

# Eugenia

Volume 16 No.3

Desember 2010

## ISI/CONTENT

KELIMPAHAN POPULASI KUTU PUTIH <i>Dysmicoccus</i> sp. (HEMIPTERA: PSEUDOCOCCIDAE) PADA TANAMAN NENAS DI KABUPATEN BOLAANG MONGONDOW <b>Juliet M. E. Mamahit., G.S.J. Manengkey., dan H.V G. Makal</b>	161 - 167
PENGUJIAN EKSTRAK BUAH LANTA DAN BUAH SAGA SEBAGAI PESTISIDA BOTANIS TERHADAP KEONG EMAS <b>Joppy Rumbayan dan D. Tarore</b>	168 - 173
PENGGUNAAN JENIS PUPUK DAN MULSA JERAMI PADA TANAMAN KEDELAI TERHADAP SERANGAN PENGGEREK POLONG KEDELAI, <i>Etiella zinckenella</i> <b>Jimmy Rimbing., J. Pelealu., dan R.T.D. Maramis</b>	174 - 179
POTENSI PARASITOID <i>Leefmansia bicolor</i> UNTUK MENGENDALIKAN HAMA KELAPA <i>Sexava nubilla</i> DI KABUPATEN KEPULAUAN TALAUD <b>Moulwy F. Dien dan S. Dumalang</b>	180 - 188
PENGGUNAAN <i>Trichoderma koningii</i> , MULSA PLASTIK UNTUK PENGENDALIAN PENYAKIT LAYU <i>Fusarium</i> PADA TANAMAN TOMAT <b>Max M. Ratulangi., M.F. Dien., dan C.S. Rante</b>	189 - 196
EFEKTIVITAS JAMUR <i>Nomuraea</i> sp. DAN <i>Metarhizium</i> sp. TERHADAP LARVA <i>Crocidolomia binotalis</i> Zeller PADA TANAMAN KUBIS <b>Emmy Senewe dan H.V.G. Makal</b>	197 - 205
KORELASI BEBERAPA SIFAT VEGETATIF DAN GENERATIF TANAMAN TOMAT ( <i>Lycopersicum esculentum</i> MILL) <b>Jantje Pongoh., L. Parindo., V. Pangemanan., dan S. Demmassabu</b>	206 - 211
PEMBERIAN PUPUK KANDANG AYAM TERHADAP PERTUMBUHAN DAN PRODUKSI BAYAM ( <i>Amaranthus tricolor</i> L.) <b>Sofia Demmassabu., S. Tulung., M. Rantung., dan J. Raintung</b>	212 - 217
<u>POLA KANDUNGAN KATARANTIN AGREGAT SEL <i>Chatharanthus roseus</i> DALAM ERLNMEYER</u> <b>Dingse Pandiangan</b>	218 - 226
MODEL PERTUMBUHAN DAN PRODUKSI JAGUNG HIBRIDA PADA PERLAKUAN PEMBERIAN NITROGEN SERTA PEMANGKASAN TASSEL <b>Frangky J. Paat., J.E.X. Rogi., dan D. S. Runtuuwu</b>	227 - 235
CONCENTRATION OF ASCORBIC ACID AND CAROTENOIDS IN BROCCOLI HEAD WITH DIFFERENT IRRIGATION RATE <b>Daniel P. M. Ludong</b>	236 - 241
DINAMIKA TENAGA KERJA SEKTOR PERTANIAN DI PROVINSI SULAWESI UTARA <b>Olfie L. S. Benu., E.O. Laoh., S. L. Montong., Y.H. Supartoyo</b>	242 - 251

## POLA KANDUNGAN KATARANTIN AGREGAT SEL *Chatharanthus roseus* DALAM ERLLENMEYER

### THE CATHARANTHINE CONTENT PATTERN OF *Chatharanthus roseus* CELL AGGREGATES THAT TRYPTOPHAN FEEDING IN ERLLENMEYER

Dingse Pandiangan

Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Sam Ratulangi Manado \_ 95115

e-mail: dingsepan@yahoo.com

---

#### ABSTRACT

Bioactive compound content *in vitro* culture can be improved by feeding precursor. The effect of tryptophan on growth and catharanthine production in cell aggregates of *Catharanthus roseus* (L.) G Don as well as in medium has been studied. Agregate cells of *C. roseus* were cultured in Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 2 mg/L NAA and 0,2 mg/L kinetin. Agregate cells culture were divided into control and treated groups. The treated group was fed by 150 mg/L tryptophan while the control was added by distilled water. The growth of cells and catharanthine production in the cell aggregates as well as in medium were observed on day 0, 4, 7, 10, 14, and 21. Qualitative and quantitative analysis of catharanthine were carried out using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The result showed that the growth pattern in the control and treated cell aggregates were similar, except addition of tryptophan could increase the growth of the cell aggregates, producing longer growth phase. The addition of 150 mg/L tryptophan also increased catharanthine production. The highest concentration of catharanthine was produced in cell aggregates  $2261,68 \pm 17,05 \mu\text{g/g DW}$  on the 14<sup>th</sup> days

