

PENGARUH PEMBERIAN ELISITOR EKSTRAK KHAMIR *Saccharomyces cerevisiae* Hansen TERHADAP KANDUNGAN AJMALISIN DALAM KULTUR AGREGAT SEL *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

[The Effect of Elicitation by Using Extract of *Saccharomyces cerevisiae* Hansen on Ajmalicine Content in Cell Aggregates Culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.]

Jujun Ratnasari^{E1}, Arbayah H Siregar**, dan Rizkita RE***

Biologi, Institut Teknologi Bandung

Jl. Ganesha No.10 . Telp. (022) 2509172 ext: 3177

*e-mail: irratnasari@yahoo.com; **e-mail: arbayah@bi.itb.ac.id;

***e-mail: [rizkita\(S\).bi.itb.ac.id](mailto:rizkita(S).bi.itb.ac.id)

ABSTRACT

There were many ways to obtain high production of secondary metabolites in plant tissue culture; among the other is elicitation. An experiment to study the effect of elicitor derived from *Saccharomyces cerevisiae* Hansen extract on ajmalicine content in cell aggregates culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, has been conducted. The media used for callus induction and cell aggregates culture were Zenk (1977) with addition of 2.5×10^{-6} M Naphthalene Acetic Acid (NAA) and 10^{-5} M 6-Benzilaminopurine (BAP). The cell aggregates culture was subcultured three times and then elicited with elicitor derived from autoclaved *S. cerevisiae* extract at concentrations 0.5, 1.0, 2.5%, and harvested at 18, 24, and 36 hours after elicitation. The ajmalicine was analyzed qualitatively and quantitatively by using High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) connected to chromatopack CR-7A Plus. The cell aggregates of *C. roseus* culture produced ajmalicine both in the cells and the media. The result of elicitation showed that ajmalicine content was influenced significantly by concentration and harvesting time. The highest ajmalicine content in the cell aggregates was 25.288 ± 0.102 jig/g dw, whilst that in media was 524.600 ± 0.566 \\ML. The optimum concentration of *S. cerevisiae* extract was 0.5%, and the best harvesting time was 24 hours.

Kata kunci/ key words: Ajmalisin/ajmalicine; elisitor/elicitor; *VhsraitlSaccharomyces cerevisiae*; kultur agregat sel/cell aggregates culture; *Catharanthus roseus*.

PENDAHULUAN

Ajmalisin adalah metabolit sekunder dari golongan alkaloid indol yang dihasilkan oleh tanaman *Catharanthus roseus* dan berguna sebagai obat anti hipertensi (Zenk, 1977). Senyawa ini potensial untuk diproduksi dalam jumlah tinggi dan waktu singkat, karena sekitar 3600 kg diperlukan per tahun (Verpoorte, 1991).

Kultur jaringan tumbuhan merupakan teknologi alternatif untuk menghasilkan metabolit sekunder karena mempunyai beberapa keuntungan, diantaranya adalah penggunaan lahan sedikit, kualitas produk yang dihasilkan lebih konsisten dan dapat dihasilkan terus menerus, serta metabolit sekunder yang dihasilkan mudah untuk dimurnikan (Fowler, 1983). Produksi metabolit sekunder ini dapat menggunakan kultur kalus maupun kultur suspensi. Kultur suspensi diantaranya adalah kultur agregat sel. Salah satu keuntungan dari kultur ini

adalah laju pertumbuhan selnya relatif lebih cepat, karena sel langsung kontak dengan medium. Namun demikian, pada beberapa kultur produksi metabolit sekundernya relatif masih rendah (Lindsey dan Yeoman, 1983). Untuk mengatasi masalah tersebut dapat digunakan teknik elisitasi (Buitelaar, 1991).

Elisitasi adalah teknik pemberian materi abiotik maupun biotik ke dalam sel tumbuhan sehingga produksi metabolit sekunder tumbuhan dapat meningkat, sebagai respon tumbuhan dalam mempertahankan diri (Buitelaar, 1991). Elisitasi pada kultur suspensi *C. roseus* dengan menggunakan elisitor jamur *Pythium aphanidermatum* berhasil meningkatkan produksi ajmalisin sebanyak 53 kali lipat, sedangkan khamir *Rhodotorula rubra* hanya mampu meningkatkan sepertiganya (Eilert, 1986). Adapun khamir *Saccharomyces cerevisiae* mampu meningkatkan produksi antosianin

sebanyak 58% pada kultur suspensi *Daucus carota* (Sim, 1994).

Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan kandungan ajmalisin pada kultur agregat sel *C. roseus* dengan pemberian elisitor ekstrak khamir *S. cerevisiae* dan untuk menentukan konsentrasi elisitor serta waktu panen optimum yang dapat digunakan untuk meningkatkan produksi ajmalisin.

BAHAN DAN METODE KERJA

Pemeliharaan khamir *Saccharomyces cerevisiae*

Khamir *S. cerevisiae* ditumbuhkan pada medium padat GYE ('glucose yeast extract') (Salle, 1969) kemudian diaktivasi dalam medium cair GYE, serta dikocok pada kecepatan 100 rpm.

Penentuan kurva tumbuh khamir

Kurva tumbuh dibuat dengan menghitung jumlah sel khamir setiap dua jam sekali selama 24 jam dengan metode 'plate count'. Khamir pada fase pertumbuhan maksimum digunakan sebagai bahan elisitor (Eilert, 1986).

Persiapan bahan elisitor

Khamir yang berada pada fase pertumbuhan maksimum dipanen dan diekstraksi dengan cara dipanaskan terlebih dahulu dalam otoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 lb/inc² selama 15 menit. Sel dikeringkan dan digerus sehingga terbentuk serbuk khamir. Serbuk khamir ditimbang sesuai dengan konsentrasi yang akan digunakan, kemudian dilarutkan dalam akuades steril dan disterilisasi kembali dalam otoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 lb/inc² selama 15 menit.

Induksi kalus

Eksplan daun ditanam pada medium padat Zenk dengan penambahan kombinasi zat pengatur tumbuh (zpt) 2,5 x 10⁶ M Asam Naftalen Asetat (NAA) dan 10⁻⁵ M 6-Benzilaminopurine (BAP) (Fitriani, 1998).

Penentuan kombinasi zpt terbaik medium cair Zenk

Kalus dari medium padat dimasukkan ke dalam medium cair Zenk dengan 16 kombinasi zpt. Kisaran zpt yang digunakan adalah 0 - 2,5 x 10⁻⁶ M NAA dan 0 - 10⁻⁵ M BAP. Evaluasi kombinasi zpt terbaik didasarkan pada berat kering agregat sel serta kandungan ajmalisin di dalam sel dan medium.

Kurva tumbuh agregat sel dan kurva kandungan ajmalisin

Kurva tumbuh agregat sel dibuat dengan menimbang berat kering (BK) agregat sel sedangkan kurva kandungan ajmalisin diperoleh dengan menghitung kandungan ajmalisin di dalam agregat dan medium setiap dua hari selama 20 hari, dari kurva-kurva tersebut dapat ditentukan waktu yang terbaik untuk melakukan elisitasi.

Elisitasi

Elisitasi dilakukan dengan cara menambahkan 5 mL ekstrak khamir *S. cerevisiae* pada konsentrasi 0,5, 1,0 dan 2,5% ke dalam kultur agregat sel *C. roseus* subkultur ke-3; untuk kontrol dilakukan penambahan akuades steril. Pemanenan dilakukan pada 0, 18, 24, dan 36 jam setelah elisitasi dilakukan (Eilert, 1986; Fitriani, 1998).

Ekstraksi bahan

Agregat sel dan medium dipisahkan setelah dielisitasi. Agregat sel dikeringkan dalam oven bersuhu 50°C. 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 menggunakan alat KCKT yang dihubungkan dengan kromatopak CR-7A Plus. Fase gerak yang digunakan adalah

metanol : asetonitril : 5 mM diamonium hidrogen fosfat = 3:4:3 secara isokratik dengan kecepatan aliran 1 mL/menit. Panjang gelombang yang digunakan adalah 298 nm dengan jenis kolom Shimpack CLC-ODS 0,15 m diameter 6,0 mm (Sims *etal.*, 1994).

Uji statistik

Uji statistik untuk mengetahui pengaruh pemberian elisitor ekstrak khamir *S. cerevisiae* terhadap kandungan ajmalisin dalam agregat sel *C. roseus* dilakukan dengan analisis varian (ANAVA) dalam rancangan acak lengkap (RAL) dengan tingkat kepercayaan 95%. Jika terlihat ada perbedaan nyata, maka dilanjutkan dengan DMRT (Duncan Multiple Range Test) dengan tingkat kepercayaan 95%. Uji statistik dilakukan dengan menggunakan program statistik SPSS for Windows Release 6.0 (1993).

