

# Efektivitas Penambahan Elisitor Asam Jasmonik dalam Peningkatan Sintesis Senyawa Bioaktif Andrografolid pada Kultur Suspensi Sel Sambiloto

(Effectiveness of Jasmonic Acid Elicitor Addition for Andrographolide Synthesis Induction of Sambiloto Culture)

**NOOR AINI HABIBAH**

Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang  
Gedung D6 Lt 1 Jl. Raya Sekaran Gunungpati Semarang 50229 Telp. (024) 8508033  
email : noorhabibah@yahoo.co.id

## ABSTRACT

*In this research, we have studied synthesis of improvement of andrographolide bioactive compound on cell culture of sambiloto by addition of jasmonic acid. The essential problems in this research are firstly, the effects of addition of jasmonic acid either can induce or not andrographolide synthesis improvement of cell culture of sambiloto and secondly, to observe the largest content of andrographolide in jasmonic acid concentrations. Meanwhile, the purpose of this research are to observe the functions of jasmonic acid elicitor for induction of andrographolide synthesis improvement of cell culture of sambiloto and to optimize jasmonic acid concentrations which can produce the largest andrographolide content. The independent variable is concentration of addition of jasmonic acid on cell culture and the dependent variable are the growth of cell suspension culture and andrographolide bioactive content. Experiment result show that the optimum medium of sambiloto cell consist of Murashige & Skoog (1962) medium supplemented by 0,5 ppm kinetin and 2,4-D 5 ppm. The cell growth phases are the followings : lag phase at age of 0-5 days, exponential phase of 5-15 days, and stationary phase at age of longer than 15 days. The highest andrographolide was  $4,66 \times 10^{-2}$  reached in cell culture was supplemented with 10  $\mu$ M jasmonic acid.*

*Keywords : andrographolide, sambiloto cell suspension culture, jasmonic acid elicitor.*

## PENDAHULUAN

*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees atau sambiloto dikenal dengan beberapa nama daerah seperti pepaitan, ki oray, ki peurat, bidara dan sadilata. Spesies ini termasuk dalam famili Acanthaceae (Santa 1996). Sambiloto digunakan dalam pengobatan berbagai penyakit antara lain kanker, HIV, diabetes, disentri, tipus, kolera, dan influenza (Calabrese 2001, Koosnadi 2000, Wallich 1999). Bahan kimia yang terkandung dalam sambiloto antara lain andrografid, andrografolid, neo-andrografod, panikulin, asam kersik, damar serta mineral berupa kalium, kalsium, dan natrium. Rasa pahit yang terdapat pada tumbuhan ini disebabkan karena zat andrografid dan andrografolid yang mencapai 2,4 – 4,6 % dari berat kering (Santa 1996). Senyawa bioaktif dalam sambiloto yang berperan sebagai anti kanker adalah andrografolid.

Kultur jaringan telah lama digunakan sebagai metode untuk produksi senyawa bioaktif dari

tumbuhan. Kelebihan penggunaan kultur jaringan dalam produksi senyawa bioaktif dibanding dengan budidaya tanaman secara utuh antara lain adalah tidak adanya keterbatasan iklim, tidak memerlukan lahan yang luas, dan senyawa bioaktif dapat dihasilkan secara terus menerus dalam keadaan yang terkontrol (Collin & Edward 1998). Sintesis senyawa bioaktif oleh kultur suspensi sel dilaporkan antara lain oleh Norbert *et al.* (2007), Haq (2004), Cusido *et al.* (2002), dan Habibah (1995).

Produksi senyawa bioaktif melalui kultur jaringan dapat ditingkatkan dengan elisitasi. Elisitasi merupakan metode yang mengacu pada fenomena alam dalam mekanisme pertahanan inang terhadap patogennya. Interaksi antara patogen dengan tumbuhan inang yang menginduksi pembentukan fitoaleksin pada tumbuhan merupakan respon terhadap serangan mikroba patogen (Vanconsuelo & Boland 2007, Yoshikawa & Sugimito 1993). Senyawa yang berperan dalam proses elisitasi disebut elisitor.

Elisitor mengaktifkan gen dalam tumbuhan yang mengkode enzim yang diperlukan untuk sintesis fitoaleksin. Elisitor selain menginduksi pembentukan fitoaleksin juga meningkatkan berbagai metabolit sekunder dan enzim lain. Pada kultur kalus dan kultur sel penambahan elisitor juga dapat menginduksi senyawa metabolit sekunder yang bukan fitoaleksin (Eilert *et al.* 1986).

