

Pertumbuhan biak kalus dan suspensi sel tanaman kina (*Cinchona ledgeriana* Moens)

Growth of callus and cell suspension cultures of cinchona (Cinchona ledgeriana Moens)

SUMARYONO & Imron RIYADI

Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

Summary

In vitro technology of plants can be used to propagate plants and to produce secondary metabolites with a short and continuous production cycle. Callus cultures of cinchona (Cinchona ledgeriana Moens) on solid media and cell cultures in liquid media have been established. Callus could be easily initiated from various explants of cinchona clone CB5, GA22 and QRC312. The best callus initiation and proliferation were obtained on a Woody Plant (WP) solid medium supplemented with 15 μ M picloram, 0.5 μ M BAP and 1 μ M phloroglucinol. In this medium the fresh weight of callus increased by 12 to 14-fold within 5 to 6 weeks. Callus that constantly grew fast was selected as a material source for cell suspension cultures. In WP liquid medium with the same composition, the cells remained to grow fast where cell volume after sedimentation (CVS) increased by almost 4-fold in 2 weeks. However, repeated subcultures decreased cell growth rate. The cell suspension culture was then scaled-up in a 5-L bioreactor. The culture medium was the same as in Erlenmeyer flasks. Cells in a bioreactor grew very slowly, the cell biomass fresh weight and packed cell volume (PCV) increased by 34% and 50% respectively after 21 days of culture, although most of the cells remained viable.

[Key words: Bioreactor, callus culture, cell-suspension culture, *Cinchona ledgeriana*, *in vitro* culture]

Ringkasan

Teknologi *in vitro* tanaman dapat digunakan untuk memperbanyak tanaman dan memproduksi senyawa sekunder dengan siklus sangat singkat dan berkelanjutan. Biak kalus tanaman kina (*Cinchona ledgeriana* Moens) pada media padat dan biak sel di medium cair telah dikembangkan. Kalus dengan mudah dapat diinduksi dari berbagai jenis eksplan tanaman kina klon CB5, GA22 dan QRC312. Inisiasi dan proliferasi kalus terbaik diperoleh pada media Woody Plant (WP) padat dengan pikloram 15 μ M, BAP 0,5 μ M dan floroglusinol 1 μ M. Pada medium ini bobot basah kalus meningkat 12-14 kali lipat dalam waktu 5-6 minggu. Kalus yang tetap tumbuh cepat dipilih sebagai sumber bahan untuk biak suspensi sel. Dalam medium cair WP dengan komposisi yang sama, sel tetap tumbuh dengan pesat, volume sel setelah pengendapan (CVS) meningkat hampir empat kali lipat dalam waktu 2 minggu. Namun subkultur berulang menurunkan laju pertumbuhan sel. Skala biak suspensi sel kemudian diperbesar dalam bioreaktor kapasitas 5 L. Media kultur yang digunakan sama dengan medium pada labu Erlenmeyer. Pertumbuhan sel dalam bioreaktor sangat lambat, bobot basah sel dan *packed cell volume* (PCV) hanya bertambah berturut-turut sebesar 34% dan 50% setelah 21 hari dalam kultur, walaupun sebagian besar sel tetap viabel.

Pendahuluan

Alkaloid kuinolin utama yang dihasilkan dari kulit batang kina adalah kinin, kinidin, sinkonin dan sinkonidin. Kulit batang kina baru bisa dipanen setelah tanaman berumur 6 sampai 12 tahun dengan cara menebang pohonnya. Teknologi *in vitro* tanaman dapat digunakan antara lain untuk memproduksi senyawa sekunder. Keuntungan dari metode ini adalah periode daur produksi yang sangat pendek dan berulang antara 2 sampai 4 minggu. Di samping itu, produksi senyawa sekunder *in vitro* dapat dilakukan di mana saja tanpa bergantung pada faktor iklim. Jumlah senyawa sekunder yang berhasil diisolasi dari biak tanaman *in vitro* meningkat dengan drastis sejak tahun 1980, dan pada tahun 1992 jumlahnya berkisar 140 (Stockigt *et al.*, 1995).

