

RESPONS PERTUMBUHAN, KADAR PROTEIN DAN AKTIVITAS TRIPTOFAN DEKARBOKSILASE AGREGAT SEL *Catharanthus roseus* (L) G. DON YANG DIBERI PREKURSOR TRIPTOFAN

Pandiangan, D.,¹ Tilaar, W.,² Karyono³,
Esyanti, R.R.,⁴ dan Subarnas, A.⁵

¹Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sam Ratulangi, Manado,

²Jurusan Agronomi Pertanian, Universitas Sam Ratulangi, Manado,

³Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Padjadjaran

⁴Program Studi Bioteknologi, Sekolah Ilmu Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung

⁵Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran

E-mail: Dingsepan@yahoo.com

ABSTRAK

Salah satu cara untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder dalam kultur jaringan adalah dengan penambahan prazat (prekursor). Penelitian mengenai pengaruh penambahan triptofan sebagai prekursor terhadap pertumbuhan, kadar protein, dan aktivitas Triptofan Dekarboksilase (TDC) pada kultur agregat sel *Catharanthus roseus* (L) G. Don telah dilakukan secara eksperimental. Penelitian ini bertujuan meningkatkan kandungan katarantin dalam kultur agregat sel *Catharanthus roseus* (L) G. Don yang didukung dengan pertumbuhan yang optimum. Konsentrasi prekursor triptofan yang digunakan adalah 50-250 mg.L⁻¹. Pertumbuhan ditentukan dengan penimbangan berat basah dan berat kering serta pengamatan perubahan secara morfologis. Kadar protein dan aktivitas TDC masing-masing ditentukan dengan spektrofotometer dan spektrofluorometer. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan prekursor triptofan dapat meningkatkan pertumbuhan agregat sel *C. Roseus*, kadar protein, dan aktivitas TDC pada kultur agregat sel. Pertumbuhan maksimum kultur agregat sel terjadi pada perlakuan triptofan 150 mg.L⁻¹ dalam Erlenmeyer. Kandungan protein dan aktivitas TDC tertinggi terjadi pada perlakuan 250 mg.L⁻¹ setelah 10-14 hari kultur. Tetapi, perlakuan triptofan menimbulkan pengaruh yang berbeda terhadap kandungan protein dan aktivitas TDC dalam kultur Erlenmeyer.

Kata kunci: triptofan, agregat sel, *catharanthus roseus*, kadar protein, aktivitas TDC

RESPONSES OF GROWTH, PROTEIN CONTENT, AND TRYPTOPHAN DEKARBOKSILASE ACTIVITY OF *CATHARANTHUS ROSEUS* (L) G. Don CELL AGGREGATE CULTURE ON THE ADMINISTRATION OF TRYPTOPHAN

ABSTRACT

One way to increase the content of secondary metabolites in tissue culture is by adding precursor. A research on the influence of tryptofan as precursor on growth, protein content, and triptofan dekarboksilase (TDC) activity of *Catharanthus roseus* (L) G. Don aggregate cell cultures has been done experimentally. The aim of the research was to enhance a catharanthine content with the optimum growth. The concentrations of tryptofan precursors used were 50-250 mg.L⁻¹ for the culture of cell aggregates. The growth was determined by measuring changes of weight and observing the morphological changes. The protein content and TDC activity were determined by the spectrophotometric and spectrofluorometric methods, respectively. The maximum growth of cell aggregate culture occurred in the treatment of tryptofan 150 mg.L⁻¹ in Erlenmeyer. The highest protein content and TDC activity occurred in the treatment of 250 mg. L⁻¹ after 10-14 days of culture. The tryptofan treatment enhanced protein content and TDC activity. The results indicated that the treatment of tryptofan as a precursor increased the optimum growth of cell aggregates of *C. Roseus*, protein content and TDC activity.

Key words: tryptofan feeding, cell aggregates, *catharanthus roseus*, protein content, TDC activity

PENDAHULUAN

Tapak dara (*Catharanthus roseus* (L) G. Don) adalah semak tahunan yang sudah dibudidayakan sebagai tumbuhan 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 (Wijayakusuma, dkk. 1992).

Kemampuan tapak dara dalam pengobatan berbagai penyakit menunjukkan bahwa tumbuhan tersebut mengandung beberapa senyawa aktif yang berperan sebagai obat. Sekitar 130 macam alkaloid telah diidentifikasi pada tumbuhan ini (McCoy & 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 & Rudjiman, 2003).

