam medium penyarinya. Metode ini sederhana dan tidak menghasilkan produk toksik yang dapat membahayakan sampel (Naddeo, *et al.*, 2007).

Identifikasi senyawa aktif dengan kromatografi

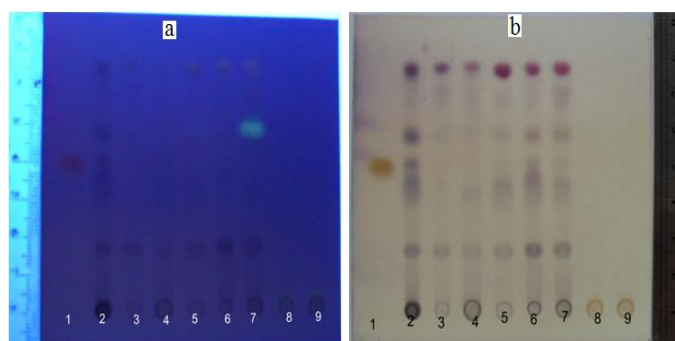
Adanya senyawa dapat dideteksi pada kromatogram KLT. Seperti pada gambar 1 dalam kromatogram tidak terlihat adanya



Gambar 1. Kromatogram (a) ekstrak etil asetat media fermentasi dibawah sinar UV-366 dan (b) setelah disemprot dengan anisaldehyd asam sulfat

Keterangan :

- Fase diam = silika gel 60 F-254
- Fase gerak = n-heksana : etil asetat (7 : 3)
- Standar artemisinin; 2.Fungi A; 3. Fungi B; 4.Fungi C; 5. Fungi D; 6.Fungi E; 7.Fungi F; 8.Media M 102 b; dan 9.Ekstrak etanolik 95% herba *A.annua* L.



Gambar 2. Kromatogram (a) ekstrak etil asetat miselia fungi yang telah disonikasi dibawah sinar UV 366 dan (b) setelah disemprot anisaldehyd asam sulfat

Keterangan :

- Fase diam – silika gel 60 F-254
- Fase gerak = n-heksana : etil asetat (7 : 3)
- Standar artemisinin; 2.Fungi A; 3.Fungi B; 4.Fungi C; 5.Fungi D; 6.Fungi E; 7.Fungi F; dan 8.Fungi L; dan 9.Fungi M

bercak dari hasil ekstraksi terhadap media fermentasi. Ini berbeda dengan ekstrak etil asetat miselia fungi setelah dilakukan sonifikasi (Gambar 2) dalam kromatogram terlihat bahwa fungi A, E, dan F; mempunyai bercak yang mempunyai harga hRf yang mirip dengan standar artemisinin, yaitu hRf 60. Warna bercak ketiganya setelah disemprot dengan anisaldehyd asam sulfat juga mirip dengan standar artemisinin, yaitu coklat tua.

Dari data ini dapat disimpulkan sementara bahwa fungi endofit A, E, dan F kemungkinan menghasilkan metabolit sekunder artemisinin atau turunannya dengan hRf 60 dan metabolit tersebut tidak disekresikan ke dalam media fermentasi, tetapi tetap tersimpan di dalam sel fungi sehingga untuk memperolehnya diperlukan pemecahan sel miselia fungi terlebih dahulu dengan sonikasi.

Uji aktivitas penghambatan polimerisasi hem

Pengujian ini dilakukan secara *in vitro* dan digunakan asam asetat agar tingkat keasamannya sama dengan tingkat keasaman vakuola digestif *Plasmodium*, yaitu sekitar pH 5; sehingga hasil yang diperoleh dapat menggambarkan kondisi sebenarnya. Dalam penelitian ini digunakan dimetil sulfoksida sebagai larutan pencuci karena larutan ini, tidak menimbulkan busa, dan siap digunakan tanpa preparasi larutan sebelumnya. Larutan lain yang dapat digunakan untuk mencuci kristal β -hematin adalah larutan SDS 2,5% (*Sodium Dodecyl Sulphate*) atau dapar natrium bikarbonat 0,1 M dengan pH 9,1 (Basilico, *et al.*, 1998). Dalam suasana asam, hematin akan berpolimerisasi menjadi kristal β -hematin. Makin banyak kristal β -hematin yang terbentuk, warna larutan (setelah kristal dilarutkan kembali dalam larutan natrium hidroksida 0,1 M) akan semakin pekat sehingga nilai OD juga semakin besar. Dengan kata lain, senyawa uji yang mampu menghambat polimerisasi hematin ini akan mengurangi kristal β -hematin yang terbentuk, sehingga semakin aktif senyawa uji, warna larutan akan semakin tidak berwarna, nilai OD akan semakin kecil. Hasil pengukuran nilai OD dengan Elisa reader yang mencerminkan IC_{50} dari sampel ekstrak etil asetat miselia A, E dan F berturut turut $0,824 \pm 2,89 \mu\text{M}$; $0,861 \pm 2,43 \mu\text{M}$ dan $1,394 \pm 3,73 \mu\text{M}$. Sebagai rujukan beberapa obat antimalaria