HASIL

Kurva tumbuh khamir

Kurva tumbuh khamir menunjukkan bahwa fase pertumbuhan maksimum terjadi setelah 16 jam inkubasi. Pada fase tersebut, biomasa khamir diharapkan sudah mencapai tingkatan maksimum, mengingat komponen yang akan digunakan sebagai elisitor adalah derivat dari dinding sel khamir, yang diperkirakan berupa glukukan (Funk, 1987; Hahn, 1996).

Induksi kalus

Potongan daun *C. roseus* yang ditanam pada medium padat Zenk dengan kombinasi zpt $2,5 \times 10^{-6}$ M NAA dan 10^{-5} M BAP mulai menunjukkan pertumbuhan kalus pada hari ke-7. Kalus yang terbentuk adalah kalus kompak, yang pada awal pertumbuhannya berwarna putih, kemudian lama kelamaan warna kalus berubah menjadi coklat. Hal yang sama terjadi pada penelitian Morris (1986) dan Fitriani (1998).

Penentuan kombinasi zpt terbaik untuk medium cair Zenk

Kombinasi zat pengatur tumbuh terbaik diperoleh pada penambahan $2,5 \times 10^{-6}$ M NAA dan 10^{-5} M BAP. Pada kombinasi tersebut berat kering sel mencapai berat kering tertinggi dibandingkan kombinasi lainnya, serta kandungan ajmalisin di dalam agregat dan medium relatif cukup tinggi. Kombinasi zpt terbaik ini kemudian digunakan untuk penelitian selanjutnya.

Kurva tumbuh agregat sel

Dari kurva tumbuh yang berdasarkan berat kering (BK) agregat sel (Gambar 1) dapat dilihat bahwa agregat sel mengalami fase log pada 0-4 hari, kemudian fase log pada 6-12 hari, dan untuk selanjutnya mengalami fase stationer sampai hari ke-20. Adapun ajmalisin dalam agregat sel sudah terdeteksi pada hari ke-0, kemudian turun pada hari ke-2 dan 4, namun naik lagi dan mencapai puncaknya pada hari ke-6, pada saat pertumbuhan agregat sel mengalami fase akselerasi (Gambar 1).

PEMBAHASAN

Kurva tumbuh khamir

Ekstrak khamir digunakan sebagai elisitor pada saat biomasanya mencapai maksimum, dengan harapan bahwa derivat dinding sel khamir yang berupa glukukan, kualitas dan kuantitasnya telah mencapai optimum. Glukukan dari ekstrak khamir secara alamiah diperkirakan mempunyai "binding site" yang sesuai dengan reseptor yang ada pada agregat sel dan mampu berkompetisi dibandingkan dengan glukukan sintetis (Hahn, 1996).

Induksi kalus

Kalus yang terbentuk dalam medium Zenk (1977) dengan penambahan $2,5 \times 10^{-6}$ M NAA dan 10^{-5} M BAP, merupakan kalus kompak yang berwarna coklat. Terbentuknya kalus kompak tersebut dapat disebabkan oleh penggunaan NAA

sebagai sumber auksin bukan pengaruh dari 2,4-D. 2,4-D hanya berperan dalam pemisahan sel ketika terjadi pembelahan (Bhojwani dan Razdan, 1983), yaitu dengan menginduksi sintesis enzim selulase dan pektinase yang mempunyai aktivitas sitolisis (Endress, 1994).

Penentuan kombinasi zpt terbaik untuk medium cair Zenk

Kombinasi zpt terbaik ditentukan berdasarkan berat kering agregat sel yang tertinggi, serta kandungan ajmalisin di dalam sel maupun di dalam medium yang relatif cukup tinggi. Pierik (1987) menyatakan bahwa biomasa yang tinggi dapat lebih mudah untuk diberi perlakuan, karena viabilitas selnya tinggi sehingga dapat diinduksi untuk menghasilkan metabolit sekunder yang tinggi.

