

BAB VII

PRODUKSI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER

Kompetensi Dasar :

1. Mampu menjelaskan peranan kultur jaringan dalam memproduksi metabolit sekunder.
2. Mampu menerapkan prinsip kultur jaringan pada produksi metabolit sekunder.
3. Mampu mengkritisi jurnal yang berhubungan dengan materi "produksi metabolit sekunder"

Tumbuhan merupakan sumber utama senyawa-senyawa kimia yang digunakan untuk industri farmasi, industri makanan (food additive), minyak wangi. Banyak dari senyawa tersebut diekstrak dari tumbuhan tropis, namun karena ketersediaan, biaya yang mahal serta struktur senyawa tersebut yang sangat kompleks, hal ini menyebabkan sintesis senyawa ini menjadi tidak ekonomis.

Dalam usaha menghasilkan metabolit sekunder untuk skala besar, sangat diperlukan pemahaman tentang tingkah laku sel, path way (bio sintesis) metabolit tersebut di dalam tubuh tanaman tersebut.

Untuk mempelajari tingkah laku sel, perlu dipelajari tentang Cytology, Nutrisi, metabolisme primer dan sekunder, mitosis dan endomitosis, prolififikasi dan fragmentasi inti. Path way metabolit tertentu menjadi syarat mutlak yang harus dikuasai, dikarenakan hal tersebut merupakan kunci untuk melakukan modifikasi-modifikasi khusus untuk meningkatkan produk metabolit tersebut.

Oleh karena itu, biosintesis metabolit sekunder ini dengan menggunakan teknik kultur jaringan menjadi alternatif pilihan dan akhirnya menjadi tujuan. Namun dari banyak penelitian dan usaha komersial, masih banyak menghadapi kendala.

Senyawa yang sudah diproduksi secara komersial adalah Shikonin yang merupakan Napthaquinone merah dan *Lithospermum erythrorhizone*, Codein (alkaloid) berasal dari tanaman *Papaver somiferum* sebagai analgesik. Diosgenin (steroid) berasal dari *Dioscorea deltoidea* sebagai anti fertilitas. Pyrethrin dari tanaman *Chrysanthemum cinerariae* sebagai insektisida. Untuk industri makanan, yaitu senyawa Thaumatine (chalcon) berasal dari tanaman *Thaumatococcus danielli* sebagai pemanis, pada industri kosmetik adalah senyawa jasmnin berasal dari tanaman *Jasminium sp* sebagai parfum.

Beberapa keuntungan pemakaian tehnik kultur jaringan untuk memproduksi senyawa metabolit sekunder antara lain :

1. Tidak tergantung faktor lingkungan (hama, penyakit, iklim, hambatan geografis)
2. Sistem produksi dapat diatur. Produksi dapat dilakukan pada saat dibutuhkan dan dalam jumlah yang diinginkan.
3. Kualitas dan hasil produk lebih konsisten.
4. Mengurangi penggunaan lahan.

Untuk produksi metabolit sekunder skala komersial, bagaimanapun pertimbangan yang utama adalah keuntungan secara komersial. Dengan teknologi kultur sel yang memerlukan dana besar pada awal pendirian laboratorium, fasilitas laboratorium dan alat-alat yang dibutuhkan

Industri farmasi merupakan industri yang didukung oleh senyawa - senyawa alami dari tumbuhan. Sampai batas - batas tertentu senyawa tersebut tidak dapat digantikan dengan senyawa sintetik, karena daya kerja aktifnya untuk dapat menyembuhkan penyakit. Berbeda halnya dengan food additive dan kosmetik yang dapat tergantikan dengan senyawa sintetik.

Faktor - faktor yang mempengaruhi produksi metabolit sekunder:

1. Ekspresi sintesis senyawa metabolit sekunder.
 - a. Sintesis senyawa metabolit sekunder dipengaruhi banyak faktor antara lain: faktor genetik, faktor di dalam kultur dan diluar kultur.
 - b. Ekspresi sintesis senyawa metabolit sekunder tergantung kepada tahap perkembangan organ yang menghasilkannya. Pada kultur invitro produksi senyawa metabolit sekunder seringkali berasosiasi dengan difrensiasi sel dan jaringan yang dikulturkan.
2. Asal eksplan.

