

PENINGKATAN PRODUKSI KATHARANTIN MELALUI TEKNIK ELISITASI PADA KULTUR AGREGAT SEL *Catharanthus roseus*

Dingse Pandiangan¹⁾

¹⁾ Program Studi Biologi FMIPA Universitas Sam Ratulangi Manado, 95115

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk optimasi dan peningkatan produksi antikanker katarantin khususnya elisitasi. Tujuan praktisnya adalah untuk mengetahui pertumbuhan kalus agregat sel *C. roseus* yang diberi elisitor, menemukan kurva tumbuh *S. cerevisiae* dan bahan elisitor, menemukan kandungan katarantin pada agregat sel dan medium perlakuan dan menemukan waktu panen perlakuan elisitasi yang menghasilkan kandungan katarantin yang paling tinggi. Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat dihasilkan suatu informasi mengenai peningkatan katarantin yang dihasilkan (diproduksi) secara kultur (*in vitro*) untuk dimanfaatkan pada penelitian selanjutnya. Tahapan penelitian dilakukan antara lain 1) tahap kultur *S. cerevisiae* dan persiapan elisitor, 2) tahap kultur agregat sel dengan perlakuan elisitasi, 3). tahap ekstraksi dan isolasinya menggunakan metanol dan diklorometan 4). tahap uji kuantitas dan kualitas katarantin dengan menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) yang dihubungkan dengan kromatopak CR-7A Plus. Kurva tumbuh ragi menunjukkan bahwa fase pertumbuhan maksimum terjadi setelah 16 jam inkubasi. Kandungan katarantin sudah terdeteksi pada hari ke-3 dan mengalami penurunan pada hari ke-6 dan ke-9. Pada hari ke-12, kandungan katarantin mencapai jumlah tertinggi di agregat sel dan mengalami penurunan sampai hari ke-24, Kandungan katarantin tertinggi pada medium terjadi pada hari ke- 18 dan selanjutnya mengalami penurunan sampai hari ke-24. Hasil elisitasi menunjukkan adanya peningkatan kandungan katarantin pada semua waktu panen yang dilakukan, baik dalam sel maupun dalam medium. Kandungan katarantin tertinggi setelah elisitasi pada agregat sel adalah sebesar 274,03 µg/g BK dengan persentase peningkatan sebesar 218,86 % pada jam ke-18. Namun dalam medium adalah pada jam ke-72 sebesar 856,75 µg/L dengan persentase peningkatan sebesar 266,13 %.

Kata kunci: katarantin, teknik elisitasi

THE ENHANCEMENT OF CATHARANTHINE PRODUCTION BY ELICITATION TECHNIC ON *Catharanthus roseus* CELL AGGREGATES

ABSTRACT

This research aims were to find out the growth respons and catharanhine content of *C. roseus* callus elisitor treatment. Catharanthine content can be produced on each callus after the elisitor treatment, cell aggregates growth pattern, medium that produces the higher catharanthine content. This research is expected to give some information about the increasing of catharanthine content produced through *in vitro* process which can be used in further research. The steps have been done in this research, They were 1) Callus culture with elisitor treatment step, 2) cell aggregates culture with elisitor treatment step, 3) extraction and isolation step, 4). The step of qualitative and quantitative assay of catharanthine by using HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) connected to cromathopac CR-7A Plus. The result of research showed that the growth curva of *S. cerevisiae* showed that the highest growth occurred after 16 hours incubation. The highest catharanthine content of the cell aggregate occurred at the 12th day and then decreased up to 24th day. The result of elisitation indicated, the increasing of catharanthine contents at the all collected days has been done, include in cell and medium. The highest catharanthine content after elicitation of cell aggregate was 274,03 µg/g DW with the presentation of increasing about 218,86 % at the 18th hour. On the other hand, medium was 856,75 µg/L with the presentation of increasing about 266,13 % at the 72th hour.

Keywords: catharanthine, elicitation technic

PENDAHULUAN

Kanker dijuluki pembunuh peringkat atas bagi manusia. Karena penyakit kanker ini tidak mudah diatasi atau diobati. Bahkan bisa muncul kembali walaupun telah dioperasi. Pengobatan kanker sangat sulit dan obat-obatannya yang sangat mahal. Kemoterapi kanker leukemia dengan menggunakan vinblastin diberikan dosis normal untuk dewasa 1-1,4 mg/m² permukaan tubuh setiap 1 kali seminggu (De Padua & Bunyapraphatsara, 1999). Menurut literatur, berbagai jenis alkaloid antikanker seperti katarantin, vinblastin, vindesin, vinorelbin dan vinkristin telah di produksi dari *C. roseus* secara *in vivo*. Produksi 50 mg vinkristin dan 2 g vinblastin membutuhkan 1 ton daun kering *C. roseus*, karena kandungan dalam daun hanya sekitar 0,70-0,82 % (Samiran, 2000). Namun Verpoorte *et al.* (1993) menyatakan bahwa katarantin dapat diproduksi 230 mg/l dalam kultur suspensi sel setelah 1 minggu pertumbuhan.

