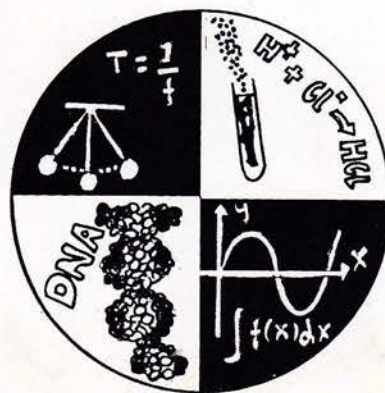


ISSN 1412-3770

JURNAL ILMIAH *SAINS*

Volume 6 Nomor 1, April 2006



FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS SAM RATULANGI
MANADO

**HUBUNGAN ANTARA KANDUNGAN IAA DENGAN PERTUMBUHAN
DAN KANDUNGAN KATARANTIN KULTUR AGREGAT SEL
Catharanthus roseus YANG DIBERI PERLAKUAN TRIPTOFAN
DALAM LABU ERLLENMEYER**

Dingse Pandiangan¹⁾

¹⁾Program Studi Biologi FMIPA Universitas Sam Ratulangi Manado, 95115
e-mail: dingsepan@yahoo.com

ABSTRAK

Salah satu cara untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder dalam kultur jaringan tumbuhan adalah dengan penambahan pre zat (prekursor). Oleh karena itu telah dilakukan penelitian hubungan antara kandungan IAA dengan pertumbuhan dan kandungan katarantin kultur agregat sel tapak dara yang diberi perlakuan triptofan dalam erlenmeyer. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan kandungan katarantin dalam kultur agregat sel *Catharanthus roseus* (L) J. Don yang didukung dengan pertumbuhan yang optimum. Penelitian dilakukan secara eksperimental di laboratorium. Konsentrasi prekursor triptofan yang digunakan ialah 0-250 mg/L. Pertumbuhan ditentukan dengan penimbangan berat basah dan berat kering serta pengamatan perubahan secara morfologis. Analisis kandungan katarantin dilakukan dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) menggunakan kolom VP-ODS C-18. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan IAA meningkat dengan bertambahnya konsentrasi triptofan sampai 150 mg/L. Kandungan IAA tertinggi sebesar (214,79±0,90 µg/g.bk) diamati pada perlakuan 150 mg/L triptofan dengan peningkatan 50,60%. Peningkatan IAA berhubungan erat dengan pertumbuhan agregat sel dengan $r = 0,931$. Hubungan IAA dan Katarantin yang diberi perlakuan triptofan juga positif dengan $r = 0,83$. Pertumbuhan yang optimum pada kandungan katarantin dan IAA yang lebih tinggi dari kontrol merupakan dasar untuk kultur dalam skala besar yang dapat berkelanjutan dalam bioreaktor.

Kata kunci: agregat sel, *Catharanthus roseus*, IAA, katarantin, triptofan.

**THE CORRELATION OF IAA CONCENTRATION WITH GROWTH AND
CATHARANTHINE CONCENTRATION OF *Catharanthus roseus* THAT WAYS
TREATED WITH TRYPTOPHAN IN ERLLENMEYER FLASKS**

ABSTRACT

Addition of the precursor is one ways to increase the concentration of secondary metabolites in plant tissue culture. Therefore, the correlation of IAA concentration with growth and catharanthine concentration *Catharanthus roseus* that treated with tryptophan precursor was examined in this research. This experimental research aimed to enhance the catharanthine concentration under optimum growth and was conducted in the laboratory. Tryptophan with concentration of 0-250 mg/L was used for the culture of cell aggregates. Growth was determined by measuring fresh weight as well as dry weight and observing morphological change. Catharanthine concentration was analyzed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in VP-ODS C-18 column. The result showed that IAA concentration increased with increment of tryptophan concentration as high as 150 mg/L. The highest concentration of IAA (214,79±0,90 µg/g.bk) was observed in the treatment of 150 mg/L tryptophan and the increase was 50,60%. The increase of IAA concentration positively correlated with the growth of cell aggregates ($r=0.931$). In the treatment of tryptophan, the correlation between concentration of IAA and catharanthine was positive ($r=0.83$). The optimum growth of cell aggregates at higher concentration of catharanthine and IAA than control would be applied in the larger scale culture of cell aggregates in a bioreactor.

