

## **Pengaruh elisitasi terhadap pertumbuhan dan produksi alkaloida kinolin dari akar rambut tanaman kina (*Cinchona succirubra* Pavon ex Klotzsch)**

*Effect of elicitation on growth and alkaloid quinoline production in hairy root of cinchona plant (Cinchona succirubra Pavon ex Klotzsch)*

Nurita TORUAN-MATHIUS<sup>1)</sup>, NURHAIMI-HARIS<sup>2)</sup>,  
Joko-SANTOSO<sup>3)</sup> & ADE-HERI<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> SEAMEO-BIOTROP, Bogor, Indonesia

<sup>2)</sup> Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

<sup>3)</sup> Pusat Penelitian Teh dan Kina, Gambung, Indonesia

<sup>4)</sup> Jurusan Kimia, Universitas Pakuan, Bogor, Indonesia

### **Summary**

*Manipulation to increase alkaloid productivity in hairy root can be done by elicitation with the addition of certain enzymes. The objective of this research is to find out the effect of elicitation by cellulase and pectolyase enzymes on the productivity of Cinchona succirubra hairy root culture. Hairy root was cultured on ½ MS macro nutrient with the addition of 40 g/L sucrose and 7 g/L agar. Elicitation was done by the addition of cellulase and pectolyase at the concentrations of 0; 0.05; 0.10; 0.50; 1.00; 3.00; 5.00; 10.00; 15.00; 20.00 and 25.00 mg/L, respectively. The effect of elicitation was analyzed by fresh weight of hairy root, and alkaloid content in four-month-old culture. The result showed that the best growth was obtained by the addition of 15 mg/L cellulase, with fresh weight as much as 920 mg. The addition of 10 mg/L pectolyase increased hairy root fresh weight as much as 880 mg. The highest quinoline alkaloid production was obtained by the addition of 25 mg/L cellulase (Quinine 580, quinidine 492, cinchonine 234, dihydroxyn-chonine 195 and cinchonidine 165 µg/g fresh weight) and 1 mg/L pectolyase (Quinine 2363, quinidine 238, cinchonine 104, dihydroxyn-chonidine 138 and cinchonidine 1558 µg/g fresh weight).*

[Key words : Hairy root-culture, *Cinchona succirubra*, enzyme elicitation, pectolyase, cellulase, quinoline alkaloid.]

### **Ringkasan**

Manipulasi untuk meningkatkan produktivitas akar rambut dapat dilakukan di antaranya dengan elisitasi melalui penambahan enzim tertentu ke dalam medium. Tujuan penelitian ini adalah untuk menetapkan pengaruh elisitasi dengan penambahan selulase dan pektioliase terhadap produktivitas akar rambut tanaman *Cinchona succirubra*. Akar rambut tanaman *Cinchona succirubra* dikulturkan dalam medium MS ½ hara makro dengan penambahan sukrose 40 g/L dan agar 7 g/L. Elisitasi dilakukan dengan penambahan selulase dan pektioliase masing-masing pada konsentrasi 0; 0,05; 0,10; 0,50; 1,00; 3,00; 5,00; 10,00; 15,00; 20,00 dan 25,00 mg/L. Peubah yang diukur adalah bobot basah akar rambut dan kandungan alkaloida kinolin pada kultur berumur empat bulan. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pertumbuhan terbaik terjadi pada penambahan konsentrasi selulase 15 mg/L dengan bobot basah 920 mg dan pektioliase 10 mg/L dengan bobot basah 880 mg. Produksi alkaloida kinolin tertinggi

diperoleh pada konsentrasi selulase 25 mg/L (kinin 580, kinidin 492, sinkonin 234, dihidroksinkonin 195 dan sinkonidin 165 µg/g bobot basah) dan pektioliase 1 mg/L (kinin 2363, kinidin 238, sinkonin 104, dihidroksinkonin 138 dan sinkonidin 1558 µg/g bobot basah).

### Pendahuluan

*C. succirubra* memiliki kadar kinin yang sangat rendah (0,8 - 1,4 %). Akan tetapi kadar sinkonidinya lebih tinggi yaitu 3,2 - 5,1 % dari pada *C. ledgeriana* yang hanya mengandung 0 - 3,4 % (Astika, 1975). Alkaloid di dalam kulit batang kina mempunyai nilai penting dan digunakan dalam bidang industri farmasi (Hay *et al.*, 1986; Raintree Nutrition, 2003), serta industri makanan dan minuman (Widayat, 2000; PT SIL, 2002). Empat jenis alkaloida utama yang mempunyai nilai ekonomi tinggi adalah kinin, sinkonin, kinidin dan sinkonidin (Brotosisworo, 1993). Selain untuk obat malaria kinin digunakan sebagai obat aritmia jantung dan hampir 50 % produksi kinin digunakan sebagai bahan tonik, yaitu *tonik water*, *bitter lemon*, dan penambah nafsu makan (Raintree Nutrition, 2003). Pada industri minuman ringan, kinin biasanya digunakan sebagai pemberi cita rasa karena rasanya pahit dan juga sebagai obat anti kejang otot (Wahyudi, 2006).

