

Isolasi dan identifikasi artemisinin dari hasil kultivasi mikroba endofit dari tanaman *Artemisia annua*. [studi mikroba endofitik tanaman *Artemisia spp.* (3)]

Isolation and identification artemisinine from product of endophyte microbe cultivation from *Artemisia annua*. [studies on endophytic microbes of *Artemisia spp.* (3)]

Partomuan Simanjuntak¹, Bustanussalam¹, Dian Malini Otovina², M. Rahayuningsih², dan E.G. Said²

¹) Pusat Penelitian Bioteknologi – LIPI, Jalan Raya Bogor Km 46, Cibinong 16911

²) Fakultas Teknik Industri, Institut Pertanian Bogor (IPB), Bogor

Abstrak

Isolasi hasil biotransformasi artemisinin dari galur bakteri endofit adalah suatu alternatif baru untuk menghasilkan senyawa antimalaria yang resistan terhadap bermacam-macam obat. Galur bakteri AT12 telah terbukti berpotensi sebagai sumber artemisinin.

Dalam penelitian ini telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi hasil biotransformasi artemisinin sebagai senyawa bioaktif antimalaria dari galur mikroba endofit *Artemisia annua*. Spektra infra merah (IR) menunjukkan pita yang berkarakteristik untuk gugus δ -laktone pada $1750-1735\text{ cm}^{-1}$, $1250-1111\text{ cm}^{-1}$, dan gugus peroksida pada $\sim 1115\text{ cm}^{-1}$, $890-830\text{ cm}^{-1}$. Hasil dari GC-MS memberikan identifikasi yang positif untuk puncak utama kromatografi gas. Spektra massa dari puncak tersebut (Rt 27,94 menit) mempunyai ion molekul artemisinin dengan hilangnya satu hidrogen pada $m/z\ 281\ (M^+ - 1)$

Kata Kunci : *Artemisia spp.*, *Artemisia annua*, Endofitik, Artemisinin, sesquiterpen

Abstract

Isolation of the biotransformation product artemisinine from endophytic bacteria is a new alternative for the production of the multidrug-resistant antimalaria compounds. The bacteria strain, AT 12, has been proved particularly potential as an artemisinin source.

This working was carried out to isolate and to identify the biotransformation product artemisinin as an antimalarial active compound from endophytic bacteria strains of *Artemisia annua*. The IR spectrum exhibited the characteristic bands for δ -lactone ($1750-1735\text{ cm}^{-1}$, $1250-1111\text{ cm}^{-1}$) and endoperoxide function ($\sim 1115\text{ cm}^{-1}$, $890-830\text{ cm}^{-1}$). As a result, the GC-MS gave a positively identification for the majority of GC peaks. The mass spectrum of the peak (Rt 27.94 min) has a molecular ion of artemisinin with one hydrogen loss at $m/z\ 281$, representing $(M^+ - 1)$.

Keywords: *Artemisia spp.*, *Artemisia annua*, Endophytic, Artemisinine, sesquiterpene

Pendahuluan

Artemisinin (1) adalah suatu senyawa kimia jenis sesquiterpena laktone yang memiliki jembatan endoperoxida yang merupakan senyawa aktif yang berkhasiat untuk

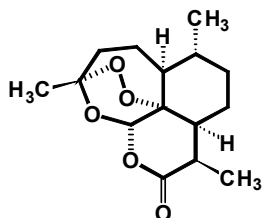
antimalaria. Hasil uji aktivitas secara *in vitro* maupun *in vivo* membuktikan bahwa artemisinin mampu bereaksi cepat dengan daya bunuh tinggi dalam memerangi *Plasmodium falciparum*

baik yang peka maupun kebal terhadap klorokuin (Geldre, *et al.* 1997)

