

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK *Saccharomyces cerevisiae* Hansen TERHADAP KANDUNGAN GOSIPOL PADA KULTUR KALUS *Gossypium hirsutum* L.

[The Effect of *Saccharomycetes Cerevisiae* Hansen Extract on Gosipol Content of *Gossypium hirsutum* L. Callus Cultures]

Rama Riana Sitinjak¹✉, Arbayah H Siregar² dan Rizkita RE²

¹ Biologi, IKIP Gunungsitoli, P. Nias

² Biologi, Institut Teknologi Bandung

ABSTRACT

This study concentrated on the effect of Saccharomyces cerevisiae Hansen extract on gosipol content of Gossypium hirsutum L callus cultures. There were many ways commonly used to obtain high secondary metabolites product by using tissue culture, i.e. elicitation. The objective of this study was to increase the production of gossypol on G. hirsutum callus cultures using elicitor derived from S. cerevisiae. The callus grew optimally and produced gossypol on Linsmaier and Skoog (LS) medium with the addition of 10⁻⁵ M NAA and 10⁻⁶ M 2,4-D. Callus derived from cotyledon was subcultured five times. Callus was then elicited with elicitor derived from autoclaved S. cerevisiae and concentration of elicitor tested were 0.5, 1.0 and 2.5% (b/v). The harvesting times were 0, 2, 4, dan 6 days after elicitation. The gossypol was analyzed qualitatively and quantitatively by using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Gossypol content was influenced significantly by concentration of elicitor and harvesting time. The maximum of gossypol content was obtained on the 4th day after elicitation i.e. 469.233 ± 2.332 pg/g dry weight in the elicited callus of G. hirsutum.

Kata kunci/ Keywords: gosipol/gossypol, tumbuhan kapas/*Gossypium hirsutum*, khamir/*Saccharomyces cerevisiae*, elisitasi/elicitation, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)/High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

PENDAHULUAN

Gosipol adalah senyawa hasil metabolisme sekunder pada tanaman kapas-kapasan dan suku Malvaceae lainnya (Robinson, 1991), dan akhir-akhir ini tengah dilakukan penelitian intensif tentang toksisitasnya terhadap sel kanker (Jaroszewski *et al.*, 1991). Gosipol juga telah digunakan sebagai senyawa antifertilitas (Tang dan Einsenbrand, 1992).

Kultur jaringan tumbuhan merupakan teknik alternatif yang dapat digunakan untuk menghasilkan metabolit sekunder karena memiliki banyak keuntungan antara lain tidak tergantung pada faktor lingkungan (iklim, hama/penyakit, serta hambatan-hambatan geografis dan musim), sistem produksinya dapat diatur sehingga kualitas dan produksinya lebih konsisten untuk memenuhi kebutuhan pasar serta dapat mengurangi penggunaan lahan (Wiendi *et al.*, 1992).

Meskipun banyak keuntungannya, teknik kultur jaringan ini masih mempunyai kekurangan yaitu produksi metabolit sekunder pada beberapa kultur tumbuhan masih rendah. Untuk mengatasi hal ini perlu dilakukan teknik elisitasi (Buitelaar dan Tramper, 1991).

Elisitasi merupakan salah satu teknik untuk merangsang pembentukan fitoaleksin dan meningkatkan kandungan senyawa konstitutif atau metabolit sekunder yang terakumulasi akibat cekaman (Barz *et al.*, 1990). Elisitor yang diberikan dapat berupa elisitor abiotik seperti radiasi UV, detergen, ion logam berat dan dapat juga berupa elisitor biotik seperti homogenat kultur kompleks yang berasal dari jamur, bakteri, khamir, atau fraksi-fraksinya (Wiendi *et al.*, 1992).

Penggunaan khamir sebagai bahan elisitor mempunyai beberapa kelebihan antara lain mudah diperoleh, siklus hidupnya relatif pendek, tidak patogen bagi manusia dan dapat tumbuh pada pH

rendah (Hariyum, 1986). Kandungan gosipol pada tanaman kapas telah dapat ditingkatkan dengan memberikan beberapa jenis elisitor biotik. Hasil penelitian Heinstejn (1985) menunjukkan bahwa kandungan gosipol meningkat pada kultur suspensi sel *Gossypium arboreum* dengan penambahan elisitor *Saccharomyces cerevisiae* dan konidia *Verticillium dahliae*. Yulia (1999) berhasil meningkatkan kandungan gosipol 50,643% pada kultur kalus *G. hirsutum* L. dan 41,110% pada kultur kalus *G. herbaceum* dengan pemberian elisitor *Rhizoctonia solani* Kuhn.

Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan kandungan gosipol pada kultur kalus *G. hirsutum* L. dengan pemberian elisitor *S. cerevisiae* dan untuk menentukan konsentrasi elisitor terbaik serta waktu kontak optimum yang dapat meningkatkan kandungan gosipol pada kultur kalus *G. hirsutum* L.

BAHAN DAN METODA

Khamir *S. cerevisiae*

Medium pemeliharaan

S. cerevisiae ditumbuhkan pada medium selektif 'Glucose Yeast Extract' (GYE) padat, pada suhu kamar.

Pembuatan kurva tumbuh

Khamir dari biakan murni (*S. cerevisiae*) yang dipelihara pada medium GYE padat, selama dua hari pada suhu kamar, diinokulasikan pada medium GYE cair. Sampel diambil setiap dua jam untuk dihitung jumlah selnya dengan menggunakan metoda 'Total Plate Count'. Kurva pertumbuhan dibuat untuk menggambarkan hubungan jumlah sel terhadap waktu inkubasi.

Persiapan bahan elisitor

S. cerevisiae yang telah mencapai awal fase stasioner diautoklaf pada suhu 121°C. Sel-sel dipisahkan dari medium dengan sentrifugasi pada kecepatan 1500 g selama 5 menit (Roos *et al.*, 1998). Sel dicuci dengan akuades steril dan

dikeringkan dalam oven hingga mencapai berat kering konstan kemudian digerus hingga diperoleh serbuk khamir. Serbuk khamir ditimbang dan dilarutkan dalam akuades dengan konsentrasi yang ditentukan yaitu 0,5, 1,0 dan 2,5% (b/v).

Ekstrak *S. cerevisiae* kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi (pound per square inch) selama 20 menit (Suvarnalatha *et al.*, 1994).

Kotiledon kapas

Medium induksi kalus

Medium yang digunakan untuk induksi kalus adalah medium dasar Linsmaier dan Skoog (1965). Konsentrasi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan untuk induksi kalus *G. hirsutum* adalah 10^{-6} M 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan 10^{-5} M asam naftalen asetat (NAA) (Purwianingsih, 1997).

Penentuan kurva tumbuh kalus

Kalus pada subkultur V dipanen dan ditimbang setiap 2 hari sekali, dimulai dari hari ke 0. Kalus dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C, lalu ditimbang hingga mencapai berat kering konstan. Kurva pertumbuhan ditentukan dari berat kering kalus terhadap waktu. Penimbangan dihentikan setelah seluruh fase pertumbuhan kalus diketahui.

Penentuan kurva kandungan gosipol

Kalus yang telah mencapai berat kering konstan diekstraksi, lalu dianalisis sehingga dapat diketahui kandungan gosipol yang diproduksi oleh kalus tersebut pada setiap fase pertumbuhan kalus. Dari kurva tumbuh kalus dan kurva kandungan gosipol dapat ditentukan waktu yang tepat untuk elisitasi.

Elisitasi kalus

Kalus yang akan dielisitasi adalah kalus yang telah mengalami 5 kali subkultur. Elisitasi dilakukan dengan menambahkan ekstrak *S.*

cerevisiae dengan konsentrasi 0,5, 1,0 dan 2,5% (b/v), sedangkan pada kalus kontrol ditambahkan akuades steril. Dilakukan 5 kali ulangan untuk masing-masing perlakuan maupun kontrol.

Ekstraksi bahan

Bahan kering berupa kalus diekstraksi dengan metode modifikasi Schmidt dan Wells (1990). Selanjutnya ekstrak disimpan pada suhu -20°C (Nomier dan Abou-Donia, 1992).

Analisis data

Analisis kualitatif dan kuantitatif

Analisis kualitatif dan kuantitatif untuk gosipol dilakukan dengan menggunakan KCKT dan jenis kolom yang digunakan adalah Shim-pack CLC-ODS 0,15 m dengan diameter 6,0 mm. Kromatopak yang digunakan adalah Shimadzu CR-7A Plus. Hasilnya dideteksi pada panjang gelombang 230 nm (Schmidt dan Wells, 1990; Nomeir dan Abou-Donia, 1982).