Kurva tumbuh agregat sel

Pada hari ke-2 dan 4 kandungan ajmalisin pada sel terlihat rendah, sebab banyak disekresikan ke dalam medium. Hal tersebut dapat dilihat dari hasil analisis ajmalisin dalam medium mulai hari ke-2, kandungan ajmalisin terus meningkat dan mencapai puncaknya pada hari ke-10 (Gambar 2). Ajmalisin disekresikan ke dalam medium karena pH di dalam sel lebih tinggi dibandingkan dengan pH medium. Perubahan pH ini terjadi oleh adanya akumulasi metabolit sekunder, dan komposisi medium yang digunakan. Sekresi terjadi selain karena perubahan pH, dapat pula terjadi oleh adanya lisis atau kematian sel (Neumann, 1983). Ketika kondisi sitosol lebih asam dibandingkan dengan vakuola, maka ajmalisin akan terprotonasi dan disimpan dalam sitosol, sehingga pada saat terjadi lisis sel, ajmalisin akan lebih mudah disekresikan ke dalam medium dari sitosol. Begitu pula bila medium lebih asam daripada sitosol, maka ajmalisin akan lebih mudah berpenetrasi melalui membran dan dinding sel sehingga akan terprotonasi dan disimpan di dalam medium (Neumann, 1983).

Pengaruh pemberian elisitor terhadap kandungan ajmalisin

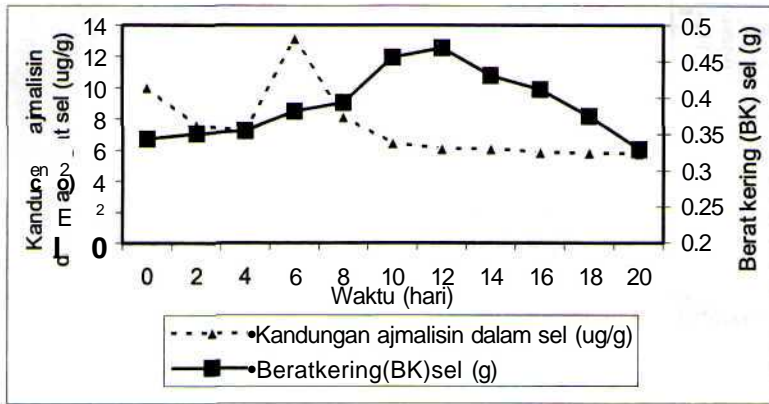
Elisitasi pada kultur agregat sel *C. roseus* dapat meningkatkan kandungan ajmalisin, namun diiringi dengan penurunan berat kering sel dan terjadinya pencoklatan pada agregat sel dan medium. Pencoklatan pada *C. roseus* dapat disebabkan oleh terjadinya sintesis senyawa fenolik DHBA (asam 2,3-dihidro benzoat), sedangkan penurunan berat kering dapat disebabkan oleh adanya perebutan prekursor antara metabolisme primer dan sekunder, selain disebabkan pula oleh terhambatnya aktivitas enzim IPP isomerase yang menyebabkan akumulasi skualen terhambat. Skualen merupakan prekursor biosintesis triterpen dan fitosterol yang dibutuhkan untuk multiplikasi sel (Moreno, 1994b).

Dari Gambar 3 dan 4 dapat dilihat bahwa elisitasi dengan ekstrak khamir *S. cerevisiae* dapat digunakan untuk meningkatkan kandungan ajmalisin. Persentase peningkatan kandungan ajmalisin terbaik di dalam agregat dan medium diperoleh pada pemberian konsentrasi elisitor 0,5% dan waktu panen 24 jam. Kandungan ajmalisin tertinggi dalam sel sebesar $25,288 \pm 0,102 \mu\text{g/g BK}$ dengan persentase peningkatan sebesar 108,440% (Gambar 3), sedangkan kandungan ajmalisin tertinggi dalam medium sebesar $524,600 \pm 0,566 \mu\text{L/L}$ dengan persentase peningkatan sebesar 216,508% (Gambar 4).

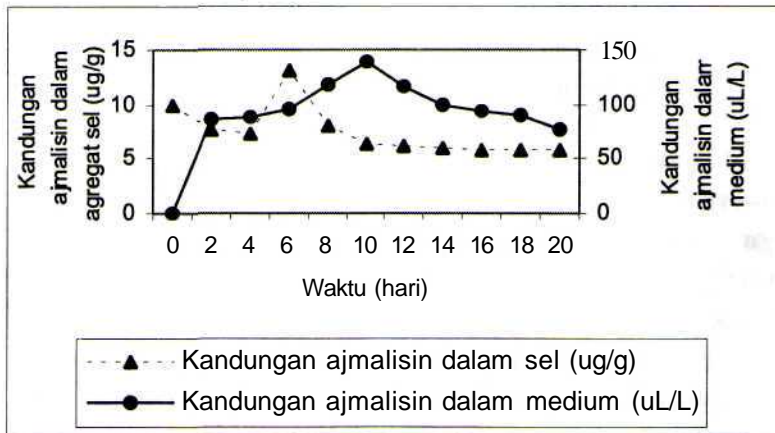
Konsentrasi elisitor dan waktu panen optimum sangat berpengaruh terhadap mekanisme 'effect post binding', yaitu proses yang diawali dengan berikatannya elisitor dengan reseptor, kemudian induksi 'secondary messenger' Ca^{2+} dan kalmodullin yang akan menginduksi protein kinase untuk berperan dalam induksi transkripsi gen *tdc*, *as*, dan *sss* sehingga translasi enzim TDC (triptofan dekarboksilase), AS (antranilat sintase), dan SSS (striktosidin sintase) yang terlibat dalam pembentukan prekursor pada pembentukan ajmalisin dapat meningkatkan enzim TDC dan AS yang berperan dalam sintesis dan akumulasi

