

## ABSTRAK

### **METABOLIT SEKUNDER DARI *PESTALOTIOPSIS* *MICROSPORA*, *FUSARIUM SOLANI* DAN *DIAPORTHE* *LITHOCARPUS*, JAMUR ENDOFITIK TUMBUHAN *ARTOCARPUS* INDONESIA SERTA BIOAKTIVITASNYA**

Oleh  
**Riga**  
**NIM: 30517002**  
**(Program Studi Doktor Kimia)**

*Artocarpus* merupakan salah satu genus penting dalam famili Moraceae. Secara tradisional tumbuhan yang dikenal sebagai nangka-nangkaan ini telah banyak dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional untuk menyembuhkan peradangan, demam, malaria dan diare. Kajian fitokimia tumbuhan genus ini menunjukkan bahwa *Artocarpus* menghasilkan senyawa fenolik dengan ciri khas terprenilasi seperti flavonoid, stilben dan 2-arilbenzofuran dengan beragam fungsi farmakologis seperti sitotoksik, antimikroba, anti malaria dan antioksidan. Laporan tersebut menunjukkan bahwa *Artocarpus* merupakan salah satu genus tumbuhan yang potensial menghasilkan berbagai senyawa bioaktif. Eksplorasi lebih lanjut terkait sumber alternatif senyawa bioaktif dapat dilakukan dengan teknologi yang mutakhir antara lain teknik kultur jamur endofitik. Jamur endofitik adalah mikroorganisme yang hidup secara berkoloni dalam berbagai jaringan tumbuhan seperti akar, batang, daun, umbi, buah dan bunga. Evaluasi biologi dan uji aktivitas dari ekstrak jamur endofitik yang terdapat pada tumbuhan inang *Artocarpus* pernah dilaporkan, akan tetapi kajian kimia terkait jamur endofitik yang diisolasi dari tumbuhan genus *Artocarpus* belum pernah diteliti sebelumnya.

Adapun tujuan penelitian ini adalah isolasi dan karakterisasi metabolit sekunder dari jamur endofitik yang berasal dari tumbuhan *A. heterophyllus* dan *A. champeden* serta menguji bioaktivitasnya yang terdiri dari uji sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388 dan uji anti mikroba. Isolat tunggal jamur endofitik yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari jaringan dua spesies tumbuhan *Artocarpus* Indonesia (*A. heterophyllus* dan *A. champeden*) yang kemudian diidentifikasi berdasarkan analisa genetika pada daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) rDNA. Selanjutnya isolat tunggal jamur endofitik dikultivasi dalam media cair pada suhu 28 °C selama waktu kultivasi optimumnya untuk kemudian miselia dipisahkan dari medianya. Miselia diekstraksi dengan metanol sedangkan medianya diekstraksi cair-cair dengan etil asetat. Masing-masing ekstrak difraksinasi dan dimurnikan dengan berbagai teknik kromatografi yang meliputi kromatografi cair vakum, kolom gravitasi dan radial sehingga diperoleh senyawa murni. Senyawa murni ini selanjutnya ditetapkan strukturnya berdasarkan analisa data spektroskopi yang terdiri dari NMR 1D (<sup>1</sup>H dan <sup>13</sup>C), 2D (HSQC, COSY,

HMBC dan NOESY) dan spektroskopi massa (MS). Senyawa hasil isolasi diuji bioaktivitasnya yang meliputi uji sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388 mengikuti metode MTT yang nilainya dinyatakan dengan IC<sub>50</sub>. Senyawa murni hasil isolasi juga diuji aktivitas anti mikrobanya terhadap lima bakteri (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus luteus* dan *Saccharomyces cerevisiae*) dan satu jamur (*Sporobolomyces salminicolor*) menggunakan *agar dilution method* yang nilainya dinyatakan dalam zona hambat.

