

**PENGARUH KONSENTRASI HOMOGENAT JAMUR *Pythium aphanidermatum*
(Edson) Fitzp terhadap Kandungan Ajmalisin dalam Kultur Agregat Sel
Catharanthus roseus (L.) G. Don**

Revis Asra
Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Jambi

ABSTRAK

An experiment on the effect of elicitor concentrations derived from *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp on ajmalicine content of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don Cell aggregates culture has been conducted. The following concentrations of elicitor tested were 0.05; 0.5; 1.0 and 5.0 mg DW/mL. The harvesting times were 0; 18; 36 and 72 hours after elicitation. The ajmalicine was analyzed qualitatively and quantitatively by using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Ajmalicine content was influenced by the concentration of elicitor and harvesting time. The highest content of ajmalicine in the cell aggregates ($13.089 \pm 0.086 \mu\text{g/gDW}$) was achieved by addition 1.0 mg DW/mL of elicitor after 18 hours whilts in the medium ($346.728 \pm 2.843 \mu\text{g/gDW}$) was achieved by addition 1.0 mg DW/mL of elicitor after 36 hours

Kata kunci: *Catharanthus roseus* (L.) G . Don, *Phytium aphanidermatum*, elisitor, ajmalisin

PENDAHULUAN

Selama berabad-abad tumbuhan merupakan sumber penting untuk obat-obatan bahkan saat ini kurang lebih setengah dari kebutuhan obat dunia masih berasal dari tumbuhan (Anderson *et al.*, 1986). Salah satu jenis tumbuhan yang banyak dimanfaatkan sebagai sumber senyawa obat alami adalah tapak dara (*Catharanthus roseus* (L.) G . Don). Tanaman ini sudah sejak lama digunakan sebagai obat tradisional. Bagian tanaman seperti bunga ,daun ,batang ,dan akar dapat dimanfaatkan sebagai obat untuk penyakit-penyakit seperti: diabetes melitus ,leukemia ,tekanan darah tinggi,kurang darah , disentri, asma dan anti malaria (Ponglux *et al.*, 1987; Eisai Indonesia, 1995). Hasil analisis fitokimia menunjukkan bahwa pada *C.roseus* terdapat lebih dari 100 alkoid, diantaranya adalah ajmalisin yang ditemukan terutama pada bagian akar (Moreno *et al.*, 1995). Alkoid ajmalisin berguna untuk pengobatan penyakit sirkulasi darah, terutama untuk pembuluh darah ke otak dan untuk antihipertensi (Zenk *et al.*, 1977).

Verpoorte dan van der Heijden (1991) melaporkan bahwa untuk mendapatkan 3600 kg ajmalisin dibutuhkan 200-300 ton akar *C. roseus*. Volume ini sangat sedikit, jika dibandingkan dengan usaha agrikultural.

Oleh karena itu diperlukan suatu metode alternatif untuk memproduksi alkaloid ini. Salah satu metode yang sering dipergunakan adalah dengan kultur jaringan.

Penggunaan kultur sel tumbuhan mempunyai beberapa keuntungan bila dibandingkan dengan metode penanaman secara konvensional. Keuntungan-keuntungan tersebut antara lain: (a) metabolit sekunder dapat dihasilkan dibawah kondisi lingkungan yang terkontrol, tidak terganggu pada iklim dan kondisi tanah ,(b) kultur bebas dari kontaminsi mikroba dan insekta, (c) sel-sel dapat dengan mudah diperbanyak untuk memproduksi metabolit spesifiknya, (d) kualitas produk lebih konsisten, (e) dapat dilakukan pengontrolan pertumbuhan sel dan pengaturan proses-proses metabolit secara otomatis, sehingga dapat meningkatkan produktivitas dan mengurangi biaya tenaga kerja (Anderson *et al.*, 1986; Fowler, 1984; Zenk *et al.*, 1977) .

Walaupun memiliki banyak kelebihan, teknik kultur jaringan juga mempunyai beberapa kekurangan, antara lain akumulasi metabolit sekunder yang diperoleh pada beberapa kultur sel relatif lebih rendah bila dibandingkan dengan tumbuhan utuh (Anderson *et al.*, 1986; DiCosmo *et al.*,

1995). Oleh karena itu diperlukan suatu metode yang dapat meningkat akumulasi metabolit sekunder .Salah satu metode yang sering digunakan untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder dari kultur sel tumbuhan adalah dengan menggunakan elisitor .

Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa metode elisitasi dapat digunakan untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder pada kultur tumbuhan tertentu, misalnya produksi metabolit sekunder gliseolin pada kultur sel *Glycine max* dapat ditingkatkan dengan penambahan homogenate jamur *Phytophthora megasperma* (DiCosmo *et al.*, 1995).