Uji statistik

Uji statistik terhadap kandungan gosipol dalam kalus *G. hirsutum*, sebelum dan sesudah elisitasi, dengan analisis varian (ANOVA) dalam rancangan acak lengkap (RAL) dengan tingkat kepercayaan 95%. Jika terlihat ada beda nyata, maka dilanjutkan dengan 'Duncan's Multiple Range Test' (DMRT) pada tingkat kepercayaan 95%. Uji statistik dilakukan dengan menggunakan program statistik "Statistica for Windows Release 4,3 Statsoft Inc. 1993.

HASIL

Kalus yang diberi elisitor memperlihatkan warna lebih gelap (coklat kekuning-kuningan) serta pertumbuhannya sangat lambat, sementara kalus kontrol memperlihatkan warna lebih terang (coklat keputih-putihan). Kalus yang telah dielisitasi ini kemudian dianalisis. Berdasarkan analisis data diperoleh hasil bahwa elisitasi dapat meningkatkan kandungan gosipol secara nyata. Perbedaan

konsentrasi elisitor dan waktu panen memberikan pengaruh peningkatan yang berbeda nyata terhadap kandungan gosipol bila dibandingkan dengan kultur kalus tanpa perlakuan elisitor.

Kalus yang dielisitasi dengan konsentrasi elisitor khamir 0,5% (b/v) memproduksi kandungan gosipol tertinggi sebesar 469,233 $\mu\text{g/g}$ BK setelah 4 hari dielisitasi. Persentase peningkatan ini mencapai 207,345% bila dibandingkan dengan kontrol. Sementara konsentrasi elisitor 1,0% (b/v) memproduksi kandungan gosipol sekitar 354,757 $\mu\text{g/g}$ BK dan konsentrasi elisitor 2,5% (b/v) memproduksi kandungan gosipol sekitar 256,609 $\mu\text{g/g}$ BK. Hasil ini menunjukkan bahwa konsentrasi elisitor 1,0% (b/v) dan 2,5% (b/v) tidak menyebabkan produksi gosipol lebih tinggi lagi.

PEMBAHASAN

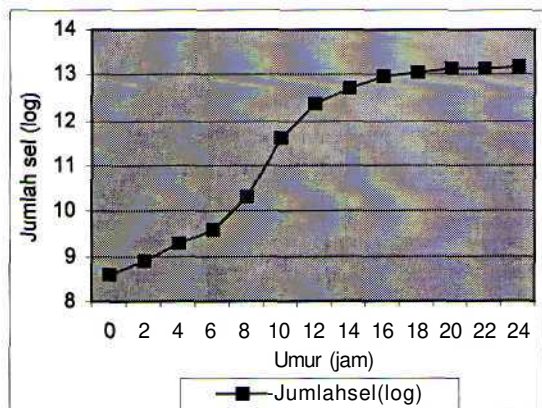
Kurva tumbuh ragi

Ekstrak sel khamir yang akan digunakan sebagai bahan elisitor diambil pada saat sel mencapai awal fase stasioner (Suvarnalatha *et al.*, 1994), karena pada awal fase ini kerapatan sel dalam keadaan maksimum dan beberapa enzim tetap dalam keadaan aktif (Moat dan Foster, 1995). Kurva tumbuh *S. cerevisiae* dapat dilihat pada Gambar 1. Elisitor dari ekstrak khamir mempunyai struktur yang serupa dengan struktur dinding dari miselium *Phytophthora megasperma*. Elisitor yang efektif dapat diisolasi dari *S. cerevisiae* adalah yang mempunyai struktur dinding sel glukana (Hahn dan Albersheim, 1978).

Hubungan pertumbuhan dan kandungan gosipol pada kalus *G. hirsutum*.

Eksplan kotiledon yang ditanam dalam medium LS dengan penambahan zat pengatur konsentrasi 10^{-6} M 2,4-D dan 10^{-5} M NAA dapat membentuk kalus. Penambahan 2,4-D akan menginisiasi pembelahan sel untuk terbentuknya kalus (George dan Sherrington, 1984) dan pemberian NAA dengan konsentrasi tinggi dapat menginisiasi pembentukan kalus yang kompak