Peningkatan produksi katarantin dapat dilakukan dengan teknik kultur jaringan tumbuhan (*in vitro*). Hal ini disebabkan oleh karena kultur jaringan tumbuhan dapat digunakan untuk memproduksi senyawa kimia yang bermanfaat obat yang diinginkan. Senyawa yang bermanfaat sebagai obat-obatan yang terdapat pada tumbuhan tergolong metabolit sekunder. Salah satu bagian dalam metabolit sekunder tersebut adalah alkaloid. Alkaloid tertentu dihasilkan dalam kadar yang lebih tinggi melalui kultur jaringan daripada kandungan tumbuhan induknya (Zhao *et al.*, 2001b, Vazquez-Flota *et al.*, 1994). Keuntungan lain penggunaan kultur jaringan ini pada teknologi produksi metabolit sekunder bermanfaat obat adalah produksinya dapat diatur, kualitas dan hasil produksinya lebih konsisten, biaya produksi lebih kecil dan penggunaan lahan dapat dikurangi (Alexandrova *et al.*, 2000).

Usaha peningkatan kandungan metabolit sekunder, khususnya katarantin, pada kultur agregat sel telah dilakukan oleh El Sayed, *et al.*, (2004); Hong *et al.*, (1997); Whitmer *et al.*, (2002); Misawa, (1994), Esyanti, dkk. (2006); Pandiangan, dkk. (2008). Metode yang digunakan adalah amobilisasi, elisitasi, dan penam-

bahan prekursor triptofan pada kultur agregat sel *C. roseus*. Metode penambahan prekursor triptofan dimaksudkan untuk mendukung pertumbuhan biomassa dan kandungan katarantin yang lebih tinggi dari kontrolnya (Esyanti, dkk. 2006., Pandiangan, dkk. 2008). Pertumbuhan dan peningkatan kandungan katarantin yang sejalan sangat dibutuhkan dalam produksi metabolit sekunder dalam bioreaktor. Kedua aspek, yaitu pertumbuhan biomassa dan metabolit sekunder tersebut terpenuhi dalam metode penambahan prekursor.

Mekanisme penambahan triptofan terhadap pertumbuhan dan peningkatan katarantin tersebut berkaitan dengan suatu proses biosintesis. Triptofan yang ditambahkan pada kultur *in vitro* *C. roseus* dapat diubah menjadi triptamin oleh triptofan dekarboksilase (TDC). TDC dihasilkan oleh adanya gen *tdc* pada tapak dara. Gen *tdc* tersebut diekspresikan membentuk enzim TDC untuk mengubah triptofan menjadi triptamin pada *C. roseus* (Thomas *et al.*, 1995). Penambahan triptofan berkaitan dengan ekspresi gen dan aktivitas triptofan dekarboksilase (Whitmer, *et al.*, 2002; Verpoorte *et al.*, 2000), sehingga penambahan kadar protein dan aktivitas TDC akan saling terkait.

Pembatasan penelitian dilakukan sampai pada analisis pertumbuhan, protein dan aktivitas TDC yang terkait dengan peningkatan kandungan metabolit sekunder, antara lain katarantin. Kandungan katarantin akan dianalisis pada tahap penelitian selanjutnya. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan pengaruh perlakuan prekursor triptofan terhadap pertumbuhan, kadar protein total dan aktivitas TDC.

BAHAN DAN METODE

Tumbuhan yang digunakan sebagai sumber eksplan di dalam penelitian ini adalah *C. roseus* yang berbunga putih. Sebagai eksplan digunakan daun yang masih aktif melakukan pertumbuhan yaitu daun ke-3 sampai ke-4 dari apeks pucuk. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan dan Analisis Bahan Alam SITH Institut Teknologi 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, 2006a; Pandiangan D., Nainggolan. 2006). Kultur kalus dan subkulturnya dilakukan dengan menggunakan medium baru yang mempunyai komposisi yang sama dengan medium produksi kalus yaitu pada medium MS padat yang ditambahkan zpt 2 mg.L^{-1} NAA dan $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ kinetin (Pandiangan dan Nainggolan, 2006c). Subkultur dilakukan secara terus-menerus untuk memperbanyak kalus sebagai sumber eksplan pada kultur agregat sel dalam Erlenmeyer. Subkultur kalus dilakukan setiap 21 hari. Kalus yang digunakan untuk eksplan kultur agregat sel 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 setelah disubkultur. Kalus sebanyak 5 g dipindahkan ke medium MS cair 50 mL (Son *et al.*, 2000), ditambahkan zpt 2 mg.L^{-1} NAA dan $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ 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 pada *Laminar Airflow Cabinet*. Agregat sel tersebut kemudian ditimbang secara aseptik kemudian disubkulturkan kembali ke medium baru dengan jenis dan komposisi medium yang sama sebelumnya sebagai kontrol. 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 50, 100, 150, 200, 250 mg.L^{-1} dilakukan langsung pada saat subkultur kedua. Berat inokulum yang digunakan dalam kultur dalam Erlenmeyer adalah 2 g agregat sel. Agregat sel ditimbang secara aseptik dalam *Laminar air flow* ketika melakukan subkultur.