Bedasarkan latar belakang dilakukan penelitian dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan elisitor dari homogenat jamur *P.aphanidermatum* terhadap kandungan ajmalisin pada kultur agregat sel *C.roseus* dan untuk mengetahui waktu dan konsentrasi elisitor optimum yang diperlukan untuk meningkatkan kandungan ajmalisin pada kultur agregat sel *C.roseus*.

MATERI DAN METODE

Bahan Tanaman

Sumber eksplan yang digunakan adalah daun ke dua dari tanaman

Catharanthus roseus (L.) G. Don yang berbunga merah muda.

Bahan Elisitor

Kultur jamur *Phthium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. Digunakan sebagai bahan elisitor. Jamur ini diperoleh dari Klinik Tanaman Jurusan Hama dan Penyakit Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.

Medium Kultur Agregat Sel

Medium untuk kultur agregat sel pada penelitian ini adalah medium cair Zenk (1977) dengan penambahan zat pengatur tumbuh NAA dan BAP. Kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA dan BAP yang terbaik yang akan digunakan.

Elisitasi

Elisitasi dilakukan dengan menambahkan 4 ml. homogenate jamur dari masing-masing konsentrasi (0.05, 0.5, 1.0, dan 5.0 mg BK/ml) pada kultur agregat sel (Moreno *et al.*, 1994), sedangkan untuk control ditambahkan akuades steril dengan volume yang sama. Masing-masing perlakuan dan control dilakukan tiga kali ulangan. Pemanenan dilakukan setelah terjadi kontak antara agregat sel dengan homogenate jamur selama 18, 36 dan 72 jam (Eilert *et al.*, 1986).

Analisis Kandungan Ajmalisin.

Analisis kualitatif dan kuantitatif untuk ajmalisin dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan jenis kolom Shim-pack CLC-ODS 0,15mm dengan diameter 6.0mm. Fase gerak berupa larutan yang terdiri dari methanol : asetonitril ; diamonium hydrogen fosfat = 3 : 4 : 3, pH 7,3. Hasilnya diamati pada panjang gelombang 298 nm (Sim *et al.*, 1994).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada table 1 dapat dilihat bahwa persentase tertinggi peningkatan ajmalisin dalam agregat sel terhadap konsentrasi elisitor adalah sebesar 142.704% yaitu pada konsentrasi elisitor 1.0 mg BK/mL dan waktu pemanenan 18 jam. Pada table tersebut juga dapat

dilihat bahwa penambahan konsentrasi elisitor kurang dari 10 mg BK/mL menyebabkan peningkatan persentase lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi elisitor yang lebih dari 1 mg BK/mL. Hasil tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi elisitor merupakan factor pembatas dalam sintesis ajmalisin, karena untuk memperoleh kandungan ajmalisin tertinggi diperlukan elisitor dalam konsentrasi optimum. Hasil penelitian Moreno *et al.* (1995) diperoleh bahwa pada konsentrasi yang rendah, ekstrak *Pythium vexans* dapat meningkatkan kandungan ajmalisin namun pada konsentrasi yang lebih tinggi produk ajmalisin menurun. Isaac (1992) menyatakan bahwa jika elisitor berlaku sebagai efektor, maka konsentrasi elisitor sangat tergantung pada jumlah reseptor yang terdapat pada membran plasma.

Tabel 1. Persentase peningkatan kandungan ajmalisin dalam agregat sel terhadap konsentrasi elisitor yang berbeda pada kultur agregat sel *C. roseus*

Konsentrasi elisitor (mg BK /mL)	Persentase peningkatan kandungan ajmalisin dalam sel pada pemanenan jam ke		
	18	36	72
(0)	5.393 ± 0.189 0%	5.008 ± 0.135 0 %	4.671 ± 0.080 0 %
(0.05)	8.385 ± 0.316 55.479 %	7.334 ± 0.307 46.446 %	6.362 ± 0.265 36.202 %
(0.5)	11.288 ± 0.108 109.308 %	9.408 ± 0.433 87.859 %	7.438 ± 0.477 59.238 %
(1)	13.089 ± 0.086 142.704 %	11.864 ± 0.256 136.901 %	9.332 ± 0.943 99.786 %
(5)	7.628 ± 0.768 41.443 %	6.086 ± 0.343 21.526 %	5.568 ± 0.363 19.204 %

Pada table 2 dapat dilihat bahwa persentase peningkatan tertinggi kandungan ajmalisin dalam medium terhadap konsentrasi elisitor adalah 221.801% pada konsentrasi elisitor 1.0 mg BK/mL dan waktu pemanenan 36 jam. Jika dibandingkan dengan persentase peningkatan ajmalisin pada agregat sel ternyata persentase peningkatan pada medium jauh lebih tinggi. Hal ini berarti bahwa ajmalisin yang dihasilkan setelah elisitasi lebih banyak disekresikan ke dalam medium daripada yang diakumulasi di dalam sel. Faktor-faktor yang menyebabkan ajmalisin ekstraseluler lebih tinggi adalah selain dari kondisi pertumbuhan kultur, yaitu dalam keadaan gelap, juga diduga karena terjadinya perubahan-

