

Pengaruh Elisitasi dengan *Verticillium dahliae* Kleb dan *Rhizoctonia Solani* Kuhn terhadap kandungan Gossipol dalam kalus *Gossypium hirsutum* L pada beberapa tingkat Subkultur

Suci Rahayu¹⁾, Rizkita Rachmi Esyanti²⁾ dan Arbayah H. Siregar²⁾

¹⁾FMIPA Biologi USU, ²⁾Jurusan Biologi ITB

Diterima Desember 2004 disetujui untuk diterbitkan Januari 2006

Abstract

An experiment on gossypol content has been conducted on callus derived from *Gossypium hirsutum* L. subcultures 5, 6, and 7 after elicitation with *Verticillium dahliae* Kleb and *Rhizoctonia solani* Kuhn. Callus was cultured on solid Linsmaier and Skoog (LS) medium supplemented with 10^{-5} M NAA and 10^{-6} M 2,4-D, and subcultured for 5, 6, and 7 times. Callus was then elicited with 40 µg dry weight /ml homogenate of fungi derived from *V. dahliae* and *R. solani*, and harvested 0, 2, 4, and 6 days after elicitation. The gossypol was analyzed qualitatively and quantitatively using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The maximum gossypol content elicited with *R. solani* was obtained on callus subculture 5, which was harvested on 4 days after elicitation, i.e. $177,995 \pm 0,248$ µg/g dry weight, whilst that with *V. dahliae* was obtained on subculture 5, harvested four days after elicitation, i.e. $108,021 \pm 0,507$ µg/g dry weight. The gossypol content of control callus on subculture 5, 6, and 7 was $37,885 \pm 0,779$ µg/g dry weight, $23,170 \pm 0,003$ µg/g dry weight, $12,284 \pm 0,221$ µg/g dry weight, respectively. The subculture level, elicitor type, and harvesting time gave significant effect on gossypol content of *G. hirsutum* callus culture.

Key words: *Gossypium hirsutum* L., *Verticillium dahliae* Kleb, *Rhizoctonia solani* Kuhn, elicitation

Pendahuluan

Salah satu penelitian yang banyak dilakukan akhir-akhir ini adalah mencari alternatif metode produksi metabolit sekunder tanaman menggunakan teknik kultur jaringan. Meskipun dengan teknik ini dapat dihasilkan metabolit sekunder, ternyata hasil yang diperoleh pada beberapa penelitian menunjukkan adanya keterbatasan. Kultur kalus dan sel tumbuhan dapat mengalami kehilangan kapasitas setelah disubkultur beberapa kali (Deus *et al.*, 1984). Sebagai contoh, produksi serpentin pada akhirnya menurun seiring dengan periode subkultur pada kultur sel *Catharantus roseus* (Stafford *et al.*, 1985 dalam Mooris, 1986), produksi kardenolid pada kultur sel *Digitalis* menunjukkan penurunan setelah 16 hingga 18 seri subkultur (Mantel dan Smith, 1983), akumulasi alkaloid mengalami penurunan selama periode pengulturan 5, 20, dan 35 kali pada kultur suspensi *Papaver somniferum* (Berlin *et al.*, 1985 dalam Endress, 1994).

Biosintesis metabolit sekunder, misalnya fitoaleksin, dapat diinduksi oleh cekaman infeksi mikroba (Buitelaar *et al.*, 1991 dan Heinstejn, 1985). Metode ini kemudian dikembangkan sebagai elisitasi. Kandungan gossipol dan hemigossipol pada kultur sel *Gossypium arboreum* meningkat setelah dielisitasi dengan konidia *Verticillium dahliae* selama 5 hari inkubasi (Heinstejn, 1985). Sementara itu, penambahan elisitor berupa homogenat ragi *Rhondotorula rubra* dapat meningkatkan kandungan furokuinolin dan

furankumarin dalam kultur *in vitro* *Ruta graveolens* (Eiler dan Bohlmann, 1994). Demikian pula, kandungan tsibulin dapat ditingkatkan setelah kultur suspensi sel *Allium cepa* diberi homogenat *Botrytis cinera* (Dmitriev *et al*, 1996). Oleh sebab itu, pemberian elisitor berupa homogenat *Verticillium dahliae* dan *Rhizoctonia solani* ke dalam kultur kalus *Gossypium hirsutum* diharapkan mampu meningkatkan kandungan gossipol setelah tereduksi oleh periode subkultur 5, 6, dan 7 kali.