Permasalahan yang dikaji adalah 1) apakah penambahan elisitor asam jasmonik dapat menginduksi peningkatan sintesis andrografolid pada kultur suspensi sel sambiloto?, dan 2) pada konsentrasi asam jasmonik berapakah dapat diperoleh andrografolid dalam jumlah paling besar?

Penelitian ini bertujuan mengetahui peran elisitor asam jasmonik dalam menginduksi peningkatan sintesis andrografolid pada kultur suspensi sel sambiloto dan menentukan konsentrasi asam jasmonik yang dapat meningkatkan kandungan andrografolid secara optimal.

Elisitor dapat berupa biotik maupun abiotik. Setiap tipe elisitor berdasarkan karakteristiknya masing-masing dapat menginduksi respon spesifik yang tergantung pada interaksi kultur tumbuhan dan elisitor. Elisitor biotik berasal dari makhluk hidup, dari patogen atau dari tumbuhan itu sendiri. Elisitor abiotik berupa faktor fisik atau senyawa kimia (Vasconsuelo & Boland 2007). Salah satu pengaruh yang ditimbulkan oleh elisitor adalah adanya depolarisasi sel tumbuhan yang berarti aktivasi saluran ion endogen oleh elisitor. Elisitor juga dapat membentuk pori sehingga memungkinkan ion menembus membran tanpa perlu terikat pada reseptor dan aktivasi saluran ion (Kluasener & Weiler 1999).

Elisitasi dipengaruhi oleh spesifikasi elisitor, konsentrasi elisitor yang ditambahkan dan kondisi kultur (Vanconseulo & Boland 2007, Rhihwani & Shanks 1998). Konsentrasi elisitor yang ditambahkan ke dalam kultur suspensi sel sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan kultur sel dan sintesis metabolit sekunder dalam kultur suspensi sel tersebut (Flocco *et al.* 1998). Jumlah elisitor yang ditambahkan ke dalam kultur sel biasanya sangat kecil dan ditambahkan pada tahapan pertumbuhan kultur tertentu (Collin & Edward 1998).

Asam jasmonik merupakan salah satu elisitor abiotik yang banyak digunakan. Asam jasmonik adalah senyawa alami yang disintesis oleh tumbuhan sebagai respon terhadap adanya serangan patogen. Asam jasmonik berperan dalam menginisiasi transkripsi gen-gen yang terlibat dalam mekanisme pertahanan pada tumbuhan. Senyawa ini merupakan senyawa pengatur penting yang mempengaruhi respon dan signal tumbuhan yang bekerja dalam penghambatan atau aktivasi suatu hubungan (Norbert

*et al.* 2007). Hasil akhir dari proses ini adalah peningkatan produksi senyawa metabolit sekunder terutama senyawa yang terlibat dalam mekanisme pertahanan pada tumbuhan (Gundlach *et al.* 1992). Hal ini menjadi dasar penggunaan asam jasmonik dan derivatnya sebagai elisitor pada berbagai kultur *in vitro* tanaman dalam rangka peningkatan produksi metabolit sekunder.

Penambahan asam jasmonik eksogen dilaporkan dapat meningkatkan sintesis shikonin pada kultur *Onosma paniculatum* (Ding *et al.* 2004), alkaloid tropan pada kultur *Brugmansia candida* (Spollansky *et al.* 2000), ginsenoside pada kultur ginseng (Yu *et al.* 2000) dan alkaloid tropan pada kultur *Datura stramonium* (Zabetakis *et al.* 1999). Gundlach *et al.* (1992) melaporkan penambahan asam jasmonik menginduksi pembentukan metabolit sekunder pada 32 spesies tanaman. Konsentrasi asam jasmonik yang digunakan untuk mengelisitasi produksi metabolit sekunder berkisar antara 0,1 – 100  $\mu\text{M}$  (Kim *et al.* 2004, Palazo *et al.* 2003, Cusido *et al.* 2002, Zabetakis *et al.* 1999, Gundlach *et al.* 1992).