Keywords: cell aggregate, *Catharanthus roseus*, IAA, catharanthine, tryptophan.

PENDAHULUAN

Berdasarkan *database NAPRALERT*, dari 250.000 spesies tumbuhan sebagai subjek studi fitokimia, diperkirakan 15% mengandung metabolit sekunder (Verpoorte *et al.* 2000). Metabolit sekunder merupakan produk yang dihasilkan dalam proses metabolisme sekunder tumbuhan. Menurut Fiehn (2002) bahwa tumbuhan menghasilkan 200.000 lebih metabolit. Sekitar 120.000 metabolit sekunder telah diidentifikasi, dan terdapat 16.000 tergolong alkaloid. Semua alkaloid tersebut mempunyai pengaruh aktif terhadap tubuh manusia (Verpoorte *et al.* 2000). Salah satu tumbuhan yang telah diidentifikasi adalah tapak dara.

Tapak dara (*Catharanthus roseus*) adalah semak tahunan yang banyak dibudidayakan sebagai tumbuhan hias dan obat. Alexandrova *et al.* (2000) menyatakan bahwa tumbuhan ini berguna untuk mengobati hipertensi, diabetes, pendarahan akibat penurunan jumlah trombosit, *chorionic epithelioma*, leukemia limfositik akut, leukemia monositik akut, limfosarkoma dan sarkoma sel retikulum. Tapak dara ini dapat mengobati berbagai penyakit menunjukkan tumbuhan tersebut mengandung beberapa senyawa aktif yang berperan sebagai obat. Sekitar 130 macam alkaloid telah diidentifikasi pada tumbuhan ini (Mccoy and Connor 2006; Dutta *et al.*, 2005), diantaranya adalah alkaloid anti kanker seperti vinblastin, vinkristin, katarantin, leurosidin dan leurosine. Senyawa antikanker yang dikomersialkan kebanyakan berasal dari tumbuhan ini, terutama yang berbunga putih (Sutarno and Rudjiman, 2003; Wijayakusuma *et al.*, 1992; Dalimartha, 2002).

Penelitian tentang prekursor sudah dilakukan semenjak tahun 1970an. Seperti penambahan prekursor asam amino pada *Salvia officinalis* dapat merangsang pembentukan 500 mM asam rosmarinat (Misawa, 1994). Demikian juga Tabata *et al.* (1971) melaporkan bahwa penambahan asam tropat ke dalam medium kultur *Scopolia japonica* dapat meningkatkan jumlah alkaloid hingga 14 kali lipat. Penambahan 100 µg/L prekursor farnesol pada kultur sel *T. wilfordii* dapat meningkatkan triptofan dan penambahan fenilalanin ke dalam kultur sel *Taxus cuspidata* dapat menstimulasi biosintesis taxol (Dicosmo, 1992 dalam

Misawa, 1994). Penambahan 50 mg/L triptofan pada kultur kalus *Rauvolfia tetraphylla* dapat memproduksi reserpin sebesar 2,1 mg/g bk (Anita and Kumari, 2006). L-triptofan merupakan prekursor yang paling tepat untuk meningkatkan produksi alkaloid pada kultur jaringan kina (Noli, 2004; Diana, 1995) dan tapak dara (Pandiangan dan Nainggolan, 2006a). Selain berpengaruh terhadap produksi alkaloid, L-triptofan juga mempengaruhi pertumbuhan kultur suspensi sel *Cinchona succirubra* (Schmauder *et al.*, 1985). Pertumbuhan sel terkait juga dengan hormon tumbuh seperti auksin. L-triptofan juga merupakan prekursor dalam sintesis IAA (Taiz and Zeiger, 2003).