Materi dan Metode

Biji *G. hirsutum* kultivar Tamcot yang diperoleh dari BALLITAS, Malang dikecambahkan. Kotiledon pada kecambah umur 3 hari dipotong 1 x 1 cm², ditanam dalam medium Linsmaier dan Skoog 1965 (LS) dengan penambahan 10⁻⁵ M NAA dan 10⁻⁶ M 2,4-D (Purwianingsih, 1997). Kultur diinkubasi pada suhu kamar dan dalam kondisi gelap (Heinstein dan El Shagi, 1981). Subkultur pertama dilakukan pada saat kultur berumur 6 minggu dan selanjutnya dilakukan setiap empat minggu sekali sehingga diperoleh subkultur 5, 6, dan 7.

Untuk memperoleh bahan elisitor terlebih dahulu dilakukan penyeragaman jumlah pelet miselium jamur. Miselium seluas 1 x 1 cm² dari biakan murni *R. solani* umur 3 hari dan *V. dahliae* umur 4 hari, masing-masing dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 ml yang berisi 50 ml medium kentang dekstrosa cair, diagitasi pada kecepatan 125 rpm, dan diinkubasi pada suhu kamar. Selanjutnya, dilakukan pemanenan tiap hari untuk mendapatkan kurva tumbuh berat kering miselium (Astuti, 1994).

Jamur yang telah mencapai pertumbuhan maksimum disterilisasi pada suhu 121° C dan tekanan 15 psi selama 15 menit, disaring dengan kertas saring Whatman no. 1, dan kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 60° C. Bahan elisitor ditimbang dan disuspensikan ke dalam akuades untuk memperoleh konsentrasi elisitor 40 µg BK/ml.

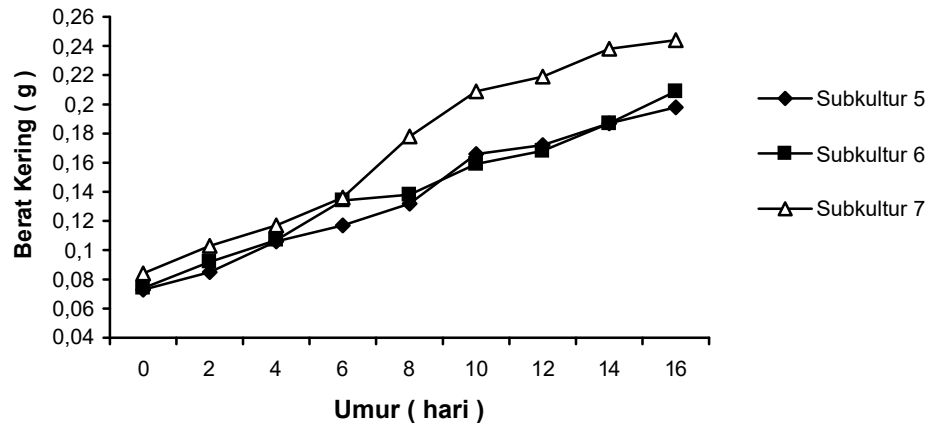
Sebanyak 0,5 ml elisitor jamur dengan konsentrasi 40 µg BK/ml ditambahkan ke dalam kultur kalus subkultur ke-5, 6, dan 7. Pada kalus kontrol ditambahkan akuades steril dengan volume yang sama, dan masing-masing perlakuan tersebut dibuat dengan lima kali pengulangan. Pemanenan dilakukan pada hari ke-0, 2, 4, dan 6 setelah elisitasi. Kalus yang telah dipanen dikeringkan dalam oven suhu 50°C sehingga mencapai berat konstan.

Kalus yang telah dikeringkan kemudian diekstraksi dengan metode Schmid dan Well (1990) yang dimodifikasi. Kalus kering digerus dan diekstraksi dengan petroleum eter 1 g/5 ml lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 15 menit. Pelet dikeringkan semalam, dan kemudian dilakukan ekstraksi lebih lanjut dalam aseton. Suspensi disaring dengan kertas saring Whatman no. 1 dan dievaporasi dalam *vaccum dryer*. Residu yang diperoleh dilarutkan dalam metanol.

Analisis kualitatif dan kuantitatif dilakukan dengan KCKT schimadzu. Digunakan coloum schim-pack CLC – ODS (panjang 0,15 m x diameter 6,50 mm), fase gerak air : methanol (10 : 90) dengan penambahan asam fosfat 0,1%, kecepatan aliran 1 ml/menit. Pengamatan dilakukan dengan detektor UV pada panjang gelombang 230 nm (Nomier dan Abouondonia, 1982). Analisis dilakukan dengan Chromatophac CR-7A Plus menggunakan gossipol standar eksternal yang diproduksi oleh Sigma.