Penelitian mengenai sintesis andrografolid saat ini banyak dilakukan karena potensinya sebagai obat antikanker. Andrografolid secara signifikan menghambat proliferasi sel kanker kolon HT-29. Andrografolid juga memperlihatkan aktivitas antikanker pada berbagai sel kanker yang mewakili berbagai tipe kanker manusia (Kumar *et al.* 2004). Andrografolid melakukan aktivitas antikanker secara langsung pada sel kanker dengan menahan siklus sel pada fase G0/G1 melalui induksi protein inhibitor siklus sel p27 dan menurunkan ekspresi cyclin-dependent kinase 4 (CDK4). Aktivitas immunostimulatori dari andrografolid dilakukan dengan peningkatan proliferasi limfosit dan produksi interleukin-2. Andrografolid juga meningkatkan produksi factor-alpha nekrosis tumor dan ekspresi *CD marker*, menghasilkan peningkatan aktivitas sitotoksik limfosit terhadap sel kanker, yang mungkin berperan dalam aktivitas antikanker tidak langsung (Rajagopal 2003).

## BAHAN DAN METODE

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah penambahan elisitor asam jasmonik pada kultur suspensi sel sambiloto dengan konsentrasi 0; 0,1; 1; 10 dan 100  $\mu\text{M}$ . Variabel tergantung yang diukur adalah pertumbuhan kultur suspensi sel dan kandungan senyawa bioaktif andrografolid. Variabel yang dikendalikan pada penelitian ini adalah pH medium dan kondisi kultur. Alat dan bahan penelitian ditampilkan pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Tabel 1. Bahan Penelitian

Uraian	Bahan
Pembuatan medium	Stok medium MS (makronutrien, mikronutrien, vitamin, myoinositol), agar, sukrosa, NaOH, HCl, 2,4-D, kinetin, aquadest, aluminium foil
Induksi Kalus	Medium MS padat, daun sambiloto, natrium hipoklorit, aquades, alkohol, detergent
Penentuan medium kultur sel cair yang optimal	Medium MS cair, kalus
Penentuan Kurva Sel	Medium MS cair, sel, kertas saring
Perlakuan penambahan asam jasmonik	Medium MS cair, sel sambiloto, kertas saring, asam jasmonik, membran milipore
Uji kuantitatif dan kualitatif kadar andrografolid	Sel sambiloto, pelat KLT, metanol, dichloroetan, senyawa andrografolid standar, kloroform

Tabel 2. Alat Penelitian

Uraian	Alat
Pembuatan medium	<i>Autoclave</i> , timbangan analitik, pH meter, alat gelas (erlenmeyer, beaker glass, botol kultur, batang pengaduk), pipet, <i>hot plate</i>
Induksi Kalus	<i>laminar air flow</i> , alat diseksi (scapel dan pinset), cawan petri
Penentuan medium kultur sel cair yang optimal	<i>laminar air flow</i> , <i>shaker</i> , timbangan analitik
Penentuan Kurva Sel	<i>laminar air flow</i> , <i>shaker</i> , timbangan analitik
Perlakuan penambahan asam jasmonik	<i>laminar air flow</i> , <i>shaker</i> , timbangan analitik, mikropipet
Uji kuantitatif dan kualitatif kadar andrografolid	Alat ekstraksi, peralatan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), spektrofotodensitometer

Medium induksi kalus yang digunakan adalah medium Murashige & Skoog (1962) yang berfase padat. Zat pengatur tumbuh yang digunakan 2,4-D dan kinetin. Konsentrasi 2,4-D dan kinetin yang digunakan mengacu pada penelitian Habibah dan Fitrianti (2004). Medium MS padat diperoleh dengan cara penambahan agar-agar sebagai bahan pematat sebanyak 8 gram untuk setiap literanya. Medium diatur pHnya hingga mencapai 5,8 dengan penambahan HCl dan NaOH. Setelah itu medium dituangkan ke dalam botol kultur, ditutup dengan aluminium foil dan disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada tekanan 15 psi.

Medium kultur suspensi sel yang digunakan adalah medium Murashige & Skoog (1962) yang berfase cair. Zat pengatur tumbuh yang digunakan 2,4-D dan kinetin. Konsentrasi 2,4-D yang digunakan 0, 1 dan 5 ppm. Kinetin yang digunakan 0; 0,25; 0,5 dan 1 ppm. Medium diatur pHnya hingga mencapai 5,8 dengan penambahan HCl dan NaOH. Setelah itu medium dituangkan ke dalam botol kultur, ditutup dengan aluminium foil dan disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada tekanan 15 psi.