Produksi kuinolin dari kultur *in vitro* tanaman kina telah dilakukan menggunakan kalus (Staba & Chung, 1981), suspensi sel (Anderson *et al.*, 1982; Koblitz *et al.*, 1983; Wijnsma *et al.*, 1986) dan akar transform (Hamill *et al.*, 1989; Geerlings *et al.*, 1999; Toruan-Mathius *et al.*, 2004). Produksi alkaloid dari kultur *in vitro* tersebut beragam dan masih sangat rendah, kurang dari 1 mg/g bobot kering. Keunggulan biak sel adalah singkatnya daur produksi yang hanya 2-3 minggu dan tingkat multiplikasi sel yang relatif cepat. Di samping itu, kultur suspensi sel memungkinkan dengan mudah untuk ditingkatkan skala produksinya (*scale up*) dalam bioreaktor (Collin, 2001).

Peningkatan volume biak sel dan organ tanaman sangat penting dalam usaha komersialisasi produk (Roberts & Shuler, 1997). Penelitian awal hampir selalu dilakukan dalam skala kecil di labu

Erlenmeyer, tetapi produksi komersial harus dilaksanakan dalam bioreaktor skala besar. Senyawa sekunder pertama yang diproduksi secara komersial dari biak sel adalah shikonin (bahan pewarna dan antiseptik) dari *Lithospermum erythrorhizon* (Fujita *et al.*, 1982). Meskipun berbagai penelitian telah dilakukan secara intensif, sampai saat ini hanya beberapa senyawa sekunder lain yang telah memasuki tahap komersial antara lain adalah *berberine*, ginseng, purpurin, paklitaksel (taxol) dan asam rosmarinat (Alfermann & Petersen, 1995; Walton, 1999; Collin, 2001). Masalah utama dalam biak sel tanaman skala besar adalah perimbangan antara kebutuhan akan pengadukan untuk mencampur medium dan mencegah sel-sel menggumpal dengan adanya kenyataan bahwa sel tanaman peka terhadap benturan dengan baling-baling bioreaktor, walaupun beberapa spesies tanaman diketahui tidak terpengaruh (Wilson & Hilton, 1995). Oleh karena itu, selain bioreaktor berpengaduk, dibuat desain lain misalnya bioreaktor dengan sistem *bubble column*, *air-lift* dan *rotating drum* (Panda *et al.*, 1989; Singh, 1997).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan formulasi media dan kondisi yang optimum bagi biak kalus dan biak suspensi sel tanaman kina klon unggul Indonesia.

Bahan dan Metode

Bahan tanaman

Jenis eksplan yang digunakan adalah daun muda berwarna hijau kecokelatan dari tanaman di rumah kaca dan tanaman muda asal benih yang dibiakkan *in vitro*. Tanaman kina *Cinchona ledgeriana* klon CB5, GA22 dan QRC312 asal sambungan

Pertumbuhan biak kalus dan suspensi sel tanaman kina

berumur 6 bulan diperoleh dari Pusat Penelitian Teh dan Kina, Gambung kemudian ditumbuhkan di rumah kaca. Sedangkan benih kina yang diperoleh dari KP Pasir Sarongge, Cipanas dikecambahkan dengan disterilisasi terlebih dahulu menggunakan Dithane M45 0,2% dan kloroks 20% masing-masing selama 15 menit, kemudian dibilas beberapa kali dengan air steril. Selanjutnya benih dikecambahkan pada kertas saring di cawan Petri. Setelah 2-3 minggu, kecambah yang tumbuh dikulturkan pada medium padat 1/2 MS (Murashige & Skoog, 1962) di botol kultur kecil yang diletakkan di bawah cahaya dengan intensitas sekitar 30 $\mu\text{mol foton/m}^2/\text{s}$ dengan lama pencahayaan 14 jam per hari. Tanaman muda *in vitro* digunakan sebagai bahan eksplan berumur dua bulan yaitu setelah mempunyai sedikitnya dua pasang daun.

Induksi dan proliferasi kalus

Eksplan daun muda dari tanaman yang dipelihara di rumah kaca dicuci dengan deterjen selama 5 menit dan dibilas air, kemudian direndam dalam larutan kloroks 20% selama 15 menit dan dibilas air steril 3-4 kali. Eksplan asal tanaman *in vitro* tidak disterilisasi. Medium dasar untuk menginduksi kalus adalah MS dengan sukrosa 30 g/L, Gelrite 2 g/L, floriglusinol 1 μM dan kinetin 1 μM . Perlakuan yang digunakan adalah konsentrasi 2,4-D 1, 5, 25 dan 50 μM . pH medium diatur 5,7 sebelum diautoklaf pada suhu 121°C dan tekanan udara 1,0 kg/cm^2 selama 20 menit. Sebanyak 10 mL medium dituang dalam cawan Petri kecil berdiameter 5 cm. Bagian pinggir daun dibuang kemudian dipotong segi empat dengan ukuran 7 mm x 7 mm dan dikulturkan pada medium sebanyak tiga