Hasil dan Pembahasan

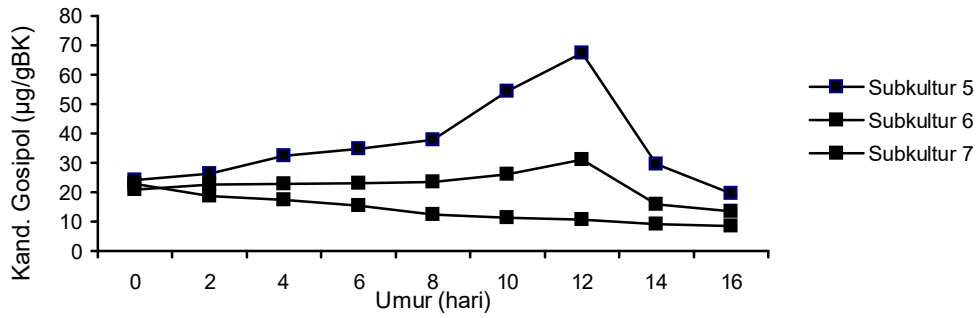
Pertumbuhan kalus dapat dilihat pada Gambar 1. Kalus pada subkultur ke-5, 6, dan 7 mengalami fase lag pada umur 0 sampai dengan 4 hari, kemudian meningkat pertumbuhannya hingga memasuki fase stasioner setelah hari ke-16.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan kalus *G. hirsutum* pada subkultur 5, 6, dan 7
Figure 1. Growth curve of *G. hirsutum* callus in subculture 5, 6, and 7

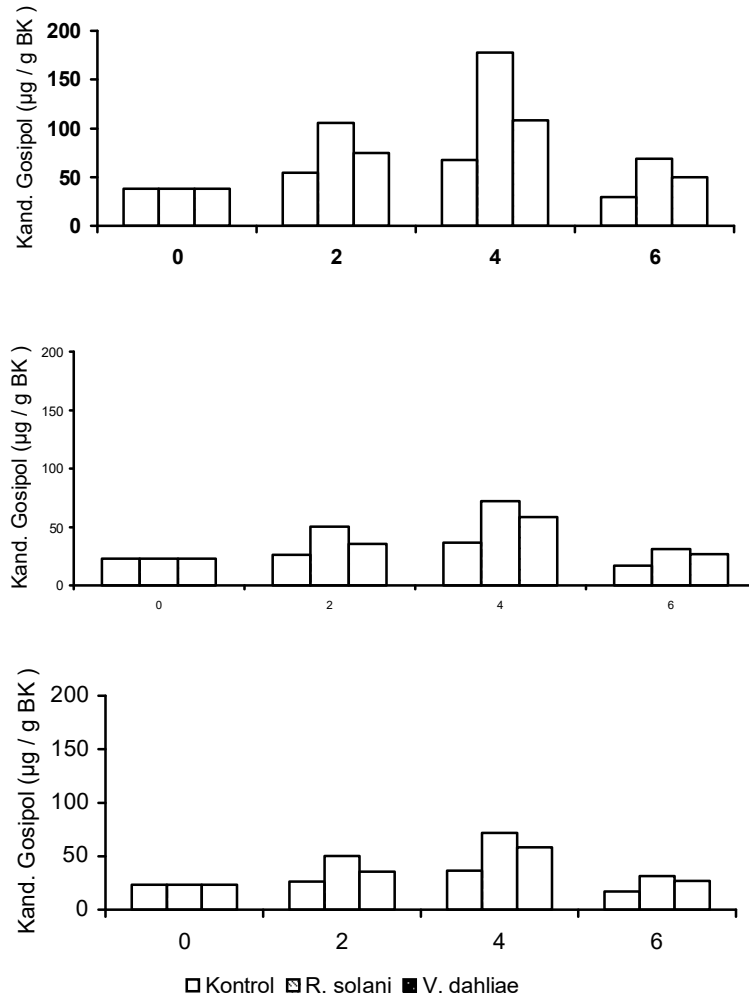
Pada awal induksi pertumbuhan kalus berlangsung lambat. Setelah subkultur, mula-mula kalus yang tumbuh berwarna kecoklatan dan pertumbuhannya terhambat. Namun, setelah hari ke-14 kalus tumbuh cepat dan berwarna lebih terang. Makin banyak seri subkultur yang dilakukan, pertumbuhan menjadi makin cepat, dan dengan demikian terlihat adanya peningkatan massa sel. Pertumbuhan yang makin baik seiring dengan tingkat subkultur diduga disebabkan oleh makin teradaptasinya kalus dengan kondisi lingkungannya (George dan Sherrington, 1984).