Pemberian beberapa konsentrasi prekursor triptofan berpengaruh terhadap kandungan metabolit sekunder dari kultur agregat sel *C.roseus*. Pengaruh pemberian prekursor triptofan tersebut dalam Erlenmeyer dapat diketahui dengan melakukan pengamatan terhadap kandungan IAA. Pengamatan dan analisis lam penelitian ini masih dalam kultur di Erlenmeyer sebagai percobaan laboratorium. Keluarannya akan digunakan pada kultur dalam Bioreaktor pada skala besar.

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan dan Metoda

Tumbuhan yang digunakan sebagai sumber eksplan di dalam penelitian ini adalah *Catharanthus roseus* (L.) G. Don yang berbunga putih. Sebagai eksplan digunakan daun yang masih aktif mengadakan pertumbuhan yaitu daun ke-3 sampai 4 dari apeks pucuk. Penelitian ini dilaksanakan selama 17 bulan mulai Februari 2008 sampai Sempember 2009 bertempat di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan dan Analisis Bahan Alam SITH ITB Bandung, Laboratorium Kimia Analitik LIPI Bandung, Laboratorium fisik dan analitik Farmasi ITB Bandung.

Teknik induksi kalus mengikuti teknik aseptik atau *in vitro* (Pandiangan dan Nainggolan, 2006c; Pandiangan *et al.*, 2006). Kultur kalus dan subkulturnya dilakukan ke medium baru dengan komposisi yang sama dengan medium produksi kalus yaitu pada medium MS padat yang ditambahkan zpt 2 mg/L NAA dan 0,2 mg/L kinetin. Subkultur ini dilakukan secara terus-menerus untuk memperbanyak kalus sebagai sumber eksplan

wada kultur agregat sel dalam Erlenmeyer. Subkultur kalus dilakukan setiap 21 hari. Kalus yang digunakan sudah disubkultur selama 1 tahun 2 bulan.

Kultur agregat sel digunakan labu Erlenmeyer 250 mL. Setiap Erlenmeyer berisi 50 mL medium cair MS dengan kombinasi zpt yang sama dengan medium produksi kalus. Kalus yang digunakan sudah berusia sekitar 1 tahun lebih disubkultur. Kalus sebanyak 5 g dipindahkan ke medium MS cair 50 mL (Son *et al.*, 2000), yang ditambahkan 2 mg/L NAA dan 0,2 mg/L kinetin (medium NK atau T0) (Pandiangan dan Nainggolan, 2006c). Kultur agregat sel diinkubasi pada suhu kamar dan diagitasi pada kecepatan 120 rpm. Subkultur dilakukan setelah 14 hari dengan cara mengganti medium cair yang lama dengan medium cair yang baru dengan komposisi nutrisi yang sama dengan medium sebelumnya.

Agregat sel hasil kultur dipisahkan dari media, kemudian media sisa pada agregat sel dikeringkan menggunakan kertas hisap dalam pretridish steril, kemudian ditimbang kemudian disubkultur. Wadah kultur yang digunakan adalah labu Erlenmeyer 100 mL. Setiap Erlenmeyer berisi 25 mL medium cair MS dengan kombinasi zpt yang sama dengan medium produksi kalus tapi tanpa agar. Subkultur dalam Erlenmeyer dengan perlakuan triptofan 0, 50, 100, 150, 200, 250 mg/L dilakukan langsung pada saat subkultur kedua. Berat nokulum yang digunakan dalam kultur dalam Erlenmeyer adalah 2 g agregat sel. Agregat sel ditimbang secara aseptik dalam *laminar air flow* ketika sedang subkultur.