Sterilisasi permukaan daun sambiloto dilakukan dengan cara mencuci daun menggunakan air mengalir dan detergen selama 1 menit, setelah itu digojok dalam alkohol 70% selama 2 menit. Alkohol kemudian dibuang dan daun dicuci dengan akuades steril. Sterilisasi dilanjutkan dengan larutan natrium hipoklorit. Terakhir dilakukan pencucian dengan akuades steril sebanyak 3 kali untuk menghilangkan bahan sterilan yang masih menempel di daun. Daun yang telah steril dipotong dengan menggunakan mata pisau tajam dengan ukuran sekitar 1 x 1 cm. Hasil potongan kemudian ditanam pada medium induksi kalus. Botol kultur berisi potongan daun disimpan dalam ruang kultur pada suhu 27°C dan intensitas cahaya 1300 lux.

Pembentukan kultur suspensi sel dilakukan dengan cara kalus yang terbentuk dipindahkan ke dalam medium MS cair dengan berbagai konsentrasi kinetin dan 2,4-D. Tiap 100 ml medium ditambahkan 2-3 gram kalus. Botol berisi medium dan kalus kemudian ditempatkan pada *shaker* dengan kecepatan 90 rpm. Setelah 1 minggu ditentukan medium cair mana yang memberikan pertumbuhan sel paling baik yang ditunjukkan dengan biomassa tertinggi. Medium

yang terbaik digunakan untuk tahap penelitian selanjutnya yaitu penentuan kurva tumbuh sel untuk menentukan waktu penambahan elisitor. Penentuan kurva tumbuh dilakukan dengan cara menumbuhkan sel dengan biomassa yang sama pada medium cair dengan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang memberikan pertumbuhan sel terbaik. Pada umur sel 5, 10, 15, 20 dan 25 hari sel ditimbang. Dari hasil penentuan kurva tumbuh maka dapat ditentukan fase stasioner dimana asam jasmonik akan ditambahkan. Setelah sel mencapai fase stasioner, asam jasmonik dengan konsentrasi yang telah ditentukan ditambahkan ke dalam medium. Dua puluh empat jam setelah penambahan asam jasmonik, sel sambiloto dipanen dan diekstraksi dengan dichloroetan dan metanol dengan perbandingan 1:1. Analisis kualitatif dilakukan dengan KLT (khromatografi lapis tipis) dan deteksi dengan UV (ultra violet). Analisis kuantitatif senyawa andrografolid dilakukan dengan menggunakan spektrofotodensitometer.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Optimasi Medium Untuk Kultur Sel

Kalus terbentuk setelah 1 minggu penanaman eksplan potongan daun sambiloto. Kalus mula-mula terbentuk pada bagian tepi bekas potongan. Hal ini terjadi karena adanya luka akan menginduksi pembelahan sel. Setelah 2

minggu kalus telah menunjukkan pertumbuhan pada seluruh bagian eksplan. Kalus yang terbentuk berupa kalus yang lunak dan meremah berwarna putih kekuningan. Kalus meremah merupakan sumber eksplan yang baik untuk pembentukan kultur suspensi sel karena kalus meremah memiliki ruang antar sel yang lebih lebar bila dibandingkan dengan kalus kompak. Ruang antar sel yang lebar memudahkan terpisahnya sel yang satu dengan sel yang lainnya pada saat pengocokan sehingga suspensi sel mudah terbentuk.

Suspensi sel sambiloto yang diperoleh dengan cara memasukkan kalus meremah ke dalam medium cair terbentuk sekitar 2 minggu setelah pemindahan kalus. Optimasi medium cair yang paling baik untuk pertumbuhan kultur suspensi sel dilakukan dengan memberikan penambahan zat pengatur tumbuh kinetin dan 2,4 -D dengan berbagai konsentrasi pada medium pertumbuhan berupa medium murashige and skoog cair. Penentuan konsentrasi berdasarkan pada medium-medium yang dapat menghasilkan kalus paling optimal. Parameter yang diteliti adalah berat basah sel yang dihasilkan pada setiap perlakuan. Berat basah sel menunjukkan gambaran pertumbuhan dari sel (Collin & Edward 1998) sehingga dapat dijadikan parameter pertumbuhan sel. Hasil optimasi medium untuk mendapatkan medium yang paling baik untuk pertumbuhan sel dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Rerata Pertambahan Berat Basah Sel Pada Medium MS dengan Penambahan Berbagai Konsentrasi Kinetin dan 2, 4 -D