Setelah dilakukan analisis kuantitatif dan kualitatif pada kalus diperoleh kurva kandungan gosipol seperti pada Gambar 2. Kalus subkultur ke-5 dan ke-6 menunjukkan pola yang sama, tetapi terdapat perbedaan kuantitas. Makin tinggi tingkat subkultur, makin rendah gosipol yang disintesis. Hal ini terlihat makin nyata pada subkultur ke-7. Kandungan gosipol makin menurun dengan makin tingginya tingkat subkultur, yang antara lain diduga karena terjadi aberasi kromosom, yang dapat mengakibatkan timbulnya variasi somaklonal (Sijun, 1992). Deus *et al.* (1984) menyatakan bahwa variasi somaklonal menyebabkan ketidakstabilan genetik. Ketidakstabilan genetik pada kultur kalus *G. hirsutum* terekspresikan dengan bervariasinya produksi gosipol, yang dalam hal ini ditunjukkan dengan adanya kecenderungan menurun. Namun, ketidakstabilan genetik tidak selalu ditunjukkan dengan adanya pola tertentu (Mooris, 1986). Kemungkinan lain adalah adanya ketergantungan kultur *in vitro* pada tingkat diferensiasi organ (Sierra *et al.*, 1992). Proses diferensiasi morfologi sering berhubungan dengan proses biokimia (Endress, 1994) sehingga diharapkan dengan menggunakan kultur yang telah mengalami diferensiasi ke tingkat yang lebih tinggi (organ) dapat dijamin kestabilan produksi metabolit sekunder yang tinggi. Hasil penelitian pada kultur *Catharantus roseus* telah menunjukkan produksi ajmalisin yang tinggi dan stabil pada saat kultur mengalami organogenesis untuk membentuk akar, sedangkan produksi viblastin dan vinkristin yang tinggi dan stabil diperoleh ketika kultur mengalami organogenesis menjadi taruk atau *multiple shoot* (Miura *et al.*, 1998). Dengan demikian, pada tanaman kapas kultur yang telah mengalami organogenesis menjadi akar diduga akan memproduksi gosipol yang tinggi dan stabil karena gen yang menyandi enzim untuk regulasi sintesis gosipol terekspresi lebih baik pada akar (Threlfall dan Whietehhead, 1991).



Gambar 2. Kurva kandungan gossypol dalam kultur *G. hirsutum* pada subkultur 5, 6, dan 7
 Figure 2. Curve of gossypol content of *G. hirsutum* culture in subculture 5, 6, and 7

Kedua macam elisitor, baik *V. dahliae* maupun *R. solani*, dapat meningkatkan kandungan gossypol pada tiap tingkat subkultur. Hasil lengkap dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Kurva kandungan gossypol pada kalus kontrol dalam elisitasi pada tiap tingkat subkultur
 Figure 3. Curve of gossypol content of elicited control callus in the respective subculture level

Sintesis gopipol setelah dielisitasi mengalami peningkatan. Hal ini diduga karena elisitor (*R. solani* dan *V. dahliae*) dapat menginduksi serangkaian proses, yang melibatkan peningkatan transkripsi dan translasi untuk mRNA bagi enzim-enzim hidroksi-3 metilglutaril koA reduktase (HMGR). Enzim ini berfungsi sebagai katalisator konversi HMG-koA menjadi asam mevalonat, yang merupakan prekursor pembentukan gopipol. Peningkatan sintesis enzim HMGR menyebabkan peningkatan *pool* asam mevalonat sehingga kandungan gopipol meningkat (Joost *et al.*, 1995). Penambahan homogenat *R. solani* pada konsentrasi yang sama dengan konsentrasi homogenat *V. dahliae* menyebabkan peningkatan akumulasi gopipol yang lebih tinggi pada kalus *G. hirsutum*. Hasil penelitian ini sesuai dengan Purwianingsih (1997), yaitu bahwa untuk mendapatkan gopipol maksimum dengan elisitor homogenat *V. dahliae* diperlukan konsentrasi 1000 µg/BB, sedangkan untuk homogenat *R. solani* diperlukan 500 µg/BB. Jika elisitor berlaku sebagai efektor, maka konsentrasi elisitor yang optimum sangat bergantung kepada jumlah reseptor pada sel *G. hirsutum*. Dalam hal ini untuk *V. dahliae* diperlukan jumlah yang lebih banyak daripada untuk *R. solani*. Kandungan gopipol tertinggi terhadap waktu pemanenan 4 hari setelah elisitasi juga ditunjukkan oleh Joost *et al.* (1995). Hal ini disebabkan oleh adanya peningkatan aktivitas mRNA HMGR pada kapas *G. hirsutum* yang terjadi 48 jam setelah infeksi dengan konidia *V. dahliae* yang telah diautoklaf. Setelah 96 jam ekspresi mRNA HMGR tersebut menurun.