Pada dekade terakhir ini perhatian memproduksi metabolit sekunder beralih pada pemanfaatan teknologi kultur akar rambut, yang diperoleh sebagai hasil transformasi sel tanaman dengan *Agrobacterium rhizogenes*. *Agrobacterium* merupakan bakteri tanah yang mempunyai kemampuan untuk mentransfer T-DNA dari plasmid yang dikenal dengan Ri plasmid (*root inducing plasmid*) ke dalam sel tanaman melalui pelukaan (Nilson & Olsson, 1997). T-DNA akan terintegrasi pada kromosom

tanaman dan akan mengekspresikan gen-gen untuk mensintesis senyawa opin, di samping itu T-DNA juga mengandung onkogen yaitu gen-gen yang berperan untuk menyandi hormon pertumbuhan auksin dan sitokinin. Ekspresi onkogen pada plasmid Ri mencirikan pembentukan akar adventif secara besar-besaran pada tempat yang diinfeksi dan dikenal dengan '*hairy root*' (Nilson & Olsson, 1997). Keuntungan menggunakan kultur *hairy root* (akar rambut) di antaranya relatif seragam, memiliki kestabilan genetik yang tinggi, dan dapat menggunakan medium tanpa penambahan zat pengatur tumbuh, di samping itu mudah dimanipulasi untuk meningkatkan produktivitasnya. Salah satu di antaranya dengan cara elisitasi menggunakan elisitor pada sel tumbuhan dengan tujuan untuk menginduksi dan meningkatkan pembentukan metabolit sekunder.

Produksi ginsenosid pada kultur akar rambut *Panax ginseng* meningkat secara nyata setelah dielisitasi dengan asam jasmonat dan elisitor lain (Yu *et al.*, 2000). Alvares *et al.* (2003) menemukan bahwa elisitasi kultur akar rambut *Brugmansia candida* meningkatkan hiosiamin intraseluler sebesar 200 – 300% dan melepaskan sampai 1500% (skopolamin) dan 1100% (hiosiamin). Messner & Boll (1999) melaporkan bahwa penambahan elisitor berupa sediaan dinding sel *Rhizosphaera kalkhoffii* yang diautoklaf, mampu meningkatkan aktivitas beberapa enzim yang berperan dalam biosintesis lignin di antaranya L-fenilalanin amonia liase (PAL) sebanyak sepuluh kali, feruloil CoA reduktase (FCR) sebanyak empat kali, sinamil alkohol dehidrogenase sebanyak dua kali, dan peroksidase sebanyak 1,5 kali yang terjadi tiga hari setelah dielisitasi. Carvalho & Curtis (2002) melaporkan bahwa elisitasi akar dan kultur suspensi sel dengan elisitor dari *Rhizoctonia solani* menyebabkan

perubahan pernafasan, asupan hara oleh akar, dan pertumbuhan yang dramatis.

Tujuan penelitian ini untuk menetapkan pengaruh perlakuan elisitasi dengan enzim selulase dan pektioliase sebagai elisitor terhadap pertumbuhan dan produksi alkaloida kinolina dalam akar rambut tanaman *C. succirubra*.

### **Bahan dan Metode**

#### *Konfirmasi integrasi T-DNA A. rhizogenes pada akar rambut*

Konfirmasi adanya integrasi T-DNA, yaitu daerah TL dan TR-DNA dari *A. rhizogenes* galur LBA 9457b ke dalam akar rambut tanaman kina dilakukan dengan teknik PCR. Sebagai kontrol positif digunakan DNA plasmid *A. Rhizogenes*, sedang DNA daun dari planlet *C. succirubra in vitro* digunakan sebagai kontrol negatif. Sebagai DNA uji adalah DNA dari akar rambut tanpa perlakuan dan perlakuan elisitasi dengan selulase dan pektioliase.

Isolasi DNA plasmid dilakukan menggunakan modifikasi metode Sambrook *et al.* (1989). Sebagai sumber DNA *A. rhizogenes* digunakan kultur berumur 48 jam. Sedang isolasi DNA planlet akar rambut dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode Orozco-Castillo *et al.* (1994). Sebagai sumber DNA digunakan daun planlet *C. succirubra* dan akar rambut dari setiap perlakuan, masing-masing sebanyak 0,2 g. Amplifikasi DNA dilakukan dengan teknik PCR menggunakan modifikasi metode Aoki *et al.* (1997). Untuk deteksi TL-DNA digunakan pasangan primer *rol B*<sub>1</sub> (5'ATG GAT CCA AAT TGC TAT TCC CCA CGA3') dan *rol B*<sub>2</sub> (5'TTA GGC TTT CAT TCG GGT TTC CTG CAG C3'). Sedangkan untuk deteksi TR-DNA digunakan pasangan

primer TR<sub>1</sub> (5'GGA AAT TGT GGC GTT GTT GTG GAC3') dan TR<sub>2</sub> (5'AAT CGT TCA GAG AGC GTC CGA AGT T 3') (Ermayanti *et al.*, 2000).

Amplifikasi DNA contoh dilakukan menggunakan alat *Thermal Cycler* (Thermolyne II), dengan siklus amplifikasi sebagai berikut : denaturasi pada suhu 94°C selama satu menit, *annealing* pada suhu 55°C selama satu menit dan ekstensi pada suhu 72°C selama 2,5 menit. Seluruh reaksi dilakukan sebanyak 35 siklus reaksi. Hasil PCR difraksinasi dengan elektroforesis 0,8% (b/v) gel agarose yang mengandung 2,5 µL etidium bromida 1% dengan kondisi arus konstan 36 mA dan 50 volt selama kurang lebih satu jam. Sebagai marker digunakan DNA 1 Kb Ladder. Gel hasil elektroforesis divisualisasikan di atas UV transluminator dan untuk dokumentasi dilakukan pemotretan dengan menggunakan film polaroid 665. Pengamatan dilakukan dengan melihat adanya pita DNA dari akar rambut yang mempunyai berat molekul yang sama dengan TR dan TL-DNA plasmid *A. rhizogenes*.