Pertumbuhan agregat sel ditentukan dengan cara menimbang berat basah agregat

sel. Sel-sel agregat ditimbang dalam timbangan Digital dengan ketelitian 4 desimal. Pengukuran berat dilakukan pada hari setiap panen atau pengambilan sampel yaitu hari ke 0, 4, 7, 10, 14, 18, 21, 24 dan 28.

Agregat sel yang dipanen diprioritaskan berumur 14 hari (Pandiangan, dkk. 2009) setelah subkultur dalam triptofan dan agregat sel yang dihasilkan dalam Erlenmeyer diukur berat basahnya untuk menentukan partumbuhannya. Agregat sel tersebut merupakan sampel dalam penelitian ini. Sampel pendukung juga diambil dengan hari kultur yang ke- 0 (sekitar 6-8 jam setelah perlakuan), ke-4, 7, 10, 14, 17, 21, 24 dan 28 untuk meyakinkan peran prekursor triptofan lebih lanjut.

Penentuan aktivitas TDC dilakukan dengan prosedur berikut.

a. Pembuatan Ekstrak

Ekstraksi dilakukan menurut metoda Li *et al.* (2003) dan Pandiangan (1996) yang dimodifikasi. Dari setiap sampel diambil 1 g agregat sel segar. Sampel digerus dalam nitrogen cair. Hasil gerusan ditambahkan 3 mL dapar yang mengandung dapar 0,05 M Tris HCl (pH 8 pada suhu 0°C) dan 0,15% (v/v) Triton X-100. Homogenat disentrifuse dengan kecepatan 14.000g selama 10 menit pada suhu 0°C . Supernatan diambil sebagai ekstrak untuk penentuan kandungan protein dan aktivitas enzim TDC.

b. Penentuan Kadar Protein

Penentuan kadar protein dilakukan mengikuti metoda Lowry *et al.* (1951). Penentuan kadar protein dilakukan dalam 2 tahap. Tahap pertama yaitu penentuan persamaan regresi kurva standar BSA. Tahap kedua adalah penentuan kadar protein sampel. Reagen pewarna yang digunakan adalah Folin-Ciocalteu dari Sigma. Sebelum digunakan reagen disaring dengan kertas saring Whatman satu Penentuan kadar protein standar menggunakan konsentrasi 0-700 $\mu\text{g/mL}$ dengan selang 100 $\mu\text{g/mL}$ berturut-turut. Absorbansi setiap protein standar ditentukan dengan menggunakan Spectrophotometer U-2800 (Hitachi) pada panjang gelombang (λ) 500 nm. Absorbansi dinyatakan sebagai Y dan konsentrasi protein dinyatakan sebagai X dalam persamaan $Y = a + bX$. Penentuan kadar protein sampel dilakukan dengan metoda yang sama seperti standar.

Absorbansi yang diperoleh kemudian dikonversikan dengan persamaan regresi linier dari standar BSA yang sudah diperoleh sebelumnya. Kadar protein yang diperoleh digunakan untuk menentukan aktivitas TDC dan profil protein.

c. Penentuan Aktivitas TDC

Penentuan aktivitas TDC (EC.4.1.1.28) dilakukan dengan metoda Li *et al.*, (2003) yang dimodifikasi. Penentuannya dilakukan dalam 2 tahap. Tahap pertama yaitu penentuan persamaan regresi kurva standar triptamin. Tahap kedua adalah penentuan kadar aktivitas TDC sampel. Sebanyak 10-100 μL ekstrak (30 μg protein) dicampurkan dengan dapar uji triptamin (100mM Tris HCl, 5 mM b-merkaptoetanol, 10 % gliserol pH 8,0) sampai volume 1 mL.

Aktivitas TDC ditentukan dengan waktu inkubasi pada 0 menit dan 30 menit dengan dapar Tris HCl sebagai blanko. Aktivitas TDC pada 0 menit dilakukan dengan mencampurkan 2 mL NaOH pada awal reaksi sebelum ekstrak dimasukkan kemudian 5 mL etil asetat. Aktivitas TDC pada 30 menit ditentukan dengan menambahkan NaOH dan 5 mL etil asetat setelah di inkubasi selama 30 menit dalam dapar. Campuran divorteks pada 262 g selama 1 menit. Fase organik atau bagian atas digunakan untuk analisis fluorometrik menggunakan Spektrofluorometer Shimadzu RF-540. Triptamin dideteksi pada panjang gelombang eksitasi 280 nm dan emisi 345 nm, pengukurannya dilakukan secara duplo.

d. Analisis Data

Uji statistik menggunakan program STATISTICA release 6 dan Excel release 7. Uji statistik untuk mengetahui pengaruh perlakuan dilakukan dengan analisis varian (ANOVA) dalam rancangan acak lengkap (RAL) yang faktorial pada tingkat kepercayaan 95% atau $\alpha=0,05$. Jika terlihat adanya perbedaan yang sangat nyata, analisis dilanjutkan dengan *Post Hoc Test DMRT (Duncan's multiple range test)* pada tingkat kepercayaan 95%.

