

**Pengaruh Sumber Nitrogen yang Berbeda dalam Medium Murashige dan
Skoog (MS, 1962) terhadap Produksi Senesionin pada Kultur “Compact
Globular Structure” *Crotalaria anagyroides* H.B.K**

Oleh:

***Wahyu Surakusumah*^{1*}**

*Jurusan Pendidikan Biologi
Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Pendidikan Indonesia*

ABSTRACT

An Experiment on the effect of different nitrogen source in Murashige and Skoog media (MS, 1962) on senesionin production of compact globular structure of *Crotalaria anagyroides* has been performed. CGS culture was obtained from callus culture on liquid MS media with 5.10^{-5} M NAA and 10^{-6} M kinetin. The CGS was transferred into media with different nitrogen source: MS A (amonium+nitrat), MS B (nitrat) and MS C (amonium). Qualitatif data showed that senesionin could be detected in the CGS extract by appearance of spot ($R_f=0,78$). The quantitative data showed that MS C was the best media to produce 4623 $\mu\text{g/DW}$ senesionin on 30th day.

Key Word : *Crotalaria anagyroides, Nitrogen Source, Senesionin, Senesionin Production.*

Crotalaria anagyroides yang dikenal dengan nama daerah orok-orok (sunda) merupakan tanaman semak yang sering digunakan sebagai bahan pupuk hijau, tetapi selain sebagai bahan pupuk hijau ada potensi lain pada tanaman ini yaitu kandungan senyawa kimia berupa senyawa pirolizidin yang mempunyai kemampuan untuk menimbulkan efek antimitotik pada sel hati (Peterson, 1965). Senyawa pirolizidin merupakan kelompok senyawa yang salah satu anggota kelompok senyawa tersebut adalah senesionin. Senesionin ($\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{O}_5$) mempunyai aktivitas yang sama yaitu dapat mencegah aktivitas mitotik pada sel-sel tumor

^{1*} Reviewer: Sari Wulan Diana
Jurusan Pendidikan Biologi
FPMIPA UPI.

walker (Culvenor, 1968) sehingga senesionin ini mempunyai potensi sebagai obat kanker.

Kandungan senesionin pada tanaman orok-orok sangat kecil . Salah satu cara untuk meningkatkan produksi senesionin adalah dengan menggunakan teknik kultur jaringan tumbuhan. menurut Mantel dan Smith (1983), produksi metabolit sekunder dipengaruhi oleh 3 faktor yaitu:

1. Faktor internal (zat pengatur tumbuh, makro dan mikronutrien, sumber karbon,prazat, elisitor dan PH)
2. Faktor eksternal (Cahaya,suhu dan agitasi)
3. Faktor biologis

Nitrogen merupakan salah satu makronutrien yang terdapat dalam medium yang berupa senyawa nitrat dan amonium. Senyawa tersebut merupakan senyawa pembentukan asam amino L-isoleusin yang merupakan prazat senyawa senesionin. Dengan melihat adanya dua sumber nitrogen tersebut maka penelitian ini dilakukan untuk melihat pengaruh sumber nitrogen yang berbeda terhadap produksi senesionin pada kultur “Compact Globular Structure” *Crotalaria anagyroides*.

Metoda Penelitian

Kultur “Compact Globular Structure” (CGS)

Kultur CGS yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari kalus yang dipelihara pada kultur cair MS dengan penambahan $5 \cdot 10^{-5}$ M NAA dan 10^{-6} M kinetin. Kultur CGS yang didapatkan kemudian dimasukan sebanyak 1 g berat basah kedalam medium perlakuan MS A (Amonium dan Nitrat), MS B (Nitrat) dan MS C (Amonium) .

Penentuan Kurva Tumbuh

Kurva tumbuh kultur CGS ditentukan dengan cara memanen kultur tersebut . Panen dilakukan pada kultur berumur 0, 5, 10, 15, 20, 25 dan 30 hari, dari tiap medium perlakuan. Hasil panen kultur CGS di keringkan dengan oven pada suhu 100 °C selama 24 jam. CGS yang sudah dikeringkan kemudian ditimbang untuk menentukan kurva pertumbuhan.