#### *Elisitasi terhadap pertumbuhan akar rambut dan produksi alkaloid kinolin*

Bahan yang digunakan yaitu akar rambut tanaman *C. succirubra* hasil inokulasi dengan *A. rhizogenes* galur LBA 9457 (Reflini, 2002) yang dikulturkan dalam medium MS ½ hara makro dengan penambahan 40 g/L sukrosa dan 7 g/L agar (Aneloi, 2004). Larutan selulase dan pektioliase melalui milipore membran (0,22 µm) ditambahkan ke dalam medium MS ½ hara makro secara aseptik. Sebanyak empat potong akar rambut dengan ukuran ± 2 cm dikulturkan dalam setiap botol yang berisi medium dengan penambahan selulase dan pektioliase, masing-masing dengan konsen-

trasi 0; 0,05; 0,10; 0,50; 1,00; 3,00; 5,00; 10,00; 15,00; 20,00, dan 25,00 mg/L yang diulang sebanyak sepuluh kali. Percobaan dilaksanakan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pola faktorial.

Pengamatan dilakukan terhadap pertumbuhan dan kandungan alkaloida kinolin akar rambut pada umur empat bulan. Peubah yang diukur untuk pertumbuhan meliputi waktu inisiasi, bobot basah akar rambut pada setiap perlakuan sebagai variabel respons. Produksi alkaloida kinolin meliputi kadar kinin, kinidin, sinkonin, dan sinkonidin. Waktu inisiasi ditentukan dengan menghitung saat (hari) terbentuknya akar rambut yang pertama. Bobot basah ditentukan dengan menimbang akar rambut yang telah dibersihkan dari medium. Sedang kadar alkaloida kinolin ditentukan dengan HPLC.

Uji statistik untuk mengetahui pengaruh penambahan elisitor terhadap pertumbuhan dan produksi alkaloida kinolin pada akar rambut tanaman kina dilakukan dengan Analisis Varian (ANOVA). Apabila terlihat ada perbedaan nyata, analisis dilanjutkan dengan *Duncan New's Multiple Range Test* (DNMRT).

#### *Analisis kandungan alkaloida kinolin dengan HPLC*

Sebanyak 50 mg contoh akar rambut dari masing-masing perlakuan digerus sampai halus dengan Nitrogen cair, selanjutnya diekstrak dengan 1 mL MeOH: 0,1 M HCl (1:1) dan divorteks, lalu disentrifugasi selama 15 menit pada 14.000 rpm. Supernatan diliopilasi dan diresuspensi dengan 1 mL eluen HPLC (larutan yang mengandung 6,8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,95 g heksilamina; 50 mL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1M dan 60 mL asetonitril dalam 1 L larutan dengan pH 2,8). Selanjutnya disaring dengan milleks 0,45 µm dan disuntikkan ke dalam HPLC, *Shimadzu* tipe C-R4A dengan kondisi

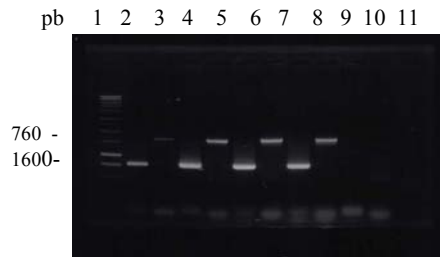
sebagai berikut : panjang gelombang/λ 245 nm, sensitivitas 0,001 AUFS, *flow rate* 2 mL/menit, *chart speed* 5 cm/menit, volume suntik sebanyak 2 µL, kolom µ Bondapak C.18 (Geerlings *et al.*, 1999). Peubah yang diamati adalah kandungan alkaloida kinolin meliputi kadar kinin, kinidin, sinkonin, dan sinkonidin pada setiap perlakuan dengan membandingkan luas area puncak contoh dengan luas area puncak dari kinin, kinidin, sinkonin dan sinkonidin standar dari SIGMA.

### **Hasil dan Pembahasan**

#### *Uji konfirmasi integrasi T-DNA A. rhizogenes*

Hasil PCR DNA menunjukkan adanya dua pita DNA pada ukuran basa 780 pb dan 1600 pb pada akar rambut kontrol maupun akar rambut dengan perlakuan elisitasi dengan selulase dan pektioliase, kecuali pada DNA planlet *C. succirubra* yang berfungsi sebagai kontrol negatif (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa gen TL dan TR dari *A. rhizogenes* tetap terintegrasi secara stabil pada akar rambut kontrol maupun akar rambut yang diberi perlakuan elisitasi. Adanya dua pita DNA pada ukuran basa 780 pb dan 1600 pb tersebut juga dilaporkan oleh Reflini (2002) dan Aneloi (2004) bahwa DNA pada ukuran basa tersebut adalah gen TL dan TR yang merupakan bagian dari plasmid Ri *A. rhizogenes* yang telah terintegrasi ke dalam genom tanaman *C. succirubra*.

Ermayanti *et al.* 2000) menyatakan bahwa gen TL merupakan T-DNA dengan ukuran 780 pb yang mengandung gen *iaa M* dan *iaa H* untuk biosintesis auksin dan sintesis senyawa opin. Gen TR, yaitu gen yang berukuran 1600 pb merupakan T-DNA yang mengandung gen *rol* penginduksi pembentukan akar. Pita DNA yang ber-



Gambar 1. Konfirmasi integrasi T-DNA dengan PCR pada akar rambut tanaman kina *C. succirubra* dengan perlakuan elisitasi (1) Marker 1 kb DNA Ladder; (2) Plasmid *A. rhizogenes* - primer TL & (3). TR; (4). Akar rambut kontrol- primer TL; (5). TR; (6). Akar rambut vs selulase- primer TL, & (7) TR, (8). Akar rambut vs pektioliase-primer TL, (9). TR, (10). Daun *C. succirubra*- primer TL, & (11). TR.

