

POLA PRODUKSIAJMALISIN DARIKULTUR AGREGAT SEL
Catharanthus roseus (L) G Don. DALAM BIOREAKTOR
[Production Pattern of Ajmalicine in *Catharanthus roseus* (L) G Don.
Cell Aggregates Culture in The Bioreactor]

Aida Muspiah¹, Rizkita Rahmi Esyanti²E³, Arbayah H Siregar³ dan Erman Tritama

Departemen Biologi Institut Teknologi Bandung

Jl. Ganesha 10 Bandung, 40154

Telp. (022)2509172 ext. 3177

Email: 'aida29@bi.itb.ac.id, ²rizkita@bi.itb.ac.id, ³arbayah@bi.itb.ac.id

ABSTRACT

A research has been conducted to optimize the rate of aeration and initial cell aggregates weight in the production of ajmalicine in *Catharanthus roseus* cell culture in bioreactor. *Catharanthus roseus* culture were grown in Zenk medium with the addition of 2.5×10^{-6} M NAA ('naphthalene acetic acid') and 10^{-4} M BAP ('benzyl amino purine'). Cell aggregates were subcultured two times before transferring 20 and 30 g/fw of cell aggregates into bioreactor, respectively, and aerated with the rate of 0.2460 L/min and 0.3405 L/min, respectively. The pattern of ajmalicine production in bioreactor were observed every 3 days for 24 days. Qualitative and quantitative analysis were conducted using HPLC connected to Cromatopac CL-7APlus. The results showed that the cell aggregates and medium contain ajmalicine. The highest concentration was obtained in combination of 30 g/fw and 0.3405 L/min aeration compare to 20 g/fw - 0.246 L/min, 20 g/fw - 0.3405 L/min, as well as 30 g/fw - 0.2460 L/min. The highest ajmalicine content in cell aggregates was obtained on the 12th days (79.23 µg/g) whilst in medium was obtained in the 18th days (981.15 µg/L).

Kata kunci/ key words: Ajmalisin/ajmalicine, kultur agregat sel/cell aggregates culture, *Catharanthus roseus*, bioreaktor/ bioreactor

PENDAHULUAN

Ajmalisin merupakan senyawa yang termasuk dalam kelompok monoterpen indol alkaloid, dihasilkan oleh tanaman *Catharanthus roseus* dan berguna sebagai obat antihipertensi (Zenk, 1977). Kebutuhan akan senyawa tersebut terus meningkat setiap tahunnya, oleh karena itu senyawa ini potensial untuk diproduksi dalam jumlah banyak dan waktu yang singkat, karena diperlukan sekitar 3600 kg per tahun (Verpoorte dan Van der Heijden, 1991).

Kultur jaringan tumbuhan merupakan metoda alternatif untuk menghasilkan metabolit sekunder karena mempunyai beberapa keuntungan, diantaranya adalah. dapat dihasilkan pada kondisi lingkunganyang, terkontrol serta tidak tergantung pada iklim dan kondisi tanah, kultur bebas dari kontaminasi mikroba dan insekta, sel-sel dapat dengan mudah diperbanyak untuk memproduksi metabolit spesifik, serta metabolit sekunder yang dihasilkan mudah untuk dimurnikan (Fowler, 1983).

J., = Pada penelitian Ratnasari (1999) peningkatan ajmalisin masih dilakukan dalam skala yang kecil, yaitupada Erlenmeyer 125 ml. Oleh karena itu untuk

produksi ajmalisin yang lebih banyak diperlukan peningkatan skala dari Erlenmeyer ke bioreaktor. Bioreaktor memiliki banyak keuntungan untuk kultivasi sel tumbuhan, yaitu memberikan kontrol yang lebih baik untuk produksi senyawa bioaktif skala besar pada kultur suspensi sel, memungkinkan pengaturan kondisi secara konstan pada setiap fase, penanganan kultur seperti inokulasi atau pemanenan lebih mudah dan menghemat waktu, serta pemberian nutrisi dapat mempercepat laju multiplikasi dan kandungan bioaktifnya (Fulzele, 2000). Shuler dan Kargi (1992) juga menyatakan bahwa kultur suspensi sel di dalam bioreaktor akan menghasilkan metabolit sekunder yang lebih banyak dan dalam waktu yang lebih singkat, bila dibandingkan dengan yang terjadi di alam. Sebagai contoh, tanaman *Lithospermum erythrorhizon* menghasilkan sikonin 1 - 2% BK setelah berumur lebih dari 5 tahun, sedangkan dalam kultur sel dengan menggunakan bioreaktor mampu memproduksi sekitar 14% BK sikonin dalam waktu 3 minggu. Selain itu reaktor yang menggunakan pengangkutan agregat sel dengan udara akan menghasilkan biomasa sel dan produksi metabolit sekunder yang tinggi, karena ripe