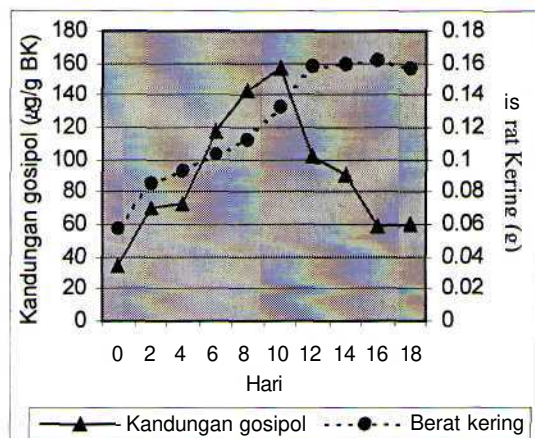
pada kultur kalus kapas (Ammirato *et al.*, 1984). Menurut Heinsteins dan El-Shagi (1981) eksplan kotiledon yang ditanam pada medium LS dengan penambahan 2,4-D dan NAA pada konsentrasi tertentu akan menghasilkan pertumbuhan kalus, sebaik produksi gossipolnya.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan *S. cerevisiae* pada medium GYE cair.

Hubungan pertumbuhan kalus dengan kandungan gossipol pada *G. hirsutum* dapat dilihat pada Gambar 2. Pada umur 0 hari hingga 10 hari pertumbuhan kalus dan sintesis kandungan gossipol berlangsung bersamaan. Jadi proses sintesis metabolisme primer sejalan dengan proses sintesis metabolisme sekunder (Endress, 1994). Pada umur kalus lebih dari 10 hari kandungan gossipol menurun, sementara fase pertumbuhan kalus meskipun relatif lambat namun berlangsung hingga umur 16 hari. Menurut Heinsteins dan El-Shagi (1981) kultur yang diinkubasi pada kondisi gelap memproduksi gossipol maksimal, namun pertumbuhannya sangat lambat. Hal ini diperkirakan karena adanya kompetisi untuk prekursor bagi proses pertumbuhan dan sintesis metabolisme sekunder (Van der Plas *et al.*, 1995). Sedangkan Threlfall dan Whitehead (1991) menyatakan bahwa konsentrasi senyawa gossipol dapat menurun akibat terdegradasi menjadi bentuk kadalen dan lansilen serta adanya lisis. Kemungkinan lain penurunan ini disebabkan adanya penghambatan balik oleh gossipol itu sendiri

terhadap enzim yang mengkatalisis pembentukannya (Byun *et al.*, 1992).



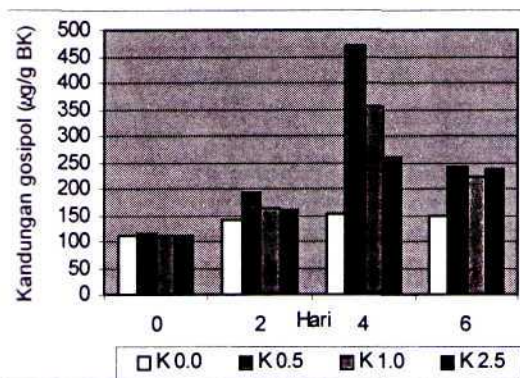
Gambar 2. Hubungan pertumbuhan dan kandungan gossipol pada kalus *G. hirsutum*

Pengaruh pemberian elisitor terhadap kandungan gossipol.

Kalus yang dielisitasi berwarna lebih gelap (coklat kekuning-kuningan) serta pertumbuhannya lebih lambat dan kandungan gossipolnya lebih tinggi bila dibanding dengan kalus kontrol. Hal ini kemungkinan merupakan suatu respons hipersensitif yang ditunjukkan oleh jaringan tumbuhan akibat adanya cekaman. Menurut Bell (1969) gossipol yang merupakan metabolit sekunder diproduksi oleh tumbuhan kapas yang mengalami cekaman secara biologi, kimia dan fisika. Jadi elisitor *S. cerevisiae* yang diinkubasikan pada kalus menyebabkan kalus tersebut mengalami cekaman, sehingga memperlihatkan warna gelap (kecoklatan). Pencoklatan kalus di samping karena adanya akumulasi fitoaleksin, juga adanya sintesis senyawa fenolik (Isaac, 1992).