Salah satu cara terbaru dalam memproduksi senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam tanaman adalah dengan memanfaatkan mikroba endofit yang hidup dalam jaringan tanaman. Mikroba endofit adalah suatu mikroba yang hidup dan berasosiasi di dalam jaringan tanaman inang. Asosiasi yang terjadi umumnya bersifat mutualistik, namun ada beberapa di antaranya yang bersifat patogenetik. Mikroba endofit diisolasi dari jaringan tanaman ditumbuhkan pada medium fermentasi dengan komposisi tertentu. Di dalam medium fermentasi, mikroba endofit menghasilkan senyawa metabolit sekunder seperti yang terkandung pada tanaman dengan bantuan aktivitas enzim. (Petrini *et al.* 1992). Eksplorasi mikroba endofit potensial merupakan alternatif baru untuk mendapatkan rendemen artemisinin dan turunannya secara lebih ekonomis dan mencukupi.

Penelitian ini dilatarbelakangi oleh masih adanya kesulitan dalam penyediaan artemisinin skala besar sebagai senyawa alternatif antimalaria. Selama ini hanya herba yang secara serius digali potensinya sebagai sumber artemisinin. Oleh karena itu perlu dilakukan eksplorasi galur mikroba endofit sebagai sumber potensial artemisinin.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengidentifikasi produk biotransformasi artemisinin sebagai zat aktif antimalaria dari galur mikroba endofit *Artemisia annua*.



Artemisinin (1)

Gambar 1. Struktur kimia artemisinin hasil isolasi tanaman *Artemisia annua*

Metodologi

Preparasi sumber mikroba

Mikroba yang digunakan adalah mikroba yang diisolasi dari tanaman *Artemisia annua* (dikoleksi dari Tawangmangu) dan hasil identifikasi diketahui bahwa mikroba tersebut adalah *Bacillus polymixa*, dan kultivasi dilakukan selama 3 hari (Parwati *et al.* 2003; Melliawaty *et al.* 2004).

Alat

Alat-alat yang digunakan adalah instrumen spektrofotometer Infra merah (IR) dan GC-MS Hewlett Packard (HP) 6890.

Penapisan contoh hasil fermentasi untuk identifikasi

Isolasi dilakukan dengan mengekstraksi sebanyak tiga kali terhadap contoh hasil fermentasi dengan 15 ml kloroform dan diuapkan. Contoh diekstraksi dengan cara dihomogenisasi dengan alat vorteks hingga tercampur rata. Lapisan bawah (jernih) yang terbentuk merupakan filtrat yang terdiri atas kloroform dan campuran metabolit sekunder. Sementara lapisan atas merupakan medium yang terekstraksi bersama pelarut. Masing-masing filtrat yang terbentuk dipisahkan dan dikeringkan.

Kemurnian produk diuji dengan melakukan purifikasi lebih lanjut dengan menginjeksikan contoh pada instrumen HPLC setelah dilakukan fraksinasi dengan kromatografi kolom.