**Keywords:** *Catharanthine, Cell Aggregate, Catharanthus roseus, Tryptophan*

#### ABSTRAK

Kandungan senyawa bioaktif dalam kultur *in vitro* dapat ditingkatkan dengan cara penambahan prekursor. Senyawa bioaktif katarantin dari *Catharanthus roseus* L. (G.) Don sudah diteliti baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Pada penelitian telah dilakukan untuk mengetahui pengaruh penambahan prekursor triptofan terhadap pola kandungan katarantin kultur agregat sel *C. roseus* yang diproduksi kultur tersebut. Agregat sel *C. roseus* dikultur pada medium Murashige dan Skoog (MS) dengan penambahan 2 mg/L NAA dan 0,2 mg/L kinetin. Perlakuan diberi dengan penambahan 150 mg/L triptofan dan kontrol tanpa pemberian triptofan. Selanjutnya diamati pertumbuhan dan kandungan katarantin dalam agregat sel dan medium pada hari ke-0, 4, 7, 10, 14 dan hari ke-21. Analisis kandungan katarantin dilakukan dengan alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Hasil penelitian menunjukkan pola pertumbuhan pada agregat sel kontrol dan perlakuan penambahan 150 mg/l triptofan serupa, namun penambahan triptofan meningkatkan pertumbuhan dan menyebabkan fase tumbuh yang lebih lama dibandingkan dengan kontrol. Agregat sel dan medium dari kultur agregat sel *C. roseus* yang diberi penambahan 150 mg/l prekursor triptofan juga menghasilkan kandungan katarantin tertinggi pada agregat sel sebesar  $2261,68 \pm 17,05 \mu\text{g/g BK}$  pada hari ke-14.

**Kata kunci :** *Katarantin, Triptofan, Catharanthus roseus, agregat sel.*

## PENDAHULUAN

Indonesia mempunyai keanekaragaman hayati terbesar kedua di dunia setelah Brasil, dan disebut juga sebagai kawasan mega-biodiversitas. Keanekaragaman tumbuhan Indonesia juga menjadi suatu kekayaan yang tak ternilai harganya. Menurut perkiraan badan kesehatan dunia, 80% penduduk dunia masih menggantungkan dirinya pada pengobatan menggunakan obat yang berasal dari tumbuhan. Bahkan seperempat dari obat modern yang beredar di dunia berasal dari bahan aktif yang diisolasi dan dikembangkan berasal dari tumbuhan (Tripathi dan Tripathi, 2003).

Metabolit sekunder telah lama digunakan sebagai bahan baku senyawa-senyawa kimia berguna, antara lain sebagai penyedap rasa, kosmetik, dan bahan baku obat, bahkan lebih dari 60% obat-obatan penting yang digunakan di dunia berbahan baku ekstrak murni metabolit sekunder yang dihasilkan oleh berbagai jenis tumbuhan (Scragg, 1994). Salah satu tanaman yang dijadikan sebagai bahan baku untuk obat-obatan adalah *Catharanthus roseus*. Tanaman ini menghasilkan lebih dari 100 macam alkaloid. Salah satunya adalah vinblastin, hasil kondensasi vindolin dan katarantin, yang berkhasiat sebagai obat antikanker (van der Heidjen *et al.* 2004).

Kendala yang dihadapi oleh industri farmasi dalam memproduksi vinblastin adalah kandungannya yang rendah dalam tanaman (hanya sekitar 0,01%), dan hingga kini belum dapat dibuat senyawa sintetikanya (van der Heidjen *et al.* 2004). Namun, hasil penelitian menunjukkan bahwa vinblastin dapat dibuat secara semisintetik, yaitu dengan cara dimerisasi katarantin dan vindolin menggunakan peroksida (Van der Heidjen *et al.* 2004). Sintesis vinblastin memerlukan vindolin dan katarantin. Vindolin dapat diekstraksi langsung dari tanaman, dengan kandungan di tanaman sekitar 5% (Sutarno dan Rudjiman, 2003), sedangkan kandungan katarantin sangat rendah dalam tanaman (Vanisree *et al.* 2004). Karena itu, penelitian-penelitian lebih mengarah kepada peningkatan produksi katarantin.

Produksi metabolit sekunder dengan metode konvensional memiliki beberapa kelemahan, antara lain memerlukan bahan baku yang banyak, lahan yang luas, produksi yang sedikit, dan sangat

dipengaruhi faktor lingkungan seperti perubahan iklim dan patogen. Metode kultur jaringan dapat digunakan sebagai alternatif metode produksi metabolit sekunder (Vanisree *et al.* 2004). Namun banyak penelitian yang melaporkan bahwa metabolit sekunder yang diproduksi pada beberapa kultur tumbuhan masih rendah. Oleh karena itu, beberapa tahun terakhir bermacam strategi telah digunakan untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder menggunakan teknik kultur jaringan, salah satunya adalah dengan penambahan prekursor secara langsung ke dalam medium (Luckner dan Diettrich, 1990). Berdasarkan uraian di atas, maka dilakukan penelitian tentang pola kandungan katarantin pada kultur agregat sel *Catharanthus roseus* dengan perlakuan triptofan.