triptamin, sedangkan enzim SSS berperan dalam kondensasi triptamin dan sekologanin menjadi striktosidin (Moreno, 1994a). Eilert (1986) dan Moreno (1994b) melaporkan bahwa elisitasi kultur

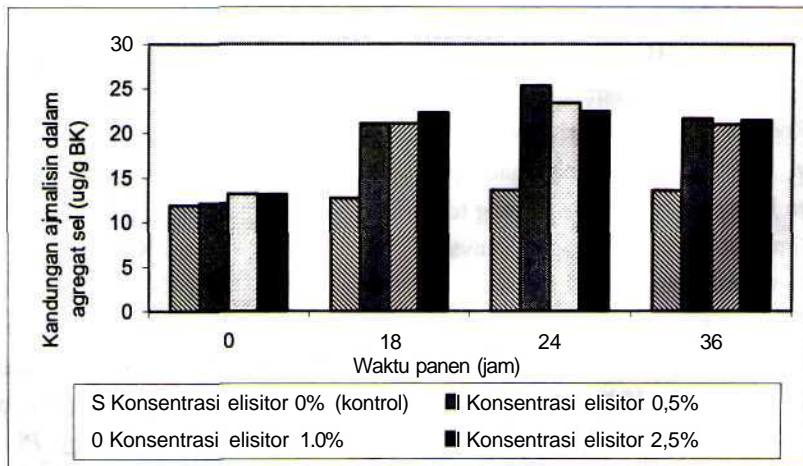
suspensi sel *C. roseus* dengan konsentrasi *Pythium aphanidermatum* 5% dan waktu panen 18 jam dapat menginduksi transkripsi gen *tdc*, *as* dan *sss*, sehingga produksi ajmalisin meningkat 53 kali.



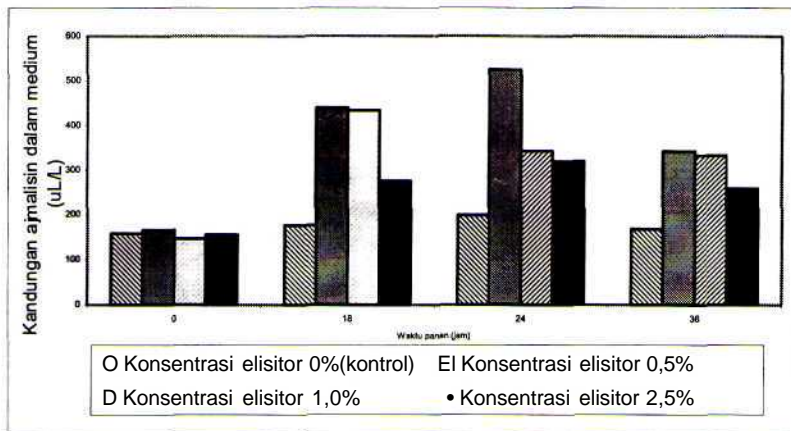
Gambar 1. Hubungan antara pertumbuhan sel dengan kandungan ajmalisin dalam agregat sel



Gambar 2. Hubungan antara kandungan ajmalisin dalam agregat sel dan medium



Gambar 3. Kandungan ajmalisin dalam agregat sel setelah dielisitasi



Gambar 4, Kandungan ajmalisin dalam medium *C. roseus* setelah dielisisasi

KESIMPULAN

- Pertumbuhan agregat sel *C. roseus* terbaik unruk menghasilkan ajmalisin diperoleh dari medium cair Zenk dengan kombinasi $2,5 \times 10^6$ M NAA dan 10^5 M BAP, serta elisitasi kultur agregat sel *C. roseus* dengan ekstrak khamir *Saccharomyces cerevisiae* dapat digunakan unruk meningkatkan kandungan ajmalisin dalam agregat (108,440%) dan dalam medium (216,508%).
- Konsentrasi elisitor *S. cerevisiae* yang optimum adalah 0,5% dengan waktu panen 24 jam, serta persentase peningkatan kandungan ajmalisin dalam medium menunjukkan hasil lebih besar dibandingkan di dalam agregat sel.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Profesor Dr. Robert Verpoorte 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 Microbiology & Biotechnology* 30, 475-481.