reaktor ini memberikan pola-pola pengadukan yang seragam dan cocok untuk kultur suspensi sel tanaman, sehingga sel tidak mengendap di dasar bioreaktor (Kargi dan Rosenberg, 1987).

Berdasarkan uraian diatas, maka dilakukan penelitian mengenai pola produksi ajmalisin dari kultur agregat sel *Catharanthus roseus* (L.) G Don. dalam bioreaktor. Adapun bioreaktor yang digunakan pada penelitian ini adalah ripe 'bubble column and airlifffreactor'.

BAHAN DAN CARA KERJA

Tanaman yang digunakan sebagai eksplan

Tanaman yang digunakan sebagai sumber eksplan adalah *Catharanthus roseus* (L.) G Don. yang berbunga merah muda dan berumur kurang lebih 3 bulan.

Induksi kalus dan agregat sel

Eksplan daun ditanam pada medium padat Zenk dengan penambahan kombinasi zat pengatur tumbuh (zpt) $2,5 \times 10^{-6}$ M AsamNaftalen Asetat (NAA) dan 10^{-5} M 6-Benzilaminopurine (BAP) (Fitriani, 1998). Kalus yang terbentuk setelah 1 bulan selanjutnya disubkultur ke medium cair dengan konsentrasi zpt yang sama dengan medium padat. Kultur cair diagitasi dengan kecepatan 120 rpm dn kultur diinkubasi pada suhu kamar dengan kondisi gelap.

Optimasi laju aerasi, berat awal agregat dan penentuan pola produksi ajmalisin

Optimasi laju aerasi, berat awal agregat dan penentuan pola produksi ajmalisin pada bioreaktor dilakukan dalam bioreaktor berukuran 1,5 L. Kultur agregat sel, masing-masing sebanyak 10, 20, 30 dan 40 g dimasukkan ke dalam bioreaktor dengan laju masing-masing 0,2460 L/menit, 0,3405 L/menit dan 0,4350 L/menit.

Penentuan kurva kandungan ajmalisin

Kurva kandungan ajmalisin diperoleh dengan menghitung kandungan ajmalisin di dalam agregat dan medium setiap tiga hari sekali selama 24 hari.

Ekstraksi bahan

Agregat sel dikeringkan dengan 'freezedryer'. Bahan kering dan medium diekstraksi dengan metode Lee *et al.* (1981 dalam Asada dan Shuler, 1989).

Analisis kualitatif dan kuantitatif dengan KCKT

Analisis kualitatif dan kuantitatif untuk ajmalisin dilakukan dengan alat KCKT yang dihubungkan dengan kromatopak Shimadzu CR-7A plus. Fase gerak yang digunakan berupa larutan yang terdiri dari metanol : asetonitril : 5 mM diamonium hidrogen fosfat = 3 : 4 : 3 secara isokratik. Kecepatan aliran diatur 1 ml per menit. Jenis kolom yang digunakan adalah shim-pack CLC-ODS C18 0,15 m diameter 0,6 mm. Panjang gelombang UV yang digunakan adalah 298nm (Sims *et al.*, 1994).

HASIL

Induksi kalus dan agregat sel

Pada potongan daun *C. roseus* yang ditanam pada medium Zenk dengan penambahan kombinasi zat NAA $2,5 \times 10^{-6}$ M dan BAP 10^{-5} M terbentuk kalus kompak yang berwarna coklat Inisiasi kalus terlihat seminggu setelah penanaman (Morris, 1986; Fitriani, 1998; Ratnasari, 1999).