Konsentrasi kinetin (mg/l)	Konsentrasi 2,4-D (mg/l)	Rerata Pertambahan Berat Basah Sel (mg)
0	5	160
0,25	0	300
0,25	1	330
0,25	5	450
<b>0,5</b>	<b>5</b>	<b>510</b>
1	5	340

Hasil di atas menunjukkan bahwa medium yang optimal untuk pertumbuhan sel adalah medium dengan penambahan kinetin 0,5 ppm dan 2,4-D sebanyak 5 ppm dengan rerata pertambahan berat basah sel sebanyak 510 mg. Penambahan kinetin lebih besar dari 0,5 ppm

memberikan hasil pertumbuhan yang lebih rendah ini berarti bahwa kinetin pada konsentrasi lebih besar dari 0,5 ppm menghambat pertumbuhan suspensi sel. Konsentrasi 2,4-D kurang dari 5 ppm tidak memberikan pertumbuhan yang optimal.

Zat pengatur tumbuh 2,4-D merupakan auksin kuat yang menginduksi pembelahan sel. Karena medium yang memberikan pertumbuhan terbaik adalah medium dengan penambahan kinetin 0,5 ppm dan 2,4-D sebanyak 5 ppm maka medium inilah yang kemudian digunakan dalam kultur sel selanjutnya.

Tabel 4. Pertambahan Berat Basah Sel Sambiloto

Umur (hari)	Pertambahan berat basah sel (mg)
0	0
5	50
10	360
15	160
20	370
25	340
	260
	350
	200
	370

**Pertumbuhan Kultur Sel Sambiloto**

Kurva pertumbuhan dilakukan sebagai cara untuk mengetahui pola pertumbuhan sel, dilakukan dengan cara penimbangan berat basah sel setiap 5 hari sekali selama 25 hari. Hasil kurva pertumbuhan dapat dilihat pada Tabel 4.

Pola pertumbuhan sel meliputi beberapa fase yaitu fase lag yang merupakan fase adaptasi sel pada medium baru, kemudian dilanjutkan dengan fase eksponensial dimana sel tumbuh secara pesat dan diakhiri dengan fase stasioner yaitu fase dimana sel sudah memasuki tahap senescens. Pada fase adaptasi, pertumbuhan sel sangat lambat, hal ini terjadi karena energi yang ada sebagian besar digunakan sel untuk melakukan adaptasi dengan medium tumbuh yang baru. Fase ini terjadi pada beberapa hari pertama setelah sel itu dipindahkan ke medium baru. Pertumbuhan sel yang sangat cepat terjadi pada fase eksponensial atau sering disebut juga fase log. Fase ini terjadi setelah sel dapat beradaptasi dengan medium yang baru. Setelah fase log maka sel akan mencapai fase stasioner dimana laju pertumbuhan sel sama atau bahkan lebih kecil daripada laju kematian sel karena sebagian besar sel telah mencapai senescens (tua). Sel yang telah tua akan mati dan hancur. Karena laju pertumbuhan sel sama atau bahkan lebih kecil daripada laju kematian sel maka biomassa kultur sel akan tetap dan tidak ada penambahan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fase lag terjadi pada saat sel berumur 0-5 hari. Ketika umur 5-15 hari sel berada pada fase eksponensial. Dan fase stasioner terjadi pada sel yang berumur lebih dari 15 hari. Hal ini hampir sama dengan kurva tumbuh kultur sel tembakau yang memasuki fase stasioner pada umur lebih dari 15 hari (Collin & Edward 1998). Penentuan kurva tumbuh dilakukan sebagai penentuan waktu penambahan asam jasmonik ke dalam kultur. Penambahan dilakukan pada tahapan sel memasuki fase stasioner. Hal ini dilakukan karena pada tahapan lag, sel sedang melakukan adaptasi terhadap medium baru dan pada tahapan fase eksponensial sel melakukan pertumbuhan yang sangat pesat sehingga sebagian besar energinya

digunakan pembuatan metabolit primer yang diperlukan bagi pertumbuhannya. Pembentukan metabolit sekunder cenderung meningkat pada akhir tahap eksponensial atau menjelang tahapan stasioner. Oleh karena itu penambahan elisitor dilakukan pada tahapan ini agar produksi yang diperoleh bisa maksimal (Norbert *et al.* 2007).

