

BIOCHEMICAL SELECTION AND SOMA CLONAL VARIATION OF HIGH ALKALOID MUTANT IN *Catharanthus Roseus* [L] Don.

Sumaryati Syukur

Laboratory of Biochemistry/Biotechnology, Department of Chemistry,
University of Andalas Padang

INTISARI

Seleksi biokimia adalah sangat bermanfaat untuk menyeleksi klon pada tanaman catharanthus roseus. Variasi klonal diperoleh dari perlakuan dengan radiasi gamma. Beberapa dosis radiasi digunakan untuk produksi variasi klonal. Dosis yang paling efektif untuk menghasilkan variasi klonal yang paling baik adalah 15 dan 20 Krad. Frekuensi dari variasi klon yang resistan adalah 10-4. Variasi klon yang resistan dapat tumbuh dan germinasi lebih baik dari tipe asalnya. Seleksi biokimia yang digunakan untuk menghasilkan variasi yang tahan adalah substrat analog dari asam amino triptofan (5-Metyltryptofan) atau (5-MT). Beberapa konsentrasi dari 5-MT yang digunakan untuk menghasilkan variasi klon yang tahan adalah (0; 0.05; 0.1; 0.15; 0.2 mM). Konsentrasi yang tertinggi untuk menyeleksi mutant yang mempunyai karakter biokimia adalah 0.2 mM.

Kami berhasil mendapatkan biji (F2) dari mutan yang diharapkan. Biji dari mutan terseleksi (M2) adalah lebih besar dan tumbuh lebih baik bila dibandingkan dengan tipe asalnya pada medium yang mengandung (5-MT). Kami mengharapkan mendapatkan mutan yang dapat menghasilkan triptofan yang berlebihan sebagai prekursor untuk indole alkaloid.

Penelitian kultur invitro dilanjutkan untuk mengembangkan kalus yang bersifat embriogenik dari daun. Beberapa manipulasi hormon auxin dan sitokinin diperlakukan untuk menginduksi pembentukan kalus. Modifikasi medium MS dengan perbandingan kinetin dan sitokinin (10:1) dapat menginduksi struktur globular dari embrio. Reagen Dragendorf digunakan untuk menentukan klon dengan kandungan alkaloid yang tinggi dari mutan yang diharapkan. Analisa TLC dari mutan kalus memperlihatkan 3 pita yang jelas pada Rf 0.22, 0.41, 0.58 sedangkan kontrol hanya memperlihatkan 2 pita yang samar pada 0.21 dan 0.52.

Kata Kunci : Seleksi Biokimia, Mutan, Variasi Klonal dan 5-Metyltryptophan

ABSTRACT

Biochemical selection have been very useful to select high alkaloid clones in *Catharanthus roseus* plant. Clonal variation have also been created after gamma-irradiation. Several doses have been used to produce clonal variation. The most effective doses used to perform better clonal variation was about 15 to 20 krad. The frequency of resistant variants was 10^{-4} . The resistant variants were germinate and grown better than the wild type. Biochemical selection used to the resistant variants was analog substrate of amino acid tryptophan (5-Metyltryptophan) or (5-MT). Several concentration of 5-MT subsequently (0; 0.05; 0.1; 0.15; 0.2 mM) were treated to the resistant variants. The highest concentration to select biochemical mutants was 0.2 mM.

We have success to get (F2) seeds from the expected mutant. The seeds from selected mutant (M2) are bigger when comparing to the wild type and growth better on medium containing (5-MT). We expected higher tryptophan over-producing mutants as a precursor of indole alkaloid.

Further experiments continue to do invitro culture in order to develop embryonic callus from leaf tip and leaf base. Several manipulations of auxin and cytokinin have been used to differentiate the callus formation. Modified MS medium with kinetin and cytokinin (10:1) can induce globular embryo like structure. Dragendorf alkaloid reagent were used to determine high alkaloid clones from the expected mutant. TLC analysis from callus mutant shows 3 clear bands with subsequent Rf about 0.22, 0.41, 0.58 while control shows two smearing bands at 0.21 and 0.52.

Key words: Biochemical Selection, Mutan, Clonal Variation and 5-Metyltryptophan

PENDAHULUAN

Untuk memproduksi suatu senyawa kimia bermanfaat, seperti asam amino esensial, senyawa metabolit sekunder dll, dapat dilakukan dengan biofermentasi sel-sel mutan yang dapat menghasilkan senyawa tersebut dalam jumlah yang berlebihan atau (over-produce). Biochemical mutan pada tanaman ataupun mikroba dapat berpotensi untuk memproduksi suatu senyawa kimia yang bermanfaat. Hal ini didasarkan pada adanya suatu mekanisme biokimia yang jelas seperti terjadinya mekanisme anti-feedback inhibition pada salah satu enzim kontrolnya, sehingga produk akhir dapat disintesa oleh sel secara berlebihan. Mutan-mutan dengan mekanisme seperti ini telah banyak diseleksi dan dipelajari sifat-sifat biokimia dan kestabilannya¹.