eksplan dalam setiap cawan Petri. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 10 kali. Kultur kemudian diletakkan di ruang kultur di bawah cahaya dengan intensitas sekitar 30 $\mu\text{mol foton/m}^2/\text{s}$ dengan lama pencahayaan 14 jam per hari dengan suhu 25°C. Enam minggu setelah kultur, jumlah eksplan yang membentuk kalus diamati. Kalus berwarna kuning dari klon CB5 disubkultur dan digunakan sebagai bahan untuk proliferasi kalus secara rutin. Untuk proliferasi kalus digunakan medium MS dengan sukrosa 40 g/L, Gelrite 2 g/L, PVP 1%, sistein 100 mg/L, kinetin 1 μM dengan 2,4-D 1 atau 10 μM dan medium Woody Plant (WP) (Lloyd & McCown, 1981) dengan sukrosa 30 g/L, Gelrite 2 g/L, floriglusinol 1 μM , BAP 0.5 μM dengan pikloram 15 atau 30 μM . Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan lima ulangan.

Induksi dan proliferasi kalus selanjutnya dilakukan dalam medium terbaik dari hasil percobaan yang diperoleh. Kalus diperbanyak dengan melakukan subkultur beberapa kali. Untuk mendapatkan kurva pertumbuhan kalus dan saat subkultur yang tepat, kalus remah asal klon CB5 dikulturkan pada medium WP dengan pikloram 15 dan 30 μM pada botol kultur berdiameter 8 cm dan tinggi 12 cm. Sebanyak masing-masing empat botol dipilih secara acak setiap minggu, kalusnya dipanen dan bobot basah kalus kemudian ditimbang. Panen kalus dilakukan sampai dengan minggu ke 8.

Biak suspensi sel

Kalus yang tumbuh cepat asal klon kina CB5 dipilih untuk dijadikan sebagai sumber bahan biak suspensi sel. Sebanyak kurang-lebih 1 g kalus ditransfer ke dalam 25 mL medium cair WP dengan zat pengatur

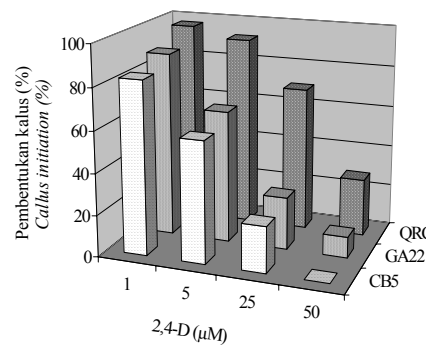
tumbuh sama dengan medium padat. Labu Erlenmeyer yang digunakan adalah labu bersekat (*buffle flasks*) berukuran 100 mL. Kultur tersebut kemudian diletakkan di atas mesin pengocok dengan kecepatan 100 rpm. Setelah dua minggu kultur disaring dengan ukuran 1000 μm dan disubkultur pada medium cair yang sama di labu Erlenmeyer biasa berukuran 100 mL. Pengamatan pertumbuhan suspensi sel dilakukan setiap dua hari terhadap 10 labu dengan menggunakan alat ukur *cell volume after sedimentation* (CVS) menurut Blom *et al.* (1992). Laju pertumbuhan sel diamati selama empat kali kultur setiap dua minggu untuk meneliti kestabilan pertumbuhan sel setelah beberapa kali subkultur. Viabilitas sel diamati dengan melakukan pewarnaan menggunakan larutan *Evans blue* 0,5 % selama 5 menit dan diamati di bawah mikroskop (Baker & Mock, 1994; Riyadi & Tahardi, 2003).

Kumpulan sel dalam labu Erlenmeyer dijadikan sebagai sumber bahan untuk kultur dalam bioreaktor. Kerapatan awal inokulum sel di bioreaktor berpengaduk (Applikon) kapasitas 5 L adalah 4% (w/v). Komposisi medium yang digunakan sama dengan medium untuk biak sel di labu Erlenmeyer kecuali dengan penambahan antibiotika rifampisin 15 mg/L. Peubah yang diukur setiap hari adalah pH, oksigen terlarut (*dissolved oxygen = dO₂*) dan suhu kultur, sedangkan bobot basah biomassa sel, *packed cell volume* (PCV), dan viabilitas sel diamati dari contoh suspensi sel sebanyak 10 mL yang diambil setiap tiga hari sampai umur 21 hari. Kecepatan agitasi di bioreaktor diatur 60 rpm dengan suhu kultur sekitar 25 °C.