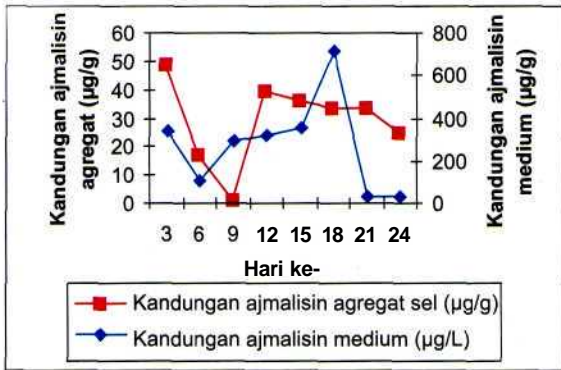
Kalus kompak yang dimasukkan kedalam medium cair Zenk dengan kombinasi zpt yang sama dengan medium padat digolongkan sebagai kultur agregat karena ukuran diameternya bervariasi dari 2 -7 mm dan dapat mengandung lebih dari 200 sel dengan komposisi sel yang homogen dan belum terdiferensiasi (Endress, 1994).

Optimasi laju aerasi, berat agregat sel awal dan penentuan pola produksi ajmalisin

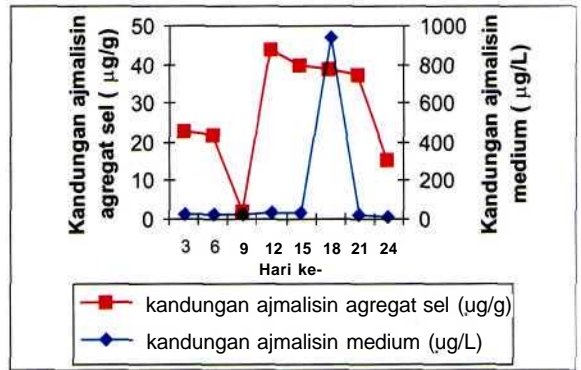
Hasil optimasi pendahuluan menunjukkan bahwa berat agregat sel awal yang dapat digunakan adalah 20 g dan 30 g, dengan laju aerasi masing-masing 0,2460 L/menit dan 0,3405 L/menit. Pola produksi ajmalisin diperlihatkan pada Gambar 1, 2, 3 dan 4, dengan kandungan ajmalisin terbanyak pada berat agregat awal 30 g dan laju aerasi 0,3405 L/menit.

Kurva kandungan ajmalisin

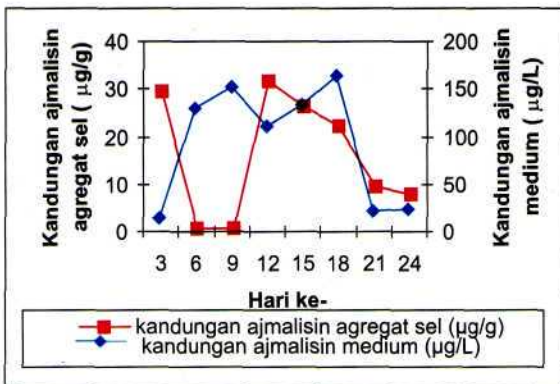
Kandungan ajmalisin sudah terdeteksi pada hari ke-3 dan mengalami penurunan pada hari ke-6 dan ke-9. Pada hari ke-12 ajmalisin mencapai jumlah terbanyak di agregat sel dan mengalami penurunan sampai hari ke-24, sedangkan pada medium terbanyak pada hari ke-18 dan selanjutnya mengalami penurunan sampai hari ke-24 (Gambar 1, 2, 3 dan 4).



Gambar 1. Kandungan ajmalisin pada agregat sel dan medium, berat agregat awal 20 g, aerasi 0,246 L/menit.



Gambar 2. Kandungan ajmalisin pada agregat sel dan medium, berat agregat awal 30 g, aerasi 0,246 L/menit.



Gambar 3. Kandungan ajmalisin pada agregat sel dan medium, berat agregat awal 20 g, aerasi 0,3405L/menit.



Gambar 4. Kandungan ajmalisin pada agregat sel dan medium, berat agregat awal 30 g, aerasi 0,3405L/menit.

PEMBAHASAN

Induksi kalus dan agregat sel

Kalus yang terbentuk pada medium Zenk (1997) dengan penambahan $2,5 \times 10^{-6}$ M NAA dan 10^{-5} M BAP, merupakan kalus kompak yang berwarna coklat. Terbentuknya kalus kompak tersebut diduga disebabkan oleh penggunaan NAA sebagai sumber auksin, sebab NAA tidak menginduksi sintesis enzim selulase dan pektinase yang mempunyai aktivitas lisis terhadap lamela tengah. Akibat tidak terjadinya lisis pada lamela tengah, maka ikatan antara sel menjadi tidak renggang dan memberikan struktur yang kompak (Krishnamoorthy, 1981).