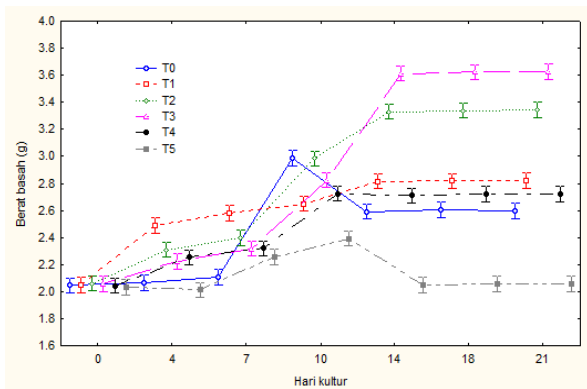
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan Agregat Sel Perlakuan Triptofan

Perlakuan triptofan berpengaruh terhadap pertumbuhan sel secara kualitatif atau pengamatan visual, tetapi penambahan konsentrasi triptofan tidak selalu meningkatkan pertumbuhan agregat sel. Hasil pengamatan secara visual agregat dan sel hasil kultur dalam berbagai konsentrasi triptofan juga dilakukan pada setiap variasi hari.

Pengamatan secara visual terhadap agregat dan sel kultur dalam berbagai konsentrasi triptofan dilakukan pada setiap variasi hari. Hasilnya menunjukkan bahwa pertumbuhan sel yang baik secara visual juga ditunjukkan dari perubahan warna agregat sel *C.roseus*. Sel yang tumbuh baik cenderung berwarna kekuningan agak keruh sedangkan yang kurang dapat tumbuh dengan baik berwarna kuning sampai coklat kemerahan.

Pengaruh perlakuan triptofan terhadap pertumbuhan sel secara kuantitatif atau pengukuran berat basah agregat sel dalam Erlenmeyer dapat dilihat pada Gambar 1. Pada gambar tersebut terlihat bahwa perlakuan triptofan tidak selalu meningkatkan pertumbuhan sel pada beberapa konsentrasi triptofan, tetapi mempunyai konsentrasi optimum. Hasil ANOVA menunjukkan bahwa hari pengamatan juga menentukan perbedaan pengaruh pada pertumbuhan agregat sel.



Gambar 1. Gambar perubahan berat basah agregat sel *C. roseus* pada Erlenmeyer dengan perlakuan triptofan (mg.L^{-1}), kontrol (T0); 50 (T1); 100 (T2); 150 (T3); 200 (T4) dan 250 (T5) pada waktu kultur (hari) 0, 4, 7, 10, 14, 18 dan 21

Konsentrasi triptofan 100 dan 150 mg.L⁻¹ atau agregat sel T2 dan T3 menunjukkan pertumbuhan sel optimum pada hari ke-14 sampai ke-21 dengan berat basah berkisar antara 3,32 sampai 3,63 g.

Penelitian sebelumnya tentang pengaruh perlakuan triptofan pada konsentrasi 100-225 mg.L⁻¹ terhadap kultur dalam Erlenmeyer, menunjukkan bahwa pada hari ke-10 sampai ke-14 terjadi pertumbuhan dan kandungan katarantin yang optimum (Pandiangan, dkk. 2008). Namun pada penelitian ini ditemukan bahwa kultur agregat sel yang menggunakan sumber kalus yang sudah disubkultur selama 1 tahun lebih menunjukkan pertumbuhan yang optimum pada hari ke-14, ke-18 dan ke-21. Setelah uji DMRT ketiga hari pengamatan atau kultur tersebut tidak berbeda nyata. Oleh sebab itu sebaiknya panen dan subkultur cukup pada hari ke-14. Hal tersebut merupakan pertimbangan efisiensi dan ekonomi. Demikian juga perlakuan triptofan T3 (150 mg.L⁻¹) berpengaruh nyata terhadap perubahan berat basah agregat sel tapak dara. Peningkatan berat basah yang paling tinggi terjadi juga pada T3 yaitu sebesar 77%. Perlakuan T3 yang optimum tersebut terjadi juga pada hari ke-14 setelah kultur dalam perlakuan triptofan. Berat basah tertinggi adalah sebesar 3,6 g yang terjadi pada hari ke-14, dan tidak berbeda dengan hari ke-18 dan ke-21.