## METODE PENELITIAN

### Bahan Penelitian

Tanaman *Catharanthus roseus* (L.) G. Don berbunga putih berumur sekitar 3-4 bulan. Bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan dalam kultur kalus adalah daun kedua dan ketiga dari pucuk.

### Induksi dan Pertumbuhan Kultur

Eksplan daun disterilisasi dengan merendam eksplan di dalam alkohol 70% selama 1 menit, kemudian di dalam larutan natrium hipoklorit (NaClO) 0,525% selama 10 menit. Daun yang telah disterilisasi dipotong-potong dengan ukuran 0,5 x 0,5 cm<sup>2</sup> di dalam kotak pemindah, lalu ditanam ke medium MS padat yang ditambahkan zat pengatur tumbuh (ZPT) 2 mg/L 2,4-D dan 0,2 mg/L kinetin. Kultur kemudian disimpan dalam rak kultur pada suhu ruangan 25°C.

Ketika kalus berusia 8 minggu, kalus dipindahkan ke dalam medium MS padat yang ditambahkan ZPT 2 mg/L NAA dan 0,2 mg/L kinetin. Setelah kalus berusia 16 minggu, 1 g kalus dipindahkan ke medium dengan komposisi yang sama serta triptofan dengan konsentrasi 150 mg/L, sedangkan untuk kontrol tidak diberi penambahan triptofan (Pandiangan *et al.* 2006). Kultur kalus diinkubasi pada suhu kamar. Kalus dikeringkan dengan *Freeze dryer*, lalu ditimbang. Pengukuran berat dilakukan pada hari ke-0, 7, 14, 21 dan hari

ke-28 dengan 4 ulangan, sehingga diperoleh data pertumbuhan.

#### Ekstraksi Kalus *Catharanthus roseus*

Cara ekstraksi ini mengikuti cara kerja Pandiangan *et al.* (2008) dan Astuti *et al.* (2008) yang dimodifikasi. Sampel kalus dikeringkan dengan *freeze dryer* hingga mencapai berat konstan. Kalus kering sebanyak 0,1 gram digerus bersama 10 mL metanol analitis. Campuran ekstraksi diagitasi selama 4 jam pada kecepatan 120 rpm dalam vial. Campuran dipisahkan dengan menggunakan pipet Pasteur setelah didiamkan 1 jam, kemudian ekstrak metanol diuapkan hingga kering pada suhu kamar sampai kering. Residu hasil penguapan dilarutkan dalam 2 ml metanol KCKT dan siap untuk dianalisis.

#### Analisis Kandungan Katarantin Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Analisis kandungan katarantin secara kuantitatif dan kualitatif dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) mengikuti cara kerja Pandiangan *et al.* 2008 dan Astuti *et al.* 2008 yang dimodifikasi. Fasa gerak yang digunakan sebagai eluen adalah larutan yang terdiri dari metanol, asetonitril, dan 5mM diamonium hidrogen fosfat dengan perbandingan 3 : 4 : 3 secara isokratik. Kecepatan aliran sebesar 1 ml/menit. Jenis kolom yang digunakan adalah shimpak VP-ODS C18 0,15 x 0,6 mm. Panjang gelombang yang digunakan untuk mendeteksi katarantin adalah 254 nm.

#### Analisis Data

Katarantin pada kalus diuji statistik dengan analisis varian (ANOVA) dalam rancangan acak lengkap (RAL) pada tingkat kepercayaan 95%. Jika terlihat adanya perbedaan yang nyata, maka dilanjutkan dengan *post hoc test* DMRT (*Duncan's multiple range test*) pada tingkat kepercayaan 95%.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Kultur agregat sel didapatkan dari potongan-potongan kultur kalus yang dipindahkan ke medium MS cair dengan penambahan 2 mg/L NAA dan 0,2 mg/L kinetin (Gambar 1A). Agregat sel yang

didapatkan kemudian dikultur pada medium dengan pengocokan pada kecepatan 120 rpm (Gambar 1). Fungsi pengocokan adalah untuk mendistribusikan sel secara merata dalam medium (Bhojwani dan Razdan, 1983), sehingga kultur akan mendapatkan nutrisi yang sama. Kultur agregat sel yang didapatkan mempunyai ukuran sel yang bervariasi mulai dari sel tunggal sampai agregat sel berdiameter 2 mm (Mattel dan Smith, 1983). Kultur agregat sel menghasilkan metabolit lebih tinggi dibandingkan kultur yang tidak beragregat (Lindsey dan Yeoman, 1983). 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.