Warna coklat pada kalus diduga karena adanya metabolit sekunder yang diproduksi oleh kalus. Menurut Morris (1986), kalus yang diinduksi pada

medium Zenk berwarna coklat dan produksi alkaloidnya tinggi. Perubahan warna juga diduga karena adanya sintesis senyawa fenolik akibat adanya cekaman berupa pelukaan pada jaringan. Pernyataan tersebut diperkuat oleh George dan Sherrington (1984), yang menyatakan bahwa terjadinya pencoklatan pada jaringan karena aksi polifenol oksidase dan tirosinase yang disintesis akibat dari oksidasi jaringan ketika terluka.

Terbentuknya kultur agregat sel dapat disebabkan oleh pemilihan jenis zat pengatur tumbuh yang digunakan (Bhojwani dan Razdan, 1991; Morris, 1986). Selain itu Fowler (1983) menyatakan tidak terpisahnya sel-sel pada agregat dapat disebabkan oleh adanya sekresi senyawa polisakarida yang melekat pada permukaan sel. Fuller dan Barlett (1983 dalam

Tramper dan Hulst, 1992) menyatakan bahwa kultur agregat sel merupakan sel amobil secara alamiah. Pada sel amobil pertumbuhan selnya rendah tetapi produksi metabolit sekundernya tinggi (Lindsey dan Yeomann, 1983).

Optimasi laju aerasi, berat agregat sel awal dan penentuan pola produksi ajmalisin

Berat agregat sel awal yang digunakan adalah 20 g dan 30 g dengan laju arasi masing-masing 0,2460 L/menit dan 0,3405 L/menit. Hasil penelitian pada berat agregat sel awal 10 g menunjukkan bahwa sel terangkat dengan sempurna, akan tetapi terbentuk busa yang menutupi seluruh permukaan bagian dalam dari bioreaktor lima hari setelah agregat sel dimasukkan ke dalam bioreaktor, yaitu pada laju 0,246 L/menit dan 0,3405 L/menit. Pada laju aerasi 0,4350 L/menit terbentuk busa setelah dua hari. Terbentuknya busa kemungkinan disebabkan oleh laju aerasi yang tinggi, sehingga akan membentuk gelembung udara yang banyak, dan menutupi permukaan bioreaktor. Terbentuknya busa juga akan menutupi seluruh permukaan kultur, sehingga menghentikan sirkulasi udara di dalam bioreaktor dan mengakibatkan terjadinya kontaminasi pada kultur (Taticek *et al.*, 1991). Taticek *et al.* (1991) juga menambahkan bahwa terbentuknya busa tersebut selain disebabkan oleh laju aerasi juga disebabkan oleh komposisi medium, viskositas kultur, struktur fisik dari bioreaktor yang digunakan dan keberadaan sel-sel tersebut.

Inokulum agregat sel dengan berat awal 40 g, tidak teraduk pada laju aerasi 0,246 L/menit maupun 0,3405 L/menit. Hal ini disebabkan jumlah agregat selnya terlalu banyak, sehingga menyebabkan masalah dalam pengadukan. Akibatnya sel akan mengendap pada permukaan bawah bioreaktor dan mengalami kekurangan oksigen. Konsentrasi oksigen yang terlarut selama kultur cair memiliki pengaruh kuat dalam aktivitas mitosis dan merupakan penyebab utama dalam rata-rata tingkat pertumbuhan. Selain itu apabila sel mengendap akan mengakibatkan kematian karena tidak ada oksigen terlarut. Oksigen diperlukan untuk pertumbuhan sel dan produksi metabolit sekunder (Taticek *et al.*, 1991).

Kurva kandungan ajmalisin

Ajmalisin pada sel sudah terdeteksi pada hari ke-3 sebagai hasil sintesis pada saat subkultur sebelumnya. Kandungan ajmalisin tersebut menurun pada hari ke-6 hingga ke-9, hal ini kemungkinan disebabkan oleh terjadinya degradasi dan polimerasi oleh enzim peroksidase maupun enzim hidrolitik yang disintesis selama periode kultur (Endress, 1994). Pada hari ke-12 kandungan ajmalisin dalam sel mencapai optimum. Peningkatan kandungan ajmalisin terjadi karena ajmalisin disintesis pada fase pertumbuhan (Endress, 1994).