Identifikasi Struktur Kimia

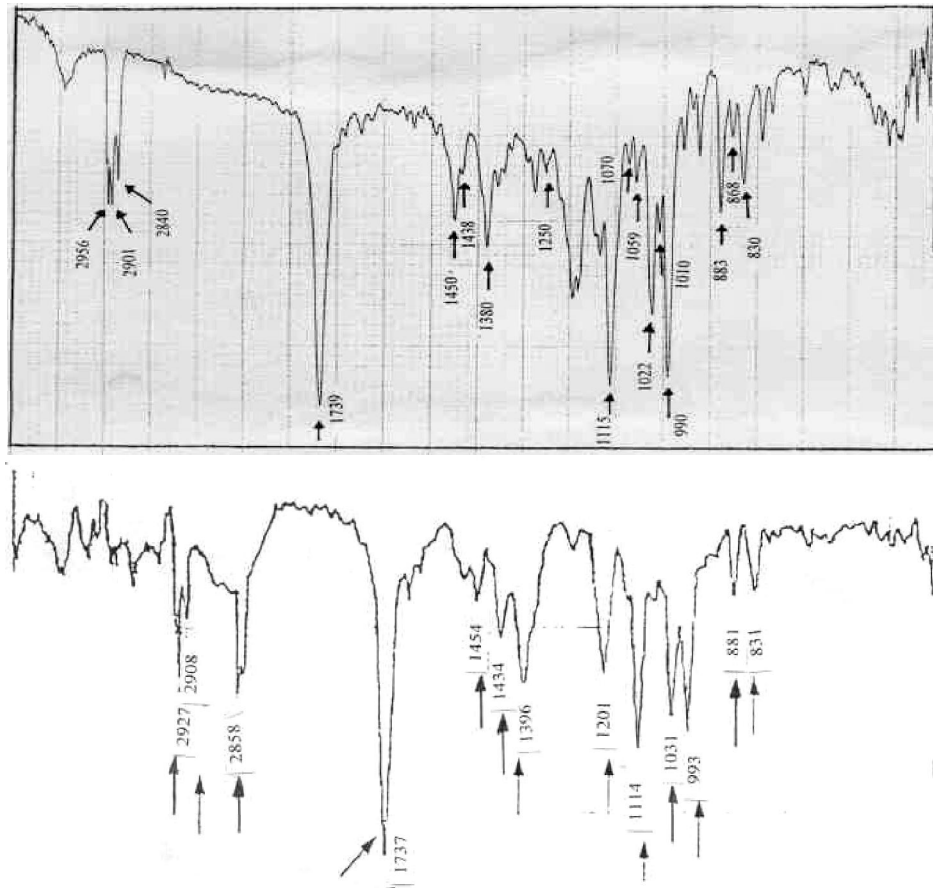
Identifikasi produk biotransformasi artemisinin dan turunannya dilakukan dengan menginterpretasikan data-data spektrum IR dan kromatogram GC-MS dari artemisinin hasil isolasi dengan artemisinin standar.

Kromatografi gas yang dipakai adalah merk Hewlett Packard (HP) 6890 yang dipasangkan pada MS merk Hewlett Packard (HP) 5973; jenis kolom Ultra I - HP (17 m x 0,20 mm x 0,11 μ m); gas pembawa He; tekanan kolom 10,2 Psi; suhu inlet 280 $^{\circ}$ C; detector MSD; dan energi yang digunakan 70 eV.

Program suhu yang dipakai adalah suhu awal 70 $^{\circ}$ C selama 2 menit, kemudian menaik hingga 250 $^{\circ}$ C dengan kenaikan 10 $^{\circ}$ C per menit (pada suhu 250 $^{\circ}$ C dibiarkan selama 1 menit). Dan selanjutnya menaik lagi hingga 310 $^{\circ}$ C dengan kenaikan 5 $^{\circ}$ C per menit (pada suhu 310 $^{\circ}$ C dibiarkan selama 3 menit).

Hasil Dan Pembahasan

Ekstraksi kultur bakteri endofit AT12, *Bacillus polymixa* (15 ml) dengan kloroform menghasilkan resin *oily* berwarna coklat kekuningan. Rendemen resin *oily* terbesar



Gambar 2: Spektra infra merah untuk senyawa artemisinin standard (atas) dan produk hasil kultur bakteri AT12, *B. polymixa* (bawah)

(17 mg) didapatkan pada contoh kultur fermentasi jam ke-72. Ekstraksi dilakukan sebanyak tiga kali agar senyawa aktif yang diinginkan terekstrak sempurna di dalam pelarut kloroform (Houghton *et al.*, 1998).

