

Biotransformasi (-)-Epigallocatekin-3-O-galat Menjadi (-)-2R,3S-Dihidromirisetin oleh Fungi Endofit *Diaporthe* sp. Isolat E dari Tumbuhan Teh

Biotransformation of (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate into (-)-2R,3S-Dihydromyricetin by the Endophytic Fungus Diaporthe sp. E Isolate Obtained from a Tea Plant

ANDRIA AGUSTA

*Phytochemistry Laboratory, Botany Division, Research Center for Biology, The Indonesian Institute of Science,
Jalan Raya Bogor Km. 46, Cibinong 16119; Phone: +62-21-8765066 ext. 1104, Fax: +62-21-8765063, E-mail: bislunatin@yahoo.com*

Received August 21, 2007/Accepted December 19, 2007

Endophytic fungi have been reported possess an interesting ability to mimic their host plant metabolites. Several fungi also show their specific capability to biotransform the chemical constituents of the host plant. The endophytic fungus *Diaporthe* sp. E isolate obtained from young stem of a tea plant (*Camellia sinensis*) show their unique capability to biotransform (-)-epigallocatechin-3-O-gallate [(-)-EGCG] into a major product in glucose-peptone-yeast extract medium that incubated under dark condition at 27 °C for 48 h. The major biotransformation product were isolated and purified through column chromatography techniques using Sephadex LH-20 and silica gel. The chemical structure of the major product were elucidated as (-)-2R,3S-dihydromyricetin based on their IR, FAB-MS, 1D- and 2D-NMR spectra.

Key words: (-)-2R,3S-dihydromyricetin, (-)-EGCG, (-)-2R,3R,4R-leucodelphynidin, biotransformation, *Diaporthe* sp. E isolate, endophytic fungus, *Camellia sinensis*

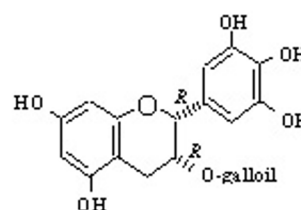
PENDAHULUAN

Dalam beberapa dekade belakangan ini, beberapa kelompok peneliti melaporkan bahwa fungi endofit memiliki keunikan untuk meniru metabolit yang diproduksi oleh tumbuhan inangnya. Stierle *et al.* (1993), melaporkan bahwa fungi endofit *Taxomyces andreanae* yang berasosiasi dengan tumbuhan *Taxus brevifolia* memiliki kemampuan untuk memproduksi senyawa taksol secara *in vitro* di laboratorium. Fungi endofit RJMEF001 yang berasosiasi dengan tumbuhan *Notapodytes foetida* dilaporkan mampu memproduksi kamtotesin di dalam medium semisintetik (Puri *et al.* 2005). Di samping itu, fungi endofit juga dilaporkan memiliki kapabilitas untuk melakukan transformasi komponen kimia tumbuhan inangnya. Shibuya *et al.* (2003) melaporkan bahwa fungi endofit *Xylaria* sp. yang diisolasi dari *Chincona pubescence* dapat mengubah alkaloid kina menjadi turunan 1-N-oksidasi yang memiliki efek sitotoksik lebih rendah dibanding senyawa asal.

Agusta *et al.* (2006a) telah mengisolasi enam jenis fungi endofit, yang berasosiasi dengan tanaman teh, *Camellia sinensis* (L.) O.K. (Theaceae). Salah satu di antara fungi endofit tersebut, yaitu *Diaporthe* sp. isolat E dapat memproduksi metabolit bisantraknon, yaitu (+)-2,2'-episitokirin dan (+)-1,1'-bislunatin dalam medium cair *potato dextrose broth* (PDB) (Agusta *et al.* 2006b). Di pihak lain, *Diaporthe* sp. isolat E memperlihatkan kemampuan yang unik untuk mengubah senyawa flavan-3-ol dari tanaman teh