Pertumbuhan agregat sel *C.roseus* dalam Erlenmeyer pada pengamatan hari ke-14, 18 dan 21 mempunyai pola yang sama, dan tidak ada perbedaan yang nyata. Namun perlakuan triptofan yang optimum terhadap pertumbuhan terdapat dalam T3. Perlakuan T5 menunjukkan penurunan pertumbuhan sel. Hasil ini berbeda dengan kultur kalus dan agregat sel yang berasal dari kalus 2 kali subkultur sebelumnya. Wilken *et al.* (2005) mendukung hasil tersebut.

Kultur kalus dan kultur sel diketahui mempunyai respon yang berbeda terhadap perlakuan eksternal, baik penambahan biomassa dan kandungan senyawa aktifnya. Hal ini kemungkinan juga disebabkan oleh difusi nutrisi ke dalam sel meningkat pada subkultur (umur kalus) berkepanjangan, karena dinding sel juga mengalami pelemahan atau perubahan komposisi (Zhong, 2001). Pola peningkatan berat basah atau pertumbuhan agregat sel yang diberi perlakuan triptofan pada prinsipnya sama.

Namun berbeda dengan kontrol (T0) bahwa biomassa maksimumnya terjadi pada hari ke-10 saja dan hari selanjutnya justru menurunkan biomassa. Sebagaimana hasil pada percobaan sebelumnya (Pandiangan, dkk. 2009) bahwa pola pertumbuhan agregat sel perlakuan triptofan itu semakin lama atau panjang untuk mencapai fase stationernya. Kontrol mencapai fase stasionernya pada hari ke 10, sedangkan perlakuan triptofan pada hari ke-14 sampai ke-21 kadar protein sel tapak dara yang diberi perlakuan Triptofan.

Kadar Protein Agregat Sel *C. Roseus* dengan Perlakuan Triptofan

Kadar protein ekstrak yang ditentukan dengan menggunakan metoda Bradford dan Lowry pada Spektrofotometer U 2800 (Hitachi) dapat dilihat pada Tabel 2. Pada tabel ditunjukkan rata-rata kadar protein total dari agregat sel yang dikultur dalam Erlenmeyer dengan perlakuan triptofan (mg.L⁻¹) kontrol (T0), 50 (T1), 100 (T2), 150 (T3), 200 (T4), dan 250 (T5), pada hari ke-0, 4, 7, 10, 14, 18, 21 dan 24 setelah kultur pada medium perlakuan.

Perlakuan triptofan meningkatkan kadar protein seiring dengan kenaikan konsentrasi pada hari ke-14 setelah perlakuan (Tabel 1). Seperti terlihat pada tabel tersebut, puncak kadar protein tertinggi terjadi pada hari ke-10 dan 14 yaitu 2,07 total (mg/mL).

Kadar protein pada hari ke-14 mengalami peningkatan dengan meningkatnya konsentrasi perlakuan triptofan. Peningkatan ini terjadi karena triptofan merupakan asam amino aromatik penyusun protein dan enzim (Malik & Singh, 1980; Grierson & Covey, 1988).

Hasil tersebut juga menunjukkan bahwa penyerapan triptofan pada hari kultur tersebut juga berjalan dengan baik. Kondisi dan komposisi medium untuk penyerapan juga sesuai dengan sel tapak dara pada hari tersebut (Endress, 1994). Kadar protein yang berfluktuasi pada hari kultur yang lain diduga sebagai akibat dari adanya berbagai kemungkinan seperti adanya degradasi protein, penghambatan balik, perubahan kondisi lingkungan sel (pH), renaturasi dan denaturasi protein (Taiz & Zeiger, 2002; Bollag & Edelstein, 1991).

Tabel 1. Rata-rata kadar protein total (mg/mL) dari agregat sel dengan perlakuan triptofan (mg.L^{-1}) kontrol (T0), 50 (T1), 100 (T2), 150 (T3), 200 (T4), dan 250 (T5)