Medium Perlakuan

Medium perlakuan yang digunakan pada penelitian ini adalah medium Murashige dan Skoog (MS, 1962). Sumber nitrogen pada medium tersebut dirubah sesuai dengan perlakuan MS A (Nitrat + Amonium), MS B (Nitrat) dan MS C (Amonium). Jumlah nitrogen yang terkandung dalam setiap medium perlakuan dalam konsentrasi yang sama.

Ekstraksi CGS

CGS hasil panen digerus dengan alat mortar dan kemudian dimaserasi dengan metanol yang mengandung HCl 0,25 % selama 48 jam. Maserat yang dihasilkan dipisahkan dengan cara menyaring. Filtrat yang dihasilkan diuapkan dan kemudian residu yang dihasilkan ditimbang . Residu kemudian dilarutkan kembali kedalam 2 ml etanol.

Analisis Kualitatif

Kandungan senesionin dianalisis secara kualitatif dengan kromatografi lapis tipis menggunakan plat lapis aluminium silikat gel GF 254 ukuran 20 X 20 cm . Ekstrak CGS dalam metanol ditotolkan pada pelat dengan menggunakan mikro pipet pada jarak 2cm dari bawah dan dari samping kanan, sedangkan jarak antara penotolan 1, 5 cm. Sebagai pembanding digunakan senyawa senesionin . Setelah totolan mengering, plat tersebut dikembangkan sampai 12 cm didalam bejana kromatografi yang berisi larutan pengembang kloroform , etanol dan amonium dengan perbandingan 20 : 4 : 1. Setelah diangkat pelat diangin-anginkan selama 5

menit. Untuk penampakan noda pelat disinari dibawah sinar UV. Noda noda yang muncul pada kromatografi segera diamati dan ditentukan nilai Rf nya. Nilai Rf dari noda dapat dihitung berdasarkan perbandingan jarak yang ditempuh oleh noda dengan jarak yang ditempuh oleh larutan pengembang (Harbone, 1987).

RF = a/b a = Jarak antara titik awal dengan pusat noda

 b = Jarak antara titik awal dengan garis akhir larutan pengembang

Analisis Kuantitatif

Analisis kuantitatif kadar senesionin dilakukan dengan melewati kromatogram pada spektodesintometer tipe Shimadzu CS-910 dual wavelength TLC-Scanner. Spektrofotodensitogram yang diperoleh akan menunjukkan panjang integrasi yang sebanding dengan kadar senesionin.