Hasil dan Pembahasan

Induksi kalus

Kalus mulai terbentuk pada eksplan daun tanaman kina sekitar dua minggu setelah dikultur. Hasil sidik ragam (*analysis of variance*) menunjukkan bahwa konsentrasi 2,4-D mempengaruhi secara sangat nyata persentase pembentukan kalus dari eksplan daun. Sebanyak 80-95% dari eksplan membentuk kalus pada medium MS dengan perlakuan 2,4-D 1 μM , sedangkan pada konsentrasi tinggi yaitu 25 dan 50 μM hanya kurang dari 30% eksplan yang membentuk kalus (Gambar 1). Hasil sidik ragam juga memperlihatkan bahwa faktor klon tidak berpengaruh terhadap persentase pembentukan kalus dan tidak terdapat interaksi antara konsentrasi 2,4-D dan jenis klon.



Gambar 1. Persentase pembentukan kalus dari eksplan daun kina *C. ledgeriana* klon CB5, GA22 dan QRC312.

Figure 1. Percentage of callus initiation on leaf explants of *C. ledgeriana* clone CB5, GA22 and QRC312.

Pertumbuhan biak kalus dan suspensi sel tanaman kina

Kalus dapat diinduksi dari daun muda tanaman sambungan atau dari tanaman asal perkecambahan biji *in vitro*. Eksplan asal tanaman *in vitro* sering digunakan mengingat kemungkinan kontaminasi yang tinggi pada eksplan asal lapangan. Dari hasil penelitian ini persentase kontaminasi eksplan *ex vitro* sekitar 40% bila tanaman sumber eksplan diletakkan terlebih dahulu di rumah kaca, sedangkan kontaminasi pada eksplan asal tanaman *in vitro* sekitar 10%. Untuk menginduksi kalus tanaman kina, MS merupakan medium yang paling banyak digunakan walaupun medium B5 kadangkala digunakan juga (Scragg *et al.*, 1986; Wijnsma *et al.*, 1986). Salah satu masalah dalam induksi kalus dari tanaman kina adalah terjadinya pencokelatan (*browning*) yang berlangsung relatif cepat. Dari penelitian ini juga terlihat bahwa penambahan 2,4-D juga berpengaruh terhadap pencokelatan eksplan daun kina. Enam minggu setelah tanam, sebagian besar eksplan mencokelat pada perlakuan 2,4-D 50 μM pada semua klon. Semakin rendah konsentrasi 2,4-D, tingkat pencokelatan eksplan cenderung semakin rendah. Pencokelatan pada kina dapat diatasi antara lain dengan PVP (Anderson *et al.*, 1982) atau floriglusinol (Hunter, 1979). Dari ketiga klon kina yang diuji, persentase pencokelatan tertinggi terjadi pada klon CB5 sebesar 59%, disusul GA22 sebesar 44% dan QRC312 sebesar 28%.

Proliferasi kalus

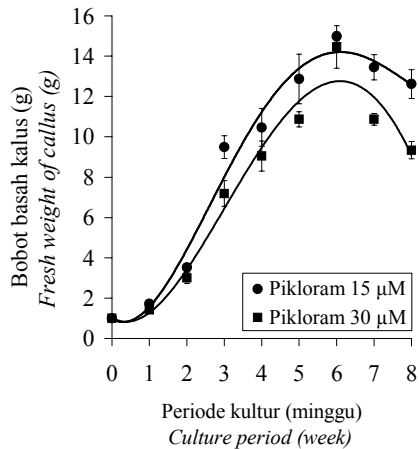
Mengingat jumlah kalus yang tersedia maka untuk biak kalus dan sel selanjutnya digunakan kalus dari eksplan kina klon CB5. Laju pertumbuhan kalus kina pada medium padat MS dengan 2,4-D 5 μM dan kinetin

1 μM relatif lambat yaitu hanya meningkat dua kali lipat dalam 4 minggu dan mudah mencokelat. Proliferasi kalus terbaik diperoleh pada medium WP dengan pikloram 15 atau 30 μM dikombinasikan dengan BAP 0,5 μM . Biak kalus pada medium WP ini tumbuh dengan sangat cepat, bobot basah kalus meningkat 12-14 kali dari bobot awal dalam waktu 6 minggu. Kalus yang diperoleh bertekstur remah, berwarna putih kecokelatan dan tidak mudah mengalami pencokelatan walaupun disubkultur berulang kali.