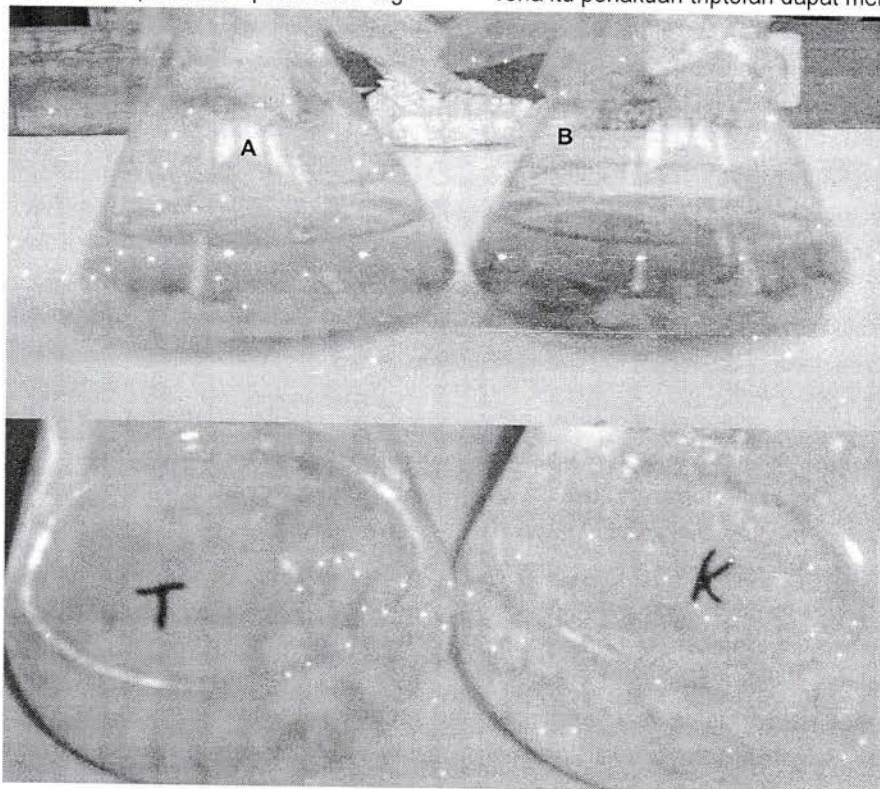
Verpoorte *et al.* (2000) melaporkan bahwa kultur agregat *C.roseus* mempunyai keunggulan dalam regulasi triptofan dekarboksilase yang menjadi faktor penting dalam biosintesis terpenoid indol alkaloid. Subkultur agregat sel dilakukan setelah 14 hari kultur. Subkultur dilakukan dengan pemindahan medium lama dengan medium baru yang komposisinya sama dengan medium sebelumnya. Perpindahan medium pada subkultur ini memberikan pertukaran gas antara kultur dan udara serta memberikan nutrisi kepada sel (Bhojwani and Razdan, 1983).

Perlakuan triptofan dapat mempengaruhi pertumbuhan agregat sel secara langsung maupun tidak langsung. Pengaruh langsung prekursor triptofan terhadap pertumbuhan sel adalah melalui sintesis protein dalam sel dengan menggunakan salah satu asam amino triptofan pada pembentukan polipeptida atau protein (Lehninger, 1990). Pengaruh secara tidak langsung melalui sintesis auksin (Dahab dan El-azis, 2006), karena triptofan berperan sebagai prekursor dalam biosintesis IAA pada jalur triptofan independen (Fosket, 1994). Moursy *et al.* (Dahab dan El-azis, 2006) telah meneliti pengaruh triptofan terhadap berat kering kalus *Datura stramonium*, diduga pemberian triptofan akan menyebabkan peningkatan jumlah IAA endogen. Selanjutnya IAA akan menginduksi pembelahan sel, sehingga pertumbuhan sel menjadi meningkat. Verpoorte *et al.* (2000) menyatakan bahwa penambahan triptofan dapat

menyebabkan over ekspresi aktivitas enzim TDC. Aktivitas TDC dalam agregat sel *C.roseus* pada fase linear tinggi, menyebabkan peningkatan akumulasi triptamin, yang dapat meningkatkan berat asah agregat sel (Facchini dan DiCosmo, 1991). Pengaruh berbagai konsentrasi triptofan tersebut terhadap pertumbuhan agregat sel dapat diperoleh jawabannya pada penelitian berikutnya.

Data pertumbuhan kultur agregat sel atau rata-rata berat kering agregat pada kontrol dan perlakuan 150 mg/L triptofan disajikan dalam Tabel 1. Hasil uji ANAVA satu arah dengan tingkat kepercayaan 95% menunjukkan berat kering kalus kontrol dan perlakuan berbeda nyata. Kurva tumbuh yang dihasilkan dari pengukuran berat kering agregat sel memperlihatkan pola seperti yang terdapat pada Gambar 2. Kurva pertumbuhan memperlihatkan bahwa pola pertumbuhan kultur agregat sel kontrol dan perlakuan pada fase lag

serupa dan sama-sama terjadi pada 4 hari pertama. Pada fase lag ini sel mengalami adaptasi fisiologis terhadap lingkungannya yang baru dan sel memulai kembali untuk meneruskan pembelahan sel pada fase log (Endress, 1994). Hasil uji analisis varians pada Tabel 1 dan Gambar 2 menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara pola pertumbuhan agregat sel tanpa perlakuan triptofan (kontrol) dengan perlakuan triptofan. Tabel 1 dan Gambar 2 menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara pola pertumbuhan agregat sel tanpa perlakuan triptofan (kontrol) dengan perlakuan triptofan. Perbedaan yang nyata adalah pada fase logaritmik atau linier agregat sel perlakuan triptofan nampak lebih panjang atau lebih lama. Fase stasioner pada agregat sel kontrol terjadi mulai pada hari 10 sedangkan pada perlakuan terjadi pada hari ke-14 (Gambar 2) karena itu perlakuan triptofan dapat memperpanjang