C. roseus (L) G. Don, sering disebut tapak dara, adalah semak tahunan yang banyak dibudidayakan sebagai tanaman hias dan obat. Alexandrova *et al.* (2000), menyatakan tanaman tapak dara ini berguna untuk mengobati hipertensi, diabetes, pendarahan akibat penurunan jumlah trombosit, *chorionic epithelioma*, leukemia limfositik akut, leukemia monositik akut, limfosarkoma dan sarcoma sel retikulum. Sekitar 100 macam alkaloid telah diidentifikasi pada tanaman ini (De Padua & Bunyapraphatsara, 1999). Diantaranya adalah alkaloid anti kanker seperti vinblastin (VLB), vinkristin (VCR), katarantin dan leurososin (Wijayakusuma *et al.*, 1992). Demikian juga Samiran (2001) mengemukakan bahwa penghasil vinkristin dan vinblastin yang dikomersialkan kebanyakan berasal dari tapak dara. Senyawa antikanker ini menekan atau menghambat pembelahan sel dengan membekukan protein mikrotubular, nampak jelas pada metafase (Alexandrova *et al.* 2000). Melalui kultur jaringan seperti kultur suspensi sel, kalus, tunas, akar dan agregat sel menyebabkan produksi alkaloid *Catharanthus roseus* mengalami peningkatan (Zhao *et al.* 2000, Zhao *et al.* 2001a).

Kultur jaringan (*in vitro*) tanaman dapat memproduksi senyawa kimia berupa alkaloid dan sejenisnya yang tergolong metabolit sekunder. Alkaloid tertentu dihasilkan dalam kadar yang lebih tinggi melalui kultur jaringan dari pada kandungan tanaman induknya (Zhao *et al.* 2001b, Vazquez-Fflota *et al.* 1994). Keuntungan lain dari penggunaan kultur jaringan ini untuk produksi alkaloid adalah produksinya dapat diatur, kualitas dan hasil produksinya lebih konsisten, biaya produksi lebih kecil dan mengurangi penggunaan lahan (Alexandrova *et al.* 2000). Dengan demikian sangat perlu untuk menggunakan kultur jaringan dalam memproduksi suatu senyawa alkaloid.

Menurut Mattel dan Smith (1993), agar produksi metabolit sekunder tinggi maka perlu optimasi faktor-faktor internal dan eksternal. Optimasi faktor tersebut dapat dilakukan dalam dua tahap yaitu tahap pertumbuhan dan tahap produksi. Pada tahap pertumbuhan, kondisi kultur diarahkan untuk memproduksi biomassa sel dalam waktu dekat, sedangkan tahap produksi dilakukan pemindahan biomassa sel ke dalam medium produksi dengan tujuan pengkondisian kultur untuk produksi metabolit sekunder. Selain optimasi pada kedua tahap di atas, pendekatan lain yang dapat dilakukan secara efektif untuk meningkatkan produksi biomassa sel dan metabolit sekunder adalah penambahan prekursor (prazat), elisitasi dan amobilisasi.

Elisitasi adalah suatu metode untuk meningkatkan fitoaleksin dan metabolit sekunder lainnya dengan menambahkan berbagai elisitor biotik maupun abiotik. Elisitor yang berasal dari miselium *Fusarium* meningkatkan kadar tiopen hingga 300 % pada kultur akar rambut *Tagetas putula*. Beberapa faktor yang mempengaruhi kandungan metabolit sekunder dalam kultur yang dielisitasi antara lain macam elisitor, konsentrasi elisitor, waktu kontak elisitor dengan sel tumbuhan, galur sel yang digunakan, waktu penambahan elisitor dan fase pertumbuhan sel dalam kultur, serta nutrien yang digunakan dalam medium

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respon pertumbuhan kalus *C. roseus* terhadap pemberian perlakuan variasi elisitor, mengetahui respon pertumbuhan agregat sel yang diberi perlakuan elisitasi,

menemukan kandungan katarantin pada setiap sel yang diberi perlakuan elisitasi, menemukan media yang diberi elisitor, yang menghasilkan kandungan katarantin yang paling tinggi dan pertumbuhan yang paling optimum.

Penelitian ini bermanfaat sebagai sumber informasi untuk penelitian produksi alkaloid anti kanker melalui kultur agregat sel, yang merupakan salah satu penanggulangan langka dan mahalnya obat yang sangat berbahaya (kanker). Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat dihasilkan suatu informasi mengenai peningkatan katarantin pada kultur agregat sel (*in vitro*) yang diberi elisitor (elisitasi) untuk dimanfaatkan pada penelitian selanjutnya seperti penelitian produksi katarantin dalam skala bioreaktor.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Pertanian Unsrat dan Laboratorium Fisiologi Tumbuhan SITH ITB Bandung. Penelitian dilaksanakan sekitar Februari 2006 sampai Nopember 2006.

Medium untuk induksi kalus yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium Murashige dan Skoog (MS). Medium perlakuan adalah medium dasar MS dengan 2 ppm NAA dan Kinetin 0,2 ppm. Medium dan alat-alat yang digunakan terlebih dahulu disterilkan di dalam otoklaf pada suhu 121⁰C, tekanan 15 psi selama 15 menit. Alat-alat selanjutnya disterilisasi dalam oven pada suhu 170⁰C selama 1 jam.