Kurva pertumbuhan kalus yang tumbuh cepat ini memperlihatkan fase eksponensial sudah mulai berlangsung setelah satu sampai dua minggu dan bobot basah tertinggi tercapai pada umur enam minggu (Gambar 2). Setelah itu bobot basah biomassa kalus menurun dengan drastis seiring dengan semakin sedikitnya medium yang tersedia dan mulainya kalus mengering. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa untuk biak kalus kina sebaiknya disubkultur ke medium baru setiap 5 minggu. Bobot basah kalus pada perlakuan pikloram 30 μM sedikit lebih rendah dibandingkan dengan pikloram 15 μM dan menurun lebih tajam setelah umur 6 minggu (Gambar 2), walaupun secara statistik tidak berbeda nyata. Oleh karena itu, untuk kultur selanjutnya digunakan medium WP dengan pikloram 15 μM dan BAP 0,5 μM .

Pertumbuhan sel dalam labu Erlenmeyer

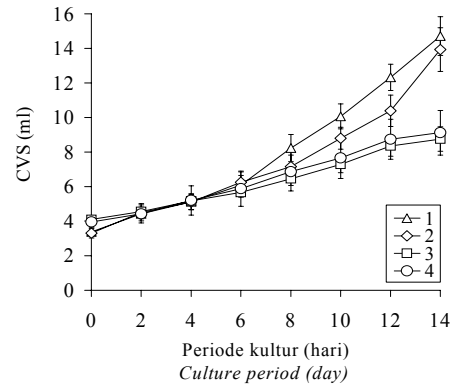
Kalus remah yang tumbuh cepat pada medium padat WP dengan pikloram 15 μM dan BAP 0,5 μM dijadikan bahan untuk biak suspensi sel. Walaupun sebagian besar peneliti menggunakan medium B5 untuk biak sel kina (Robins *et al.*, 1986; Scragg



Gambar 2. Kurva pertumbuhan kalus kina pada medium padat WP dengan penambahan pikloram 15 µM (●) atau 30 µM (■).

Figure 2. Growth curve of cinchona callus on solid WP medium added with 15 µM (●) or 30 µM (■) picloram.

et al., 1986; Wijnsma et al., 1986), pertumbuhan sel kina dalam medium cair B5 dengan 2,4-D 10 µM dan kinetin 1 µM sangat lambat, CVS sel hanya meningkat dua kali lipat (dari 1,44 menjadi 2,86) dalam periode kultur 20 hari. Penggunaan medium WP dengan pikloram 15 atau 30 µM dan BAP 1 µM meningkatkan secara drastis laju pertumbuhan sel kina, biomassa sel meningkat sampai dengan empat kali dalam waktu 14 hari (Gambar 3). Namun, laju pertumbuhan sel menurun sejalan dengan dilakukannya subkultur secara berulang.



Gambar 3. Kurva pertumbuhan lini sel kina *C. ledgeriana* yang tumbuh cepat dalam medium cair WP dengan pikloram 15 µM dan BAP 1 µM pada kultur pertama (1), kultur kedua (2), kultur ketiga (3) dan kultur keempat (4).

Figure 3. Growth curve of a fast-growing cell line of *C. ledgeriana* in WP liquid medium with 15 µM picloram and 1 µM BAP at the first culture (1), second culture (2), third culture (3) and fourth culture (4).

Pada kultur ketiga dan keempat terlihat bahwa laju pertumbuhan sel suspensi melambat menjadi 2 sampai 2,5 kali dalam periode 14 hari (Gambar 3). Dari penelitian ini menunjukkan bahwa laju pertumbuhan sel yang tinggi hanya berlangsung pada kultur pertama dan kedua. Dibandingkan dengan hasil penelitian lain, laju pertumbuhan sel kina yang diperoleh relatif tinggi. Masa penggandaan (*doubling time*) sel sekitar tujuh hari pada kultur pertama dan kedua (Gambar 3), sedangkan hasil penelitian lain adalah lima hari (Koblitz