Figure 1. Confirmation the integration of T-DNA by PCR on *C. succirubra hairy root* with elicitation treatment. (1). Marker 1 kb ladder DNA, (2). *A. rhizogenes* plasmid -TL primer & (3). TR, (4). Control hairy root, TL primer, & (5).TR, (6). Hairy root vs cellulase-TL primer, & (7). TR, (8). Hairy root vs pectyoliase-TL primer, (9). TR, (10). *C. succirubra leaf*-TL primer, & (11). TR.

ukuran 780 pb relatif lebih tebal daripada pita DNA yang berukuran 1600pb. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan gen TL dalam akar rambut lebih besar dibandingkan dengan kandungan gen TR-nya.

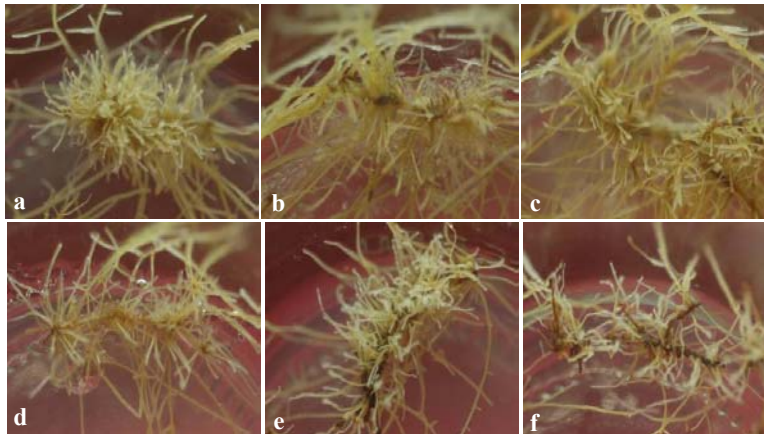
Menurut Gelvin (2000) proses pembentukan akar rambut terjadi karena di dalam T-DNA terdapat berbagai gen penyandi protein yang berperan dalam proses biosintesis zat pengatur tumbuh yaitu auksin dan sitokinin di dalam sel tanaman. Zayed & Winka (2004) melaporkan

bahwa kultur akar rambut *B. suaveolens* dilakukan dengan menginfeksi ujung akar dengan *A. rhizogenes*. Hasil analisis dengan PCR menunjukkan bahwa telah terjadi transformasi gen *rolC* dan *virC*.

#### Pertumbuhan akar rambut

Akar rambut yang ditumbuhkan dalam medium dengan berbagai konsentrasi selulase memiliki waktu inisiasi, bobot basah, dan penampakan akar baru yang berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol (Gambar 2). Tampak bahwa semakin tinggi konsentrasi selulase semakin lama waktu inisiasi dan semakin rendah bobot basah akar rambut, pada umur empat bulan. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh adanya pengaruh *feedback inhibition* dari konsentrasi enzim yang terlalu tinggi (Tabel 1). Di samping itu penambahan selulase menghasilkan akar rambut yang memiliki bentuk serabut tipis, kompak dan banyak (Gambar 2). Hal tersebut menyebabkan bobot basah akar rambut cukup tinggi. Sedangkan akar rambut yang ditumbuhkan dalam medium kontrol memiliki bentuk lebih besar, tidak terlalu kompak (lepas satu dengan lainnya) dan berukuran agak panjang. Struktur akar tersebut menghasilkan bobot basah agak rendah. Pertumbuhan akar rambut terbaik diperoleh pada konsentrasi selulase 15 mg/L yang memiliki bobot basah tertinggi, yaitu 920 mg (Tabel 1).

Akar rambut yang ditumbuhkan dalam berbagai konsentrasi pektioliase memiliki pertumbuhan yang berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol dalam hal waktu inisiasi, dan bobot basah (Tabel 2) serta morfologi akar rambut (Gambar 3). Semakin tinggi pektioliase semakin lama waktu inisiasi dan semakin rendah bobot basah akar rambut. (Tabel 2). Bobot basah tertinggi, yaitu 880 mg diperoleh dari



Gambar 2. Penampakan akar rambut dengan perlakuan elisitasi selulase (a) kontrol, (b) 5 mg/L; (c) 10 mg/L; (d) 15 mg/L; (e) 20 mg/L dan (f) 25 mg/L, berumur empat bulan setelah dikulturkan.

Figure 2. Hairy root performance with enzyme cellulase elicitation (a) control, (b) 5 mg/L; (c) 10 mg/L; (d) 15 mg/L; (e) 20 mg/L and (f) 25 mg/L, four-month-old after culture.

Tabel 1. Pengaruh enzim selulose terhadap pertumbuhan akar rambut setelah berumur empat bulan.

Table 1. Effect of cellulase on hairy root growth after four-month old.

No.	Konsentrasi selulase <i>Cellulase concentration</i> mg/L	Waktu Inisiasi <i>Initiation time</i> Hari (Day)	Bobot basah <i>Fresh weight</i> mg
1.	0,00	11,6 b*)	290 a
2.	0,05	5,8 a	390 a
3.	0,10	6,0 a	490 b
4.	0,50	6,1 a	630 c
5.	1,00	6,6 a	640 c
6.	3,00	5,7 a	680 c
7.	5,00	13,8 b	700 c
8.	10,00	14,1 b	790 d
9.	15,00	17,8 c	920 e
10.	20,00	19,4 c	570 b
11.	25,00	20,2 d	540 b

\*) Angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan pada ( $P < 0,05$ ).

\*) Figures in the same column of each group followed by similar letter are not significantly different according to Duncan MRT ( $P < 0,05$ ).