Gambar 1 Kultur agregat sel *C.roseus* pada medium MS cair. A= Kultur agregat sel hari ke-4 yang kontrol B= Kultur agregat sel hari ke-4

perlakuan triptofan. K= Kultur agregat sel 14 hari kultur yang kontrol. T= Kultur agregat sel 14 hari kultur perlakuan (Cell aggregate culture of *C.roseus* in liquid MS medium. A= The control cell aggregate culture at 4<sup>th</sup> day. B= The tryptophan treatment of cell aggregate culture at 4<sup>th</sup> day. K= Control cell aggregate culture at 14<sup>th</sup> day. T= The tryptophan treatment of cell aggregate culture at 14<sup>th</sup> day).

masa subkultur dan sangat bermanfaat pada penyimpanan atau stok sel selama produksi.

Pada Gambar 2 ditunjukkan bahwa agregat sel kontrol mempunyai fase lag hari ke-0 sampai ke-4, kemudian fase akselerasi pada hari ke-4 sampai ke-7, selanjutnya fase log atau eksponensial terjadi mulai hari ke-7 hingga hari ke-10, akhirnya fase stationer atau fase senesens setelah hari ke-10. Pada kultur agregat sel dengan penambahan 150 mg/L triptofan, fase lag hari ke-0 sampai ke-4, kemudian fase akselerasi di sekitar hari ke-4 dan fase ini lebih pendek dari kontrol, selanjutnya fase log atau eksponensial terjadi mulai hari ke-4 hingga hari ke-14, akhirnya fase stationer atau fase senesens setelah hari ke-14. Pada agregat sel kontrol, fase stationer terjadi lebih cepat empat hari dibandingkan pada perlakuan. Hal ini diduga, penambahan prekursor triptofan akan menyebabkan pertumbuhan sel pada fase linier cukup lama yaitu dari hari 4 sampai 14, karena triptofan yang tersedia untuk mensintesis protein yang cukup untuk pertumbuhan kalus dan juga untuk kepentingan lain dalam metabolisme agregat sel tapak dara. Kurva pertumbuhan agregat sel *C.roseus* kontrol dan perlakuan triptofan menunjukkan perbedaan. Perbedaan pola pertumbuhan

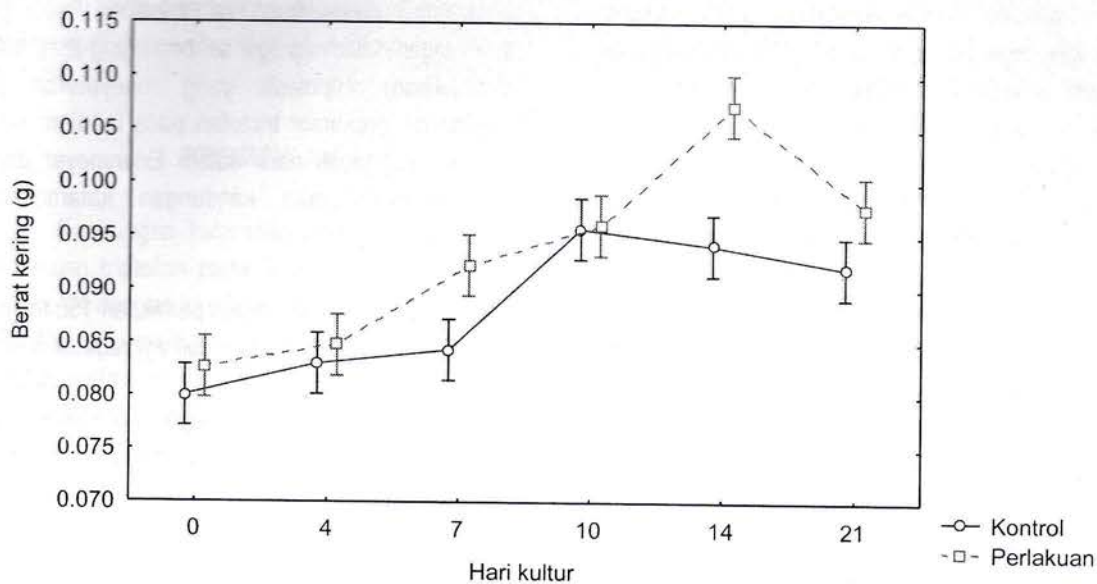
kultur agregat sel kontrol dan perlakuan terletak pada fase akselerasi, log dan stationer. Pada fase akselerasi atau percepatan, sel mengalami pertumbuhan dan peningkatan jumlah sel yang cukup tinggi, karena pada fase ini sel sudah beradaptasi dengan lingkungan serta mendapatkan nutrisi yang cukup dari medium. Fase akselerasi agregat sel perlakuan triptofan kemungkinan lebih pendek, tapi karena pengukuran berat kering tidak dilakukan setiap hari hal tersebut tidak nampak dalam data. Fase logaritmik atau eksponensial sel perlakuan triptofan kemungkinan lebih lama, diperkirakan sekitar hari ke-4 sampai 14. Selanjutnya fase stationer, sel akan mengalami penurunan jumlah karena nutrisi medium yang semakin berkurang dan kemungkinan adanya substansi buangan yang bersifat toksik terhadap sel (Moreno-Valenzuela, *et al.*, 1999). Walton *et al.* (1988) menyampaikan bahwa alkaloid kadaferin pada kultur akar *Nicotiana rustica* memiliki efek toksik terhadap sel. Karena itu, akumulasi alkaloid pada fase akhir stationer kultur agregat sel diduga menjadi penyebab turunnya jumlah sel. Fase stationer sel perlakuan triptofan lebih lama dicapai dari pada kontrol.