Pertumbuhan biak kalus dan suspensi sel tanaman kina

et al., 1983; Wijnsma *et al.*, 1986), 14 hari (Staba & Chung, 1981), bahkan ada yang mencapai 28 hari (Robins *et al.*, 1986). Perbedaan hasil ini berkaitan dengan perbedaan bahan tanam, medium dan kondisi kultur yang digunakan. Kurva pertumbuhan sel menunjukkan laju pertumbuhan masih tinggi dan belum menunjukkan fase perlambatan pada saat dilakukan subkultur (umur 14 hari) terutama pada kultur pertama dan kedua (Gambar 3). Oleh karena itu, lama kultur sel mungkin dapat diperpanjang melebihi 14 hari sebelum disubkultur ke media yang baru. Hasil percobaan oleh Wijnsma *et al.* (1986) menunjukkan bahwa pertumbuhan sel kina masih meningkat sampai dengan umur 18 hari, setelah itu memasuki fase perlambatan. Viabilitas sel dalam kultur cair tetap tinggi, pengujian dengan *Evans blue* menunjukkan tingkat viabilitas sel sekitar 97% sampai dengan umur 14 hari penambahan antioksidan, pencokelatan diatasi dengan memperpendek siklus kultur atau mengganti sebagian medium dengan medium baru dalam periode waktu yang sangat singkat misalnya setiap 3-4 hari (Koblitz *et al.*, 1983).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dengan penambahan floroglusinol 1 μM dan penggunaan kalus remah yang tumbuh pesat, baik biak kalus maupun suspensi sel tidak mengalami pencokelatan walaupun telah disubkultur berulang kali.

Biak sel di bioreaktor

Kondisi biak sel di bioreaktor diatur dengan suhu sekitar 25°C yang relatif stabil pada kisaran tersebut. Sedangkan pH kultur berkisar antara 4,1 pada awal kultur sampai dengan 4,4 pada akhir penelitian yaitu pada hari ke 21. Tingkat pH medium yang rendah

ini sejalan dengan hasil pengamatan Koblitz *et al.* (1983) yang memperlihatkan bahwa pH medium kultur kina menurun dari 5,7 menjadi 4,0 setelah beberapa hari. Kecepatan pengadukan diatur 60 rpm untuk mencegah penggumpalan agregat sel dan meningkatkan aerasi tanpa menimbulkan kerusakan sel. Biomassa sel yang tumbuh pesat dalam labu Erlenmeyer digunakan sebagai inokulum untuk biak suspensi sel di bioreaktor. Suspensi sel dalam bioreaktor terdiri dari agregat sel yang merupakan kumpulan individu sel yang berbentuk memanjang (*elongated cells*) (Gambar 4).

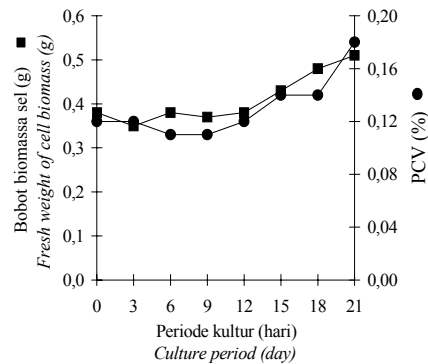
Viabilitas sel relatif tetap tinggi, hasil pengujian menunjukkan bahwa persentase sel yang viabel menurun perlahan sejalan dengan umur kultur, dan mencapai 81% pada umur 21 hari. Pengamatan agregat sel dengan mikroskop memperlihatkan bahwa sebagian besar sel masih tetap utuh, hal ini menunjukkan tidak terjadi kerusakan sel akibat pengadukan. Pertumbuhan biomassa sel kina dalam kultur bioreaktor sangat lambat. Bobot basah biomassa sel hanya meningkat 34% sedangkan PCV meningkat 50% setelah 21 hari dalam kultur (Gambar 5). Kemungkinan faktor penyebab lambatnya pertumbuhan sel di bioreaktor adalah bahan sel diperoleh dari kultur di labu Erlenmeyer yang sudah beberapa kali disubkultur sehingga laju pertumbuhannya telah menurun. Faktor lain yang diduga kuat adalah ketersediaan oksigen yang kurang memadai. Pada penelitian ini terjadi kerusakan dalam pengukuran dO_2 pada panel sehingga pasokan udara diatur secara manual. Pasokan udara yang terlalu banyak menyebabkan timbulnya busa (*foaming*), oleh karena itu pasokan udara diatur sehingga busa yang terbentuk hanya sedikit.