Sebelum kultur *in vitro* dilakukan harus dilakukan lebih dahulu analisis

secara *in vivo* bagian organ yang mana yang mampu menghasilkan metabolit tertinggi. Deteksi dapat dilakukan dengan bantuan alat Spectrophotometer atau Thin layer Chromatography. Berdasarkan informasi tersebut maka bagian tanaman tertentu tersebut yang digunakan sebagai sumber eksplan dan dimodifikasi sehingga dapat dihasilkan produk dalam jumlah banyak dan berkualitas baik

3. Kondisi-kondisi yang mempengaruhi kultur *in vitro*.

Hal hal yang harus dipertimbangkan apakah sintesis senyawa yang diinginkan sejalan dengan produksi biomassa atau tidak berhubungan sama sekali, jadi path way (bio sintesis) senyawa tersebut harus sudah dipahami sebelum tehnik ini di pergunkan.

Produksi Biomassa.

Hal hal yang sangat menentukan keberhasilan produksi biomassa adalah:

- Sumber karbohidrat : glukosa, fruktosa, galaktosa, sukrosa, molase, pati dan lainnya. Berbeda tanaman, maka sumber karbohidrat yang dibutuhkan juga berbeda.
- Suplay nitrogen. Nitrogen diberikan ke dalam media dalam bentuk NH_4NO_3 dan KNO_3 , tetapi ada kecenderungan KNO_3 mempengaruhi pertumbuhan kultur.
- Kalium (K), Kalsium (C), Fosfor.
Perlu optimasi khusus karena tanaman yang berbeda memberi respon yang berbeda untuk kultur sel dan kalus dalam rangka menghasilkan metabolit sekunder.
- Vitamin. Keuntungan menambahkan vitamin pada kultur metabolit sekunder adalah untuk menurunkan stress pada eksplan atau kultur
- Zat pengatur tumbuh (ZPT).

Harus dilakukan uji pendahuluan apakah eksplan yang digunakan setelah diletakkan didalam media pertumbuhan akan mengeluarkan auksin dan sitokinin endogennya, atau eksplan tersebut yang memerlukan tambahan ZPT dari luar.

Usaha-usaha untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder:

1. Seleksi sel. Seleksi klon pada kultur jaringan untuk mendapatkan lini sel dengan produksi metabolit sekunder yang tinggi. Seleksi dapat dilakukan

secara visual, berdasarkan analisis kimia atau berdasarkan ukuran agregat sel. Kemudian lini sel tersebut dikembangkan sebagai kultur metabolit baru.

2. Menggunakan fusi sel, seperti kultur protoplas. Fusi protoplas ini dikembangkan dari kultur kultur protoplas yang memiliki lini sel yang menghasilkan metabolit sekunder tinggi. Protoplas-protoplas tersebut difusikan sehingga diharapkan hasilnya (hibrida somatik) dengan produk metabolit sekunder yang tinggi.
3. Penggunaan Elicitor untuk memproduksi metabolit sekunder. Pada kultur sel ini, dimanfaatkan alterasi metabolisme sel melalui faktor-faktor eksternal, misalnya stress. Enzim-enzim untuk memproduksi metabolit sekunder banyak diinduksi oleh patogen, infeksi patogen menginduksi pembentukan produk (fitoaleksin). Elicitor berperan dalam menginduksi enzim yang terlibat dalam siklus metabolisme ini. Sebagai elicitor umumnya adalah karbohidrat.

4. Penggunaan kultur akar berambut (hairy root).

Pada mulanya, *Agrobacterium rhizogenes* merupakan bakteri gram negatif yang terdapat didalam tanah, yang dapat menyebabkan hairy root (akar berambut) pada tanaman. *Agrobacterium rhizogenes* mempunyai kemampuan untuk mentransfer sebagian bahan genetiknya (DNA) pada sel tanaman melalui pelukaan. DNA yang ditransfer disebut tDNA, merupakan potongan beberapa ratus kilo basa dari plasmid yang dikenal dengan Ri plasmid (Root inducing plasmid). T-DNA akan terintegrasi pada kromosom tanaman dan akan mengekspresikan gen-gen untuk mensintesis senyawa opin. T-DNA juga mengandung onkogen yaitu gen-gen yang berperan untuk menyandi hormon pertumbuhan, auksin dan sitokinin. Apabila onkogen terekspresi maka akan terjadi pertumbuhan yang sangat pada sel tersebut. Ekspresi onkogen pada plasmid Ri mencirikan pembentukan akar adventif secara besar-besaran pada tempat yang diinfeksi dan dikenal dengan hairy root.