Peningkatan kandungan gossipol pada kalus yang dielisitasi disebabkan oleh adanya aktivitas enzim setelah pengikatan elisitor oleh reseptor. Pada Gambar 3 diketahui bahwa pada kalus *G. hirsutum* terjadi peningkatan kandungan gossipol yang dielisitasi. Joost *et al.* (1995) menyatakan bahwa pada tanaman kapas yang dielisitasi akan terjadi peningkatan transkripsi mRNA untuk enzim 3-hidroksi-3-metil glutari KoA

reduktase (HMGR). Enzim ini bertanggung jawab untuk mengkatalisis pembentukan asam mevalonat yang menjadi prekursor dalam pembentukan gopipol. Kalus yang dielisitasi dengan konsentrasi elisitor *S. cerevisiae* 0,5% (b/v) memproduksi kandungan gopipol tertinggi, yaitu sebesar 469,233 $\mu\text{g/g}$ BK, setelah 4 hari dielisitasi. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi elisitor merupakan faktor pembatas dalam sintesis gopipol, karena untuk meningkatkan kandungan gopipol diperlukan konsentrasi elisitor optimum. Isaac (1992) menyatakan bahwa jika elisitor sebagai efektor, maka konsentrasi elisitor optimum sangat bergantung pada jumlah reseptor yang terdapat pada sel tumbuhan.



Gambar 3. Pengaruh elisitasi terhadap kandungan gopipol pada kalus *G. hirsutum*.
K = konsentrasi elisitor

Waktu pemanenan juga dapat mempengaruhi kandungan gopipol karena adanya efek "post binding". Jadi untuk memproduksi gopipol kemungkinan diperlukan waktu untuk meningkatkan, menghambat, atau menurunkan aktivitas enzim setelah pengikatan elisitor oleh reseptor. Hasil penelitian Joost *et al.* (1995) menunjukkan bahwa peningkatan aktivitas mRNA untuk enzim HMGR pada tanaman kapas *G. hirsutum* terjadi 48 jam setelah diinjeksi dengan konidia *V. dahliae* yang telah diautoklaf. Setelah 96 jam ekspresi mRNA untuk enzim HMGR tersebut menurun mendekati produksi kontrol. Jadi produksi gopipol pada kultur kalus *G. hirsutum* setelah

elisitasi dipengaruhi oleh konsentrasi elisitor dan waktu pemanenan.

KESIMPULAN

1. Pemberian elisitor ekstrak *Saccharomyces cerevisiae* dengan konsentrasi dan waktu pemanenan yang berbeda berpengaruh secara nyata terhadap peningkatan produksi gopipol pada kultur kalus *Gossypium hirsutum* (13,764%-207.345%).
2. Konsentrasi terbaik elisitor ekstrak *S. cerevisiae* adalah 0.5% (b/v) dengan waktu panen hari ke 4. Kondisi ini meningkatkan kandungan gopipol pada kultur kalus *G. hirsutum* dari $114,460 \pm 0,258 \mu\text{g/g}$ BK.hingga $469,233 \pm 2,427 \mu\text{g/g}$ BK.

SARAN

Konsentrasi elisitor dan waktu panen termasuk faktor yang berperan dalam mempengaruhi produksi metabolit sekunder pada kultur kalus atau sel tumbuhan yang dielisitasi. Untuk memperoleh metabolit sekunder yang sangat tinggi, perlu diberikan konsentrasi elisitor yang lebih efektif dan waktu panen yang tepat.

DAFTAR PUSTAKA

- Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR and Yamada Y. 1984.** *Handbook of Plant Cell Culture*, 487-510 Third edition. Collier Macmillan London.
- Barz W, Bless W, Borger-Papendorf G, Gunia W, Makenborck U, Meier D, Otto CH and Super E. 1990.** Phytoalexin as the part of induced defense reaction in plants: Their elicitation, function, and metabolism. *Dalam: Bioactive Compound of Plants*, 141-156. Ciba Foundation Symposium 154. Wiley, Chichester.
- Bell AA. 1969.** Phytoalexin Production and *Verticillium* Wilt Resistance in Cotton. *Phytopathology* 59, 1119-1126.
- Buitelaar RM and Tramper I. 1991.** Strategies to Improve the Production of Secondary Metabolites With Plant Cell Culture, A Literature Review. *Dalam: Production and Excretion of Secondary Metabolites by*