*Pengaruh elisitasi terhadap pertumbuhan dan produksi alkaloida kinolin..*

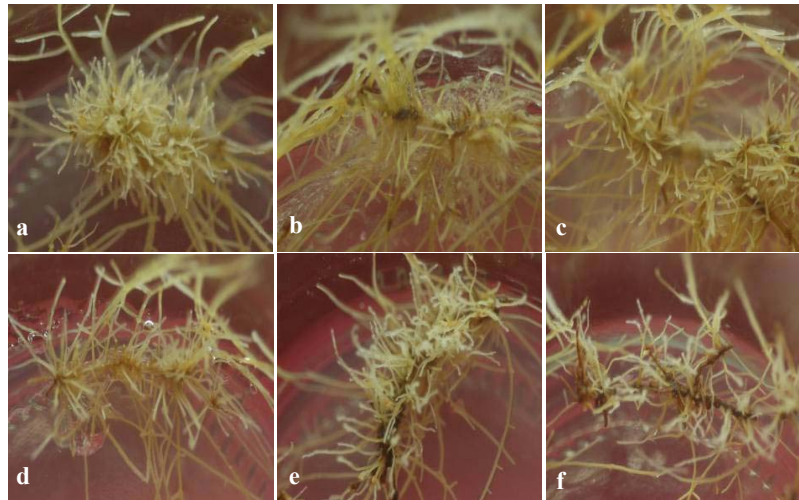
Tabel 2. Pengaruh enzim pektioliase terhadap pertumbuhan akar rambut setelah berumur empat bulan.

*Table 2. Effect of pectyoliase enzyme on hairy root growth after four- month- old.*

No.	Konsentrasi pektioliase <i>Cellulase concentration</i> mg/L	Waktu Inisiasi <i>Initiation time</i> Hari (Day)	Bobot basah <i>Fresh weight</i> mg
1.	0,00	11,6 b*)	400 c
2.	0,05	6,2 a	490 c
3.	0,10	8,4 a	550 d
4.	0,50	5,8 a	560 d
5.	1,00	6,7 a	570 d
6.	3,00	9,5 b	620 e
7.	5,00	12,7 c	630 e
8.	10,00	15,6 c	880 f
9.	15,00	22,7 e	230 b
10.	20,00	30,9 f	160 a
11.	25,00	40,6 g	120 a

\*) Angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan pada  $P < 0,05$ .

\*) *Figures in the same column of each group followed by similar letter are not significantly different according to Duncan MRT ( $P < 0.05$ )*



Gambar 3. Penampakan akar rambut dengan perlakuan elisitasi pektioliase (a) kontrol, (b) 5 mg/L; (c) 10 mg/L; (d) 15 mg/L; (e) 20 mg/L dan (f) 25 mg/L, berumur empat bulan setelah dikulturkan.

*Figure 3. Hairy root performance with enzyme pectyoliase elicitation (a) control, (b) 5 mg/L; (c) 10 mg/L; (d) 15 mg/L; (e) 20 mg/L and (f) 25 mg/L, four-month-old after culture.*

penambahan 10 mg/L pektioliase. Bentuk akar rambut yang berupa serabut tipis yang jarang, tidak kompak sehingga memiliki bobot basah yang rendah. Pada awal pertumbuhan eksplan mengalami pencokelatan, yang tampaknya menghambat inisiasi dan pertumbuhan akar rambut

Selulase adalah enzim penghidrolisis selulosa yang merupakan unsur penyusun dinding sel tanaman. Sedang pektioliase adalah enzim penghidrolisis asam poligalaktouronat menjadi monomernya yaitu asam galaktouronat. Asam poligalaktouronat adalah salah satu polimer penyusun dinding sel tanaman. Dengan penambahan enzim selulase dan pektioliase ke dalam medium yang digunakan untuk pertumbuhan akar rambut tanaman kina, maka diharapkan asupan hara ke dalam sel lebih tinggi sehingga pertumbuhannya lebih baik dan sel tanaman tersebut akan memproduksi alkaloida kinolin yang lebih tinggi sebagai respons pertahanan sel. Semakin tinggi konsentrasi selulase pektioliase semakin tinggi cekaman yang terjadi sehingga pertumbuhan akar rambut semakin terhambat.

Menurut Vazques-Flota *et al.* (1994) perubahan konsentrasi komponen medium seperti penambahan enzim hidrolitik dan elisitor biotik lainnya dapat digunakan sebagai strategi untuk meningkatkan hasil alkaloida. Verpoorte *et al.* (1998) menemukan bahwa pada kultur *Catharanthus roseus* pembentukan alkaloida seringkali berhubungan dengan diferensiasi dalam membentuk organ tertentu, seperti akar atau pucuk.

Zayedb & Winka (2004) melaporkan bahwa pada kultur akar rambut *B.suaveolens* yang diberi perlakuan elisitasi dengan menambahkan elisitor metiljasmonat, kuersetin, dan asam salisilat untuk mempelajari pembentukan alkaloida tropan di antaranya hiosiamin. Perlakuan dengan elisitasi

200  $\mu$ m metiljasmonat meningkatkan akumulasi hiosiamin sebanyak 25 kali, yaitu 1 mg/g bobot basah dibandingkan dengan kontrol. Kuersetin meningkatkan produksi alkaloida sebanyak sepuluh kali (400 mg/g bobot basah) selama 24 jam. Sedang penambahan elisitasi sebanyak 100  $\mu$ m asam salisilat menurunkan produksi alkaloida sampai pada tingkat 1  $\mu$ g/g bobot basah. Sim *et al.* (1994) melaporkan bahwa tidak ada pengaruh yang nyata dari elisitasi fungi terhadap produksi sikonin dalam akar rambut dan kultur suspensi sel *Lithospermum erythrorhizon*. Alvarez *et al.* (2003) menemukan bahwa akar rambut *Brugmansia candida* yang dielisitasi dengan pektinase menyebabkan peningkatan (200 – 300%) kandungan hiosiamin intraselular, 1500% (skopolamin) dan 1100% (hiosiamin). Sedang elisitasi dengan homogenasi akar *B. candida* meningkatkan akumulasi kedua alkaloid tersebut sebesar (50 – 600%).