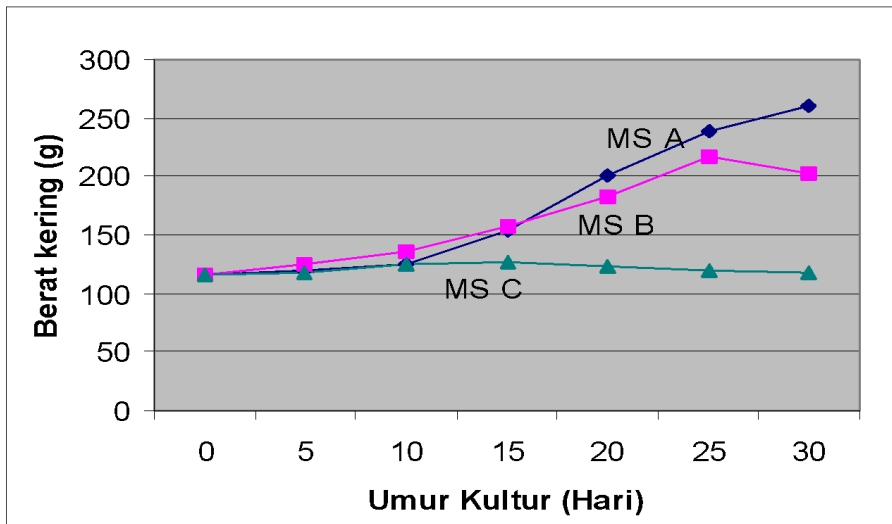
Hasil Dan Pembahasan

Pertumbuhan Kultur CGS

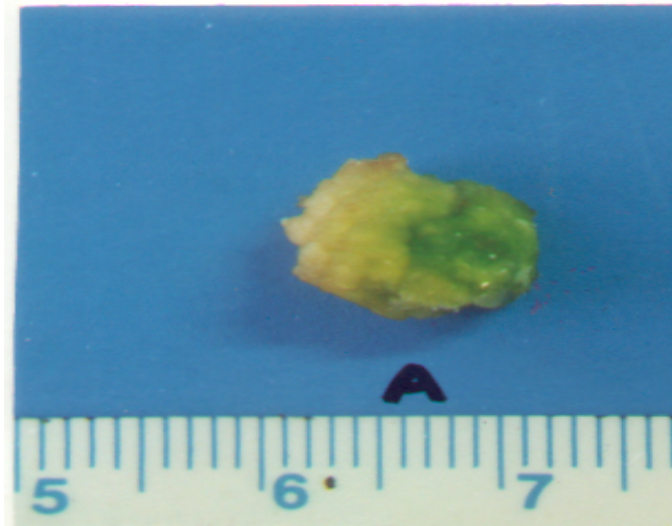
Hasil penelitian penentuan kurva tumbuh dapat dilihat pada Tabel 1. Dari tabel tersebut dapat ditentukan bahwa pertumbuhan kultur CGS yang terbaik adalah pada MS A, sedangkan pada MS C biomassa yang dihasilkan sangat kecil, hal ini diduga disebabkan sumber nitrogennya berasal dari amonium. Amonium diperlukan oleh sel tanaman untuk pembentukan asam amino dan protein, tetapi apabila terlalu banyak dapat menyebabkan tertimbunnya didalam sel maka akan bersifat toksik. Sintesis ATP pada mitokondria dan kloroplas dapat terhambat oleh amonium sehingga pertumbuhan terhambat. Selain itu amonium dapat menyebabkan kecenderungan PH medium menjadi asam sehingga aktivitas enzim menjadi terhambat dan biosintesis protein dan asam amino terhambat (Dodds dan Robert, 1985).

Tabel.1. Berat kering kultur CGS *Crotalaria anagyroides*

Hari ke	MS A (mg)	MS B (mg)	MS C (mg)
0	115±1,42	115±1,42	115±1,42
5	119±13,43	124±4,24	117±1,42
10	125±1,42	135±4,24	124±1,42
15	154±3,54	158±2,83	127±2,12
20	200±2,12	182±4,24	123±1,42
25	239±2,83	217±4,95	119±0,71
30	261±1,42	203±10,61	118±2,12



Grafik 1. Pertumbuhan kultur CGS *Crotalaria anagyroides* pada setiap medium perlakuan



Gambar 1. Kultur kalus *Crotalaria anagyroides*

Hasil Analisis kualitatif

Hasil analisis kualitatif senesionin pada kultur CGS pada tiap medium perlakuan dapat dilihat pada Tabel.2. Hasil penelitian senesionin standard ditunjukkan dengan adanya noda yang mempunyai nilai $R_f = 0,78$. Noda yang mempunyai $R_f = 0,78$ muncul juga pada setiap medium perlakuan, hal ini menunjukkan senesionin dapat diproduksi pada setiap medium perlakuan.