- Plant Cell Cultures of Tagetes*, 5-15. Buitelaar, R.M. (Ed). Wageningen.
- Byun SY, Ryu YW, Kim P and Pederson H. 1992.** Elicitation of Sanguinarine Production on Two-Phase Culture of *Eschscholtzia californica*. *Fermentation and Bioengineering*, 73, 380-385.
- Endress, R. 1994.** *Plant Cell Biotechnology*, 240-245. Springer-verlag, Berlin Heidelberg.
- George EF and Sherrington PD. 1984.** *Plant Propagation By Tissue Culture*, 326-328. Exegetics.
- Hanh MG and Albersheim P. 1978.** Host-Pathogen Interactions. *Plant Physiology* 62,107-111.
- Hariyum A. 1986.** *Pembuatan Protein Sel Tunggal*, 12-19. Waca Utama Pramesti. Jakarta.
- Heinstein PF. 1985.** Future Approaches to the Formation of Secondary Natural Products in Plant Cell Suspension Cultures. *Journal of Natural Products* 48 (1), 1-9.
- Heinstein PF and El-Shagi H. 1981.** Formation of Gossypol by *Gossypium Hirsutum* L. Cell Suspension Cultures. *J. Natural Production* 44,1-6.
- Isaac S. 1992.** *Fungal plant interaction*, 186-206. Chapman and Hall, London.
- Jaroszewski JW, Hansen TS, Hansen SH, Thastrup O dan Kefod H. 1991.** On the Botanical Distribution of Chinal Forms of Gossypol. *Planta Media* 58, 454-458.
- Joost O, Bianchini G, Bell AA, Benedict CR and Magil CW. 1995.** Differential Induction of 3-Hydroxy-3-Methylglutanyl Coa Reductase in Two Cotton Species Following Inoculation with *Verticillium*. *MPMI* 8 (6), 880-885.
- Moat AG and Foster JW. 1995.** *Microbial Physiolog*, Ed 3, 21-22. John Wiley & Sons, New York.
- Nomeir AA and Abou-Donia MB. 1982.** Gossypol: High-Performance Liquid Chromatographic Analysis and Stability in Various Solvents. *JAOCS*. 59 (12), 546-549.
- Wiendi NMA, Wattimena GA dan Gunawan LW. 1992.** Produksi Senyawa Metabolit Sekunder dengan Kultur Jaringan. *Dalam: Bioteknologi Tanaman*, 169-219. Depdikbud-Direktorat Pendidikan Tinggi, Pusat Antar Universitas, IPB. Bogor.
- Purwianingsih W. 1997.** Efek Pemberian Homogenat *Verticillium dahliae* Kleb dan *Rhizoctonia solani* Kuhn sebagai Elisitor terhadap Kandungan Gosipol dalam Kultur Kalus *Gossypium hirsutum* L. *Tesis Paska Sarjana ITB*, 20-27. Bandung.
- Robinson T. 1991.** *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, 154. Penerjemah Padmawinata, K. ITB. Bandung.
- Roos W, Evers S, Hieke M, Tschope M and Schumann B. 1998.** Shifts of intracellular Ph Distribution as Part of the Signal Mechanism Leading to the Elicitation of Benzophenanthrodine Alkaloids. *Plant Physiol.* 118, 349-364.
- Schmidt JH and Wells R. 1990.** Evidence for the Presence of Gossypol in Malvaceous Plant Other Than Those In The Cotton Tribe. *Agric and Food Chem.* 38, 505-50.
- Suvarnalatha G, Rajendran L, Ravishandar GA and Venkataraman LV. 1994.** Elicitation of Anthocyanin Production in Cell Cultures of Carrot (*Daucus Carota* L.) by Using Elicitors and Abiotic Stress. *Biotechnology Letters*. 16 (12), 1275-1280.
- Tang W and Eisenbrand G. 1992.** *Chinese Drugs of Plant Origin*, 403-404 Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.
- Threlfall DR and Whitehead IM. 1991.** Terpenoid Phytoalexins: Aspects of Biosynthesis, Catabolism, and Regulation. *Dalam: Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*, 159-208. Oxford University.
- Van der Plas LHW, Eijkelboom C and Hagendoorn MJM. 1995.** Relation between Primary and Secondary Metabolism in Plant Cell Suspension. Competition between Secondary Metabolite Production and Growth in a Model System (*Morinda citrifolia*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 43,111-116.
- Yulia D. 1999.** Perbandingan Kandungan Gosipol pada Kalus *Gossypium Hirsutum* L. dan *Gossypium herbaceum* L. yang Dielisisasi dengan *Rhizoctonia*. *Tesis Paska Sarjana ITB*, 48, Bandung.