Penggunaan sinar gamma dan mutagen lainnya telah banyak berhasil untuk menginduksi variasi klonal baik berasal dari biji maupun sumber explant lainnya². Problema yang sering muncul adalah tentang kestabilan sifat-sifat genetik yang diinginkan pada generasi berikutnya³. Oleh karena itu karakterisasi mutan secara biokimia, molekular dan genetik yang stabil adalah penting untuk aplikasi mutan⁴.

Tanaman obat *Catharanthus roseus* telah banyak diteliti baik secara biokimia/bioteknologi, kimia organik, molekular level karena banyak mengandung alkaloid yang bernilai ekonomi tinggi seperti ajmalicin, serpentine, vincristine dan vinblastine dll⁵. Penelitian untuk meningkatkan kandungan indole alkaloid secara plant cell biotechnology telah banyak dilakukan di Leiden Amsterdam Center for Drug Research (LACDR), akan tetapi hingga saat ini masalah kestabilan genetik sifat-sifat yang diinginkan untuk skala produksi dan penggunaan yang terus menerus didalam kultur/bioreaktor menjadi kendala menurunnya produksi hingga dapat merugikan.

Salah satu cara yang mudah dan sederhana adalah dengan memberikan perlakuan sinar gamma pada biji dan melakukan seleksi yang tepat pada generasi F2. Penggunaan seleksi awal germinasi biji dengan analog asam amino tertentu diharapkan dapat menghasilkan asam amino tersebut secara berlebihan. Dalam hal ini asam amino yang digunakan adalah tryptophan. Diharapkan pada penelitian ini seleksi germinasi dengan analog tryptophan (5-MT) dapat memperoleh mutan over-produce triptophan yang merupakan prekursor biosintesa alkaloid indole. Mutan seperti ini diharapkan akan mempunyai

mekanisme anti feed-back inhibition terhadap produk akhirnya dan dapat mempunyai kestabilan yang tinggi. Hal ini akan menjadi tujuan akhir untuk menggunakan secara bioteknologi fermentasi sel tanaman guna produksi senyawa obat indole alkaloid yang bernilai ekonomi tinggi.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan variasi klonal dengan penggunaan sinar gamma dan karakterisasi awal klonal unggul pada F2 untuk memperoleh tanaman dengan kandungan alkaloid yang tinggi.

METODOLOGI

1. Sumber tanaman

Tanaman *Catharanthus roseus* berbunga pink yang digunakan berasal dari koleksi pribadi yang diambil di sepanjang pantai Padang. Biji dipanen untuk diradiasi di BATAN Jakarta.

2. Radiasi Gamma

Biji diperlakukan dengan sinar gamma dosis (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 dan 40 Krad) dengan Gamma Cell model 220 BATAN Jakarta. Biji setelah diradiasi ditanam pada tanah kompos dengan sinar matahari penuh (green house terbuka).

3. Variasi Klonal

Efek radiasi sinar gamma menimbulkan variasi klonal berdasarkan phenotypic yang muncul dari tanaman. Data phenotypic pada M1 seperti tinggi tanaman, batang dan daun, shape/diameter daun. Tanaman yang unggul dipelihara hingga mendapatkan biji M2 untuk karakterisasi kuantitatif seperti berat per 100 biji (mg), kandungan klorofil ditentukan di BATAN Jakarta dengan metoda spektrofotometry pada panjang gelombang 625 nm.

4. Kultur invitro biji (F2) dan induksi katus

a. Germinasi biji/seleksi

Biji dari mutan unggul yang lebih besar yang diperoleh dengan dosis 20 Krad, klon 1 s/d 5 dipanen setelah 3 s/d 4 bulan untuk mendapatkan generasi F2. Medium seleksi MS yang mengandung 5-MT dengan konsentrasi 0.2 m M untuk mutan dan 0.02 mM untuk wild type.

b. Induksi kalus

Induksi kalus dilakukan terhadap daun muda mulai dari bahagian ujung, tengah dan pangkal daun. Medium modifikasi MS digunakan dengan konsentrasi hormon pertumbuhan diklorofenoksi asetat (2,4-D) dan kinetin yang bervariasi dengan perbandingan (2:1), (4:1), (6:1), (8:1), (10:1), (12:1) dan (14:1) ppm. Kultur ditumbuhkan pada ruangan kultur dengan temperatur 20-22 °C, dengan cahaya dan tanpa cahaya. Media dan alat yang digunakan terlebih dahulu disterilkan didalam autoclaf pada suhu 121°C, tahanan 15 psi selama 15 menit. Daun yang akan ditanam pada media terlebih dahulu disterilkan dengan larutan Ca-hipoklorit 5% selama 20 menit, lalu dibilas dengan akuadest steril tiga kali. Penanaman daun yang steril dilakukan dengan memotong bahagian daun sekitar 0.5 x 0.5 cm.