Tabel 2. Nilai R_f yang dihasilkan kromatogram ekstrak CGS pada setiap medium perlakuan

Ekstrak	Nilai R_f					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Senesionin					0,78	
MS A		0,28	0,46	0,52	0,78	0,89
MS B	0,19	0,28	0,46	0,52	0,78	0,89
MS C	0,19	0,28	0,46	0,52	0,78	0,89

Ket: F= Noda yang timbul

Hasil Analisis Kuantitatif

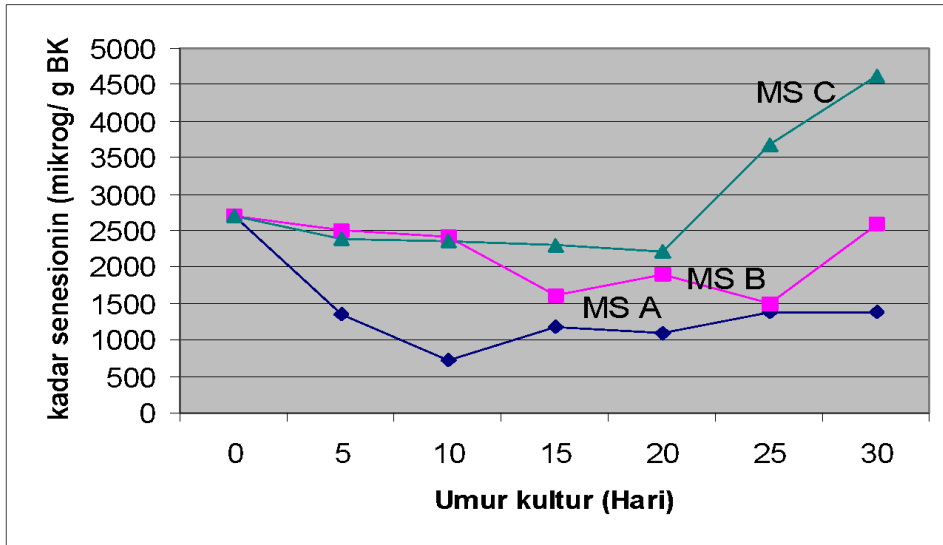
Pada Tabel.3. Dapat dilihat kadar rata-rata senesionin dari tiap perlakuan. Kadar senesionin tertinggi yang dapat dihasilkan adalah 4623 μg /berat kering oleh MS C pada hari ke 30, sedangkan MS A dan MS B kadar tertinggi sebesar 2688 μg /berat kering pada hari ke 0. Hal ini diduga disebabkan oleh pengaruh sumber nitrogen berupa amonium pada MS C yang apabila tertimbun dapat bersifat toksik, oleh karena itu kultur CGS pada MS C lebih cenderung untuk memproduksi metabolit sekunder dibandingkan metabolit primer. Produksi metabolit sekunder yang terjadi pada MS C berfungsi sebagai respon untuk mempertahankan diri.

Pada MS A dan MS B merupakan peristiwa kebalikan pada MS C. Pada MS A dan MS B. Pada MS A dan MS B produksi metabolit primer lebih besar dibandingkan produksi metabolit sekunder, sehingga pertumbuhan dan biomassa yang dihasilkan lebih tinggi dibandingkan pertumbuhan dan biomassa pada MS C, hal ini terjadi dikarenakan sifat toksisitas dari amonium yang terkandung lebih sedikit dibandingkan pada MS C sehingga kecenderungan produksi metabolit primer lebih besar.

Dari hasil penelitian ini dapat ditunjukkan bahwa medium MS C merupakan medium yang paling cocok untuk produksi senesionin. Dari hasil uji statistik dapat memperlihatkan bahwa perlakuan MS A, MS B dan MS C berbeda secara nyata.