Gambar 4. Agregat sel dalam kultur suspensi sel kina di bioreaktor terdiri dari sel-sel yang berbentuk memanjang.

Figure 4. Cell aggregates in a cinchona cell suspension culture in a bioreactor consist of elongated cells.

Oksigen terlarut merupakan salah satu faktor terpenting dalam pertumbuhan sel di bioreaktor (Williams & Doran, 1995). Pencokelatan sel merupakan masalah utama dalam biak cair tanaman kina. Di samping Pengadukan (*mixing*) sangat penting untuk mempertahankan keseragaman kondisi fisiologis di dalam bejana kultur. Pengadukan memperbaiki pertumbuhan dengan meningkatkan transfer hara dari fase cair dan gas ke dalam sel dan meningkatkan aerasi. Pada penelitian ini kecepatan putaran diatur 60 rpm yang merupakan kecepatan optimum untuk biak sel embriogenik tanaman kelapa sawit (Tahardi, 1999). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kecepatan pengadukan 60 rpm tidak merusak keutuhan sel (Gambar 4). Kecepatan ini mungkin perlu ditingkatkan sampai batas tertentu yang fungsinya



Gambar 5. Kurva pertumbuhan bobot basah biomassa sel dan PCV selama satu periode kultur di bioreaktor.

Figure 5. Growth curve of biomass fresh weight and PCV over one culture period in a bioreactor.

sebagai pengaduk dan pemasok oksigen lebih optimum tetapi tidak sampai merusak keutuhan sel tanaman.

Beberapa faktor lain yang mungkin mempengaruhi pertumbuhan sel di bioreaktor adalah pH kultur yang rendah dan intensitas cahaya yang kurang. Pada penelitian ini pH kultur stabil pada kisaran 4,1 – 4,4 yang jauh lebih rendah dari pH medium yang diatur pada kisaran 5,7 – 5,8 pada saat membuat medium sebelum diautoklaf. Di samping itu, intensitas cahaya rendah disebabkan bioreaktor diletakkan di ruangan yang sumber cahayanya hanya berasal dari lampu TL yang terletak di plafon. Hal ini menyebabkan intensitas cahaya yang diterima kultur di bioreaktor jauh lebih rendah dari yang diperoleh pada saat biak sel di labu Erlenmeyer di ruang kultur.

Kesimpulan

Komposisi medium terbaik untuk induksi kalus dari eksplan daun tanaman kina *C. ledgeriana* adalah MS dengan 2,4-D 1 μM dan kinetin 1 μM . Proliferasi kalus pada medium WP dengan pikloram 15 μM dan BAP 0,5 μM memperlihatkan pertambahan biomassa kalus 12 sampai 14 kali lipat dalam waktu 5 minggu. Penggunaan florogusinol 1 μM efektif dalam menekan terjadinya pencokelatan kalus kina. Medium terbaik untuk kultur suspensi sel kina dalam labu Erlenmeyer adalah medium WP ditambah pikloram 15 μM , BAP 0,5 μM dan rifampisin 15 mg/L. Namun, pertumbuhan biomassa sel kina menjadi lambat dalam kultur bioreaktor.

Daftar Pustaka

- Alfermann, A.W. & M. Petersen (1995). Natural product formation by plant cell biotechnology: results and perspectives. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **43**, 199-205.
- Anderson, L.A., A.T. Keene & J.D. Phillipson (1982). Alkaloid production by leaf organ, root organ and cell suspension cultures of *Cinchona ledgeriana*. *Plant. Med.*, **46**, 25-27.
- Baker, C. J. & N.M. Mock (1994). An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using evans blue. *Plant Cell, Tiss. & Org. Cult.*, **39**, 7-12.
- Blom, T. J. M., W. Kreis, F. van Iren & K.R. Libbenga (1992). A non-invasive method for the routine-estimation of fresh weight of cells grown in batch suspension cultures. *Plant Cell Rep.*, **11**, 146-149.
- Collin, H.A. (2001). Secondary product formation in plant tissue culture. *Plant Growth Reg.*, **34**, 119-134.
- Fujita, Y., M. Tabata, A. Nishi & Y. Yamada (1982). New medium and production of secondary compounds with the two-staged culture method. In: A. Fujiwara (ed.) *Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Cult.*, p. 399-400.
- Geerlings, A., D. Hallard, A. M. Caballero, I. L. Cardoso, R. van der Heijden & R. Verpoorte (1999). Alkaloid production by a *Cinchona officinalis* 'Ledgeriana' hairy root culture containing constitutive expression constructs of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase cDNAs from *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.*, **19**, 191-196.
- Hamill, J.D., R.J. Robins & M.J.C. Rhodes (1989). Alkaloid production by transformed root cultures of *Cinchona ledgeriana*. *Plant. Med.*, **55**, 354-357.
- Hunter, C.S. (1979). *In vitro* culture of *Cinchona ledgeriana* L. *J. Hort. Sci.*, **54**(2), 111-114.
- Koblitz, H., D. Koblitz, H.P. Schmauder & D. Groger (1983). Studies on tissue cultures of the genus *Cinchona* spp.:

- alkaloid production in cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.*, **2**, 122-125.
- Lloyd, G. & B. McCown (1981). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* **30**, 421-427.
- Murashige, T. & F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and biomass with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- Panda, A.K., S. Mishra, V.S. Bisaria & S.S. Bhojwani (1989). Plant cell reactors - a perspective. *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 386-397.
- Riyadi, I. & J.S. Tahardi (2003). Inisiasi, karakterisasi dan regenerasi kultur suspensi sel embriogenik tanaman teh [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz] In : B. Sriyadi *et al.* (eds.) *Pros. Simp. Teh Nas. 2003*, Bandung, 15 Oktober 2003, p. 247-255.
- Roberts, S.C. & M.L. Shuler (1997). Large-scale plant cell culture. *Curr. Opin. in Biotechnol.*, **8**, 154-159.
- Robins, R. J., J. Payne & M. J. Rhodes (1986). Cell suspension cultures of *Cinchona ledgeriana*. I. Growth and quinoline alkaloid production. *Planta Med.*, **52**, 220-225.
- Scragg, A. H., P. Morris & E.J. Allan (1986). The effects of plant growth regulators on growth and alkaloid formation in *Cinchona ledgeriana* callus culture. *J. Plant Physiol.*, **124**, 371-377.
- Schulman, A.H. (1998). Plant cells in plants. *Trends in Biotechnol.* **16**, 1-2.
- Singh, G. (1997). Reactor design for plant cell culture of food ingredients and additives. *Food Technol.*, **51**, 62-66.
- Staba, E.J. & A.C. Chung (1981). Quinine and quinidine production by cinchona leaf, root and unorganized cultures. *Phytochem.*, **20**(11), 2495-2498.
- Stockigt, J., P. Orbitz, H. Falkenhagen, R. Lutterbach & S. Endres (1995). Natural products and enzymes from plant cell cultures. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **43**, 97-109.
- Tahardi, J.S. (1999). Growth characteristics of embryogenic cells of oil palm in bioreactor cultures. *J. Bioteknologi. Pert.*, **4**(2), 49-55.
- Toruan-Mathius, N., Reflini, Nurhaimi-Haris & J. Santoso & A.Priangi-Roeswiem (2004). Kultur akar rambut *Cinchona ledgeriana* Moens dan *C. succirubra* Pavon dalam kultur *in vitro*. *Menara Perkebunan*, **72** (1), 71-90.
- Walton, N. J., A.W. Alfermann & M.J.C. Rhodes (1999). Production of secondary metabolites in cell and differentiated organ cultures. In: J. Hammond *et al.* (eds.) *Plant Biotechnology: New Products and Applications*, Springer-Verlag, p. 311-345.

Pertumbuhan biak kalus dan suspensi sel tanaman kina

- Wijnsma R., R. Verportee, P.A.A. Harkes, T.B. van Vliet, H.J.G. Ten Hoopen & A.B. Svendsen (1986). The influence of initial sucrose and nitrate concentrations on the growth of *Cinchona ledgeriana* cell suspension cultures and the production of alkaloids and anthraquinones. *Plant Cell, Tiss. & Org. Cult.* ,7, 21-29.
- Williams, G.R.C. & P.M. Doran (1995). The importance of oxygen in hairy root culture. *Australian Biotechnol.*, 5, 92-94.
- Wilson, P.D.G. & M.G. Hilton (1995). Plant cell bioreactors. In J.A. Asenjo & J.C. Merchuk (eds.) *Bioreactor System Design*. Marcel Dekker, Inc. p. 413-439