5. Uji Kualitatif Alkaloid

a. Dragendorff

Uji kualitatif alkaloid dilakukan terhadap kalus dengan reagen Dragendorff yaitu: Bismut subnitrat sebanyak 0.85 g dilarutkan dalam 10 ml asam asetat glasial dan 40 ml air suling. 8 g KI dilarutkan dalam 20 ml air suling, kedua larutan dicampurkan dan ambil sebanyak 10 ml kemudian ditambahkan 20 ml asam asetat glasial. Volume dicukupkan dengan akuabides hingga 100 ml. Larutan disimpan dalam botol bewarna gelap.

b. Identifikasi alkaloid

Kalus ditimbang kira-kira sebanyak 2 g. Kemudian digerus pada lumpang porselein dan ditambahkan 10 ml kloroform dan 10 ml campuran kloroform amoniak dengan perbandingan (20:1), sambil terus digerus sampai halus. Kemudian disaring kedalam tabung reaksi dan tambahkan 10 tetes asam sulfat 2N, larutan dikocok. Pipet lapisan asam pada bahagian atas dan ditambahkan 2 tetes perekusi Dragendorff yang ditandai dengan adanya endapan jingga.⁷

c. Ekstraksi kalus untuk TLC

Kalus diekstraksi dengan metoda Sim et al. (1994) yang dimodifikasi. Kalus dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 48 jam, lalu digerus dalam metanol murni dan

disaring dengan kertas Whatman No 1. Residu dibilas dengan metanol murni sebanyak dua kali. Ekstrak metanol digabungkan dan diajak. Residu dilarutkan kembali dalam 10 ml 0.5 M HCl dan diekstraksi dengan diklorometana murni dua kali. Fasa asam dibasakan dengan NaOH 4N hingga pH 10 dan diekstraksi lagi dengan diklorometana murni dua kali. Sisa-sisa air dalam kumpulan fraksi diklorometana dihilangkan dengan Na₂SO₄ kering, selanjutnya diajak hingga kering dan dilarutkan dalam 1 ml metanol untuk ditotarkan pada plat TLC.

TLC preparatif silika gel dari Merck digunakan dengan larutan pengembang terdiri atas etil asetat dan metanol dengan perbandingan 9:1.

HASIL DAN DISKUSI

Pengaruh radiasi sinar gamma pada biji *Catharanthus roseus* dapat menginduksi terjadinya variasi phenotypic tanaman. Sebanyak 2000 biji diperlakukan untuk setiap dosis radiasi sinar gamma ditumbuhkan langsung pada media tanah kompos. Pengaruh yang efektif untuk menginduksi pertumbuhan terjadi pada dosis 20 Krad. Pada kondisi ini tanaman tumbuh lebih cepat bila dibandingkan dengan kontrol. Pada hari ketiga telah tampak pertumbuhan tanaman kira-kira sepanjang 1 cm. Tanaman kontrol germinasi lebih lambat kira-kira 10 hari bila dibandingkan dengan mutan. Radiasi gamma dapat menghambat pertumbuhan lebih dari 60 % pada dosis lebih besar dari 20 Krad seperti terlihat pada gambar 1. Perlakuan radiasi dengan dosis 40 Krad menghambat pertumbuhan hampir 100%.

Terjadinya variasi phenotypic tanaman seperti tinggi dan diameter daun yang terlihat lebih besar dua kali lipat terlihat jelas pada mutan dengan radiasi 20 Krad bila dibandingkan dengan parentalnya (gambar 1 dan tabel 2). Hal ini sering terjadi karena pemberian radiasi dapat menyebabkan mutasi pada beberapa basa-basa DNA yang mungkin mengenai gen-gen fungsional atau struktural tertentu yang ekspresinya dapat mempengaruhi phenotypic. Kandungan khlorophyl meningkat secara signifikan pada mutan hasil radiasi 20 Krad (Tabel 1). Meningkatnya dosis radiasi juga akan menurunkan kandungan khlorophyl. Hal yang sama juga dilaporkan pada radiasi terhadap biji

tanaman kedele dengan menggunakan sinar gamma. Hal ini mungkin disebabkan karena radiasi dengan dosis tinggi dapat merusak basa-basa DNA dan sel atau jaringan tertentu tanaman¹⁰.