#### *Produktivitas kinolin pada akar rambut*

Peningkatan alkaloida kinolin melalui elisitasi dengan selulase dan pektioliase sebagai elisitor terbaik terjadi pada konsentrasi selulase tertinggi yaitu 25 mg/L yang memiliki pertumbuhan yang lebih baik dibandingkan dengan kontrol, sedangkan dengan pektioliase terjadi pada konsentrasi 1 mg/L yang memiliki pertumbuhan yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol.

Tampak bahwa semakin tinggi konsentrasi enzim yang digunakan menyebabkan pertumbuhan akar rambut semakin terhambat yang menyebabkan semakin rendah pula kandungan alkaloida kinolin yang dihasilkannya. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa produksi alkaloida kinolin tertinggi untuk jenis alkaloida yang berbeda terjadi pada konsentrasi enzim yang berbeda. Kinin dan sinkonidin tertinggi pada konsentrasi selulase 25,0 mg/L, kinidin pada penam-

bahan selulase 0,5 mg/L, sinkonin pada selulase 0,1 mg/L, dihidrosinkonin pada selulase 3,0 mg/L (Gambar 5). Penambahan selulase dengan konsentrasi optimum, yaitu 25,0 mg/L yang memproduksi semua jenis alkaloida kinolin dengan konsentrasi yang cukup tinggi (kinin 580; kinidin 492; sinkonin 234; dihidrosinkonin 195 dan sinkonidin 165 µg/g bobot basah) serta memiliki pertumbuhan yang cukup baik.

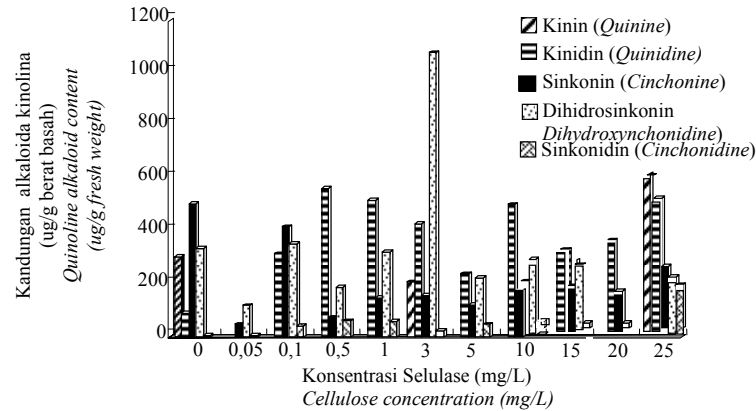
Pada perlakuan pektioliase, pertumbuhan yang terbaik diperoleh dari konsentrasi 0,05 mg/L dengan bobot basah yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Peningkatan kandungan alkaloida kinolin tertinggi terjadi pada konsentrasi 1,0 mg/L. Kinin tertinggi pada konsentrasi enzim pektioliase 1,0 mg/L, kinidin pada pektioliase 0,1 mg/L, sinkonin pada pektioliase 0,1 mg/L, dihidrosinkonin pada pektioliase 10,0 mg/L, dan sinkonidin pada pektioliase 1,0 mg/L (Gambar 2). Pada pemberian pektioliase 1,0 mg/L menyebabkan akar rambut mampu memproduksi semua jenis kinolin dengan konsentrasi yang tertinggi untuk kinin dan sinkonidin (kinin 2363; kinidin 238, sinkonin 104; dihidrosinkonin 138, dan sinkonidin 1558 µg/g bobot basah). Hal ini menunjukkan bahwa pektioliase sangat baik digunakan sebagai elisitor pada konsentrasi rendah karena pada konsentrasi tinggi, menyebabkan cekaman pada sel. Penambahan selulase dan pektioliase ke dalam medium pertumbuhan akar rambut tanaman *C. succirubra*, dapat menyebabkan terjadinya hidrolisis unsur-unsur penyusun dinding sel yaitu selulosa dan asam poligalaktouronat menjadi monomernya. Hal ini akan menyebabkan perubahan perilaku dari membran dinding penghalang pada cekaman dengan penambahan elisitor.

Menurut Aprianita *et al.* (2003) bahwa faktor yang menentukan keberhasilan elisitasi di antaranya adalah konsentrasi elisitor

dan waktu kontak antara sel dengan elisitor. Contin *et al.* (1999) menjelaskan bahwa elisitor dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder dengan dua cara, yaitu meningkatkan aktivitas enzim dan meningkatkan sintesis enzim yang terlibat dalam jalur biosintesis metabolit tertentu. Pada penelitian ini, peningkatan alkaloida kinolin diduga terjadi melalui peningkatan sintesis enzim.