perubahan fisik pada medium setelah elisitasi, seperti perubahan pH medium. Dengan rendahnya pH medium maka ajmalisin lebih banyak disekresikan ke dalam medium kultur. Hal ini didukung oleh Nef *et al.* (1994) yang menyatakan bahwa penambahan elisitor *P. vexans* pada kultur suspense sel *C. roseus* pada medium Murashige dan Skoog (MS) dengan penambahan 2.4D dan kinetin menyebabkan medium kultur lebih asam, dan perbedaannya mencapai 0.7 unit setelah 5 hari perlakuan. Selanjutnya Nef *et al.* (1994) dalam Floata et al. (1994) menyatakan bahwa konsentrasi yang rendah dari homogenate jamur menginduksi 90% pembebasan dari total ajmalisin ke dalam medium kultur

Tabel 2. Persentase peningkatan kandungan ajmalisin dalam medium kultur terhadap konsentrasi elisitor yang berbeda pada kultur agregat sel *C. roseus*

Konsentrasi elisitor (mg BK /mL)	Kandungan ajmalisin dalam sel pada pemanenan jam ke		
	18	36	72
(0)	102.707 ± 1.744 0 %	107.746 ± 4.155 0 %	91.202 ± 0.985 0 %
(0.05)	142.904 ± 2.000 39.138 %	174.995 ± 4.143 162.377 %	149.845 ± 3.205 64.300 %
(0.5)	173.458 ± 2.660 68.886 %	227.431 ± 4.303 111.081 %	187.193 ± 2.651 105.251 %
(1)	239.452 ± 4.099 133.141 %	346.728 ± 2.843 221.801 %	267.648 ± 4.089 193.467 %
(5)	158.044 ± 1.937 53.879 %	169.174 ± 0.792 57.012 %	148.929 ± 3.726 63.296 %

Pada penelitian ini juga diperoleh bahwa ajmalisin merupakan metabolit sekunder yang disekresikan ke dalam medium kultur dalam jumlah yang cukup tinggi. Hal ini memberikan suatu keuntungan dalam mengekstraksi ajmalisin tersebut, karena ajmalisin yang diekstraksi dari medium kultur pengerjaannya lebih mudah dan dari segi biaya lebih murah dibandingkan dengan mengisolasi dari agregat sel. Keuntungan lainnya dikemukakan oleh Parr *et al.* (1986) bahwa metabolit sekunder yang dikeluarkan ke medium kultur dapat dihasilkan secara terus menerus tanpa merusak sel. Hal serupa juga ditemukan pada alkaloid dari *Cinchona ledgeriana*. Kemudian Verpoorte *et al.* (1991) menyatakan bahwa ketika alkaloid disekresikan ke medium setelah elisitasi maka biomasnya dapat dielisitasi kembali (reelisitasi).

KESIMPULAN

Dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan:

1. Konsentrasi elisitor yang terbaik dalam meningkatkan kandungan ajmalisin adalah 1 mg BK/mL pada pemanenan 18 jam untuk agregat sel dan 36 jam untuk medium.
2. Persentase kenaikan kandungan ajmalisin sesudah elisitasi pada

medium lebih tinggi dari pada agregat sel dan persentase kenaikan tertinggi pada jam ke 36 sesudah elisitasi yaitu 221.801 %.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, L. A., Phillipson, J. D. & Roberts, M. F. 1986. Aspectsof Alkaloid Production by Plant Cell Culture. In: Secondary metabolism in plant cell culture. Morris, P...., Scragg, A. H., Stafford, Fowler, M.W. (Eds). Cambridge University Press. Cambridge. p. 1-14
- DiCosmo, F. & Misawa, M. 1995. Plant Cell and Tissue Culture: Alternative for Metabolite Production. Biotechnologu Advances. 3: 425-453
- Eilert, U., Constabel, F. & Kurz, W. G. W. 1986. Elicitor Stimulation of Monoterpen Indole Alkaloid Formation in Suspension Culture of *Catharanthus roseus*. Journal of Plant Physiology. 126:11-22
- Eisai Indonesia. 1995. Medicinal Herb Index in Indonesia. Index Tumbuh-tumbuhan Obat di Indonesia. Edisi kedua. p. 196
- Flota, F. V., Valenzuela, O. M., Ham, M. M. L., Coello, J. C. 1994. Catharanthine and Ajmalicine Synthesis in *Catharanthus roseus* Hairy Root Culture Medium Optimization and Elicitation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. P. 273-279

Fowler, M.W. 1984. Plant Cell Culture:
Natural Product and Industrial
Applicaton. In: Biotechnology
and Genetic Engineering
Review. Russel, G.E. (Ed.)
Volume 2 Intercept Limited
England. p. 41-68

Isaac, S. 1992. Fungal-Plant Interaction.
Chapman Hall. London. p. 17-
19