Contoh yang telah diekstraksi dengan cara divorteks diinkubasi selama beberapa waktu (kira-kira 20-45 menit) hingga terbentuk lapisan bawah berwarna jernih. Inkubasi tersebut sekaligus bertujuan untuk penjenuhan. Penjenuhan dilakukan untuk menyediakan semacam jembatan agar terjadi pemindahan selektif senyawa artemisinin dan turunan sejenisnya ke dalam fase kloroform (El Sohly *et al.* 1990). Tahap ini juga bertujuan untuk mengurangi jumlah komponen yang akan difraksinasi dengan kromatografi kolom. Resin *oily* selanjutnya diuapkan sehingga diperoleh

residu kering fase kloroform *oily* yang siap difraksinasi dan diuji TLC.

Fraksinasi dilakukan dengan kromatografi kolom menggunakan sistem gradien elusi (SiO_2 , *n*-heksan-etilasetat = 10 : 1 – *n*-heksan-etilasetat = 2 : 1).

Identifikasi dan Karakterisasi Struktur Spektrum IR

Identifikasi contoh uji hasil produksi dilakukan dengan membandingkan spektrum IR contoh dengan standar artemisinin. Tabel II menyajikan berbagai gugus fungsi dalam spektrum contoh kultur bakteri AT12, *bacillus polymixa* setelah difraksinasi dan artemisinin standar sebagai senyawa pembanding.

Spektrum IR artemisinin standar maupun artemisinin produk dari kultur bakteri AT12 memperlihatkan adanya serapan dua

Tabel II. Identifikasi berbagai gugus fungsi dalam spektrum IR contoh kultur bakteri AT 12 dengan artemisinin standar

Daerah Serapan (cm ⁻¹)		Gugus Fungsi Serapan
Contoh Kultur Bakteri AT 12	Artemisinin Standar	
2956-2840	2927-2858	uluran C-H alifatik (l-s)
1739	1737	uluran C=O (t)
1450-1380	1454-1396	tekukan C-H (l-s)
1250	1201	uluran C-O (t)
1115, 883-868, 830	1114, 881, 831	gugus C-O-O-C (t)
1070-990	1031-993	cincin sikloheksana (t)

Keterangan: (t) = tajam; (s) = sedang; (l) = lemah

Tabel III. Perbandingan kromatogram GC contoh kultur bakteri AT12, *Bacillus polymixa* dan artemisinin standar terhadap puncak-puncak dengan waktu retensi sama

Contoh AT 12		Artemisinin Standar	
Waktu Retensi (Menit)	Luas Puncak (%)	Waktu Retensi (Menit)	Luas Puncak (%)
13,44	2,02	13,41	0,83
13,79 *	3,04	13,77 *	1,19
14,33 *	3,60	14,31 *	1,74
14,84	6,85	14,82	2,47
16,61	2,86	16,58	0,73
18,38	4,57	18,36	1,33
20,60	2,23	20,57	1,00
20,69	2,35	20,67	0,87
21,32	5,79	21,32	2,34
21,73 *	10,75	21,74 *	4,95
22,18	4,86	22,17	1,29
22,83	4,82	22,83	1,43
23,13	7,07	23,13	2,42
23,37	2,18	23,36	0,51
24,48	2,68	24,45	0,84
25,49	2,60	25,47	1,01
27,94 *	1,59	27,94 *	9,44
28,48	0,93	28,50	1,86
44,21	1,17	44,19	4,40
45,75	1,75	45,72	2,16
46,70	1,99	46,74	3,17

Keterangan: * = puncak-puncak yang difragmentasi dalam MS

gugus penting dalam molekul artemisinin, yaitu δ -lakton dan endoperoksida (Klayman 1993). Adanya gugus δ -lakton ditunjukkan oleh keberadaan pita-pita serapan uluran C=O dan C-O masing-masing pada daerah 1750-1735 cm⁻¹ dan 1250-1111 cm⁻¹. Sementara keberadaan gugus endoperoksida dideteksi pada pita-pita serapan di daerah 890-830 cm⁻¹ dan 1115 cm⁻¹. Cincin sikloheksana berkonformasi kursi diidentifikasi dari adanya serapan di daerah 1055-1000 cm⁻¹ dan 1005-925 cm⁻¹ (Zheng 1994). Sehingga dari hasil spektrum IR contoh kultur