Sumber eksplan berupa daun yang akan ditanam pada medium terlebih dahulu dicuci di bawah air mengalir selama 15 menit, kemudian direndam dalam etanol 70% selama enam menit dan dibilas dengan akuades steril. Penanaman dan induksi kalus dilakukan di dalam kotak pemindah beraliran udara. Medium induksi kalus yang telah siap tanam, alat-alat seksi yang sudah steril dan eksplan yang sudah steril dimasukkan dalam kotak pemindah beraliran udara. Setelah penanaman semua botol kultur disimpan dalam ruang kultur pada suhu kamar. Subkultur kalus dilakukan untuk memperbanyak kalus untuk digunakan pada kultur agregat kalus. Subkultur kalus juga digunakan sebagai stok untuk ulangan penelitian.

Kalus kompak yang berumur tiga minggu setelah subkultur kemudian dipindahkan ke dalam medium cair untuk digunakan dalam optimasi medium cair MS. Kalus sekitar 1 gram dipotong-potong kemudian dimasukkan ke dalam media cair MS yang mempunyai komposisi sama dengan media kultur kalus. Kultur diagitasi dengan kecepatan 120 rpm pada suhu kamar. Kultur agregat disubkultur dengan mengganti media lama dengan media baru yang sama komposisi mediumnya pada volume 50 ml media cair MS dalam erlenmeyer 125 ml. Medium cair yang memberikan pertumbuhan sel terbaik digunakan untuk penelitian selanjutnya.

Medium yang digunakan untuk pemeliharaan ragi adalah “glucose yeast extract (GYE)” padat, sedangkan untuk produksi ragi adalah medium cair. Kultur murni *Saccharomyces cerevisiae* dioptimasi pada media agar miring GYE selama 48 jam kemudian ditambahkan larutan NaCl 0,85% secara aseptik. Sebanyak 1 ml suspensi diambil dan dioptimalkan dalam 100 ml medium cair GYE selama 2 X 24 jam. Kultur hasil optimasi kedua digunakan untuk menentukan kurva tumbuh ragi. Kurva tumbuh ragi diamati setiap 2 jam selama 24 jam, perhitungan jumlah sel dilakukan dengan “plate count”. Ragi yang berada pada fase pertumbuhan maksimum (dari kurva tumbuh) digunakan sebagai elisitor. Ragi dipanen kemudian di otoklaf pada suhu 121⁰C tekanan 15 lb/inc² selama 15 menit, dan disentrifugasi sebanyak 3 kali masing-masing dengan 1500 rpm selama 5 menit. Setiap kali sentrifuga supernatan dibuang dan diganti dengan akuades sejumlah supernatan yang dibuang. Setelah tiga kali sentrifuga endapan kemudian dikeringkan, dan digerus untuk memperoleh serbuk ekstrak ragi. Serbuk ekstrak ragi ditimbang dan dilarutkan dalam akuades steril sehingga diperoleh konsentrasi 0,5 % (b/v) kemudian disterilisasi dengan otoklaf selama 15 menit, dan selanjutnya digunakan sebagai elisitor (Esyanti, 1991).

Elisitasi digunakan secara aseptik dengan cara menambahkan 5 ml elisitor ragi dengan konsentrasi 0,5 % pada kultur agregat sel subkultur ke-3 dan untuk kontrol dilakukan penambahan akuades steril dengan volume yang sama. Pemanenan dilakukan

pada jam ke 0, 12, 18, 24, 36, 48 dan 72 setelah elisitasi (Esyanti, 1991).

Agregat sel yang telah kering ditimbang sekitar satu gram. Pengekstrak yang digunakan adalah menurut metode Pandiangan dan Siahaan (2002) dengan modifikasi. Bahan kering digerus dengan metanol, lalu disaring. Residu dibilas dengan metanol sebanyak dua kali. Ekstrak metanol digabungkan, kemudian diuapkan. Sari metanol kental diasamkan dengan 10 ml 0.5 M HCl, sehingga diperoleh sari asam. Sari asam ditambahkan dengan NaOH 4 N, sehingga pH sama dengan 10. Kemudian diekstraksi dengan diklorometana sehingga diperoleh dua fraksi yaitu fraksi air dan diklorometana. Fraksi diklorometana diambil dan fraksi air dibuang. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali. Fraksi diklorometana dikeringkan dengan serbuk Na₂SO₄ anhidrat. Filtrat diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga kering kemudian dilarutkan dengan 1 ml methanol.

Analisis kualitatif dan kuantitatif untuk katarantin dilakukan dengan HPLC atau alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yang dihubungkan dengan kromatopak Shimadzu CR-7A Plus. Fase gerak yang akan digunakan berupa larutan yang terdiri dari metanol : asetonitril : 5 mM diamonium hidrogen fosfat = 3 : 4 : 3 secara isokratik. Kecepatan aliran 1mL/menit. Jenis kolom yang digunakan adalah Shim-pack CLC-ODS C18 0,15 m dengan diameter 6,0 mm. Panjang gelombang UV yang digunakan untuk mendeteksi katarantin adalah 298 nm. Sebagai senyawa pembanding digunakan "catarantine" standard yang diperoleh dari Magdi El-Sayed dari Laboratorium Gorlaeus, Pusat Ilmu Pengetahuan Biofarma, Leiden – Nedherland. Analisis kualitatif dilakukan dengan membandingkan waktu retensi antara katarantin standar dengan waktu retensi sampel. Bila dalam sampel terdapat senyawa yang mempunyai waktu retensi sama dengan katarantin standar, maka senyawa tersebut adalah katarantin. Koinjeksi standar dan sampel dilakukan untuk memastikan keberadaan katarantin pada sampel.