Kandungan metabolit sekunder dalam kultur agregat sel *C. roseus* diperoleh menggunakan HPLC dengan menggunakan kolom Shimpack VP-OS, 18, 150x4,6 mm. Kondisi running menggunakan eluen MeOH : ACTN : 5mM DHF (3:4:3) dengan kecepatan 1ml/min, atenuasi 6, speed 5 nm/min, isokratik pada UV Vis 254 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan IAA perlu dilakukan dalam penelitian ini. Prekursor triptofan berlaku juga terhadap IAA, selain sebagai prekursor alkaloid dan katarantin. Oleh karena itu sangat penting diamati sebagai

salah satu parameter dalam penelitian ini. Disamping itu supaya dapat dikaitkan antara peranan triptofan terhadap produksi metabolit dengan perannya terhadap pertumbuhannya akibat adanya IAA.

Rata-rata kandungan IAA dalam kultur agregat sel *C.roseus* yang diberi perlakuan triptofan dalam labu erlenmeyer dapat dilihat pada Tabel 1. Kandungan IAA mengalami peningkatan sampai pada T4 dari kontrolnya. Peningkatannya mencapai 50,60% terjadi pada T3. Tetapi berbeda dengan T5, justru mengalami penurunan kandungan IAA sebesar 25,77%. Penurunan ini mungkin disebabkan pH yang semakin tinggi pada perlakuan tersebut. Berdasarkan hasil uji korelasi antara perlakuan triptofan dan pH (Taiz and Zeiger, 2003). Perlakuan triptofan meningkatkan pH pada media setelah steril dan setelah kultur 14 hari. Agregat sel membutuhkan pH optimum (Lehniger, 1990) agar dapat menginduksi aktivitas Enzim sintesis IAA.

Berdasarkan pada hasil analisis ANAVA pada perlakuan triptofan dari 0, 50, 100, 150, 200 dan 250 mg/L berpengaruh sangat nyata terhadap kandungan IAA dalam agregat sel. Kandungan IAA maksimum terdapat pada perlakuan T3 yaitu sebesar 213,73 µg/g bk (Gambar 1 dan Tabel 1). Hasil analisis ANAVA kemudian selanjutnya diuji perlakuan yang paling berpengaruh melalui uji Duncan (DMRT). Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa umumnya perlakuan triptofan memimbulkan pengaruh yang berbeda terhadap kandungan IAA dalam agregat sel pada hari ke-14 (Tabel 1). Perlakuan yang paling berpengaruh adalah perlakuan T3 (150 mg/L triptofan). Berdasarkan analisis tersebut disimpulkan bahwa penambahan triptofan terhadap kultur agregat sel mulai dari 0-250 mg/L dapat meningkatkan kandungan IAA dalam agregat sel *C.roseus*.

Kandungan IAA dalam agregat sel yang diberi perlakuan triptofan mempunyai pola seperti kurva pertumbuhan agregat sel pada percobaan tahap 4 sebelumnya. Hasil analisis korelasi antara pertumbuhan atau berat basah dan kandungan IAA sangat berkorelasi positif. Besarnya korelasi tersebut 0,931 atau 93,1%. Hubungan ini juga dinyatakan dengan $r = 0,931$ dan persamaan sebagai berikut: Berat basah (g) = 0,59075 + 0,01455 IAA (µg/g bk) atau Gambar 2. Hal

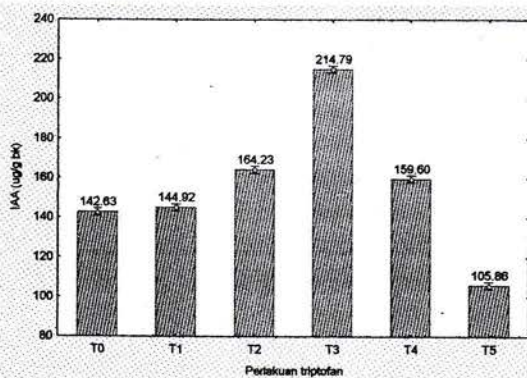
ini menunjukkan bahwa perlakuan prekursor triptofan dapat meningkatkan kandungan IAA dalam kultur agregat sel *C.roseus*

sebesar 50,60%. Peningkatan tertinggi ini terjadi pada T3 (150 mg/L triptofan).