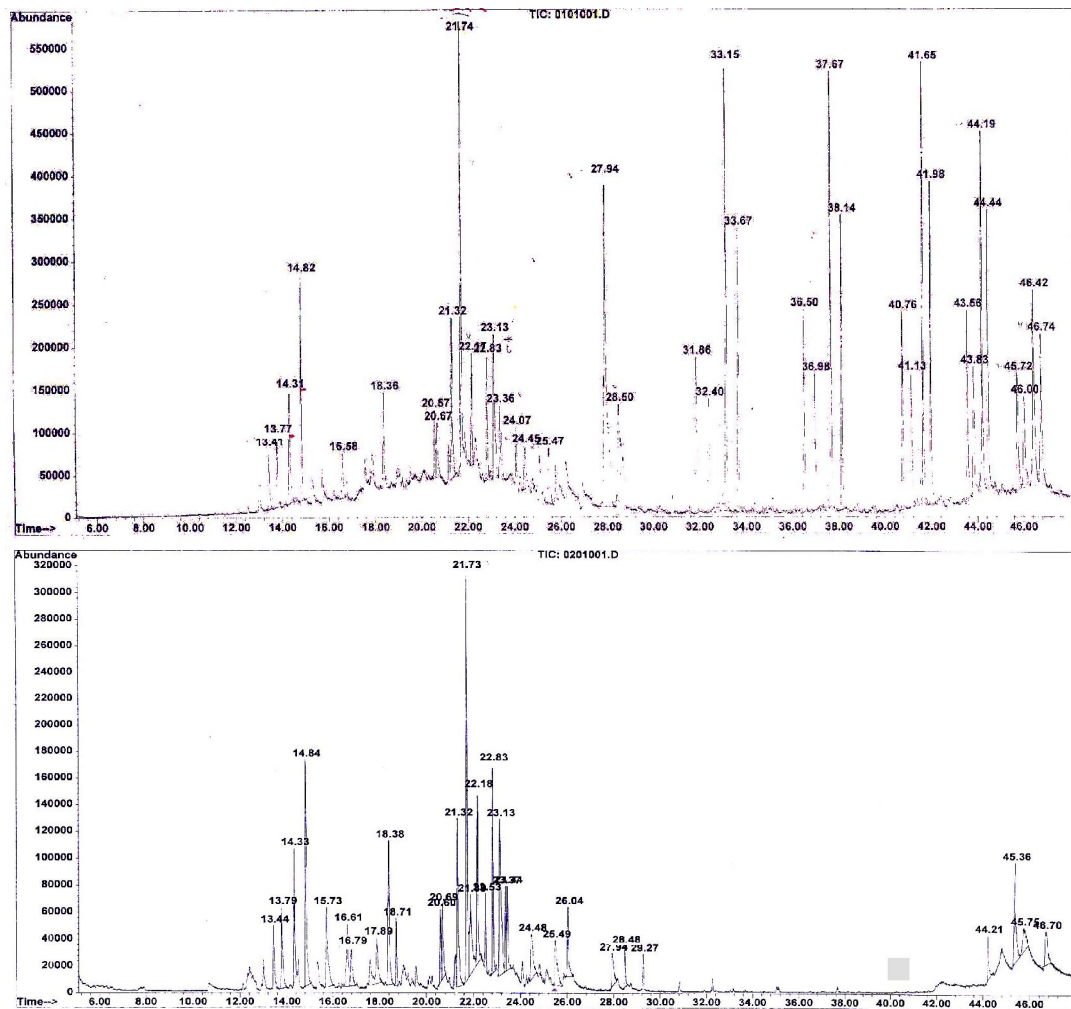
bakteri AT 12 memiliki kemiripan dengan spektrum artemisinin standar (Gambar 2).