**Kandungan Andrografolid pada Kultur Sel Dengan Penambahan Asam Jasmonik**

Hasil uji kualitatif andrografolid menunjukkan bahwa semua sampel yang diujikan mengandung andrografolid meskipun dengan kadar yang bervariasi. Ini berarti bahwa semua kultur suspensi sel baik dengan ataupun tanpa penambahan asam jasmonik dapat menghasilkan senyawa bioaktif andrografolid. Hal ini sesuai dengan yang dikatakan oleh Haq (2004) yang menyatakan bahwa kultur suspensi sel dapat menghasilkan senyawa bioaktif seperti yang dihasilkan oleh tumbuhan asalnya. Sesuai teori sel dari Schleiden dan Schwann yang menyatakan bahwa sel tumbuhan mempunyai totipotensi sehingga sel mampu berkembang atau menghasilkan hasil metabolit sekunder seperti yang dihasilkan oleh induknya. Kadar andrografolid yang bervariasi dipengaruhi oleh adanya penambahan asam jasmonik karena hanya variabel tersebut yang berbeda diantara semua perlakuan. Hasil pengujian kadar andrografolid dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Kadar Andrografolid pada Kultur Suspensi Sel Sambiloto dengan Penambahan Asam Jasmonik

Konsentrasi asam jasmonik $\mu\text{M}$	Kadar andrografolid (%)
0	$2,57 \times 10^{-2}$
0,1	$2,44 \times 10^{-2}$
1	$2,11 \times 10^{-2}$
10	$4,66 \times 10^{-2}$
100	$3,82 \times 10^{-2}$

Hasil uji andrografolid menunjukkan bahwa penambahan asam jasmonik meningkatkan sintesis senyawa bioaktif andrografolid. Ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Ding *et al.* (2004) pada kultur *Onosma paniculatum*, Spollansky *et al.* (2000) pada kultur *Brugmansia candida*, Yu *et al.* (2000) pada kultur ginseng dan Zabetakis *et al.* (1999) pada kultur *Datura stramonium*. Asam jasmonik juga berlaku sebagai penginduksi pembentukan Lebih lanjut dikatakan oleh Gundlach *et al.* (1992) bahwa asam jasmonik meningkatkan metabolit sekunder pada 32 spesies tanaman. Hasil uji andrografolid juga menunjukkan bahwa penambahan asam jasmonik sampai konsentrasi 10  $\mu\text{M}$  meningkatkan kadar andrografolid. Kadar andrografolid menurun pada penambahan asam jasmonik 100  $\mu\text{M}$ . Meskipun terjadi peningkatan kadar andrografolid dengan penambahan asam jasmonik tetapi kadar tersebut masih rendah bila dibandingkan dengan kadar andrografolid yang terdapat pada daun kering dan kalus. Andrografolid yang dihasilkan pada kultur suspensi sel sambiloto baik dengan penambahan asam jasmonik maupun tanpa penambahan asam jasmonik jauh lebih rendah dari pada yang dihasilkan daun dan kultur kalus pada biomassa yang sama. Kadar andrografolid pada daun kering dapat mencapai 1,18 % (Habibah 2005). Kadar andrografolid yang dihasilkan pada kultur suspensi sel sambiloto juga lebih rendah dari pada kadar andrografolid yang terdapat pada kalus sambiloto. Kadar andrografolid pada kalus sambiloto dapat mencapai  $12,70 \times 10^{-2}$  % (Habibah 2005). Hal ini kemungkinan terjadi karena sebagian andrografolid telah disekresikan oleh sel ke dalam medium sebagai responnya terhadap kehadiran asam jasmonik. Asam jasmonik merupakan senyawa alami yang disintesis oleh tumbuhan sebagai respon terhadap adanya serangan patogen. Penambahan asam jasmonik eksogen akan menginisiasi transkripsi gen-gen yang terlibat dalam mekanisme pertahanan pada tumbuhan. Hasil akhir dari proses ini adalah peningkatan produksi senyawa-senyawa metabolit sekunder terutama senyawa yang terlibat dalam mekanisme

pertahanan pada tumbuhan (Gundlach *et al.* 1992). Andrografolid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh sambiloto sebagai senyawa pertahanan.