Analisis kuantitatif untuk mendapatkan konsentrasi katarantin diperoleh dengan cara mengkonversikan luas area

sampel dengan luas area standar yang telah diketahui konsentrasinya pada kurva kalibrasi standar. Kurva kalibrasi standar diperoleh dari data luas area berbagai konsentrasi larutan katarantin standar kemudian dibuat hubungan antara luas area dengan kandungan katarantin.

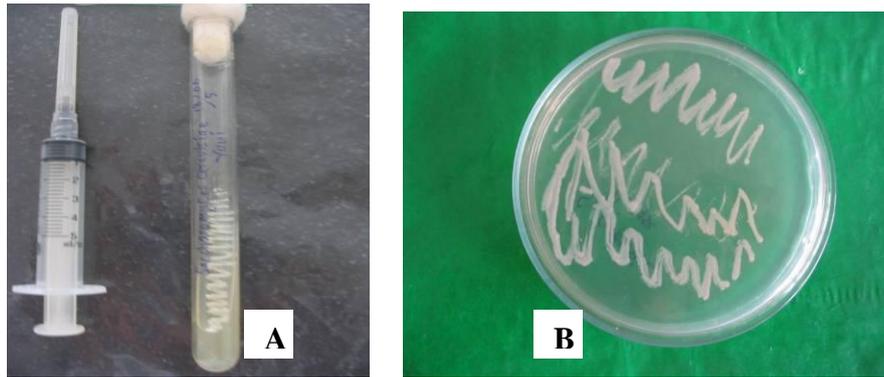
Data akan dikumpulkan, ditabulasi dan dianalisis secara statistik untuk penarikan kesimpulan. Data hasil penelitian akan disajikan dalam bentuk persentase, tabel, grafik atau kurva sesuai dengan jenis data yang diperoleh dalam percobaan. Hasil pemotretan dibuat sebagai sumber data untuk keperluan interpretasi data hasil penelitian. Data dari hasil pengukuran akibat perlakuan dilakukan uji t. Program yang dipakai untuk analisis statistik adalah program SAS162 atau *Excel soft ware*

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan dan kurva tumbuh ragi (*S. cerevisiae*)

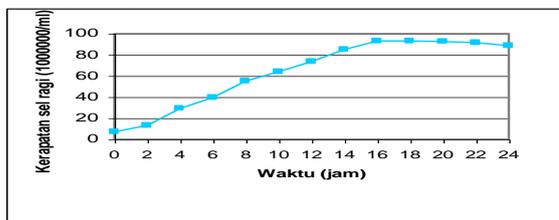
Kultur murni ragi dikultur pada media PDA. Kultur ragi yang sudah diaktivasi pada media GYE dapat dilihat pada Gambar 1A. Kultur tersebut berumur 16 jam. Hasil pengamatan aktivasi dalam media GYE pada cawan petri juga dapat dilihat pada Gambar 1B. Dari hasil aktivasi tersebut dilakukan penghitungan jumlah sel setiap 2 jam sehingga diperoleh suatu kurva tumbuh ragi pada Gambar 2.

Kurva tumbuh ragi menunjukkan bahwa fase pertumbuhan maksimum terjadi setelah 16 jam inkubasi. Pada fase tersebut, biomassa ragi diharapkan sudah mencapai tingkatan maksimum, mengingat komponen yang akan digunakan sebagai elisitor adalah derivat dari dinding sel ragi, yang diperkirakan berupa glukukan (Hahn, 1996). Sisi aktif dari elisitor glukukan ragi adalah 1,6 β-D glukopiranosil. Glukan dari ekstrak ragi secara alami diperkirakan mempunyai 'binding site' yang sesuai dengan reseptor yang ada pada agregat sel dan mampu berkompetisi dibandingkan dengan glukukan sintesis (Hahn, 1996).

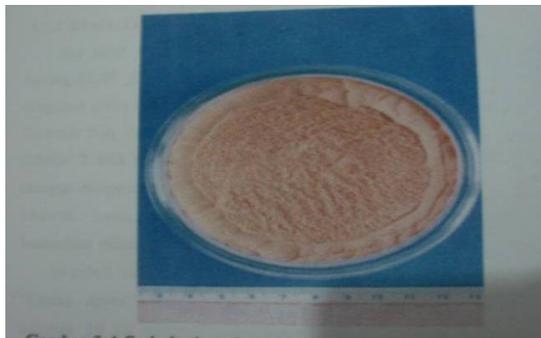


Gambar 1. Kultur *S. cerevisiae* pada umur 16 jam pada media GYE (A) dalam tabung reaksi (B) dalam cawan petri

Berdasarkan pada hasil pengamatan kurva pertumbuhan ragi pada Gambar 2, maka ditetapkan jam panen dari ragi yang diaktivasi pada media cair GYE adalah pada jam ke-16 setelah inkubasi. Ekstrak ragi pada Gambar 3 diperoleh setelah 16 hari inkubasi. Serbuk tersebut yang digunakan sebagai elisitor setelah dilarutkan dalam akuades hingga konsentrasi 0,5%. Konsentrasi ini merupakan hasil penelitian dari Silalahi (1999) yang menyatakan bahwa pada konsentrasi tersebut kandungan alkaloid indol paling tinggi.