Kromatografi gas-selektif massa (GC-MS)

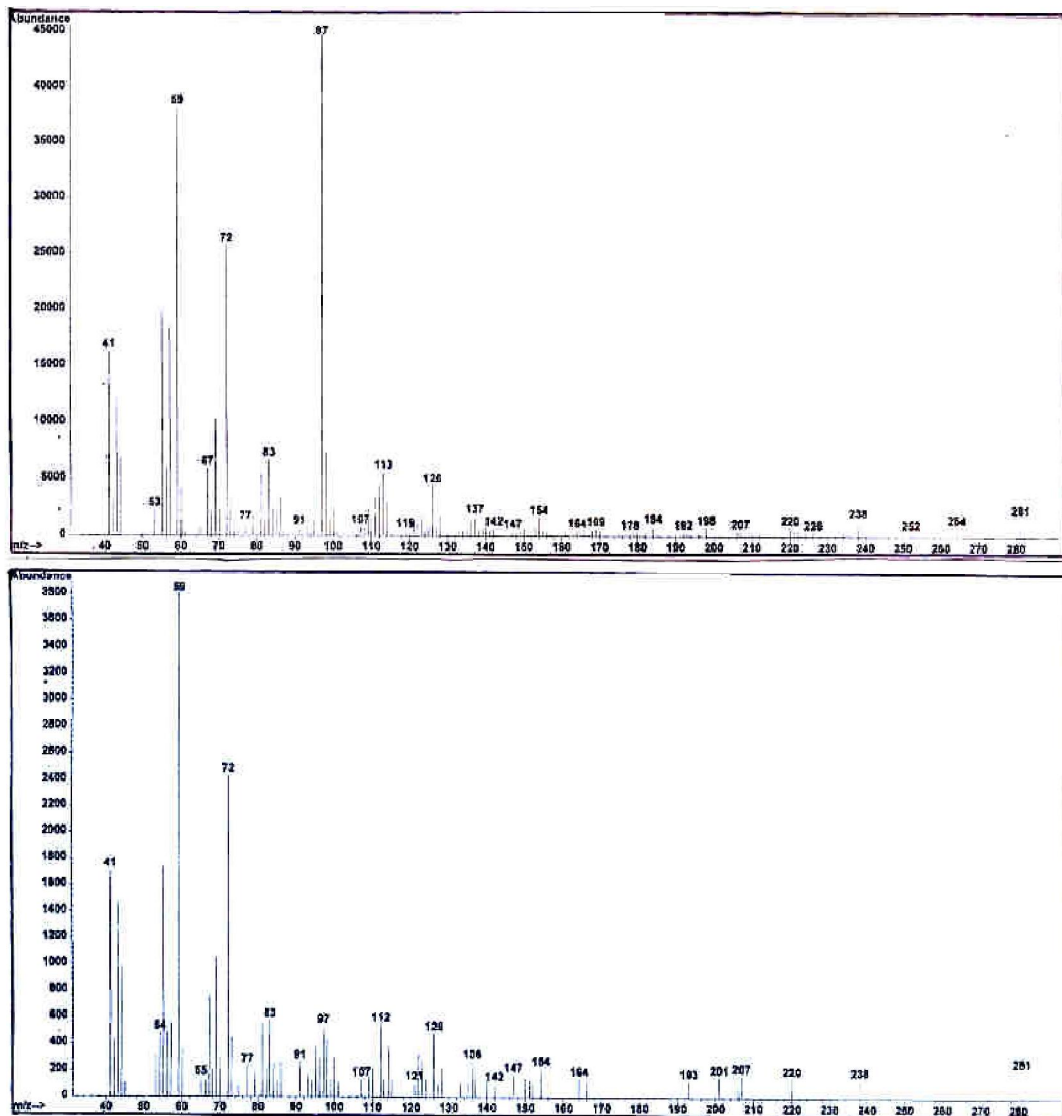
Hasil kromatografi GC menunjukkan adanya 21 puncak dengan waktu retensi yang relatif sama baik pada kromatogram contoh kultur bakteri AT 12 maupun kromatogram artemisinin standar seperti tertera pada Tabel III. Di antara puncak-puncak tersebut selanjutnya dipilih masing – masing empat puncak dengan waktu retensi 13,79; 14,33; 21,73; 27,94 menit pada kromatogram contoh