Penentuan kualitatif alkaloid dengan pereaksi Dragendorff adalah spesifik untuk penentuan alkaloid dimana terjadi larutan berwarna merah jingga dengan endapan berupa kristal halus. Kandungan alkaloid secara kualitatif dengan menggunakan standart Ajmalisin dengan konsentrasi (0.01 ppm) untuk (+). Dengan penambahan sedikit alkohol murni kemudian dipanaskan, kristal akan larut dan dapat menghablur kembali pada suhu kamar¹¹. Mutan dengan radiasi 20 Krad menampakkan larutan jingga yang lebih tua dan jumlah endapan yang jauh lebih banyak (—). Hal ini dapat menunjukkan bahwa mutan tersebut mempunyai kandungan alkaloid yang lebih tinggi. Semakin tinggi dosis radiasi seperti pada 30 dan 35 Krad terhadap kandungan alkaloid meningkat (+) tabel 3. Radiasi sinar gamma dosis yang efektif juga dapat meningkatkan kandungan Stevioside sebanyak 2 kali lipat bila dibandingkan dengan kontrol pada tanaman *Stevia rebaudiana Bertoni*¹². Analisa TLC baik pada mutan maupun pada wild type memperlihatkan adanya indole alkaloid Ajmalicine Rf Standart = 0.58 yang ekspresinya jauh lebih banyak pada mutan F2 (20 Krad) dengan pita lebih jelas dan area noda lebih besar. Hasil analisa TLC akan dilanjutkan dengan HPLC untuk mengetahui kuantitas Ajmalicine dan kandungan alkaloid yang lain.

Seleksi germinasi biji F2 (20Krad) dilakukan dengan menggunakan medium MS dan 5-MT dengan konsentrasi tinggi (0.2 mM). Sebanyak 200 biji yang ditumbuhkan pada medium seleksi tumbuh baik (99%), sedangkan wild type hanya dapat tumbuh pada konsentrasi yang sangat kecil (0.02 mM) data pada tabel 5. Diharapkan seleksi mutan yang tahan analog triptofan pada konsentrasi tinggi dapat mempunyai sifat biokimia yang jelas dan memproduksi asam amino triptophan yang berlebihan. Selanjutnya triptofan adalah prekursor dan dibiokonversi menjadi indole alkaloid¹³.

Tabel 1. Kandungan chlorophyl pada daun mutan F1 setelah diradiasi sinar gamma dengan berbagai dosis.

Dosis Radiasi (Krad)	Kandungan klorofil (mg/g FW)
0	1.80
5	1.65
10	1.56
15	1.89
20	2.15
25	1.91
30	1.22
35	1.04

Tabel 2. Tinggi tanaman (cm) pada F1 setelah diradiasi sinar gamma berbagai dosis.

Dosis Radiasi (Krad)	Tinggi Tanaman (cm)
0	57
5	55
10	60
15	70
20	85
25	64
30	40*
35	10*

* tidak ada produksi biji

Tabel 3. Analisa kualitatif Alkaloid dengan pereaksi Dragendorff pada daun Mutan (1) dengan variasi dosis radiasi sinar gamma.

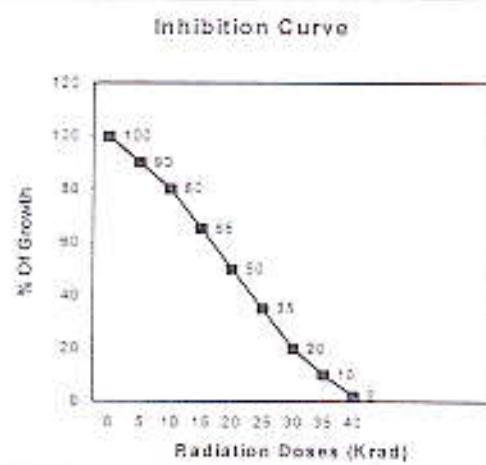
Dosis Radiasi (Krad)	Test Alkaloid (Warna Orange)
0	+
5	+
10	+
15	++
20	++++
25	+++
30	+
35	+

Tabel 4. Berat kalus daun (Fresh Weight) pada mutan F2 (20Krad) dan wild type ditumbuhkan pada medium MS dengan variasi hormon pertumbuhan (2,4-D : kinetin), A= 2 : 1; B= 4 : 1; C= 6 : 1; D= 8 : 1; E= 10 : 1 dan F= 12 : 1; G= 14 : 1, untuk 5 kali ulangan Standar deviasi < 5%.