Dua spesies jamur endofitik yaitu *Pestalotiopsis microspora* dan *Diaporthe lithocarpus* berhasil diisolasi dari tumbuhan *A. heterophyllus* dan jamur *Fusarium solani* diperoleh dari tumbuhan *A. champeden*. Ketiga jamur endofitik tersebut dilaporkan pertama kalinya dari tumbuhan inang *Artocarpus*. Pada penelitian ini telah berhasil diisolasi dua puluh dua senyawa murni dari ketiga jamur endofitik tersebut yang terdiri dari tiga senyawa baru dan sembilan belas senyawa yang telah dikenal. Selanjutnya dua dari sembilan belas senyawa yang telah dikenal tersebut diisolasi untuk pertama kalinya dari jamur endofitik. Dari dua puluh dua senyawa hasil isolasi, delapan senyawa diperoleh dari jamur *P. microspora*, lima senyawa dari *F. solani* dan sembilan senyawa lainnya dari *D. lithocarpus*. Delapan senyawa yang telah diisolasi dari *P. microspora* terdiri dari satu senyawa baru turunan lakton (+)-asetilpestalotin (**1**), tiga senyawa turunan lakton yang telah dikenal ((-)-pestalotin (**2**), (6*S*,7*S*,8*R*)-hidroksipestalotin (**3**) dan nekipiron D (**5**)), satu senyawa lignan (+)-pinoresinol (**4**) dan tiga senyawa seskuiterpen (+)-asam sidonoat (**6**), (+)-asam sidowoat (**7**) dan (+)-dendokarbin L (**8**). Lima senyawa yang berhasil diisolasi dari *F. solani* terdiri dari satu senyawa baru alkaloid fusarindopirolidin (**12**), satu senyawa turunan azaantrakuinon 7-desmetilskorpinon (**13**) dan tiga senyawa turunan skitalon dan isokleron yaitu 3,4,8-trihidroksi-1(2*H*)-naftalenon (**9**), 8-metoksinaftalen-1-ol (**10**) dan 1,8-dimetoksinaftalena (**11**). Selanjutnya sembilan senyawa berhasil diisolasi dari jamur *D. lithocarpus* yang terdiri dari satu senyawa baru asam diaportindoat (**14**), satu senyawa turunan trikotesen makrolida mirotessin C (**15**), dua senyawa antrakuinon (1,2,8-trihidroksiantrakuinon (**16**) dan emodin (**17**)), dua turunan kumarin (skopoletin (**18**) dan kumarin (**19**)), dua turunan fenil etanol (2-feniletanol (**20**) dan tirosol (**21**)) dan arbutin (**22**). Penemuan tiga senyawa baru (**1**, **12** dan **14**) dari ketiga jamur endofitik mengindikasikan bahwa jamur endofitik merupakan sumber yang potensial dalam pencarian metabolit sekunder baru.

Pengujian aktivitas sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388 menunjukkan bahwa dua dari delapan senyawa (**5** dan **7**) yang diisolasi dari *P. microspora* menunjukkan sitotoksitas dengan kategori aktif (IC<sub>50</sub> 6,37 dan 7,30 µM), sedangkan senyawa **1-4** dan **6** memiliki sitotoksitas dengan kategori sedang. Selanjutnya aktivitas sitotoksik lima senyawa dari *F. solani* cukup beragam dengan rentang nilai IC<sub>50</sub> 6,03-223,48 µM. Senyawa yang diperoleh dari ekstrak EtOAc jamur *F. solani* (senyawa **9**, **10** dan **11**) memperlihatkan sitotoksitas dengan kategori tidak aktif (IC<sub>50</sub> > 113,30 µM). Hasil ini berbanding terbalik dengan dua senyawa (**12** dan **13**) dari ekstrak MeOH-nya yang mempunyai sifat sitotoksik dengan kategori aktif (IC<sub>50</sub> 6,03 dan 7,65 µM). Dua senyawa (**15** dan **17**) dari jamur *D. lithocarpus* menunjukkan kemampuan sitotoksik dengan kategori aktif