Pada hari ke-18, kandungan ajmalisin di dalam medium mengalami peningkatan karena ajmalisin disekresikan ke dalam medium. Peningkatan ajmalisin di medium diduga disebabkan oleh pH di dalam sel lebih tinggi dibandingkan dengan pH di medium. PH medium pada hari ke- 15 berkisar antara 5,4 - 5,6 sedangkan pada hari ke-18 antara 4,6-4,8 (Tabel 1).

Hari	Pengukuran pH pada laju aerasi 0,2460 L/menit		Pengukuran pH pada laju aerasi 0,3405 L/menit	
	Berat agregat sel 20 g	Berat agregat sel 30 g	Berat agregat sel 20 g	Berat agregat sel 30 g
	3	5,9	5,9	5,8
6	5,7	5,7	5,7	5,8
9	5,4	5,4	5,4	5,4
12	5,4	5,4	5,4	5,4
15	5,5	5,6	5,4	5,4
18	4,6	4,7	4,7	4,8
21	5,5	5,5	5,5	5,5
24	5,4	5,4	5,4	5,4

Menurut Neumann *et al.* (1983), dalam keadaan vakuola lebih asam dari sitoplasma, alkaloid akan berpenetrasi melalui tonoplas ke dalam vakuola dalam bentuk tidak terprotonasi. Di dalam vakuola yang asam, alkaloid akan terprotonasi sehingga sulit untuk berpenetrasi kembali melalui tonoplas. Alkaloid terprotonasi di dalam sitoplasma akan mudah disekresikan ke dalam medium, terutama jika pH medium menjadi lebih rendah dari pH sitoplasma. Perubahan pH ini dapat diakibatkan oleh adanya hasil metabolime sekunder dan perubahan komposisi

medium selama kultur. Sekresi terjadi selain karena perubahan pH dapat pula terjadi oleh adanya lisis dan kematian sel (Neuman *et al.*, 1983).

Kandungan ajmalisin yang terbaik adalah pada berat agregat awal 30 g dan laju aerasi 0,3405 L/menit. Scragg *et al.* (1987 dalam Taticek *et al.*, 1991) menyatakan bahwa sel-sel tanaman yang dikultur pada laju aerasi yang tinggi sekitar (0,85 v.v.m) akan menghasilkan konsentrasi CO₂ sekitar 2-4%, hal ini akan menghambat laju pertumbuhan dan mereduksi biomasa sel. Menurut McHale *et al.* (1987), pertumbuhan kultur sel tumbuhan membutuhkan O₂ tidak terlalu tinggi, bahkan pada konsentrasi O₂ terlalu tinggi dapat menghambat pertumbuhan dan laju pembelahan sel, namun oksigen juga diperlukan untuk pertumbuhan sel dan produksi metabolit sekunder.

Jumlah agregat tinggi, 20-30% (v/v) diperlukan untuk meminimalkan fase lag dan meningkatkan pertumbuhan (Son *et al.*, 1999). Kozai (1991) melaporkan bahwa sel tumbuhan tidak akan tumbuh dengan normal pada kerapatan populasi yang terlalu rendah, sel teraduk pada berat agregat sel 10 g tetapi aerodinamis yang terbentuknya tidak baik. Kerapatan sel yang tinggi sangat menguntungkan pada kultur yang sangat lambat bahkan berat inokulum maksimum dapat sebesar 60 g/L (Tanaka, 1987), tetapi jika sel terlalu rapat akan menyebabkan masalah dalam pengadukan sehingga sel tidak akan terangkat sempurna dan produksi metabolit sekunder menjadi rendah (Taticek *et al.*, 1991).