Gambar 2. Kurva tumbuh ragi (*S. cerevisiae*) pada media GYE



Gambar 3. Serbuk ekstrak ragi (*S. cerevisiae*) yang diperoleh dan digunakan sebagai elisitor

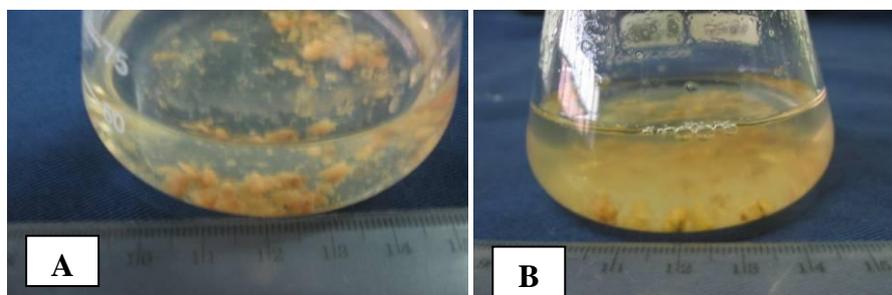
Pertumbuhan dan Kultur Agregat Sel Hasil Elisitasi

Setelah kalus yang disubkultur ke-2 di media induksi sudah 10 hari kemudian di subkultur ke media MS cair sekitar 1 g berat basah kalus untuk setiap media perlakuan. Kultur agregat pada hari ke-0 nampak seperti pada Gambar 4A, setelah berumur 3 hari pertumbuhan agregat sel nampak seperti pada Gambar 4B. Pada Gambar tersebut ditunjukkan juga bahwa agregat sel mulai membesar dan semakin banyak selnya. Setelah 3 kali disubkultur pada media cair nampak seperti pada Gambar 5. Dari gambar tersebut dapat dibandingkan bahwa jumlah sel yang terbentuk pada kontrol lebih banyak dan lebih besar daripada yang diberi elisitor (elisitasi).

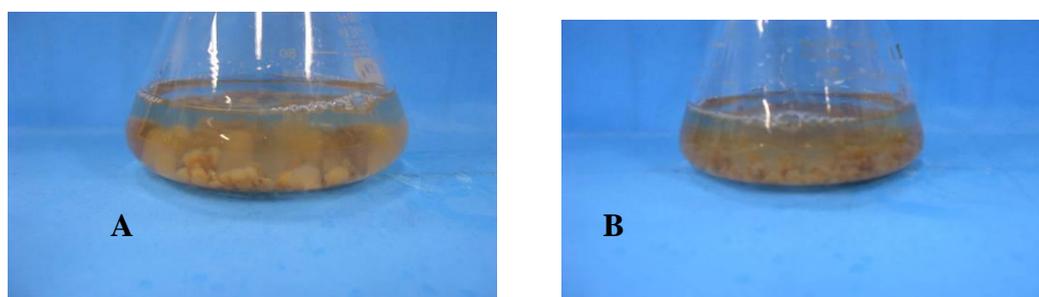
Kultur pada Gambar 4 dan 5 disebut sebagai kultur suspensi sel karena memanfaatkan medium cair sebagai sumber nutrisi, dan dari kultur suspensi ini dihasilkan suatu tipe sel yang disebut dengan agregat sel. Agregat sel tersusun oleh kumpulan sel yang homogen dan belum terdiferensiasi, dengan ukuran diameter 2 – 30 mm dan dapat mengandung lebih dari 200 sel (Ratnasari, 1999). Proses pembentukan kalus menjadi agregat sel disebabkan adanya sekresi dari lapisan sisa yang kaya akan karbohidrat, protein, dan pektin yang melekat pada permukaan sel dan menyebabkan sel-sel saling teragregasi (Fowler, 1983). Lindsey dan Yeoman (1983) menyatakan bahwa kultur agregat sel merupakan sel amobil alami, dengan pertumbuhan sel yang rendah dan produksi metabolit sekundernya tinggi.

Hal ini disebabkan posisi sel-sel yang rapat dalam agregat sel dapat membatasi pembelahan sel dan pengambilan nutrisi dari medium, namun dapat meningkatkan interaksi kimiawi dan fisika antar sel sehingga terbentuk kondisi yang menyerupai

kondisi normal pada tanaman utuh. Gambar 4 dan 5 memperlihatkan kultur agregat sel yang dikultur dalam medium cair MS dengan penambahan NAA 2 ppm dan Kinetin 0,2 ppm setelah 14 hari subkultur.