Tabel 1. Rata-rata kandungan IAA ($\mu\text{g/g}$ bk) dan peningkatan dari kontrolnya pada agregat sel *C. roseus* yang diberi perlakuan triptofan (mg/L) 0 (T0), 50 (T1), 100 (T2), 150 (T3), 200 (T4), 250 (T5), pada hari ke-14 setelah kultur pada medium perlakuan.

Perlakuan Triptofan	Kandungan IAA ($\mu\text{g/g}$ bk)	Peningkatan IAA (%)	Notasi Duncan
	Rata-rata \pm SD		
T0	142,63 \pm 2,76	0,00	b
T1	144,92 \pm 1,05	1,61	b
T2	164,23 \pm 0,90	15,15	d
T3	214,79 \pm 0,90	50,60	e
T4	159,60 \pm 0,90	11,90	c
T5	105,86 \pm 1,10	-25,77	a

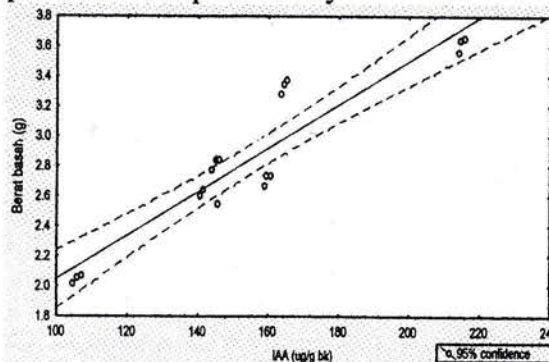
Ketetapan: Rata-rata dari 3 kali pengukuran. Huruf yang sama dalam notasi Duncan dalam tabel menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi $\alpha=0.05$.



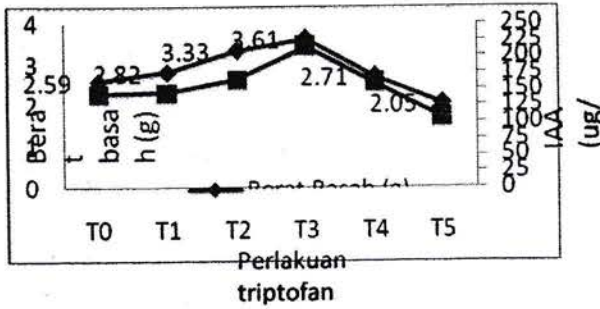
Gambar 1. Grafik kandungan IAA ($\mu\text{g/g}$ bk) dari agregat sel tapak dara (*C.roseus*) dalam erlenmeyer yang diberi perlakuan triptofan (mg/L) 0 (T0), 50 (T1), 100 (T2), 150 (T3), 200 (T4), 250 (T5), pada hari ke-14 setelah kultur pada medium perlakuan.

Pengaruh prekursor triptofan terhadap kandungan IAA merupakan faktor yang mendukung pertumbuhan agregat sel. Pertumbuhan sel dengan kandungan IAA menunjukkan pola yang sama (Gambar 3). Berdasarkan pada analisis kandungan IAA dapat terjawab bahwa pertumbuhan sel yang tidak selalu meningkat dengan meningkatnya konsentrasi triptofan disebabkan oleh adanya pengaruh prekursor triptofan terhadap kandungan IAA. IAA merupakan hormon tumbuh yang secara alami disintesis dalam