Tabel 1 Rata-rata berat kering agregat sel *C.roseus*  
(Table 1. The average dry weight of *C.roseus* cell aggregates)

Hari kultur	Berat kering (g)			
	Kontrol	± SD	Perlakuan	± SD
0	0,080	± 0,002	0,083	± 0,001
	a		ab	
4	0,083	± 0,001	0,085	± 0,001
	ab		b	
7	0,084	± 0,001	0,092	± 0,002
	ab		c	
10	0,096	± 0,003	0,096	± 0,006
	cd		cd	
14	0,094	± 0,001	0,107	± 0,003
	cd		e	
21	0,092	± 0,001	0,098	± 0,002
	c		d	

Keterangan : Nilai diatas adalah rata-rata berat kering agregat sel ± simpangan baku (SD).

Nilai yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan dengan taraf kepercayaan 95% (Notes: The above datas is an average cell aggregate dry weight ± standard deviation (SD). Datas followed by same letters below indicate the number was not significantly different based on Duncan multiple range test at 95% confidence level)



Gambar 2. Kurva pertumbuhan agregat sel *C.roseus* kontrol dan perlakuan triptofan (*The growth curve of control and tryptophan treatment *C.roseus* cell aggregate culture*)

#### Pola Kandungan Katarantin Agregat Sel Yang Diberi Perlakuan Triptofan

Kandungan katarantin di dalam agregat sel pada perlakuan sangat berbeda nyata. Kandungan katarantin sel perlakuan triptofan juga lebih tinggi dari kontrolnya pada setiap hari pengamatan (Tabel 2 dan Gambar 3). Secara umum, perbedaan kontrol dengan perlakuan adalah pada hari ke-4, kandungan katarantin kontrol mengalami penurunan, sedangkan pada perlakuan tidak berbeda dengan hari ke-0. Demikian juga kandungan katarantin paling tinggi pada kontrol dan perlakuan berbeda nyata yaitu kontrol terdapat pada hari kultur ke-10 ( $2026,86 \pm 12,05 \mu\text{g/gr bk}$ ) sedangkan pada perlakuan pada hari ke-14 ( $2261,68 \pm 17,05 \mu\text{g/g bk}$ ). Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Tabel 2.

Kandungan tertinggi katarantin pada kultur agregat sel perlakuan triptofan terjadi pada hari ke-14 setelah kultur, hal ini mendukung bahwa pada hari ke-14 tersebut merupakan tahap awal fase stasioner kurva pertumbuhan. Menurut Endress (1994), bahwa akumulasi metabolit sekunder serpentin pada *C. roseus* tertinggi terjadi pada kurva pertumbuhan fase awal stasioner. Kandungan katarantin yang tinggi pada fase tersebut berkaitan juga dengan aktivitas TDC (Facchini and DiCosmo, 1991). Hal ini akan dibuktikan pada penelitian tahap berikutnya. Islas et

al. (1994) menyatakan bahwa TDC merupakan enzim yang mengkatalis konversi triptofan menjadi triptamin. Triptamin berkondensasi dengan sekologanin untuk memproduksi striktosidin, yaitu prekursor umum untuk monoterpenoid indol alkaloid, salah satu di antaranya adalah katarantin (Gaines, 2004). Dengan demikian, terdapat kemungkinan bahwa akumulasi katarantin tertinggi pada agregat sel adalah setelah adanya peningkatan aktivitas TDC ini. Hal ini akan dibuktikan pada tahap penelitian tahap berikutnya. Kaitan antara pertumbuhan dan kandungan katarantin dalam agregat sel menjadi pertimbangan untuk memperoleh kultur yang optimum. Setelah dikaitkan antara kedua parameter tersebut (Tabel 1 dan 2) maka sebaiknya subkultur dilakukan pada hari ke-14, dan sebaiknya panen agregat sel perlakuan juga pada hari ke-14 setelah subkultur. Hal ini penting untuk mempertahankan agar sel tetap tumbuh dengan berkesinambungan tanpa harus beradaptasi lagi pada fase lag lebih lama. Demikian juga dengan panen untuk produksi katarantin sebaiknya digunakan setelah 14 hari pada perlakuan triptofan dan kontrol.