Bhojwani SS and Razdan MK. 1983. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, 25-71. Elsevier. Amsterdam.

Buitelaar RM and Tramper J. 1991. Strategies to Improve the Production of Secondary Metabolites with Plant Cell Cultures: A Literature Review. *Journal of Biotechnology* 23, 111-141.

Eilert U, Constabel F, and Kurz WGW. 1986. Elicitor Stimulation of Monoterpene Indolealkaloid Formation in Suspension Cultures of *Catharanthus Roseus*. *Journal Plant Physiology* 126, 11-22.

Endress R. 1994. *Plant Cell Biotechnology*, 173-255. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Jerman.

Fitriani A. 1998. Pengaruh Pemberian Homogenat Jamur *Pythium Aphanidermatum* (Edson) Fitzp terhadap Kandungan Ajmalisin dalam Kultur Kalus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Tesis Magister*. Program Pascasarjana. Institut Teknologi Bandung.

Fowler MW. 1983. Commercial Application and Economic Aspect of Mass Plant Cell Culture. *Dalam: Plant Biotechnology*, 3-38. Mantell SH and Smith H. (Eds). Cambridge University.

- Funk C, Gugler K and Brodelius P.** 1987. Increased Secondary Product Formation in Plant Cell Suspension Cultures after Treatment with a Yeast Carbohydrate Preparation (Elicitor). *Phytochemistry* 26, 401-405.
- Hahn GM.** 1996. Microbial Elicitors and Their Receptors in Plant. *Annual Review Phytopathology* 34, 387-412.
- Lindsey K and Yeoman MM.** 1983. Novel Experiment System for Studying the Production of Secondary Metabolites by Plant Tissue Culture. Dalam: *Plant Biotechnology*, 39-66. Mantell SH and Smith H (Eds). Cambridge University.
- Moreno RHP, Van der Heijden R and Verpoorte R.** 1994a. Cell and Tissue Cultures of *Catharanthus Roseus* (L.) G. Don, a Literature Survey II. Dalam: *Influence of Stress Factors on the Secondary Metabolites in Suspension Cultured Catharanthus roseus Cells*, 9-52. Moreno RPH (Ed).
- Moreno RHP, Van der Heijden R and Verpoorte R.** 1994b. Elicitor-Mediated Induction of Isochorismate Synthase and Accumulation of 2,3-Dihydroxy Benzoic Acid in *Catha-ranthus Roseus* Cell Suspension and Shoot Cultures. Dalam: *Influence of Stress Factors on the Secondary Metabolites in Suspension Cultured Catharanthus roseus Cells*, 79-88. Moreno RPH. (Ed).
- Moreno RHP, Poulsen C, Van der Heijden R and Verpoorte R.** 1994. Effect of Elicitation Different Metabolic Pathway in *Catha-ranthus roseus* (L.) G. Don. Cell suspension cultures. Dalam: *Influence of Stress Factors on the Secondary Metabolites in Suspension Cultured Catharanthus roseus Cells*, 53-76. Moreno RPH (Ed).
- Morris P.** 1986. Regulation of Product Synthesis in Cell Cultures of *Catharanthus Roseus* II: Comparison of Production Media. *Planta Medica*, 127-131.
- Pierik RLM.** 1987. In-vitro Culture of Higher Plants, 39-50. Martinus Nijhoff Publisher. Netherland.
- Sim JS, Chang NH, Liu RJ and Jung HK.** 1994. Production and Secretion of Indole Alkaloids in Hairy Root Cultures of *Catharanthus Roseus*: Effects of In-Situ Adsorption, Fungal Elicitation And Permeabilization. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 78,229-234.
- Verpoorte R and Van der Heijden R.** 1991. Plant Biotechnology for The Production of Alkaloids: Present Status and Prospect. *The Alkaloids* 40, 87-142. Leiden University.
- Zenk MH, El-Shagi H, Arena H, Stockigt J, Weioler 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*, 27-43. Barz W, Reinhard E, dan Zenk MH (Eds). Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, New York.