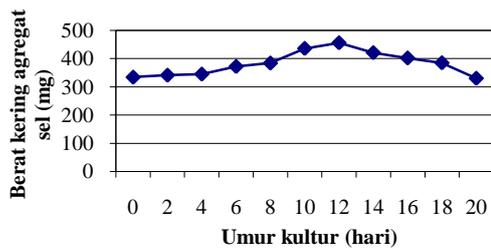
Gambar 4. Penampakan kultur agregat sel pada : A = hari ke-0 (saat kultur), B= hari ke-3 setelah kultur pada subkultur pertama



Gambar 5. Kultur agregat sel *C. roseus* dalam medium cair MS dengan penambahan NAA 2 ppm dan Kinetin 0,2 ppm setelah 14 hari kultur pada subkultur ke 3 (A) Kontrol, (B). Elisitasi

Kultur kalus dan agregat sel *C. roseus* yang dipelihara dalam medium MS dengan penambahan NAA dan Kinetin dapat memproduksi katarantin yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan penggunaan 2,4-D dan kinetin (Pandiangan dan Nainggolan, 2006). Hal ini disebabkan 2,4-D mampu menghambat transkripsi gen-gen pengkode enzim yang berhubungan dengan sintesis katarantin, seperti triptofan dekarboksilase (TDC) dan striktosidin sintase (SSS). Darsini (2001) juga menyatakan bahwa perkembangan latisifer pada kultur kalus *C. roseus* diamati paling baik pada kalus yang diinduksi dengan 2,5 μ M NAA dan 10 μ M BAP. Kinetin termasuk golongan zpt yang mempunyai sifat sama dengan BAP pada metabolisme tumbuhan. Pada konsentrasi tersebut, pembentukan latisifer terjadi lebih awal dan sempurna bila dibandingkan dengan kalus yang diinduksi oleh kombinasi lainnya.

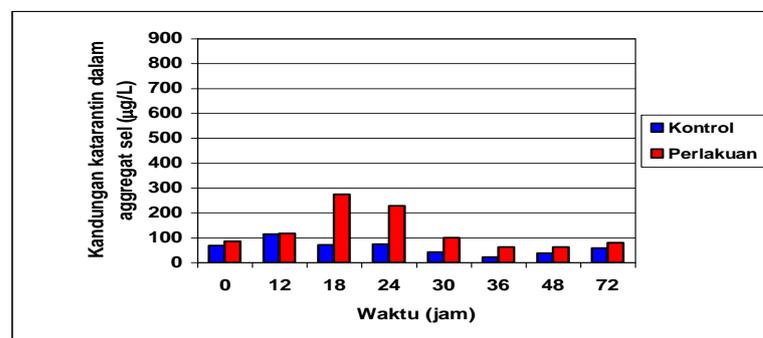
Pertumbuhan kultur agregat sel pada medium cairan MS dengan penambahan 2 ppm NAA dan 0,2 ppm Kinetin pada hari ke-5 setelah subkultur ketiga baik kontrol maupun hasil elisitasi dapat dilihat pada Gambar 5. Kurva tumbuh dibuat berdasarkan Gambar tersebut, sehingga didapatkan kurva tumbuh pada Gambar 6. Pola pertumbuhan kultur agregat sel pada Gambar tersebut dapat diuraikan bahwa kultur agregat sel mengalami fase lag atau fase adaptasi pada umur 0 sampai 4 hari. Kemudian pertumbuhan sel meningkat atau kultur dalam fase eksponensial pada umur 4 sampai 12 hari, dan mengalami fase penurunan pada hari 14 sampai ke 20 (Gambar 6). Dengan hasil ini maka waktu subkultur yang terbaik adalah pada hari ke-14 setelah kultur.



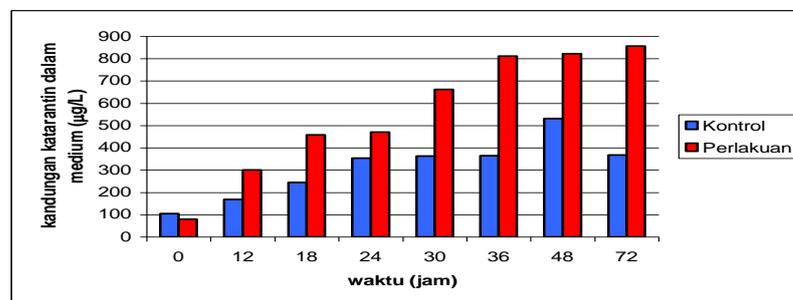
Gambar 6. Kurva tumbuh agregat sel *C. roseus* dengan NAA 2 ppm dan Kinetin 0,2 ppm

Pengaruh Pemberian Elisitor terhadap Kandungan Katarantin

Kultur agregat sel *C. roseus* yang dielisitasi dengan elisitor *S. cerevisiae* mengalami perubahan warna, baik pada sel maupun pada medium, yaitu menjadi lebih coklat bila dibandingkan dengan kontrol. Pencoklatan pada *C. roseus* dapat disebabkan oleh terjadinya sintesis senyawa fenolik DHBA (asam 2,3-dihidro benzoat) yang terakumulasi dengan cepat, yaitu sekitar 6 jam setelah elisitasi dilakukan (Moreno *et al.*, 1994).



Gambar 7. Kandungan katarantin dalam sel *C. roseus* sebelum (kontrol) dan sesudah elisitasi



Gambar 8. Kandungan katarantin dalam medium sebelum (kontrol) dan sesudah elisitasi.