Kultur sel, jaringan, organ diinfeksi dengan *Agrobacterium rhizogenes* yang kemudian menginfeksi DNA nya ke kultur akar, sehingga dihasilkan kultur akar berambut dalam jumlah banyak. Untuk skala komersial teknik ini sangat banyak dipakai dikombinasikan dengan penggunaan bioreaktor.

Keuntungan menggunakan teknik ini adalah : pertumbuhan kultur sangat cepat, produktif dalam kemampuannya menghasilkan senyawa metabolit sekunder dan mudah dimodifikasi, relatif seragam, kestabilan genetik cukup tinggi, dapat menggunakan medium tanpa menggunakan tambahan

ZPT Ernawati dalam Wattimena dkk (1995), pemanfaatan akar berambut untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder telah banyak dilakukan antara lain **lobelin** dari *Lobelia inflanta*, katarantin dan ajmalin dari *Cataranthus roseus* (Mukarlina dkk, 2005), dari saponin dari *Solanum aculeatissimum*, glukotropaeolin dari *Tropaeolum majus*, hiosiamin dan skopolamin dari *Atropa belladonna* dan *Datura innoxia*.

5. Penambahan inducer (pemacu)

Penambahan inducer kedalam media kultur dapat merangsang aktivitas enzim tertentu yang terlibat dalam jalur biosintesis sehingga dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder. *Inducer* yang digunakan untuk meningkatkan kandungan senyawa triterpene secara *in vitro* adalah skualen, yang merupakan senyawa triterpene linier tak jenuh dan *inducer* untuk semua triterpene. Penambahan skualen pada kultur sel *Azadirachta indica* akan dapat meningkatkan kandungan azadirachtin secara *in vitro* (Zakiah dkk, 2003)

Metode bioteknologi telah terbukti dapat meningkatkan produksi beberapa metabolit sekunder pada tanaman. Untuk meningkatkan perolehan metabolit sekunder digunakan tanaman hasil transformasi genetik dengan induksi *Agrobacterium rhizogenes*. Transformasi genetik menggunakan *Agrobacterium rhizogenes* adalah salah satu teknik yang digunakan untuk produksi metabolit sekunder ini.

Melalui metode kultur jaringan dilakukan transformasi genetik yaitu memindahkan suatu DNA bakteri *Agrobacterium rhizogenes* ke dalam sel tanaman. Selain itu, juga bertujuan untuk mengkondisikan dengan menggunakan *Nicotiana tabacum*. Diperoleh akar rambut *Artemisia annua* hasil transformasi genetik yang bentuk akar dan kadar artemisinin yang berbeda dengan akar biasa.

Tahapan dari transformasi guna menghasilkan metabolit yang meningkat adalah sebagai berikut:

Isolasi. Penelitian yang dilakukan meliputi pemilihan koleksi tanaman obat dan determinasi tanaman *Nicotiana tabacum* L. dan *Artemisia annua* L. Bagian dari kedua tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun. Dilakukan optimasi terhadap pertumbuhan bakteri *Agrobacterium rhizogenes* dengan menggunakan dua komposisi media yang berbeda.

Proses selanjutnya adalah dengan melakukan persiapan. Laboratorium kultur jaringan tertentu menggunakan tanaman *Nicotiana tabacum* L. Kemudian dilakukan beberapa proses optimasi untuk tanaman *Nicotiana tabacum* L.

ini. Optimasi tersebut mencakup optimasi sterilisasi tanaman, pemilihan medium pertumbuhan tanaman, optimasi komposisi hormon pertumbuhan tanaman. Proses optimasi ini juga dilakukan pada tanaman *Artemisia annua* L. dengan menggunakan *Nicotiana tabacum* L. sebagai acuan.