Tabel 3. Kadar rata-rata senesionin pada kultur CGS *Crotalaria anagyroides* Pada setiap medium perlakuan

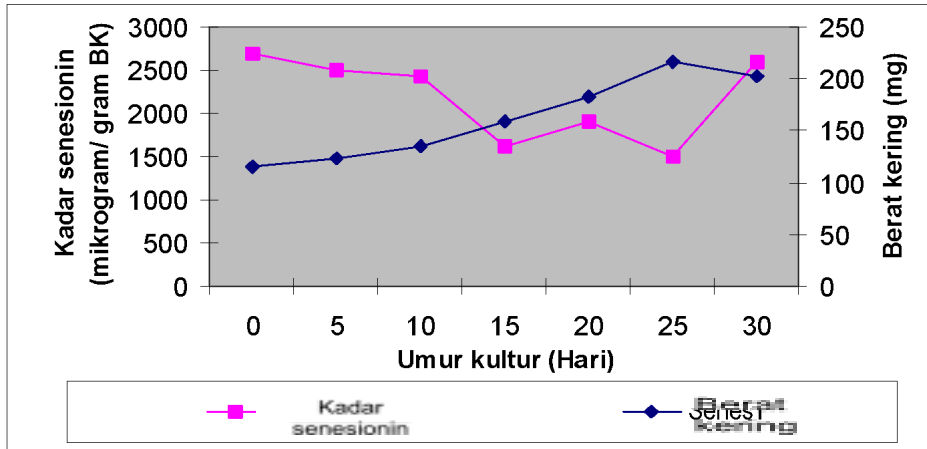
Umur (Hari)	Kadar rata-rata senesionin ($\mu\text{g}/\text{g BK}$)		
	MS A	MS B	MS C
0	2688 \pm 23,45	2688 \pm 23,45	2688 \pm 23,45
5	1361 \pm 34,55	2493 \pm 45,67	2371 \pm 30,11
10	727 \pm 21,55	2424 \pm 43,33	2346 \pm 12,24
15	1181 \pm 13,13	1611 \pm 9,87	2291 \pm 31,22
20	1091 \pm 21,98	1898 \pm 32,12	2217 \pm 32,41
25	1369 \pm 11,11	1508 \pm 32,75	3667 \pm 32,41
30	1393 \pm 12,22	2597 \pm 30,00	4623 \pm 2143



Grafik 2. Kadar senesionin pada kultur CGS *Crotalaria angyroides* pada setiap perlakuan

Hubungan Pola Pertumbuhan CGS Dengan Kadar Senesionin

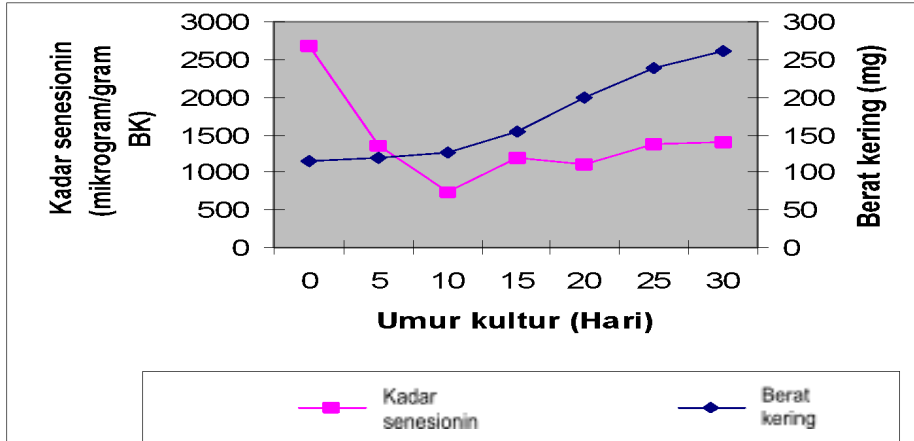
Pada Grafik 1 Dapat dilihat hubungan pertumbuhan CGS dan produksi senesionin pada medium perlakuan MS A (Nitrat + Amonium). Pada umur kultur hari ke-0 sampai hari ke-10 produksi senesionin mengalami penurunan sedangkan pertumbuhan CGS relatif stabil (Fase lag), setelah hari ke-10 produksi senesionin dan pertumbuhan CGS mengalami peningkatan, hal ini menunjukkan bahwa hubungan pola pertumbuhan sejalan dengan produksi senesionin (Tabata, dkk; 1971)