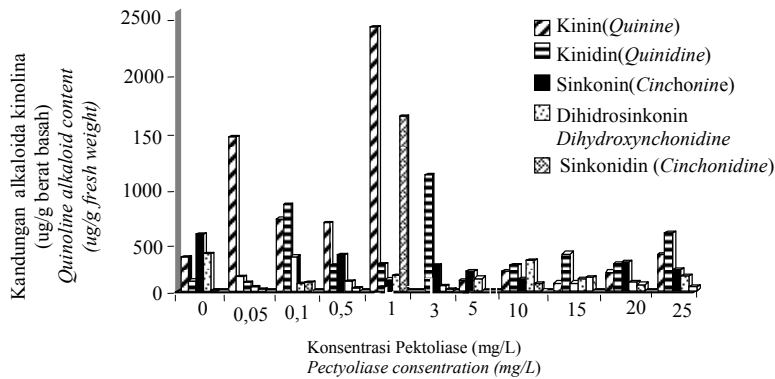
Endress (1994) menemukan pada kultur sel *C. roseus* yang dielisitasi terjadi induksi enzim triptofan dekarboksilase (TDC) dan striktosidin sintetase (SS) yang didahului dengan sintesis mRNA kedua enzim tersebut. Enzim TDC berfungsi untuk mengkatalisis pembentukan triptamin sebagai prekursor alkaloida kinolin, sedangkan SS berperan dalam kondensasi antara triptamin dan sekologanin sebagai prekursor alkaloida kinolin.

Menurut Yu *et al.* (2000) pendekatan umum yang dapat digunakan untuk memperoleh hasil yang lebih tinggi adalah menggunakan sistem kultur dengan dua tahap proses. Tahap pertama dengan medium pertumbuhan tanpa elisitor untuk biomassa maksimum, sedangkan pada tahap kedua jaringan akar rambut yang terakumulasi ditransfer ke dalam medium yang mengandung elisitor sebagai medium produksi yang membatasi pertumbuhan tetapi merangsang biosintesis alkaloida. Kandungan fitoaleksin kapsidiol pada kultur sel *Capsicum annuum* dapat ditingkatkan setelah diberi penambahan ekstrak dari spora dan miselium *Gliocladium deliquies* Cens. Antosianin pada kultur sel *Daucus carota* dapat ditingkatkan setelah diberi penambahan filtrat sel dan homogenat dari *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, dan *Candida albicans* (Survanalatha *et al.*, 1994) terhadap kerusakan yang terjadi pada dinding sel tanaman.



Gambar 4. Kandungan alkaloida kinolin pada akar rambut *C. succirubra* dengan perlakuan selulase pada umur empat bulan.

Figure 4. Quinoline alkaloid content on hairy root *C. succirubra* with cellulose treatment on four-month-old.



Gambar 5. Kandungan alkaloida kinolin pada akar rambut dengan perlakuan enzim pektioliase pada kultur umur empat bulan.

Figure 5. Alkaloid quinoline content on hairy root with pectinase treatment in four-month-old culture.

Produksi ginsenosida pada kultur akar rambut *Panax ginseng* meningkat secara nyata setelah dielisitasi dengan asam jasmonat dan elisitor lain (Yu *et al*, 2000). Elisitasi dengan selulase dan pektinase pada

kultur *C. roseus* menunjukkan adanya aktivasi enzim pendegradasi sekologanin sehingga menurunkan kandungan sekologanin dan striktosidin seluler tetapi meningkatkan kandungan triptamin seluler,

serta menghalangi pengambilan loganin dalam sel yang dielisitasi. Zabetakis *et al.* (1999) melaporkan terjadinya peningkatan biosintesis alkaloida tropan pada akar rambut *Datura stramonium* yang dielisitasi.

### Kesimpulan

1. Adanya dua pita DNA pada ukuran basa 780 pb dan 1600 pb pada DNA *hairy root* yang diberi perlakuan elisitasi menunjukkan bahwa gen TL dan TR dari *A. rhizogenes* tetap terintegrasi secara stabil pada akar rambut.
2. Pertumbuhan akar rambut *C. Succirubra* terbaik diperoleh dari penambahan selulase 15 mg/L (pertambahan bobot basah 920 mg) dan pektioliase 10 mg/L (pertambahan bobot basah 880 mg). Produksi alkaloida kinolin tertinggi diperoleh dari penambahan selulase 25 mg/L (kinin 580, kinidin 492, sinkonin 234, dihidrosinkonin 195 dan sinkonidin 165 µg/g bobot basah) dan pektioliase 1 mg/L (kinin 2363, kinidin 238, sinkonin 104, dihidrosinkonin 138 dan sinkonidin 1558 µg/g bobot basah).

### Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada (i) Penanggungjawab Proyek RUT XI, DRN-LIPI yang telah mendanai penelitian ini dari tahun 2004-2005, dan kepada (ii) Kepala Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, atas fasilitas yang digunakan untuk pelaksanaan penelitian.

### Daftar Pustaka

- Alvarez, S.P., P.L. Marconi & A. Giulietti (2003). The influence of different elicitors on hyosyamine and scopolamine content in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *In Vitro Cell & Dev. Biol. Plant*, **39**(6), 640-644.
- Aneloi, Z. (2004). Pertumbuhan dan produksi alkaloid kinolina pada kultur akar rambut kina (*Cinchona ledgeriana* Moens dan *C. succirubra* Pavon ex Klotzsc) hasil transformasi *Agrobacterium rhizogenes* galur LBA 9457. *Disertasi*. Program Pascasarjana Universitas Pajajaran, Bandung. 117p.
- Aprianita, R.R.Esyanti & A.H. Siregar (2003). Pengaruh pemberian elisitor jamur *Phytium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. terhadap kandungan ajmalisin pada kultur kalus berakar *C. roseus* (L.) G. Don. *Berita Biologi*, **6** (7), 43-547.
- Astika, W. (1975). Klon QRC, Asal-usul dan daya produksinya. *Warta BPTK*, **1** (2,3), 175 - 192.
- Aoki, T., H. Matsumoto, Y.Asako, Y. Matsunaga & K. Shimomura (1997). Variation of alkaloid productivity among several clones of hairy roots and regenerated plants of *Atropa belladonna* transformed with *Agrobacterium rhizogenes* 15834. *Plant Cell Rep.*, **16**, 282-286.
- Brotosisworo, S. (1993). Efek garam anorganik tertentu terhadap pertumbuhan dan kandungan alkaloid kultur jaringan tanaman *Cinchona*. *Ringkasan Disertasi*. Yogyakarta, Universitas Gadjah Mada. (Tidak dipublikasikan).
- Contin, A., R. van der Heijden & R. Verpoorte (1999). Effects of alkaloid precursor feeding and elicitation on the accumulation of secologanin in a *Catharanthus roseus* Dell suspension culture. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **56**,111-119.