Perlakuan Triptofan	Hari 0		Hari 4		Hari 7		Hari 10		Hari 14		Hari 18		Hari 21		Hari 24	
	Rata-rata \pm	SD	Rata-rata \pm	SD	Rata-rata \pm	SD	Rata-rata \pm	SD	Rata-rata \pm	SD	Rata-rata \pm	SD	Rata-rata \pm	SD	Rata-rata \pm	SD
T0	0,73	$\pm 0,72$	0,60	$\pm 0,02$	1,07	$\pm 0,02$	1,35	$\pm 0,05$	1,34	$\pm 0,03$	1,24	$\pm 0,03$	0,94	$\pm 0,05$	0,97	$\pm 0,03$
	de		k		jk		o		o		mn		h		gh	
T1	0,72	$\pm 0,73$	0,78	$\pm 0,02$	1,21	$\pm 0,02$	1,02	$\pm 0,01$	1,36	$\pm 0,01$	1,13	$\pm 0,09$	0,97	$\pm 0,04$	0,43	$\pm 0,05$
	de		ef		mn		ij		o		lm		hi		a	
T2	0,75	$\pm 0,74$	0,79	$\pm 0,02$	1,25	$\pm 0,02$	1,19	$\pm 0,07$	1,40	$\pm 0,02$	0,97	$\pm 0,02$	1,18	$\pm 0,09$	0,69	$\pm 0,03$
	de		ef		m		mn		o		hi		mn		bc	
T3	0,74	$\pm 0,74$	0,84	$\pm 0,02$	1,76	$\pm 0,02$	1,85	$\pm 0,14$	1,58	$\pm 0,09$	0,93	$\pm 0,03$	1,10	$\pm 0,02$	0,59	$\pm 0,08$
	de		k		r		s		p		h		kl		b	
T4	0,75	$\pm 0,75$	0,85	$\pm 0,02$	1,56	$\pm 0,02$	1,54	$\pm 0,10$	1,76	$\pm 0,02$	1,10	$\pm 0,12$	1,61	$\pm 0,01$	0,78	$\pm 0,02$
	de		fg		p		p		r		ijk		pq		ef	
T5	0,74	$\pm 0,75$	0,75	$\pm 0,02$	1,67	$\pm 0,02$	2,07	$\pm 0,06$	2,07	$\pm 0,06$	1,53	$\pm 0,08$	1,18	$\pm 0,02$	0,81	$\pm 0,16$
	de		de		q		t		t		p		mn		cd	

Keterangan: Huruf pada angka yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada tingkat kepercayaan 95%. Rata-rata didapatkan dari 3 kali pengukuran. Masing-masing pengukuran dilakukan duplo. T0: Kontrol, T1: Triptofan 50 mg.L^{-1} , T2: Triptofan 100 mg.L^{-1} , T3: Triptofan 150 mg.L^{-1} , T4: Triptofan 200 mg.L^{-1} , T5: Triptofan 250 mg.L^{-1} ,

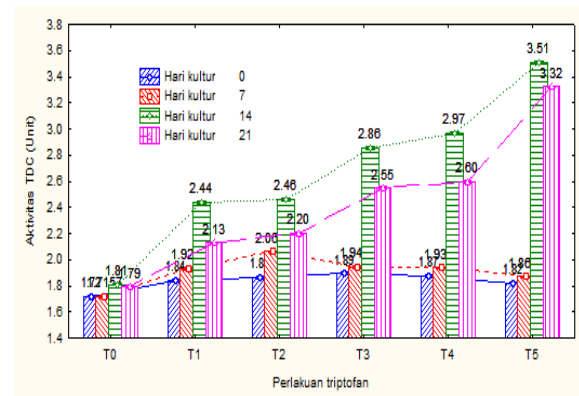
Aktivitas TDC Agregat Sel *C. roseus* yang Diberi Perlakuan Triptofan

Hasil penentuan aktivitas TDC dapat dilihat pada Gambar 2. Pada gambar tersebut ditunjukkan aktivitas TDC dari agregat sel dengan perlakuan triptofan kontrol (T0), 50 (T1), 100 (T2), 150 (T3), 200 (T4), 250 (T5) mg.L^{-1} , pada hari ke- 0, 7, 14 dan 21 setelah kultur pada medium perlakuan. Sama halnya dengan kadar protein total (mg/mL), bahwa perlakuan triptofan meningkatkan aktivitas TDC seiring dengan kenaikan konsentrasi triptofan pada hari ke-14 dan 21 setelah kultur. Puncak aktivitas TDC tertinggi terjadi pada hari ke-14 pada T5 yaitu 3,510 (Unit).

Dari hasil analisis Statistik dengan program STATISTICA Release 6 bahwa perlakuan triptofan dari T1 sampai T5 menunjukkan pengaruh yang sangat signifikan terhadap aktivitas TDC. Hari ke-14 dan 21 setelah kultur pada perlakuan mengalami peningkatan dengan meningkatnya konsentrasi perlakuan triptofan.

Pada Gambar 2 ditunjukkan bahwa pola pengaruh perlakuan triptofan terhadap aktivitas TDC pada agregat sel tapak dara setelah 14 dan 21 hari kultur nampak linier dan meningkat sesuai konsentrasi perlakuan triptofan. Pola yang nyata terlihat adalah linier positif. Gambar tersebut menunjukkan bahwa aktivitas TDC

meningkat dan peningkatannya bergantung pada konsentrasi triptofan.