Tabel IV. Hasil analisis fragmentasi MS contoh kultur bakteri AT 12 dan artemisinin standar

Waktu Retensi (Menit)	Kesamaan Fragmentasi Ion (m/z)	
	Contoh AT 12	Artemisinin Standar
13,79	43, 55, 65, 77, 91, 105, 119, 131, 145, 161, 178, 204	43, 55, 65, 77, 91, 105, 119, 131, 145, 161, 178, 204
14,33	43, 51, 55, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 91, 105, 115, 119, 128, 133, 141, 145, 161, 204	43, 51, 55, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 91, 105, 115, 119, 128, 133, 141, 145, 161, 204
21,73	43, 55, 67, 79, 93, 107, 124, 135, 151, 165, 189, 195, 210, 224, 238, 266	43, 55, 67, 79, 93, 107, 124, 135, 151, 165, 189, 195, 210, 224, 238, 266
27,94	41, 59, 72, 77, 83, 91, 97, 107, 126, 142, 147, 154, 164, 207, 220, 238, 281 M^{+1}	41, 59, 72, 77, 83, 91, 97, 107, 126, 142, 147, 154, 164, 207, 220, 238, 281 M^{+1}



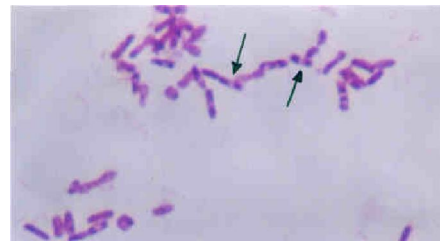
Gambar 3. Kromatogram GC untuk artemisinin standar (atas) dan produk hasil fermentasi (bawah)



Gambar 4. Spektra massa untuk artemisinin standar (atas) dan produk hasil fermentasi (bawah)



Gambar 5. Morfologi sel bakteri endofit AT 12 pada perbesaran 1000 kali. Sel dengan endospora subterminal ditunjukkan di dalam lingkaran.



Gambar 6. Penampakan daerah refraktil subterminal sel bakteri AT 12 pada kultur fermentasi jam ke-30.

serta waktu retensi 13,77; 14,31; 21,74; 27,94 menit pada kromatogram standar (Gambar 3). Puncak-puncak tersebut selanjutnya difragmentasi dalam MS. Puncak yang memperlihatkan ion molekuler m/z 282 diidentifikasi sebagai puncak artemisinin (Gambar 4).

Pola fragmentasi yang teramati dalam spektrum massa artemisinin standar maupun contoh puncak 27,94 menit (Tabel IV) menunjukkan kemiripan.

Pola fragmentasi rangka karbon artemisinin yakni kadinanolida meliputi pecahan ion-ion m/z 69, 71, 81, 95, 107, 123, 151, 165, 178, 192, 218, 232, 239, 251, dan 282 (M^+) (Bicchi dan Rubiolo 1996). Pada puncak t_R 27,94 menit teramati beberapa fragmen ion yang mirip, yaitu ion m/z 72 ($M^+ + 1$), 83 ($M^+ + 2$), 97, 107, 164 ($M^+ - 1$), 193 ($M^+ - 1$), 220 ($M^+ + 2$), dan 281 ($M^+ - 1$). Terlihat pula adanya puncak dengan intensitas rendah pada fragmen m/z 164, 107, 97, dan 83 masing-masing pada puncak dasar m/z 207, 136, 126, dan 112 yang merepresentasikan $[M - 29]^+$, lepasnya molekul CHO seperti dilaporkan oleh Bicchi dan Rubiolo (1996).