Hasil elisitasi menunjukkan adanya peningkatan kandungan katarantin pada semua waktu panen yang dilakukan, baik dalam sel (Gambar 6) maupun dalam medium (Gambar 7). Akan tetapi peningkatan kandungan katarantin hasil elisitasi yang tertinggi dalam sel diperoleh pada waktu panen jam ke-18 (Gambar 7), yaitu sebesar 274,03 µg/g BK dengan persentase peningkatan sebesar 218,86 % sedangkan dalam medium adalah pada jam ke-72 (Gambar 8) sebesar 856,75 µg/L dengan persentase peningkatan sebesar 266,13 %. Kandungan katarantin di dalam medium hingga jam ke-72 belum mengalami penurunan. Faktor yang menyebabkan

katarantin ekstraseluler (dalam medium) lebih tinggi diduga adalah karena adanya perubahan pH pada medium setelah elisitasi. Hal ini didukung oleh Nef-Campa *et al.* (1993) yang menyatakan bahwa penambahan elisitor *Pythium vexans* pada kultur suspensi sel *C. roseus* pada medium Murashige dan Skoog (MS) dengan penambahan 2,4-D dan kinetin menyebabkan penurunan pH sekitar 0,7 unit setelah 5 hari perlakuan, sehingga metabolit sekunder banyak disekresikan ke medium.

Peningkatan kandungan katarantin setelah diberi elisitor ekstrak ragi *S. cerevisiae* diduga karena terinduksinya serangkaian proses yang mengarah pada

akumulasi katarantin. Moreno *et al.* (1994) menyatakan bahwa hasil interaksi antara elisitor dengan reseptor yang ada pada membran sel tanaman akan memicu jalur transduksi sinyal, antara lain mengaktifasi 'secondary messenger' (misalnya Ca^{2+} dan kalmodulin) yang akan menginduksi protein kinase untuk berperan dalam induksi transkripsi gen *tdc*, *as* dan *sss*. Proses transkripsi dilanjutkan dengan translasi enzim TDC (triptofan dekarboksilase), AS (antranilat sintase) dan SSS (striktosidin sintase) yang terlibat dalam pembentukan prekursor untuk sintesis katarantin. Enzim TDC dan SS berperan dalam sintesis dan akumulasi triptamin, sedangkan enzim SSS berperan dalam kondensasi triptamin dan sekologanin menjadi striktosidin. Striktosidin selanjutnya diubah menjadi geisoin, lalu katenamin, dan akhirnya menjadi katarantin (Moreno *et al.*, 1994)

Konsentrasi elisitor merupakan salah satu faktor pembatas yang menentukan kandungan metabolit sekunder pada kultur jaringan yang dielisitasi. Hal ini menunjukkan bahwa pada membran plasma terdapat reseptor untuk elisitor dengan jumlah tertentu, sehingga untuk meningkatkan kandungan katarantin diperlukan konsentrasi elisitor yang optimum (Buitelaar *et al.*, 1991). Pada penelitian ini hanya digunakan satu konsentrasi elisitor, yaitu 0,5 % (b/v) ekstrak ragi sehingga perlu dilakukan pengoptimasian kembali konsentrasi elisitor untuk memperoleh konsentrasi elisitor yang optimum.

Kontak antara elisitor dan reseptor memerlukan waktu yang optimum hingga dihasilkan metabolit sekunder yang optimum. Waktu elisitasi tersebut menggambarkan lamanya waktu yang diperlukan sel untuk melangsungkan jalur metabolit sekunder hingga terbentuknya suatu produk (Buitelaar *et al.*, 1991), dalam hal ini adalah katarantin

KESIMPULAN

1. Elisitasi kultur agregat sel *C. roseus* dengan ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dapat meningkatkan kandungan katarantin, baik pada agregat sel maupun pada medium, dibandingkan dengan kontrol.

2. Kandungan katarantin sesudah elisitasi lebih tinggi pada medium (857 $\mu\text{g/L}$) dibandingkan agregat sel (274 $\mu\text{g/g}$).

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kami sampaikan kepada Dr. Magdi El Sayed dari Division of Pharmacognosy, Centre for Biopharmaceutical Sciences, Leiden University, Netherland yang telah memberikan katarantin murni sebagai senyawa pembanding dalam penelitian ini. Demikian juga kepada Dirjen Dikti lebih khusus DP2M yang memberi bantuan dana dalam pelaksanaan penelitian ini demikian juga pimpinan dan laboran Laboratorium Fisiologi Tumbuhan SITH ITB Bandung.

DAFTAR PUSTAKA

- Asada M, and Shuler M.L. 1989. Stimulation of ajmalicine production and excretion from *Catharanthus roseus* : Effect of adsorption *in situ*, elicitor and alginate immobilization. *Applied of Microbiology Biotechnology*. 30: 475 – 481
- Alexandrova, R., I. Alexandrova, M.Velcheva, T. Varadinova. 2000. Phytoproduct and Cancer. *Experimental Pathology and Parasitology*. Bulgarian Academy of Sciences.
- Buitelaar R.M, Cesario MT and Tramper J. 1991. Strategies to improve the production of secondary metabolites with plant cell cultures: a literature review. *Journal of Biotechnology*. 23 : 111 – 141
- Burgess, J. 1985. *An introduction to plant cell development*. Cambridge University Press. Britain. p. 137 – 153
- Darsini, N.N. 2001. Perkembangan Latisifer pada Kultur Kalus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Tesis ITB Bandung.
- De Padua, L.S., Bunyapraphatsara, N. 1999. *Plant Resources of South East Asia no. 12(1): Medicinal and Poisonous plants 1*. Ed. R.H.M.J. Lemmens. PROSEA Bogor, Indonesia.
- Esyanti, R.R. 1991. Elicitor of phytoalexin synthesis from *Verticillium albo-*