Gambar 2. Grafik aktivitas TDC (unit) agregat sel *C. roseus* dalam Erlenmeyer setelah 0,7, 14, 21 hari kultur dalam medium MS yang diberi perlakuan triptofan (mg.L^{-1}) kontrol (T0), 50 (T1), 100 (T2), 150 (T3), 200 (T4), 250 (T5)

Oksman-Caldentey, *et al.* (2007) menjelaskan bahwa TDC mengkatalisis dekarboksilasi terhadap triptofan untuk menghasilkan triptamin. TDC merupakan enzim kunci atau utama yang mengubah metabolit primer menjadi metabolit sekunder dengan memanfaatkan triptofan sebagai prekursor (Li, *et al.* 2003). Aktivitas TDC pada hari ke-7 setelah perlakuan

triptofan tidak berbeda dengan hari ke-0, dan tidak selalu meningkat dengan konsentrasi perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas TDC yang optimal terjadi pada hari ke-14 dan 21 setelah kultur. Sebagaimana halnya pengaruh prekursor triptofan terhadap kadar protein bahwa waktu kultur juga mempengaruhi aktivitas TDC, yang terkait dengan sintesis protein sel yang dihasilkan akibat perlakuan. Dari hasil tersebut ditunjukkan bahwa kadar maksimum protein dan aktivitas TDC pada T5 atau 250 mg.L⁻¹ triptofan.

SIMPULAN

Pertumbuhan agregat dan sel tapak dara (*C. roseus*) meningkat pada semua konsentrasi triptofan dari 50-250 mg.L⁻¹ dari kontrolnya dan optimum pada 150 mg.L⁻¹ setelah 14 hari kultur. Penambahan triptofan terhadap kultur agregat sel *C. roseus* dapat meningkatkan kadar protein sejalan dengan peningkatan konsentrasi triptofan. Kadar protein tertinggi terjadi pada perlakuan 250 mg.L⁻¹ yaitu 2,07±0,06 mg/mL setelah 10 hari kultur. Penambahan triptofan terhadap kultur agregat sel *C. roseus* dapat meningkatkan aktivitas TDC sejalan dengan bertambahnya konsentrasi triptofan, dan aktivitas tertinggi terjadi pada perlakuan 250 mg.L⁻¹ triptofan dengan aktivitas tertinggi 3,510±0,06 Unit setelah 10 dan 14 hari kultur.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian yang didanai oleh Program Penelitian Fundamental, dengan no kontrak No:0125.0/023-04.2/XXVII/2009 tanggal 31 Desember 2008 tahun anggaran 2009. Satuan Kerja Universitas Sam Ratulangi Departemen Pendidikan Nasional. Atas bantuan pendanaannya diucapkan terima kasih.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexandrova, R., Alexandrova, I., Velcheva, M., Varadinova, T. 2000. Phytoproduct and Cancer. *Experimental Pathology and Parasitology*. Bulgarian Academy of Sciences.
- Bollag, D. M., Rozycki M. D. & Edelstein, S. J. 1996. *Protein Methods*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Dutta A., Batra, J., Pandey-Rai, S., Singh, D., Kumar, S., Sen, J. 2005. Expression of terpenoid indol alkaloid biosynthetic pathway genes corresponds to accumulation of related alkaloid in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Planta*. Springer-Verlag. New Delhi. 220:376-383.
- El-Sayed, M., Choi, Y.H., Frederick, M., Roytrakul, S., Verporte, R. 2004. Alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures fed with stemmadenine. *Biotechnology Letters* 26: 793-798.
- Endress, R. 1994. *Plant Cell Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York. P.67.
- Esyanti, R.R., Pandiangan, D., & Usviany, V. 2006. Enhancement of Catharanthine Production in *Catharanthus roseus* Cell Cultures by Adding Tryptophan as Precursors. In. *Proceeding International Conference on Mathematics & Natural Sciences*. November 29-30, 2006, Bandung-Indonesia. p.247-251
- Grierson, D & Covey, S.N. 1988. *Plant Molecular Biology* 2nd Edition. Blackie. USA: Chapman & Hall. New York.
- Hong, J, Lee, H., Kim, D., Hwang, B. 1997. Enhancement of catharanthine production by the addition of paper pulp waste liquors to *Catharanthus roseus* in chemostat cultivation. *Biotechnology Letters*, 19 (10): 967-969
- Li, Q.R., Di Fiore, S., Fischer, R. & Wang, M. 2003. Expression of tryptophan decarboxylase in chloroplasts of transgenic tobacco plants. *Bot. Bull.Acad. Sin* 44: 193-198.
- Lowry, O. H., Rosebrou6h, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*193:265-275.