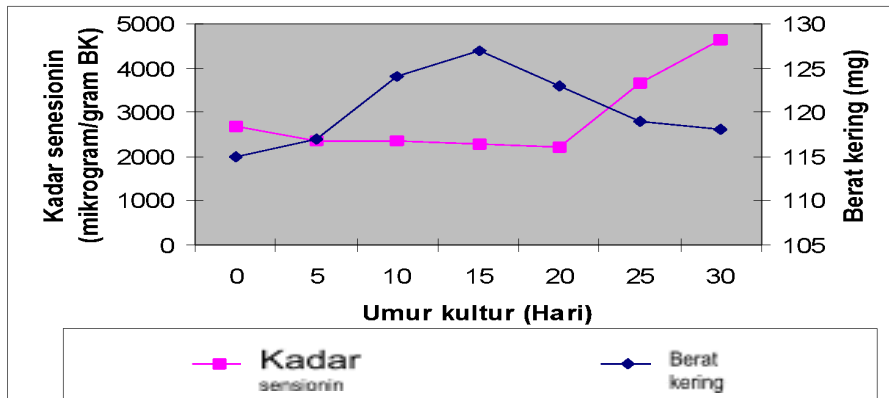
Grafik 3. Hubungan kadar sesionin terhadap pertumbuhan CGS pada perlakuan MSA

Pada Grafik 4 dan Grafik 5. Dapat dilihat pola hubungan pertumbuhan CGS dan produksi sesionin pada medium perlakuan MS B dan MS C. Pola pertumbuhan CGS pada medium MS B mengalami peningkatan pada umur kultur hari ke-0 sampai hari ke-25 sedangkan produksi sesionin mengalami penurunan dari hari ke-0 sampai ke-25.

Apabila dilihat dari pola hubungan terjadi pola pertumbuhan CGS berlawanan dengan produksi sesionin (Nakanishi, 1974). Hal serupa terjadi pada medium perlakuan MS C hubungan pola pertumbuhan CGS dengan produksi sesionin berlawanan.



Grafik 4. Hubungan kadar senesinin dan pertumbuhan CGS pada medium perlakuan MS B



Garfik 5. Hubungan kadar senesinin dan pertumbuhan CGS pada medium perlakuan MSC



Gambar 2. Kultur CGS pada meduum perlakuan

Kesimpulan

Dari hasil penelitian pengaruh sumber nitrogen yang berbeda terhadap produksi senesionin pada kultur CGS *Crotalaria anagyroides* dapat disimpulkan:

1. Kultur CGS *Crotalaria anagyroides* dapat menginduksi pembentukan senyawa senesionin
2. Medium yang menggunakan sumber nitrogen amonium (MS C) merupakan medium terbaik untuk produksi senyawa senesionin.

Daftar Pustaka

- Culvenor,C.C.J. 1968. *Tumor-Inhibitor Activity Of Pyrolizidin Alkaloids*. Journal Of Pharmaceutical Sciences.
- Dodds,J.H. dan Roberts,L.W. 1985. *Experiments In Plant Tissue Culture*. 2nd edition. Cambridge University Press. Cambridge.

- Harbone, J.B. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tanaman*. 2nd edition. Penerbit ITB. Bandung.
- Mantell, S.H. dan Smith, H. 1983. *Cultural Factors That Influences Secondary Metabolites Accumulation In Plant Cell And Tissue*. In *Plant Biotechnology*. Cambridge University Press. Cambridge .
- Nakanishi, K. 1974. *Natural Product Chemistry*. Academic Press. New York.
- Paterson, J.E. 1965. *Effect Of Pyrolizidine Alkaloid, Lasiocapine N-Oxidase In Nuclear And Cell Division In The Liver Rat*. Academic Press. New York.
- Tabata, Yamada, Hiraoka dan Konoshima. 1971. *Regulation Of Nicotine Production In Tobacco Tissue Culture By Plant Growth Regulator*. *Phytochem.* New York