Penambahan asam jasmonik meningkatkan sintesis andrografolid secara signifikan. Hal ini terlihat bahwa penambahan asam jasmonik 10  $\mu\text{M}$  menghasilkan peningkatan kandungan andrografolid terbesar yaitu 1,8 kali lipat bila dibandingkan kontrol. Hal ini juga terjadi pada kultur suspensi sel *Rubia tinctorum* L. Terjadi peningkatan signifikan produksi pseudopurpurin yang merupakan derivat dari anthraquinone pada kultur suspensi sel *Rubia tinctorum* L. Produksi pseudopurpurin pada kontrol 2,93 mg/g, asam jasmonik dengan konsentrasi 30  $\mu\text{l/ml}$  mampu meningkatkan hingga mencapai 84,9 mg/g (Norbert *et al.* 2007). Peningkatan produksi metabolit sekunder karena penambahan asam jasmonik juga dilaporkan oleh Krolicka *et al.* (2007) pada kultur *Dionaea muscipula* and *Drosera capensis*. Pada kedua kultur tersebut penambahan asam jasmonik menyebabkan peningkatan kandungan naphthoquinone (2,6 kali lipat dibanding kontrol untuk plumbagin dan 1,9 kali untuk ramentaceone).

## PENUTUP

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa, kultur sel sambiloto dapat tumbuh secara optimal pada medium MS dengan penambahan kinetin 0,5 ppm dan 2,4-D sebanyak 5 ppm. Fase lag terjadi pada saat sel berumur 0-5 hari, umur 5-15 hari sel berada pada fase eksponensial dan fase stasioner terjadi pada sel yang berumur lebih dari 15 hari. Kultur sel sambiloto dapat menghasilkan senyawa bioaktif andrografolid. Hasil uji kandungan andrografolid menunjukkan bahwa penambahan asam jasmonik 10  $\mu\text{M}$  menghasilkan peningkatan kandungan andrografolid terbesar yaitu 1,8 kali lipat bila dibandingkan kontrol.