- Malik, C.P. & Singh, M.B. 1980. *Plant Enzymology and Histo-Enzymology: A Text Manual*. Kalyani Publisher. New Delhi.
- McCoy, E. & Connor, S.E.O. 2006. Directed biosynthesis of alkaloid analysis in the medicinal plant *Catharanthus roseus*. *J. Am. Chem. Soc.*, 128(44), 14276-14277.
- Misawa, M. 1994. *Plant Tissue Culture: An Alternative for Production of Useful Metabolites of Useful Metabolites*. Bio International Inc. Canada.
- Oksman-Caldentey, K.M, Häkkinen, S.T. & Rischer, H. 2007. Metabolic engineering of the alkaloid biosynthesis in plants: functional genomics approaches. In: R. Verpoorte, A.W. Alfermann, T.S. Johnson (Eds). *Applications of Plant Metabolic Engineering*. pp. 109-127. Published by Springer, P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, Netherlands.
- Pandiangan, D. 1996. *Aktivitas Peroksidase dan Profil Protein Lini Kalus Padi (Oryza sativa L.) yang Toleran Salinitas*. [Tesis]. Pascasarjana. ITB Bandung.
- Pandiangan D & Nainggolan, N. 2006a. Produksi alkaloid dari kalus tapak dara. *Jurnal Ilmiah Sains* 6: 48-54.
- Pandiangan D & Nainggolan, N. 2006b. Respons pertumbuhan dan kandungan katarantin kalus *C. roseus* yang diberi asam 2,4-Diklorofenoksi asetat. *Jurnal Eugenia* 12:3, p. 184-195.
- Pandiangan D & Nainggolan, N. 2006c. Peningkatan produksi katarantin pada kultur kalus *C. roseus* yang diberi NAA. *Jurnal Hayati* 13:3 p.90-94.
- Pandiangan, D., Rompas, D., Aritonang, H., Esyanti, R. R., & Marwani, E. 2006. Pengaruh triptofan terhadap pertumbuhan dan kandungan katarantin pada kultur kalus *C. roseus*. *Jurnal Matematika dan Sains* 11:4,111-118.
- Pandiangan, D., Esyanti, R.R., & Usviany, V., Wulansari, W. 2008. Production of catharanthine in *Catharanthus roseus* aggregate cell cultures by feeding, elicitation and immobilization method. Proceedings of The 2nd International Conference on Mathematics & Natural Sciences (ICMNS) 2008. 28-30 October, 2008, Bandung-Indonesia .p.379-386.
- Pandiangan, D. Esyanti, R.R., & Astuti, D.P. 2009. Pola pertumbuhan dan produksi katarantin kultur agregat sel *C.roseus* yang diberi perlakuan triptofan. Prosiding Seminar Nasional Biologi di Bandung. ISBN: 978-602-95207-0-5. Juli 2009, hlm.47-56.
- Son, S.H., Choi, S.M., Lee, Y.H., Choi, K.B., Yun, S.R., Kim, J.K., Park, H.J., Noh, O.W., Seon, J.H. & Park, Y.G. 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., & Rudjiman 2003. Plant Resources of South East Asia No 1. *Medicinal & Poisonous Plants*, Baclihuys Publisherds, Leiden.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology*, 3rd ed. Publisher: Sinauer Associates. p 423-460
- Thomas, J.C., Adams, D. C., Nessler, C.L., Brown, J. K., & Bohnert, H. J. 1995. Tryptophan Decarboxylase, Reproduction of the Tryptamine, and Whitefly. *Plant Physiol.* 109: 717-720
- 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. Netherlands.
- Verpoorte, R., van der Heijden, R. & Memelink, J. 2000. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite

- production. *Transgenic Research* 9: 323–343.
- Verpoorte, R., van Der Heidjen, R. & Scripsema, J. 1993. Plant Cell Biotechnology For The Production of Alkaloids: Present Status and Prospects. *Journal of Natural Products*. Vol.56.No.2: 186-207.
- Whitmer S, van der Heijden, R., & Verpoorte, R. 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., Dalimarta, S., & Winar, A.S. 1992. *Tanaman Berkasiat Obat di Indonesia*, Jilid I. Pustaka Kartini, Ikapi Jaya
- Wilken, D.,Gonzalez, E.J., Hohe, A., Jordan, M., Kosky, R. G., Hirschman, G. S. & Gerth, A. 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.
- Zhao J., Zhu, W. & Hu, Q. 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., Hu, Q., Guo, Y.Q., & Zhu, W.H. 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.
- Zhong, J. J. 2001. Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. In: *Advances in Biochemical Engineering*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.