KESIMPULAN

1. Kandungan ajmalisin tertinggi di dalam sel sebesar 79,23 µg/g pada hari ke-12, diperoleh pada jumlah agregat 30 g dengan laju aerasi 0,3405 L/menit.
2. Kandungan ajmalisin tertinggi di dalam medium sebesar 981,15 µg/L pada hari ke-18, diperoleh pada jumlah agregat 30 g dengan laju aerasi 0,3405 L/menit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kami sampaikan kepada Profesor Dr. Robert Verpoorte dan Maghdi dari Division of Pharmacognosy, Centre for Biopharmaceutical Sciences, Leiden University,

Netherland yang telah memberikan ajmalisin murni sebagai senyawa pembanding dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Asada M and Shuler ML. 1989.** Stimulation of ajmalicine production and excretion from *Catharanthus roseus*: Effect of adsorption *in situ*, elicitor and alginate immobilization. *Applied of Microbiology Biotechnology* 30, 475-481
- Bhojwani SS and Razdan MK. 1983.** *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Elsevier. Amsterdam, p. 25-71.
- Endress R. 1994.** *Plant Cell Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany, p. 173-255
- Fitriani A. 1998.** Pengaruh pemberian homogenat jamur *Phythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp terhadap kandungan ajmalisin dalam kultur kalus *Catharanthus roseus* (L.) G .Don. *Tesis Magister. Program Pascasarjana*. ITB. Bandung
- Fowler MW. 1983.** Comercial aplication and economic aspect of mass plant cell culture. Dalam : *Plant biotechnology*. Mantell, S.H and Smith, H (Eds). Cambridge University, p. 3-38.
- Fulzele DP. 2000.** *Bioreactor technology for large scale cultivation of plant cell suspension cultures and production of bioactive compounds*. <http://www.bat.erncf>. In/web.pages/letter/newsletter-year-2000/paper4(dpf)-24k.
- George EF and Sherington PD. 1984.** *Plant Propagation by Tissue Culture*. Eastern Press. Exegetic. England, p. 331-382.
- Kargi F and Rosenberg MZ. 1987.** Plant cell bioreactor: present status and future trends. *Biotechnol. Prog.* 3,1-8.
- Kozai T. 1991.** Photoautotrophic micropropagation. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant* 27, 47-51.
- Krishnamoorthy HN. 1981.** *Plant Growth Substances*. Including Applications in Agriculture. Tata McGraw-Hill Company Limited. New Delhi, p. 42-45
- Lindsey K and Yeoman MM. 1983.** Novel experiment system for studyng the production of secondary metabolites by plant tissue culture. Dalam : *Plant Biotechnology*. Mantell, S.H & Smith, H. (Eds). Cambridge University Press, p. 39-66.
- McHale NA, Zeltech J and Peterson RB. 1987.** Effects of CO₂ and O₂ on photosynthesis and growth of autotrophic tobacco callus. *Plantphysiol.* p. 84:1055.
- Morris P. 1986.** Regulation of product sunthesis in cell culture of *Catharanthus roseus*. III. Alkaloid metabolism in leaf tissue and primary callus. *Planta Medica*. 121,127-132.

- Neumann D, Krauss G, Hieke M and Groger D. 1983.** Indole alkaloid formation and storage in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta Medica*. 48,20-23.
- Ratnasari J. 1999.** Pengaruh pemberian ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae* Hansen) terhadap kandungan ajmalisin dalam kultur agregat sel *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Tests Magister*. ITB. Bandung.
- Shuler ML and Kargi F. 1992.** *Bioprocess engineering: basic concepts*. Prentice-hall, Inc. Englewood Cliffs. New Jersey, p. 232-307.
- Sim JS, Chang NH, Liu RJ and Jung HK. 1994.** Production and secretion of indol alkaloids in hairy root cultures of *Catharanthus roseus*: Effects of in-situ adsorption, fungal elicitation and permeabilization. *Jurnal of Fermentation and Bioengineering* 78,229-234.
- Son SH, Choi SM and Kwon SR. 1999.** Large-scale culture of plant cell and tissue by bioreactor system. *Plant Biotechnol* 1, 1-8.
- Taticek RA, Moo-Young M and Legge RL. 1991.** The scale-up of plant cell culture: Engineering considerations. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* 24, 139-158
- Tramper J and Hulst A C. 1992.** Immobilized plant cell: A literature survey. Dalam : *Plant Cell: Immobilized and Oxygen Transfer*. Wageningen. Netherland. p. 3-17.
- Verpoorte R and Van der Heijden R. 1991.** Plant biotechnology for the production of alkaloids; Present status and prospect. In : *The Alkaloids* 40, 87-142.
- Zenk MH, El-Shagi H, Stockigt J, Weiler EW and Deus B. 1977.** Formation of the indole alkaloids serpentin and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* Dalam *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application*. Barz, W., Reinhard, E. and Zenk Springer - Verlag. Berlin Heidelberg. New York.