(IC<sub>50</sub> 0,63 dan 1,52 µM), sementara tujuh senyawa lainnya (**14**, **16**, **18-22**) tergolong tidak aktif. Analisis hubungan struktur dan aktivitas pada senyawa golongan lakton (**2**, **3** dan **5**) menunjukkan bahwa gugus hidroksi pada atom C-9 dan C-8 diprediksi berperan penting dalam meningkatkan nilai aktivitas sitotoksiknya. Selanjutnya kehadiran cincin siklik pada senyawa seskuiterpen golongan bisabolan (**6** dan **7**) diduga mampu menaikkan aktivitas sitotoksiknya dibandingkan rantai asiklik pada posisi yang sama. Sementara itu pada senyawa turunan antrakuinon (**16** dan **17**), kehadiran gugus -CH<sub>3</sub> (C-6) dan -OH (C-3) diduga berpengaruh signifikan dalam meningkatkan aktivitas sitotoksiknya.

Hasil uji anti mikroba terhadap senyawa isolasi menunjukkan bahwa senyawa trikosen makrolida, mirotessin C (**15**), yang diisolasi dari *D. lithocarpus* memperlihatkan aktivitas anti mikroba paling baik. Senyawa **15** dapat menghambat pertumbuhan keenam mikroba dengan nilai zona hambat berkisar antara 14,17-16,00 mm. Selanjutnya aktivitas anti mikroba senyawa seskuiterpen bisabolan (+)-asam sidowat (**7**) tergolong aktif terhadap lima mikroba, yaitu *B. subtilis* dan *M. luteus*, *E. coli*, *P. fluorescens* dan *S. salminicolor*. Dua senyawa turunan antrakuinon yaitu 1,2,8-trihidroksiantrakuinon (**16**) dan emodin (**17**) juga menunjukkan aktivitas penghambatan pertumbuhan beberapa mikroba. Senyawa **16** aktif terhadap *E. coli*, *B. subtilis* dan *S. cerevisiae*, sedangkan senyawa **17** menunjukkan aktivitas terhadap *E. coli*, *B. subtilis*, *P. fluorescens*, *M. luteus* dan *S. cerevisiae* dengan nilai zona hambat 11,67-14,67 mm. Satu senyawa baru (+)-asetilpestalotin (**1**) juga memperlihatkan aktivitas anti mikroba terhadap *B. subtilis* dengan nilai zona hambat 12,17 ± 0,29 mm. Merujuk pada kedua hasil uji bioaktivitas senyawa isolasi ini dapat disarankan bahwa senyawa (+)-asam sidowat (**7**), mirotessin C (**15**), dan emodin (**17**) mempunyai potensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai kandidat obat kanker dan anti mikroba. Ketiga senyawa ini ditemukan pada jamur endofitik tumbuhan *A. heterophyllus*.

Berdasarkan penelitian ini diketahui bahwa jamur endofitik dari tumbuhan *A. heterophyllus* dan *A. champeden* mampu memproduksi senyawa baru dan senyawa yang juga ditemukan pada tumbuhan inangnya. Selain itu, penemuan berbagai senyawa pada penelitian ini dapat menambah informasi terkait keanekaragaman struktur dan kerangka dari jamur endofitik tumbuhan *Artocarpus*.

Kata kunci: *Artocarpus*, bioaktivitas, *Diaporthe lithocarpus*, *Fusarium solani*, jamur endofitik, *Pestalotiopsis microspora*.