Setelah diperoleh hasil yang optimal, masing-masing daun tanaman diinduksi hingga berbentuk kalus. Dari kalus yang terbentuk inilah kemudian diberi 3 perlakuan yang berbeda. Pertama disubkultur dalam media tanpa hormon, kedua disubkultur dengan menggunakan media dengan hormon, dan yang ketiga dilakukan induksi dengan merendam kalus di dalam suspensi bakteri *Agrobacterium rhizogenes*.

Evaluasi dilakukan dengan membandingkan kadar alkaloid pada *Nicotiana tabacum* dan artemisinin pada *Artemisia annua* L. dengan melakukan ekstraksi terlebih dahulu. Ekstraksi untuk kedua senyawa ini dilakukan dengan cara maserasi dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Dari hasil ekstraksi kemudian dipantau dengan menggunakan kromatografi lapis tipis lalu kadarnya diukur dengan menggunakan spektrofotodensitometer.

Hasil optimasi menunjukkan bahwa baik *Nicotiana tabacum* L. dan *Artemisia annua* L. tumbuh optimal pada media Murashige-Skoog (MS). Untuk komposisi hormon pada tanaman tembakau adalah NAA 2 mg/L dan BAP 1 mg/l sedangkan untuk *Artemisia annua* L. digunakan komposisi hormon NAA 2 mg/l dan BAP 0,5 mg/l.

Akar hasil transformasi, akar tanpa transformasi, dan tanaman asli kemudian diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut yang sesuai. Lalu ekstrak yang diperoleh dipantau dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dan dibandingkan kadar metabolit sekundernya dengan menggunakan spektrofotodensitometer.

Diperoleh kadar alkaloid pada kalus yang berbentuk akar relatif lebih tinggi dibandingkan dengan kadar pada kalus. Sedangkan pada *Artemisia annua* L. hasil transformasi genetik diperoleh kadar artemisinin yang lebih tinggi dibandingkan dengan kadar *Artemisia annua* L., tanpa transformasi dari tanaman aslinya. Oleh karena bentuk akar yang terbentuk berbeda dan kadar artemisinin yang meningkat dapat disimpulkan bahwa telah terjadi transformasi genetik pada tanaman yang telah diinduksi dengan menggunakan *Agrobacterium rhizogenes* (atas kebaikan laboratorium farmasi ITB).

Pertanyaan:

1. Beberapa keuntungan pemakaian kultur jaringan untuk memproduksi senyawa metabolit sekunder antara lain, kecuali :

- a. Tidak tergantung faktor lingkungan
 - b. Sistem produksi dapat diatur
 - c. Kualitas dan hasil produk lebih konsisten
 - d. Menambah penggunaan lahan
(Kunci Jawaban : D, Tipe Soal C₂)
2. Hal-hal yang sangat menentukan keberhasilan produksi biomassa ialah:
- a. Carbon
 - b. Hidrogen
 - c. Karbohidrat
 - d. Zat-zat tanaman
(Kunci Jawaban : C, Tipe Soal C₃)
3. Faktor-faktor yang mempengaruhi produksi metabolit sekunder ialah:
- a. Ekspresi sintesis senyawa metabolit sekunder
 - b. Makanan
 - c. Zat pengatur tumbuh
 - d. Vitamin
(Kunci Jawaban : A, Tipe Soal C₄)

GLOSARIUM

Metabolit sekunder:

Senyawa sampingan yang dikeluarkan suatu tanaman dalam jumlah sedikit, dengan jalur yang berbeda dengan metabolit primer.

Agrobacterium rhizogenes:

Bakteri yang berasal dari tanah yang mempunyai kemampuan mentranfer bahan genetiknya untuk membentuk tumor di akar, dimanfaatkan untuk proses transfer gen dalam produksi metabolit sekunder

Alkaloid:

Suatu senyawa metabolit sekunder yang dapat dihasilkan dari tanaman, umumnya bermanfaat bagi manusia.

Flavonoid:

suatu senyawa metabolit sekunder yang dapat dihasilkan dari tanaman, umumnya bermanfaat bagi manusia.

Mahkota dewa:

Tanaman obat tradisional yang populer di masyarakat yang khasiatnya dipercaya dapat menyembuhkan berbagai macam penyakit diantaranya Diabetes Melitus (DM), anti oksidan, anti inflamasi.