Variasi Hormon	Berat Basah (g) Wild Type	Berat Basah (g) Mutan F2
A	0.45	0.73
B	0.55	0.84
C	0.48	0.81
D	0.62	1.24
E	1.22	2.32
F	0.55	0.79
G	0.39	0.50

Tabel 5. Seleksi germinasi pada F2 (mutan 20 Krad no. 1-5) pada medium MS yang mengandung 5-MT. Ulangan 3 kali standar deviasi < 5%.

	Wild type	Mutan
Jumlah biji	200	200
Germinasi pada 0.02 mM (5-MT)	80%	99%
Germinasi pada 0.1 mM (5-MT)	2%	99%
Germinasi pada 0.2 mM (5-MT)	0%	93%



Gambar 1. Kurva inhibisi pertumbuhan biji F1 dengan berbagai variasi dosis sinar gantung.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan beberapa hal yaitu:

1. Radiasi gama dapat menginduksi variasi phenotypic tanaman seperti, tinggi tanaman, biji dan kandungan chlorophyl.
2. Dosis radiasi (20Krad) adalah efektif untuk menginduksi biochemical mutan dan tahan terhadap 5 MT dengan kandungan alkaloid yang tinggi (++++) dibandingkan dengan kontrolnya (+) pada tanaman F2.

Ucapan Terima kasih

Ucapan terimakasih ditujukan pada BATAN Jakarta untuk penggunaan sinar gamma dan analisis tanaman. Juga Jurusan Kimia FMIPA-Unand atas pendanaan penelitian melalui project Due-Like sejak tahun 1999, 2000 dan 2001.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sumaryati S, Negrini I, and Jacob M, 1992, Biochemical Characterization of Salt and Drought Mutant in *Nicotiana Plumbaginifolia*, J.Theory Appl Genetics,83, 612-615.
2. Sumaryati S, 1992, Invitro selection Biochemical Characterization and Molecular Study of Salt and Water Stress Mutant in *N. plumbaginifolia*, Thesis Ph.D. Institute Molecular Biology, V.U.B. Brussels, Belgia.
3. Sumaryati S, 2001, Bioteknologi Tanaman Untuk Produksi Metabolit Sekunder Indole Alkaloid pada *Catharanthus roseus*, Project DIKNAS Kimia Bahan Alam dan Bioteknologi, 2001
4. Novak F.J, 1991, Plant Mutation Breeding for Crop Improvement. Proceeding of Symposium, Vienna Jointly Organized by IAEA and FAO, 2, 327-342.
5. Verpoorte R, 1999, Plant Cell Biotechnology, Leiden Amsterdam Center for Drug Research,
6. Fransworth N.R, Blomster R.N, Dantratoski, Meer W.A and Cammarato W.A, 1964, Studies on *Catharanthus* Alkaloid.IV, Evaluation by means of Thin Layer Chromatography and Ceric Ammonium Sulfate Spray Reagen, Lloydia 27, 302-314.
7. Sim S.J, Chang J.R.L and Jung K.H, 1994, Production and Secretion of Indole Alkaloid

- in *Catharanthus roseus*. J. ferment.Bioeng. 78, 229-234.
8. Fransworth N.R, Blomster R.N, Damrateski, Meer W.A and Cammarato W.A, 1964, Studies on *Catharanthus* Alkaloid.IV, Evaluation by means of Thin Layer Chromatography and Ceric Ammonium Sulfate Spray Reagen , Lloydia 27, 302-314.
9. Susiana , 1999, Perubahan Sifat Kedelai Varitas Willis Melalui Induksi Mutasi sinar Gamma, Thesis S-2. Fakultas Pasca Sarjana UNAND.
10. Mathius N.T, Pratiwi T, Hutabarat T,1995, Somaclonal Variation in *Stevia rebaudiana*
- Bertoni Irradiated with Gamma Rays. Menara erkebunan. 63, (2) 33-42.
11. Sumaryati S, 1991, Analysis of Mutant Resistant to Proline Analogues in *N. plumbaginifolia*. J.Plant Mutation Breeding,2.265-270.
12. Pasquali G, Godjin O.J.M, De wall,A, Verpoorte R.A, Schilperoort J.H.C, Hege and Memelink J, 1992, Coordinated Regulation of two Indole Alkaloid Biosynthetic genes from *Catharanthus roseus*.Plant Mol. Biol 18,1121-1131.