(Gambar 1) menjadi leukoantosianidin. Hal ini merupakan bukti bahwa fungi endofit dapat mengubah komponen kimia dari tumbuhan inangnya seperti yang dihipotesiskan sebelumnya (Agusta *et al.* 2005; Shibuya *et al.* 2005). Hal yang tidak kalah menariknya adalah kenyataan bahwa fungi endofit *Diaporthe* sp. isolat E tersebut memiliki reaksi biotransformasi selektif terhadap struktur ruang dari molekul substrat dengan konfigurasi 2R-fenil tersubstitusi yang merupakan tipe alami dari senyawa flavan-3-ol dalam tumbuhan teh. Fungi endofit ini tidak dapat melakukan reaksi oksidasi terhadap senyawa flavan dengan konfigurasi 2S-fenil tersubstitusi, seperti (-)-galokatekin-3-O-galat (Agusta *et al.* 2005) yang merupakan senyawa artefak yang terbentuk selama proses pemanasan daun teh atau produk-produk yang berasal dari teh (Wilkins *et al.* 1971).

Salah satu senyawa flavan-3-ol dari tanaman teh yang bisa ditransformasi oleh fungi endofit *Diaporthe* sp. isolat E adalah (-)-epigallocatekin-3-O-galat [(-)-EGCG, 5]. Penambahan



Gambar 1. Struktur kimia (-)-apigalokatekin 3-O-galat (EGCG), flavan-3-ol utama pada tanaman teh (Nonaka *et al.* 1984).

sejumlah larutan (-)-EGCG ke dalam kultur medium *Diaporthe* sp. isolat E yang telah berumur lima hari dapat menghasilkan (-)-2*R*,3*R*,4*R*-leukodelfinidin (Gambar 2) dalam 28 jam waktu inkubasi dengan kemampuan biotransformasi sebesar 43% (Agusta *et al.* 2005). Untuk mempelajari lebih lanjut tentang seberapa jauh fungi endofit *Diaporthe* sp. isolat E dapat mengubah komponen kimia utama pada tumbuhan inangnya, maka dilakukan penelitian biotransformasi (-)-EGCG oleh *Diaporthe* sp. isolat E pada kondisi biotransformasi yang berbeda.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tumbuhan. Bahan yang digunakan berupa ranting muda tanaman teh, *C. sinensis* (L.) O.K. (Theaceae) yang dikoleksi dari bekas perkebunan teh di Desa Gunung Mas, Kecamatan Cisarua, Kabupaten Bogor, Jawa Barat pada Agustus 2003. Identifikasi jenis dilakukan di Herbarium Bogoriense, Puslit Biologi, LIPI.

Deteksi Senyawa Hasil Biotransformasi. Fungi endofit *Diaporthe* sp. isolat E ditumbuhkan di dalam Erlenmeyer berukuran 500 ml yang berisikan 200 ml medium GYP (20 g glukosa, 1 g ekstrak khamir, 5 g pepton, 0.5 g K_2HPO_4 , 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1000 ml air) pada *rotary shaker* dengan kecepatan agitasi 90 rpm pada kondisi gelap. Setelah diinkubasi selama lima hari pada suhu 27 °C, 20 ml substrat larutan steril (-)-EGCG dalam metanol (1 mg/ml) ditambahkan ke dalam medium tumbuh. Selanjutnya larutan tersebut diinkubasi kembali pada kondisi yang sama. Jalannya reaksi biotransformasi dimonitor dengan melakukan sampling 5 ml medium tumbuh berikut miselia pada jam ke-1, 28, dan 48 setelah penambahan substrat, dan diekstraksi dengan etil asetat. Kemudian pelarut diuapkan dengan penguap putar pada suhu 30 °C dan setelah kering dilarutkan kembali di dalam 5 ml metanol. Selanjutnya, 10 µl sampel dianalisis dengan HPLC (TOSOH PD 8020) fasa terbalik menggunakan kolom CAPCELL PAK Phenyl SG-120 (250 x 4.6 mm) pada temperatur ruang. Elusi secara gradien menggunakan 20 mM KH_2PO_4 -asetonitril dari 5-15% asetonitril dengan laju aliran 1 ml/min dalam waktu 40 menit serta dideteksi dengan detektor UV pada 210 nm.