- atrum*. Seminar Vascular Pathogen. University of Swansea. U.K.
- Fowler MW. 1983. Commercial application and economic aspect of mass plant cell culture. Dalam : *Plant biotechnology*. Mantell, S.H and Smith, H (Eds). Cambridge University. p. 3 –38.
- Hahn G.M. 1996. Microbial elicitor and their receptors in plant. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34 : 387 – 412
- Lindsey K., Yeoman MM. 1983. Novel experiment system for studying the production of secondary metabolites by plant tissue culture. Dalam : *Plant Biotechnology*. Mantell, S.H & Smith, H. (Eds). Cambridge University Press. p. 39-66.
- Mattel, SH.dan H. Smith. 1993. Cultural factor that influence secondary metabolites accumulation in plant cell and tissue cultures. Dalam : *Plant Biotechnology*. S.H. Mattel & H.Smith (Eds). CambridgeUniversity. London. P. 75-102.
- Moreno RHP, Van der Heijden R and Verpoorte R. 1994. Cell and tissue culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. a literature survey II. In : *Influence of stress factors on the secondary metabolites in suspension cultured Catharanthus roseus cells*. Moreno, R.P.H (Ed.). p. 9 – 52
- Pandiangan, D. P. Siahaan. 2002. Produksi Alkaloid dari kalus tapak dara. Prosiding Seminar Nasional MIPA I dalam Rangka Dies Natalis ke- 5 FMIPA UNSRAT Manado.
- Pandiangan, D. Nainggolan, N. 2006. Peningkatan produksi katarantin pada kultur kalus *C. roseus* yang diberi NAA. *Jurnal HAYATI* Vol 13 no.3 Edisi September 2006
- Pandiangan, D., Rompas, D., Aritonang, H., Esyanti, R., Marwani, E. 2006. Produksi katarantin pada kultur kalus *C. roseus* yang diberi triptofan. *Jurnal Matematika dan Sains* ITB Bandung (Inpress).
- Ratnasari J. 1999. Pengaruh pemberian ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae* Hansen) Terhadap kandungan ajmalisin dalam kultur agregat sel press. London. p. 1 – 39.
- Robinson, T. 1968. *The Biochemistry of Alkaloids*. Springer-Verlag New York Inc.
- Samiran. 2001. Tapak dara penumpas kanker payudara. Laboratorium Fitokimia, Balitbang Botani (Herbarium) LIPI Bogor. Dalam Majalah Intisari bulan Januari 2001.
- Silalahi, M. 1999. Pengaruh pemberian elisitor ekstrak ragi terhadap kandungan ajmalisin pada kultur kalus *C. roseus* (L). G. Don. Thesis Magister Sains, ITB Bandung.
- Sim JS, Chang NH, Liu RJ., Jung HK. 1994. Production and secretion of indol alkaloids in hairy root cultures of *Catharanthus roseus* : Effects of in-situ adsorption, fungal elicitation and permeabilization. *Jurnal of Fermentation and Bioengineering* 78,229-234.
- Sumarsi, Darjiyanto, S. dan Suprpto. 1990. Isolasi Komponen Aktif Daun Tapak Dara. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Industri Hasil Pertanian.
- Trapper, J. & Hulst, A. C. 1992. Immobilized plant cells: A literature survey Dalam: *Plant Cells: Immobilized and oxygen transfer*. Wageningen. Netherland. P.3-17.
- Vazquez-Flota, F., Moreno-Valenjuela, O., Miranda-Ham, M.L., Coello-Coello, J., & Loyola-Vargas, V.M. 1994. Catharanthine and ajmalisine synthesis in *Catharanthus roseus* hairy root cultures. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 38: 273-279. Kluwer Academic Publisher. Nederlands.
- Verpoorte, R. dan Van Der Heidjen . 1993. *Plant Biotechnology For The Production of Alkaloids: Present Status and Prospects*. Dalam: *The Alkaloids. Vol. 40*. Academic Press. Inc.
- Whitmer S, R van der Heijden, R Verpoorte. 2002. Effect of precursor feeding on alkaloid accumulation by a tryptophan decarboxylase over-expressing transgenic cell line T22 of *Catharanthus roseus*. *J Biotechnol.* 96 (2) : 193-203.
- Wijayakusuma, H.M.H., Dalihmarta, S., Winar, AS. 1992. Tanaman Berkasiat

- Obat di Indonesia, Jilid I. Pustaka Kartini, Ikapi Jaya
- Zenk MH, Ei-Shagi H, Arens H, Stockigt J, Weiler EW & Deus B (1977) Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In: Barz W, Reinhard E & Zenk MH (Ed) *Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application*, (pp 27-43). Springer-Verlag, Berlin
- Zhao J, W. Zhu, Q. Hu. 2001a. Enhanced catharanthine production in *catharanthus roseus* cell cultures by combined elicitor treatment in shake flasks and bioreactors. *Enzyme Microb Technol.* 28(7-8):673-681.
- Zhao J, Q Hu, YQ Guo, WH Zhu. 2001b. Effects of stress factors, bioregulators, and synthetic precursors on indole alkaloid production in compact callus clusters cultures of *Catharanthus roseus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 55(6):693-8.
- Zhao J, WH Zhu and Q Hu . 2000. Rare earths promote alkaloid production by *Catharanthus roseus* cells. *Biotechnology Letters* 22:825-828.