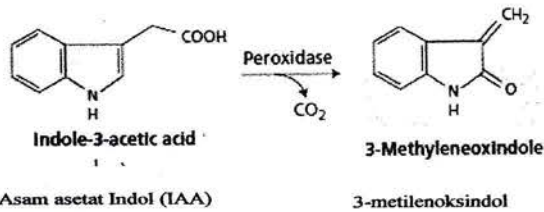
sel tumbuhan. IAA menurun pada perlakuan triptofan yang tinggi mungkin suatu mekanisme penghambatan *feedback*. Triptofan yang berlebihan akan menghambat kerja enzim antranilat sintase untuk mengkatalisis korimat menjadi antranilat pada jalur sintesis IAA (Taiz and Zeiger, 2002). Disamping itu dapat juga disebabkan biodegradasi IAA oleh peroksidase menjadi 3-metilenoksidol (Gambar 4). Aktivitas PO lebih tinggi pada agregat sel yang mempunyai pertumbuhan rendah juga pada percobaan tahap sebelumnya.



Gambar 2. Korelasi kandungan IAA ($\mu\text{g/L}$ medium) dan berat basah dari medium kultur agregat sel tapak dara (*C.roseus*) dalam erlenmeyer yang diberi perlakuan triptofan (mg/L) 0 (T0), 50 (T1), 100 (T2), 150 (T3), 200 (T4), 250 (T5), pada hari ke-14 setelah kultur pada medium perlakuan.



Gambar 3. Pengaruh triptofan terhadap pertumbuhan (pengamatan berat basah dan IAA) agregat sel tapak dara (*C.roseus*) dalam erlenmeyer yang diberi perlakuan triptofan (mg/L) 0 (T0), 50 (T1), 100 (T2), 150 (T3), 200 (T4), 250 (T5), pada hari ke- 14 setelah kultur pada medium perlakuan.



Gambar 4. Degradasi IAA oleh peroksidase (Dekarboksilasi IAA) menjadi 3-metilenoksindol (Taiz and Zeiger, 2002)

Hubungan antara variabel pengamatan dengan kandungan katarantin dapat diketahui melalui analisis korelasi melalui program Statistica. Besar koefisien korelasi dari setiap parameter yang diamati pada agregat sel *C.roseus* yang diberi perlakuan triptofan dalam Erlenmeyer setelah kultur 14 hari. Hal ini penting untuk menjelaskan keterkaitan antara setiap parameter dalam mendukung peningkatan kandungan katarantin pada kultur agregat sel tapak dara. Hubungan dengan IAA mempunyai korelasi positif dengan besar koefisien korelasi 0,83. Hasil analisis korelasi ini menunjukkan bahwa hubungan yang meningkatkan kandungan katarantin kultur Erlenmeyer adalah kandungan IAA. Tipe sel dan subkultur juga tidak kalah pentingnya mempengaruhi kandungan katarantin yang diberi perlakuan triptofan (Rijhwani and Shanks, 2008). Sel kalus dan suspensi telah diteliti dan dibandingkan oleh Wilkens *et al.*, (2005) dan menyatakan kedua tipe sel tersebut mengandung metabolit sekunder berbeda.

KESIMPULAN

1. Perlakuan triptofan dapat meningkatkan kandungan IAA dalam kultur Erlenmeyer.
2. Kandungan IAA meningkat sampai perlakuan triptofan 150 mg/L yaitu sebesar $214,79 \pm 0,90 \mu\text{g/g}$ bk dengan peningkatan 50,60%.
3. Peningkatan IAA berhubungan erat dengan pertumbuhan agregat sel yaitu dengan $r = 0,931$.
4. Hubungan IAA dan Katarantin yang diberi perlakuan triptofan juga positif dengan $r = 0,83$.
5. Kandungan IAA dan katarantin serta pertumbuhan mempunyai perlakuan triptofan optimum pada perlakuan triptofan 150 mg/L pada agregat sel *C.roseus* dalam Erlenmeyer.