Isolasi dan Purifikasi Produk Biotransformasi. Fungi endofit *Diaporthe* sp. isolat E ditumbuhkan di dalam Erlenmeyer berukuran 500 ml yang berisikan 200 ml medium GYP, dan diinkubasi dengan kondisi yang sama dengan di atas. Setelah lima hari, 20 ml substrat larutan steril (-)-EGCG dalam metanol (1 mg/ml) ditambahkan ke dalam medium

tumbuh. Selanjutnya diinkubasi kembali pada suhu 27 °C, 90 rpm selama 48 jam pada kondisi gelap. Kemudian seluruh medium tumbuh berikut miselia diekstraksi dengan etil asetat dan pelarutnya diuapkan dengan penguap putar, dan diperoleh 49 mg ekstrak. Pemisahan dilakukan dengan teknik kromatografi kolom (2 x 70 cm) menggunakan Sephadex LH-20 sebagai fase diam dan metanol sebagai fase gerak sehingga dihasilkan dua fraksi, yaitu fraksi 1 dan fraksi 2. Permurnian fraksi 2 dengan kolom kromatografi menggunakan gel silika sebagai fase diam dengan fase gerak lapisan bawah (fase organik) dari campuran kloroform:metanol:air (65:35:10) dan menghasilkan 5.4 mg produk utama.

Penentuan Struktur Kimia Produk Utama. Struktur kimia produk utama ditentukan berdasarkan sifat karakter fisikokimianya. Sifat fisikokimia yang ditentukan meliputi rotasi optik yang diukur dengan alat polarimeter digital (Jasco DIP-360) dengan konsentrasi 6.9 mg/ml di dalam metanol pada temperatur 24 °C dan panjang sel 50 mm. *Fast atomic bombardment mass spectrometry* (FAB-MS) diukur dengan menggunakan alat spektrometer masa JMS SX-102 A. Spektrum *infra red* (IR) diukur dengan alat spektrofotometer Shimadzu FT-IR 8500 dengan plat KBr. Sedangkan spektrum 1H - dan ^{13}C -resonansi magnet inti (RMI) diukur dengan spektrometer JEOL JNM-Lambda 500 yang dioperasikan pada 500 MHz untuk 1H dan 125 MHz untuk ^{13}C di dalam pelarut *d*₆-aseton. Geseran kimia diberikan dalam skala δ (ppm) yang relatif terhadap tetrametilsilana (TMS, $\delta=0$) sebagai internal standar, dan konstanta kopling diberikan dalam satuan Herzt.

HASIL

Deteksi Senyawa Hasil Biotransformasi. Setelah fungi endofit *Diaporthe* sp. isolat E tumbuh dan berkembang selama lima hari dalam medium tumbuh, sebanyak 20 mg (-)-EGCG dilarutkan dalam 20 ml metanol ditambahkan ke dalam medium tumbuh dan diinkubasi kembali. Hasil analisis HPLC setelah satu jam waktu inkubasi belum memperlihatkan berlangsungnya proses reaksi biotransformasi (Gambar 3b). Setelah waktu inkubasi berlangsung selama 28 jam terlihat bahwa substrat (-)-EGCG telah diubah seluruhnya menjadi (-)-EGC (diidentifikasi dengan adisi standar (-)-EGC, Wako, Jepang), dan asam galat (diidentifikasi dengan adisi atau penambahan standar asam galat, Wako, Jepang). Pada waktu inkubasi jam ke-28, kromatogram hasil analisis HPLC (Gambar 3c) juga memperlihatkan adanya puncak baru yang selanjutnya disebut sebagai produk minor. Gambar 3d memperlihatkan bahwa perpanjangan waktu inkubasi sampai 48 jam



Gambar 2. Reaksi biotransformasi (-)-EGCG oleh jamur endofit (Agusta *et al.* 2005).

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/2086099>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/2086099>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)