Kesimpulan

Tingkat subkultur, jenis elisitor, dan waktu panen berpengaruh nyata terhadap kandungan gopipol pada kultur kalus *G. hirsutum*.

Daftar Pustaka

- Astuti, D.A. 1994. Kajian awal fermentasi bawah permukaan dari *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach untuk produksi biomassa sehubungan dengan zat cita – rata. Tesis Sarjana ITB. Bandung.
- Buitelaar, J.M., M.T. Cesario, and J. Tramper. 1991. Elicitation of Thiopene Production by Hairy Root of *Tagetes patula*. In: Production and Secretion of Secondary Metabolites by Plant Cell Cultures of *Tagetes*. Buitelaar, R. M. (Ed). Wageningen. 15 pp.
- Deus, B, Neuman, and M.H. Zenk. 1984. Instability of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Planta Medica* 49: 427– 431.
- Dmitriev, A., D. Julia, and G. Dmitry. 1996. The role of Ca²⁺ in elicitation of phytoalexin synthesis in cell culture of onion (*Allium cepa* L) *Plant Cell Report* 15: 945 – 948.
- Eiler, U and J. Bohlman. 1994 Elicitor induced secondary metabolism in *Ruta grafeolens* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 38: 109 – 198.
- Endress, R. 1994 *Plant Cell Biotechnology*. Springer – Verlag, Berlin. 5 pp.
- George, E.F. and P.D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Eastern Press, Reading Berks, Great Britain. 3 pp.

- Heinstein, P. and El-Shagi. 1981. Formation of gossypol by *Gossypium hirsutum* L. cell suspension cultures. *Journal of Natural Product* 44: 1 – 6.
- Heinstein, P. 1985. Formation approaches to the formation of secondary natural product in plant cell suspension cultures. *Journal of Natural Product* 48: 1 – 9.
- Joost, O., G. Bianchini, A.A. Bell, C.R. Benedict, and C.W. Magill. 1995. Differential induction of 3- hydroxy-3- methylglutaryl CoA reductase in two cotton species following inoculation with *Verticillium*. *Molecular Plant – Microbe interaction* 8: 880 – 885.
- Mantell, S.H. and H. Smith. 1983. *Plant Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge. 28 pp.
- Miura, Y., H. Kazumaza, K. Norihide, M. Kazuhisa, and U. Kenchi. 1998. Formation of vinblastine in multiple shoot culture of *Catharanthus roseus*. *Planta Medica*: 18 – 20.
- Morris, P. 1986. Long-term Stability of an Alkaloid Productivity in Cell Suspension Cultures of *Catharanthus roseus* In: *Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures*. Morris, P., H.S. Allan, S. Angela, W.F. Michael. (Eds). Cambridge University Press, Cambridge. 7 pp.
- Nomaier, A.A. and M.B. Aboudonia. 1982. Gossypol: high - performance - liquid - chromatographic, analysis and stability in various solvents. *JAOCCS* 59: 546 – 549.
- Purwianingsih, W. 1997. Efek pemberian homogenat *Verticillium dahliae* Kleb dan *Rhizoctonia solani* Kuhn sebagai elisitor terhadap kandungan gossypol dalam kultur kalus *G. hirsutum* L. Tesis Pascasarjana ITB. Bandung.
- Schmidt, J.H. and R. Well. 1990. Evidence for the presence of gossypol in *Malvaceous* plant other those in the cotton tribe. *Agriculture and Food Chemistry* 38: 505 – 508.
- Sierra, M.I., R. van der Heijden, T. van der Leor, and R. Verpoote. 1992. Stability of alkaloid production in cell suspension cultures of *Tabernaemontana divariacata* during long – term subculture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 28: 59 – 68.
- Sijun, Z. 1992. Chromosom Variation in Callus Culture of *Gossypium hirsutum* L. In: *DNA Banking and in vitro Biotechnology*. Adam, R.P. and E.A. Jaunce (Eds). Academic Press Inc., San Diego, California. 11 pp.
- Threlfall, D.R. and T.N. Whietehead. 1991. Terpenoid Phytoalexin, Aspects of Biosynthesis, Catabolism, and Regulation. In: *Ecological Chemistry of Plant Terpenoid*. Tomas, J.B. and F.A. Baxberan (Eds). Oxford University Press, Oxford. 50 pp.