Ucapan trimakasih:

Ucapan trimakasih disampaikan kepada Satuan Kerja Universitas Sam Ratulangi Kementerian Pendidikan Nasional melalui DP2M-Dikti atas bantuan penelitian Multi tahun melalui DIPA Unsrat dengan no 0147.0/023-04.0/XXVII/2010 Tanggal 31 Desember 2009 Tahun Anggaran 2010. Demikian juga dengan Laboratorium Fisiologi Tumbuhan SITH ITB atas fasilitas yang diberikan dalam penyelesaian penelitian ini diucapkan trimakasih.

DAFTAR PUSTAKA

Alexandrova, R., I. Alexandrova, M.Velcheva, T. Varadinova. 2000. *Phytoproduct and Cancer. Experimental Pathology and Parasitology*. Bulgarian Academy of Sciences.

Anita, S., and B.D.R. Kumari. 2006. Stimulation of reserpine biosynthesis in the callus of *Rauvolfia tetraphylla* L. by precursor feeding. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5(8): 659-661.

Diana, S. 1995. Pengaruh L-Triptofan Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Alkaloid Kultur Akar Kina *Cinchona ledgeriana* (Howard) Moens [Tesis] Jurusan Biologi ITB Bandung.

- Dutta A., J. Batra., S. Pandey-Rai., D. Singh., S. Kumar., J. Sen. 2005. *Expression of terpenoid indol alkaloid biosynthetic pathway genes corresponds to accumulation of related alkaloid in Catharanthus roseus (L.) G. Don. Planta*. Spinger-Verlag. New Delhi. 220:376-383.
- Fiehn, O. 2002. Metabolomics: the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 48: 155-171.
- Lehninger, A.L. 1990. *Principles of Biochemistry 4th Edition*. D.L. Nelson and M.M. Cox (Eds). pp.78-80, 147-, 671-680, Worth Publisher, Inc.
- Misawa, M. 1994. *Plan Tissue Culture: An Alternative for Production of Useful Metabolites of Useful Metabolites*. Bio International Inc. Canada.
- Pandiangan D, N. Nainggolan. 2006a. Produksi alkaloid dari kalus tapak dara. *Jurnal Ilmiah Sains* 6: 48-54.
- Pandiangan, D. dan N. Nainggolan. 2006b. Peningkatan produksi katarantin pada kultur kalus *C. roseus* yang diberi NAA. *Jurnal Hayati* 13:3 p.90-94
- 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.
- Rijhwani, S. K. and J. V. Shanks. 2008. Effect of subculture cycle on growth and indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 22: 606-611.
- Son, S.H., S.M.Choi, Y.H.Lee, K.B. Choi, S.R.Yun, J.K.Kim, H.J.Park, O.W.Noh, J.H.Seon, Y.G.Park. 2000. Large-scale growth and taxane production in cell cultures of *Taxus cuspidate* (Japanese yew) using a novel bioreactor. *Plant Cell Reports* 19: 628-633.
- Sutarno H., and Rudjiman. 2003. *Plant Resources of South East Asia No 1. Medicinal and Poisonous Plants*, Baclihuys Publisherds, Leiden.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 2003. *Plant Physiology*, 3rd ed. Publisher: Sinauer Associates. p 423-460
- Verpoorte, R., R. van der Heijden and J. Memelink. 2000. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Research* 9: 323-343.
- Wijayakusuma, H.M.H., S. Dalihmarta, A.S. Winar. 1992. *Tanaman Berkasiat Obat di Indonesia*. Jilid I. Pustaka Kartini, Ikapi Jaya
- Wilken, D, E.J.Gonzalez, A. Hohe, M. Jordan, R. G Kosky, G. S, Hirschmann and A. Gerth. 2005. Comparison of secondary plant metabolite production in cell suspension, callus culture and temporary immersion system. In: A. K. Hvoslef-Eide and W. Preil (Eds) *Liquid Culture Systems For In Vitro Plant Propagation*. pp.525-538. Springer Netherlands.