Daftar Pustaka

- Bicchi C, Rubiolo P. 1996. High-performance liquid chromatographic-particle beam mass spectrometric analysis of sesquiterpene lactones with different carbon skeletons. *J. Chromatogr A* 727:211-221.
- ElSohly, H.N., Croom E.M., El-Feraly F.S., dan El-Sherey M.M., 1990. A large-scale extraction technique of artemisinin from *Artemisia annua*. *J. Nat. Prod.* 53 (6), 1560 – 1564
- Geldre EV, Vergauwe A, Eechout E., 1997. State of art of the production of antimalarial compound artemisinin in plants. *Plant Mol. Biol.* 33, 199 - 209
- Klayman DL. 1993. *Artemisia annua*: from weed to expectable antimalarial plant. Di dalam: Kinghorn AD, Balandrin MF, editor. Human Medicinal Agent From Plant. ACS Symposium Series 534. Washington DC: *American Chemical Soc.* 242-250.
- Melliawaty, R., Dian Malini Oktovina, T. Parwati dan P. Simanjuntak. 2004. Studi mikroba endofit tanaman *Artemisia annua* (2) : Produksi senyawa aktif anti malaria artemisinin hasil fermentasi *Bacillus polymixa* AT12, *Jurnal Biosains dan Bioteknologi Indonesia* (in press).
- Misra LN, Ahmad A, Thakur RS, Jakupovic J. 1993. Bisnor-cadinanes from *Artemisia annua* and definitive ^{13}C NMR assignments of β -arteether. *Phytochem* 33(6):1461-1464.
- Parwati, T., Bustanussalam, P. Simanjuntak 2003. Studi pendahuluan mikroba endofit penghasil senyawa terpen dari tanaman *Artemisia annua*, *Jurnal Ilmu Kefermasian Indonesia* vol. 1, no 1, 2003. 27 – 32.
- Petrini O, Sieber TN, Toti L, Viret O. 1992. *Ecology Metabolite Production, and Utilization in Endophytic Fungi*. Wilwy-Liss Press. 1- 10
- Ranasinghe, A., Sweatlock J.D., Cooks, R.G., 1993. A rapid screening method for artemisinin and congeners using MS/MS: search for new analogues in *Artemisia annua*, *J. Nat. Prod.* 56 (4); 552 - 563
- Zheng, G. Q. 1994. Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*. *Planta Med.* 60:54-57

Selain itu, fragmentasi produk biotransformasi artemisinin diduga berkaitan dengan penghilangan molekul netral kecil secara serempak, seperti H_2O , CO, COOH, HCOOH, dan CH_2CO (Ranasinghe *et al.* 1993; Misra *et al.* 1993). Lepasnya molekul H_2O teramati saat puncak dasar fragmen m/z 238 berdampingan dengan fragmen m/z 220 ($M^+ - 18$). Sementara itu, penyingkiran molekul CO ($M^+ - 28$) terjadi pada ion m/z 164 terhadap m/z 136 serta ion m/z 154 terhadap m/z 126. Terlepasnya molekul COOH ($M^+ - 45$) terjadi pada fragmen-fragmen ion m/z 142 terhadap m/z 97 serta ion m/z 136 terhadap m/z 91. Pelepasan molekul CH_2CO ($M^+ - 42$) dideteksi pada fragmen-fragmen ion m/z 154 terhadap m/z 112 serta ion m/z 107 terhadap m/z 65.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa mikroba endofit (*Bacillus polymixa*) hasil isolasi dari tanaman *Artemisia annua* dapat memproduksi senyawa kimia antimalaria artemisinin di dalam media cair sintetik.