## **ABSTRACT**

### **SECONDARY METABOLITES OF PESTALOTIOPSIS MICROSPORA, FUSARIUM SOLANI AND DIAPORTHE LITHOCARPUS, ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM INDONESIAN ARTOCARPUS AND THEIR BIOACTIVITIES**

By

**Riga**

**NIM: 30517002**

**(Doctoral Program in Chemistry)**

*Artocarpus is one of the important plant genus in family Moraceae which has been widely used as the traditional medicine to treatment inflammation, malaria, fever and diarrhea. Phytochemical studies of Artocarpus reported that the main secondary metabolites are prenylated phenolic compounds including flavonoids, stilbenes and 2-arylbenzofuranes with important biological activities such as cytotoxic, antimicrobial, antimalarial and antioxidants, that make Artocarpus becomes one of the interesting natural sources in bioactive compound discovery. Further exploration of bioactive compounds from Artocarpus can also be conducted by advanced technologies such as developing culture of its endophytic fungi. Endophytic fungi are microorganisms living within tissues in plant organ, such as in roots, stems, leaves, tubers, fruits and flowers, without causing any visible manifestation of disease to the host plants. Endophytic fungi have been reported to synthesize secondary metabolites with various structures and bioactivities. However, there are no reports regarding the chemical investigation of endophytic fungi derived from Artocarpus. In this research, the chemical constituents of endophytic fungi isolated from Artocarpus were investigated.*

*The purpose of this research was isolation and identification of endophytic fungi from *A. heterophyllus* and *A. champeden* and then isolation, identification and bioactivity evaluation of secondary metabolites obtained from endophytic fungi. Endophytic fungi were characterized based on analysis of the ITS region on the rDNA. Endophytic fungi were cultivated on PDB media and incubated at 28 °C for their optimum cultivated time. Then, the mycelia and media were separated using Buchner funnel. The mycelia were extracted with MeOH (three times) and the media were extracted with EtOAc (three times) to obtain methanol and ethyl acetate extract. Fractionation and purification of secondary metabolites from the extracts of endophytic fungi were conducted using various chromatographic techniques including vacuum liquid, column and radial chromatography. The structures of the isolated compounds were determined by means of spectroscopic data, NMR 1D (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C), NMR 2D (HSQC, HMBC, NOESY and COSY) and MS. Secondary metabolites obtained from endophytic fungi were evaluated for their cytotoxicity against murine leukemia P-388 cells according to MTT assay method expressed in*

*IC*<sub>50</sub> value. The isolated compounds were also examined for their antimicrobial activities against five bacteria (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus luteus*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Sporobolomyces salminicolor*) and a fungus (*Sporobolomyces salminicolor*) following agar dilution method expressed in inhibition zone.

Two endophytic fungi identified as *Pestalotiopsis microspora* and *Diaporthe lithocarpus* have been isolated from the tissues of *A. heterophyllus* and *Fusarium solani* has been isolated from *A. champeden*. All endophytic fungi were reported for the first time from *Artocarpus*. In this research, twenty-two compounds have been isolated from the endophytic fungi where three of them are new compounds and two other compounds are firstly reported from endophytic fungi. Among twenty-two compounds, eight compounds have been obtained from *P. microspora*, five compounds from *F. solani* and nine compounds from *D. lithocarpus*. The eight compounds isolated from *P. microspora* were a new lactone, (+)-acetylpestalotine (**1**), three known lactones ((-)-pestalotine (**2**), (6*S*,7*S*,8*R*)-hydroxypestalotine (**3**) and necpiron D (**5**)), a lignan (+)-pinoresinol (**4**) and three sesquiterpene derivatives (+)-cydonicacid (**6**), (+)-cydowicacid (**7**) and (+)-dendocarbin L (**8**). Moreover, the five other compounds obtained from *F. solani* were a new alkaloid fusarindopyrrolidine (**12**), a known 2-azaanthraquinone alkaloid 7-desmethylskorpinone (**13**) and three skitalon and isokleron derivatives (3,4,8-trihydroxy-1(2*H*)-naphthalenone (**9**), 8-metoxynaphthalen-1-ol (**10**) and 1,8-dimethoxynaphthalena (**11**)). Additionally, the nine other compounds yielded from *D. lithocarpus* consisted of a new compound diaporthindoicacid (**14**), a known tricotesen macrolide derivative mirotessin C (**15**), two anthraquinone derivatives (1,2,8-trihydroxyanthraquinone (**16**) and emodin (**17**)), two coumarin derivatives (scopoletin (**18**) and coumarin (**19**)), two phenyl ethanol derivatives (2-phenylethanol (**20**) and tyrosol (**21**)) and arbutin (**22**). Discovery the new compounds (**1,12** and **14**) from each endophytic fungus in this research showed that endophytic fungus is a potential source in searching the new secondary metabolites.