Penurunan kandungan katarantin setelah hari ke-14 pada perlakuan dan hari ke-10 kontrol dapat juga disebabkan oleh sekresi katarantin ke medium kultur. Nijkamp et al. (1990) menjelaskan bahwa sejumlah metabolit sekunder yang

dihasilkan oleh sel akan disekskresikan ke medium. Demikian juga Drapeau, *et al.* (1987) melaporkan penambahan asam suksinat juga meningkatkan alkaloid ajmalisin sampai lima kali lipat, dari peningkatan tersebut lebih dari 78% dari total ajmalisin dan 67% total serpentin dilepaskan ke medium. Ada kemungkinan setelah tahap stasioner

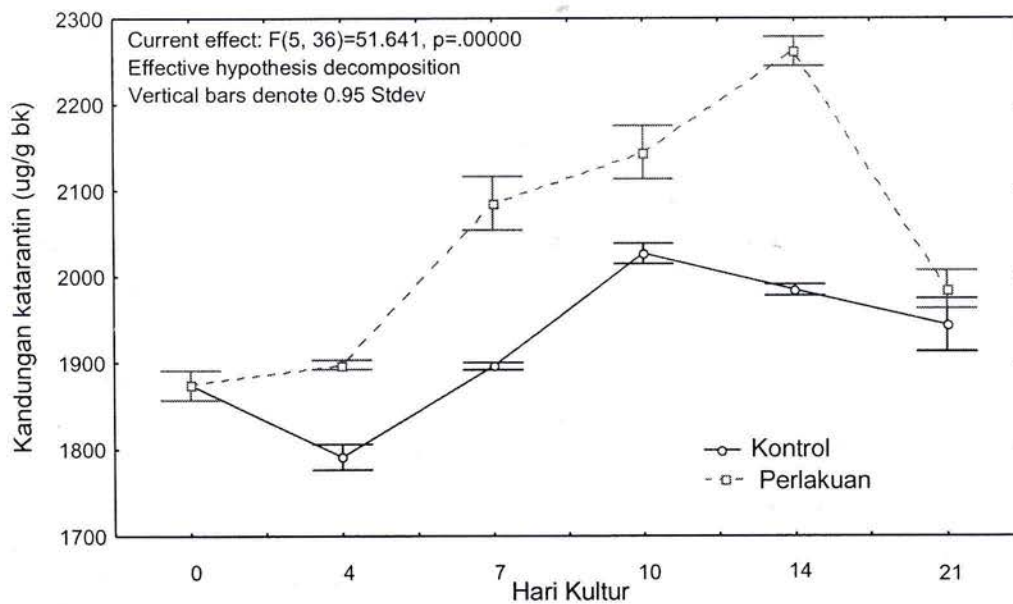
katarantin dikeluarkan ke medium, sehingga kandungan dalam agregat sel berkurang (data tidak ditunjukkan). Hipotesis yang menyatakan penambahan prekursor triptofan pada medium kultur agregat sel tapak dara dalam Erlenmeyer dapat mempengaruhi pola kandungan katarantinnya dapat diterima.

Tabel 2. Rata-rata kandungan katarantin ( $\mu\text{g/g}$  bk) pada agregat sel *C.roseus* yang diberi perlakuan 150 mg/L triptofan. (Table 2. The average catharanthine content ( $\mu\text{g/g}$  dw) of *C.roseus* cell aggregates treated 150 mg/L tryptophan)

Hari kultur	Kontrol $\pm$ SD	Perlakuan $\pm$ SD
0	1874,19 $\pm$ 17,07 b	1874,19 $\pm$ 17,07 b
4	1791,29 $\pm$ 14,91 a	1898,09 $\pm$ 5,48 b
7	1896,25 $\pm$ 4,44 b	2085,32 $\pm$ 31,07 f
10	2026,86 $\pm$ 12,05 e	2144,48 $\pm$ 30,92 g
14	1984,40 $\pm$ 6,55 d	2261,68 $\pm$ 17,05 h
21	1944,08 $\pm$ 30,64 c	1985,13 $\pm$ 21,93 d

Keterangan : Nilai diatas adalah rata-rata kandungan katarantin  $\pm$  simpangan baku (SD)

Nilai yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan dengan taraf kepercayaan 95% (Notes: The above datas is an average of catharanthine content  $\pm$  standard deviation (SD) Datas followed by same letters below indicate the number was not significantly different based on Duncan multiple range test at 95% confidence level).



Gambar 3. Kurva kandungan katarantin ( $\mu\text{g/g}$  BK) control dan perlakuan triptofan dalam agregat sel *C.roseus* (The catharanthine content ( $\mu\text{g/g}$  dw) curve of control and tryptophan treatment *C.roseus* cell aggregate culture)



Pengaruh yang ditimbulkan juga sangat nyata dan mempunyai pengaruh positif atau ada peningkatan-an.

## KESIMPULAN

Kandungan katarantin paling tinggi setelah perlakuan triptofan pada agregat sel terjadi pada hari ke-14 dengan kandungan  $2261,68 \pm 17,05$   $\mu\text{g/g}$  bk. Waktu subkultur dan panen sel yang terbaik adalah pada hari ke-14 setelah kultur, dan pada hari kultur tersebut kandungan katarantin dan biomassa paling tinggi terjadi.

Rekomendasi untuk penelitian tahap berikutnya adalah mengamati pertumbuhan dan kandungan katarantin pada hari kultur ke-14 pada setiap konsentrasi perlakuan triptofan yang paling diprioritaskan.