- Carvalho, E. B. & W. R. Curtis (2002). Effect of elicitation on growth, respiration, and nutrient uptake of root and cell suspension cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Biotechnol. Prog.*, **18** (2), 282-289.
- Endress, R. (1994). *Plant Cell Biotechnology*. Berlin, Springer-Verlag. p.122-128.
- Ermayanti, T.M., L. Sari, E.M.R. Siregar & D. Sudradjat (2000). Transformasi mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) dengan *Agrobacterium rhizogenes* galur ATCC-15834. *Dalam Pros. Semimar Nasional Bioteknologi Pertanian*. Yogyakarta, 7-9 Nopember, 2000.
- Geerlings, A., D. Hallard, A.M. Cabbalero, I.L. Cardoso, R.van der Heijden & R. Verpoorte (1999). Alkaloid production by *Cinchona officinalis* 'ledgeriana' hairy root culture containing constitutive expression construct of Tryptophan Decarboxylase and Strictosidine Synthase cDNAs from *Cantharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.*, **19**, 191-196.
- Gelvin, S.B. (2000). Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Ann. Rev. Plant. Mol. Biol.*, **51**, 223-256.
- Hay, C.A., L.A. Anderson, M.F. Roberts & J.D. Phillipson. (1986). *In Vitro* culture of *Cinchona* species precursor feeding of *C. ledgeriana* root organ suspension cultures with L-Tryptophan *Plant Cell Rep.*, **5**, 1-4.
- Messner, B. & M. Boll (1993). Elicitor-mediated induction of enzymes of lignin biosynthesis and formation of lignin-like material in a cell suspension culture of spruce (*Pice abis*). *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **34**, 261-264.
- Nilsson, O. & O. Olsson (1997). Getting to the root : the role of The *Agrobacterium rhizogenes* rol genes in the formation of hairy roots. *Physiol. Plant.*, **100**, 463-473.
- Orozco-Castillo, K.J. Chalmers, R. Waugh & W. Powell. (1994). Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD marker. *Theor. Appl. Genet.*, **87**,934-938.
- PT. SIL. (2002). *Kebijakan Pemasaran dan Pengembangan Kina Dunia*. Bandung, Pusat Penelitian Teh dan Kina Gambung. Rapat Kina Indonesia.
- Raintree Nutrition. (2003). *Tropical plant database. Database File For: Quinine* (*Cinchona offinalis*). Raintree Nutrition Inc., Austin, Texas 78758. All right reversed. File://C:\My Documens\ Quinine Bark-Cinchona-Database entry for-Quinine Bark - Cinchona -quinine Bark. Htm.
- Reflini (2002). *Kajian Pertumbuhan Akar Rambut Cinchona sp dari Inokulasi Beberapa Galur Agrobacterium rhizogenes*. Bogor, Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, 60p.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T Maniatis (1989). *Molecular Cloning*. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press. p. 468 - 500.
- Sim, S.J., J.D Kim & H.N. Chang (1994). Shikonin production by extractive cultivation in transformed-suspension and hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Ann. N.Y. AcadSci.*, **30** (745), 442-454.
- Survalalatha, G. L. Rajendran, G.A. Ravishankar & L.V. Venkataraman (1994). Elicitation of anthocyanin production in cell cultures of carrot (*Daucus carota* L.) by using elicitors and abiotic stress. *Biotechnol. Lett.*, **16** (12), 1275-1280.
- Vazques-Flota, F. O., M. Moreno-Valezuela, L. Miranda-Ham, J. Coello-Coello, & V.M. Vargas (1994). Catharanthine and ajmalicine synthesis in *Catharantus roseus* hairy root culture. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **38**, 273-279.

*Pengaruh elisitasi terhadap pertumbuhan dan produksi alkaloida kinolin...*

- Verpoorte, R., R. Van der Heijden, H.J.G. ten Hoopen & J. Memelink (1998). Metabolic engineering for the improvement of plant secondary metabolite production. *Plant Tiss. Cult. & Biotechnol.*, **4**(1),3-20.
- Widayat, W. (2000). Peluang pasar dan perkembangan kina dunia. *Dalam Prosiding Pengembangan Kina Nasional*. Bogor, Asosiasi Penelitian Perkebunan Indonesia. p. 4-10.
- Wahyudi, H.I. (2006). Pasar kina dan prospeknya. *Dalam Lokakarya Kina Nasional. Pusat Penelitian Teh dan Kina Gambung*. Bandung, 9 Mei 2006.
- Yu Kee-Won, Wen-Yuan Gao, Sung-Ho Son & Kee-Yoeup Paek (2000). Improvement of ginsenoside production by jasmonic and some other elicitor in hairy root culture of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, **36**,124-128.
- Zabetakis, I., R. Edwards & M. J. Leech (2000). Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry* **50**, 53-56.
- Zayedb, R. & M. Winka (2004). Induction of tropane alkaloid formation in transformed root cultures of *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae). *Z. Naturforsch.*, **59c**, 863-867.