mempunyai penghambatan polimerisasi hem dengan IC_{50} untuk klorokuin = $1,85 \mu\text{M}$, primakuin = $1,28 \mu\text{M}$; amodiakuin $1,95 \mu\text{M}$; kuinidin = $4,65 \mu\text{M}$; artemisinin = $1,25 \mu\text{M}$ dan dihidroartemisin $1,61 \mu\text{M}$ (Basilico, *et al.* 1998) Sebagai kontrol negatif digunakan akuades dan larutan dimetil sulfoksida. Identifikasi dari ketiga fungi endofit yang mempunyai aktivitas sebagai penghambat polimerisasi hem masih dilakukan penelitian.

Kesimpulan

Dari hasil pengujian aktivitas penghambatan polimerisasi hem, fungi A, E, dan F mempunyai aktivitas dalam menghambat polimerisasi hem dengan nilai IC_{50} berturut-turut sebesar $0,824 \pm 2,89 \mu\text{M}$; $0,861 \pm 2,43 \mu\text{M}$; dan $1,394 \pm 3,73 \mu\text{M}$. Metabolit yang mampu menghambat tersebut tidak disekresikan ke dalam media fermentasi tetapi tersimpan di dalam miselia fungi. Metabolit yang aktif tersebut diduga adalah golongan senyawa terpenoid .

Ucapan Terima Kasih

Terimakasih kami ucapkan kepada Kementerian Negara Riset dan Teknologi melalui LPPM Universitas Gadjah Mada dengan No. Kontrak LPPM-UGM/822/2010 yang telah memberi dana untuk penyelesaian penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Basilico, N., Pagani, E., Monti, D., Olliaro, P., and Taramelli, D., 1998, A microtitre-based method for measuring the haem polymerization inhibitory activity (HPIA) of antimalarial drugs, *J. Antimic. Chem.*, 42, 55-60.
- Guetzoyan, L., Yu, X., Ramiandrasoa, F., Pethe, S., Rogier, C., Pradines, B., Cresteil, T., Perrée-Fauvet, M., and Mahy, J., 2009, Antimalarial acridines: Synthesis, *in vitro* activity against *P. falciparum* and interaction with hematin, *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 8032-8039.
- Huy, N.T., Maeda, A., Uyen, D.T., Trang, D.T.X., Sasai, M., Shiono, T., Oida, T., Harada, S., and Kamei, K., 2007, Alcohols induce beta-hematin formation via the dissociation of aggregated hem and reduction in interfacial tension of the solution, *Acta Tropica*, 101, 130–138.
- Kardinan, A., 2008, Artemisia (*Artemisia annua*) tanaman anti malaria, *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri*, Bogor, 14(2), 1-3.
- Krishna, S., Uhlemann, A., and Haynes, R.K., 2004, Artemisininins : mechanisms of action and potential for resistance, *Drug Resistance Updates*, 7, 233-244.
- Liu, C.H, Zou, W.X., Lu, H., and Tan, R.X., 2001, Antifungal activity or *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi, *J. Biotech.*, 88, 277-282.

- Magnani, M., Calliari, C.M., de Macedo Jr., F.C., Mori, M.P., de Syllos Cólus, I.M., and Castro-Gomez, R.J.H., 2009, Optimized methodology for extraction of (1→3)(1→6)-β-D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative, *Carb. Polym.*, 78, 658–665.
- Naddeo, V., Belgiorno, V., and Napoli, R.M.A., 2007, Behavior of natural organic mater during ultrasonic irradiation, *Desalination*, 210, 175-182.
- Prihatiningtias, W., 2005, Senyawa bioaktif fungi endofit akar kuning (*Fibraurea chloroleuca* Miers) sebagai agensia antimikroba, *Tesis*, Sekolah Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Shio, M.T., Kassa, F.A., Bellemare, M.J., and Olivier, M., 2010, Innate inflammatory response to the malarial pigment hemozoin, *Microbes and Infection*, doi: 10.1016/j.micinf.2010.07.001.
- Strobel, G. and Daisy, B., 2003, Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (4), 491-502.
- Suryanarayanan, T.S. and Thennarasan, S., 2004, Temporal variations in endophyte assemblages of *Plumeriarubra* leaves, *Fungal Diversity*, 15, 197-204.
- Suwandi, J.F., Wijayanti, M.A., and Mustofa, 2008, Aktivitas penghambatan polimerisasi hem antiplasmodium ekstrak daun sungkai (*Peronema canescens*) *in vitro*, Seminar Nasional sains dan Teknologi II, *Prosiding*, Universitas Lampung.

*) Koresponden : Wahyono
Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada
Sekip Utara, Yogyakarta
Email : wahyonougma@yahoo.com