### Ucapan terimakasih:

Ucapan trimakasih disampaikan kepada DP2M-Dikti Departemen Pendidikan Nasional atas bantuan dana penelitian Hibah Doktor melalui DIPA UNPAD Bandung. Demikian juga dengan Pimpinan Laboratorium Fisiologi Tumbuhan SITH ITB atas fasilitas yang diberikan dalam penyelesaian penelitian ini diucapkan trimakasih.

## DAFTAR PUSTAKA

- Astuti, D.P, I. Mardiah, R. R. Esyanti. 2008. *The Effect of Tryptophane Feeding on Growth Rate and Catharanthine Production of Catharanthus roseus (L.) G. Don Cell Aggregate Culture. Proceedings International Conference on Mathematics and Natural Sciences (ICMNS) October 28-30, 2008., Bandung-Indonesia.p.373-378.*
- Dahab, T.A.M. A. and N.G. A. El-Azis, 2006. Physiological effect of diphenylamin and tryptophan on the growth and chemical constituents of *Philodendron erubescens* plants. *World Journal of Agricultural Sciences* (2) 1: 75-81
- Drapeau D, H.W..Blanch and C.R.Wilke. 1987. Ajmalicine, serpentine, and catharanthine accumulation in *Catharanthus roseus* bioreactor cultures. *Planta Med.* (53): 373-376
- Endress, R. 1994. *Plant Cell Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York. P.67
- Facchini P.J. and F. DiCosmo. 1991. Secondary metabolite biosynthesis in cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don immobilized by adhesion to glass fibres. *Appl Microbiogil Biotechnol.* (35):382-392.
- Fosket, D. E. 1994. *Plant Growth and Development. A Molecular Approach*. Academic Press. New York
- Gaines, J. 2004. Increasing alkaloid production from *Catharanthus roseus* suspension through methyl jasmonate elisitation. *Parmaceutical Engineering* 24 (4).
- Islas I, V.M. Loyola-Vargas, M.L. Miranda-Ham. 1994. Tryptophan decarboxylase activity in transformed roots from *Catharanthus roseus* and its relationship to tryptamine, ajmalicine, and catharanthine accumulation during the culture cycle. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* (30)1: 81-83.
- Lehninger, A.L. 1990. *Principles of Biochemistry 4<sup>th</sup> Edition*. D.L. Nelson and M.M.. Cox (Eds). pp.78-80, 147-, 671-680, Worth Publisher, Inc.
- Lindsey, K. and M. M. Yeoman. 1983. *Novel Experiment System for Studying The Production of Secondary Metabolites by Plant Tissue Culture*. In S. H. Mantell and H. Smith. *Plant Biotechnology*. Cambridge University Press. London
- Mattel, S.H. and H. Smith. 1993. *Cultural factor that influence secondary metabolites accumulation in plant cell and tissue cultures*. In: *Plant Biotechnology*. S.H. Mattel and H.Smith (Eds). Cambridge University. London. P. 75-102.
- Moreno-Valenzuela, O.A., R.M. Galaz-Avalos, Y. Minero-Garcia, V. M. Loyola-Vargas. 1998. Effect of differentiation on the regulation of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Plant Cell Reports.* (18): 99-104.
- Nijkamp, H. J. J. , L. H. W. Van der Plas, J. Van Aartrijk. 1990. *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Current Plant Csience and Bio-technology in Agriculture*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

- Pandiangan, D., D. Rompas, H. Aritonang, R. Esyanti, E. Marwani. 2006. Pengaruh triptofan terhadap pertumbuhan dan kandungan katarantin pada kultur kalus *C. roseus*. *Jurnal Matematika dan Sains* (11) : 4,111-118.
- Scragg, A. H. 1994. *Bioreactors for The Mass cultivation of Plant Cell*. In: Fowler, M. W., Warren, G. S., and Moo-Young (Ed). *M. Plant Biotechnology*. Pergamon Press. Inc. New York. Hal: 49-62.
- Sutarno H., and Rudjiman. 2003. *Plant Resources of South East Asia No 1. Medicinal and Poisonous Plants*, Baclihuys Publisherds, Leiden.
- Tripathi, L. and J.N.Tripathi. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*(2) 2: 243-253.
- Van der Heidjen, R., D. I. Jacobs, W. Snoeijs, D. Hallard and R. Verpoorte. 2004. The Catharanthus Alkaloid: Pharmacognosy and Biotechnology. *Current Medicinal Chemistry*. (11): 607-628
- Van der Heidjen, R., D. I. Jacobs, W. Snoeijs, D. Hallard and R. Verpoorte. 2004. The Catharanthus Alkaloid: Pharmacognosy and Biotechnology. *Current Medicinal Chemistry*.( 11): 607-628
- Verpoorte, R., R. van der Heijden and J. Memelink. 2000. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Research* ( 9): 323-343.
- Walton, N.J., R.J. Robins, M.J.C. Rhodes. 1988. Perturbation of alkaloid production by cadaverine in hairy root cultures of *Nicotiana rustica*. *Plant Sci* (54): 125-131.