The cytotoxic properties of isolated compounds against murine leukemia P-388 cells showed that the most compounds isolated from *P. microspora* were active and moderate (*IC*<sub>50</sub> 6.37-33.17  $\mu$ M). Among eight compounds from *P. microspora*, two compounds (**5** and **7**) were active against murine leukemia P-388 cells (*IC*<sub>50</sub> 6.37 and 7.30  $\mu$ M) and compounds **1-4** and **6** were moderate with *IC*<sub>50</sub> in the range of 10.10-33.17  $\mu$ M. All compounds (**9**, **10** and **11**) from EtOAc extract of *F. solani* tested against murine leukemia P-388 cells were not active, whereas compounds (**12** and **13**) from MeOH extract were active with *IC*<sub>50</sub> values of 6.03 and 7.65  $\mu$ M, respectively. Furthermore, two compounds (**15** and **17**) obtained from *D. lithocarpus* were active against murine leukemia P-388 cell (*IC*<sub>50</sub> values of 0.63 and 1.52  $\mu$ M), a compound (**22**) was moderate and six other compounds (**14**, **16**, **18-21**) were not active. The analysis of structure-activity relationship suggested that the existence of the hydroxyl group at C-9 and C-8 in lactone derivatives (**2**, **3** and **5**) can increase the activity. The presence of the cyclic ring in bisabolane-type sesquiterpenes (**6** and **7**) can enhance the cytotoxic activity. Meanwhile,

*the presence of a methyl group at C-6 and a hydroxyl group at C-3 in anthraquinone derivatives (16 and 17) is the significant factor to increase the cytotoxicity.*

*The antimicrobial activities of isolated compounds showed that tricotesen macrolide derivative, mirotesin C (15), was most active against six microbes with inhibition zone values of 14.17-16.00 mm. The bisabolane-type sesquiterpene cydowicacid (7) exhibited anti microbial activities against B. subtilis dan M. luteus, E. coli, P. fluorescens and S. salminocolor. Two anthraquinone derivatives, 1,2,8-trihydroxyanthraquinone (16) and emodin (17), were also active to inhibit the growth of microbes. Compound 16 was active against E. coli, B. subtilis and S. cerevisiae, while compound 17 was active against E. coli, B. subtilis, P. fluorescens, M. luteus and S. cerevisiae with the values of inhibition zone in the range of 11.67-14.67 mm. A new compound (+)-acethylpestalotine (1) also showed antimicrobial activity against B. subtilis with an inhibition zone value of  $12.17 \pm 0.29$  mm. Meanwhile, the other compounds were inactive as antimicrobial agent. Results of this research showed that compounds 7, 15 and 17 could be used as the candidate of lead compounds for cancer and anti microbes. Compounds 7, 15 and 17 were isolated from endophytic fungi derived from A. heterophyllus.*

*The results of this study indicated that endophytic fungi can produce the new compounds and can also synthesize the same secondary metabolites with the host plant Artocarpus. Furthermore, the invention of all compounds from endophytic fungi isolated from Artocarpus can enhance the phytochemical information including the diversity of structures and skeletons.*

*Keywords: Artocarpus, bioactivities, Diaporthe lithocarpus, endophytic fungi, Fusarium solani, Pestalotiopsis microspora.*