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk melihat kandungan andrografolid pada medium karena kemungkinan sebagian andrografolid yang dihasilkan oleh kultur sel dilepaskan ke dalam medium sebagai reaksi terhadap kehadiran elisitor. Adanya deteksi kadar andrografolid pada medium akan bisa memberikan gambaran yang lengkap terhadap peningkatan produksi andrografolid sebagai respon terhadap penambahan elisitor asam jasmonik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Calabrese C. 2000. A Phase I Trial of Andrographolide in HIV Positive Patient and Normal Volunteers. *Phytother Res* 14 (5).
- Collin HA, Edwards S. 1998. *Plant Cell Culture*. UK : BIOS Scientific Publisher. Hlm 103-112
- Cusido RM, Palazo J, Bonfill M, Navia OA, Morales C, Pinol T. 2002. Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus medias*. *Biotechnol. Prog.* 18, 418–423.
- Ding. 2004. Effects of Methyl Jasmonate with indole-acetic Acid and 6- Benzilaminopurine on the Secondary Metabolism of Cultured *Onosma Paniculatum* Cell. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 40(6):581-585.
- Eilert U, Constabel F, Kurz WGW.1986. Elicitor-Stimulation of Monoterpene Indole Alkaloids Formation in Suspension Culture of *Catharanthus roseus*. *Journal of Plant Physiology* 126: 11-22.
- Esyanti RR. 1995. Biologi Molekul Pada Sistem Pertahanan Tanaman Terhadap Penyakit. *Seminar Biologi Molekul*. Jurusan Biologi Institut Teknologi Bandung.
- Flocco CG, Alvarez MA, Giulietti AM. 1998. Peroksidase Production *in Vitro* by *Armoracia lapathifolia* (horseradish)-transformed root cultures: Effect of Elicitation on Level and Profile of Isoenzymes. *Biotechnol. Appl. Biochem* 23: 33- 38.
- Gundlach H, Muller MJ, Kutchan TM, Zenk MH. 1992. Jasmonic Acid is a Signal Transducer in Elicitor-Induced Plant Cell Cultures. *Proceedings of National Academy of Science* 89: 2389-2393.
- Habibah NA. 1995. Kandungan Alkaloid Senesionin dalam Kultur Suspensi Agregat Sel *Crotalaria anagyroides* H.B.K. *Skripsi*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Habibah NA dan Fitrianti A.2004. Senyawa Bioaktif Pada Kultur Kalus Sambiloto (*Andrographis paniculata*) dan Aktivitasnya Terhadap Sel Kanker Payudara. *Laporan Penelitian Dosen Muda*. Tidak dipublikasikan.
- Haq H. 2004. *Production of Bioactive Compound: In Vitro Production of Bioactive Compounds from Medicinal and Aromatic Plants*. ICUC. University of Southampton, UK.
- Kavalier A. 2001. The Effect of Methyl Jasmonate on the Anthocyanin Content and Growth Rates of the Wisconsin Fast Plants *Brassica rapa*. <http://www.wmrs.edu/oldweb/interns-2001>[10 Maret 2001]
- Kim OK, Kim MY, Hong MH, Ahn JC, Hwang B. 2004. Stimulation of asiaticoside accumulation in the whole plant cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban by elicitors. *Plant Cell Rep.* 23: 339–344.
- Koosnadi S, Soeprapto M, dan Roem S. 2000. *Terapi Biologi Untuk Kanker*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Kumar RA, Sridevi K, Kumar NV, Nanduri S, Rajagopal S. 2004. Anticancer and Immunostimulatory Compound from *Andrographis paniculata*. *Journal Ethnopharmacology* 92 (2-3): 291-295. [http://localhost/G:/pustaka/ScienceDirect%20%20Journal%20of%20Ethnopharmacology%20\\_%20Anticancer%20and%20immunostimulatory%20compounds%20from%20Andrographis%20paniculata.htm](http://localhost/G:/pustaka/ScienceDirect%20%20Journal%20of%20Ethnopharmacology%20_%20Anticancer%20and%20immunostimulatory%20compounds%20from%20Andrographis%20paniculata.htm). [28 Feb 2008]
- Krolicka A, Szpitter A, Gilgenast E, Romani G, Kaminski, Lojkowska E. 2007. Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in carnivorous plants grown *in vitro* by addition of elicitors. *ScienceDirect. Enzyme Microb Technol* doi:10.1016/j.enzmictec.2007.09.011. <http://www.elsevier.com/locate/emt>
- Norbert O, Imre B, Zolta S, Be'la Da'nos. 2007. Influence of different elicitors on the synthesis of anthraquinone derivatives in *Rubia tinctorum* L. cell suspension cultures. *ScienceDirect. Dyes and Pigments* 77 (2008): 249-257. <http://www.elsevier.com/locate/dyepig> [30 April 2007]
- Palazo J, Cusido RM, Bonfill M, Mallol A, Moyano E, Morales C, Pin MT. 2003. Elicitation of different *Panax ginseng* transformed root phenotypes for an improved ginsenoside production. *Plant Physiol. Biochem.* 41: 1019–1025.
- Rajagopal S, Kumar RA, Deevi DS, Satyanarayana C, Rajagopalan R. 2003. Andrographolide, a potential cancer therapeutic agent isolated from *Andrographis paniculata*. *International Bibliographic Information of Dietary Supplements. J-Exp-Ther-Oncol.* 3(3): 147-

58. [http://grande.nal.usda.gov/ibids/index.php?mode2=detail&origin=ibids\\_references&the\\_row=747118](http://grande.nal.usda.gov/ibids/index.php?mode2=detail&origin=ibids_references&the_row=747118). [28 Feb 2008]
- Robin, R.J. 1994. Secondary Product from Cultured Cell Andorgans: Molecular and Cellular Approaches. Dixon, R.A & Gonzales, R.A. (Eds). *Plant Cell Cultures, A Practical Approach*. New York: Oxford University Press. Hlm 169-198.
- Santa. 1996. Studi Taxonomi Sambiloto *Andrographis paniculata* (Burn F) Ness. *The Journal on Indonesian Medicinal Plants* 3 (1).
- Spollansky T, Alvarez SIP, Giulietti AM. 2000. Effect of Jasmonic Acid and Aluminium on Production of Tropane Alkaloids in Hairy Root Cultures of *Brugmansia candida*. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*. Vol 3 No 1 Issue 15 April 2000.
- Wallich. 1999. *Andrographis paniculata* (Burm.f). In: de Padua, L.S., Bunyapraphatsara, N. And Lemmens, R.H.M.J. (Editors): *Plant Resources of South-East Asia No. 12(1). Medicinal and Poisonous Plants I*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherland. Hlm 119-123.
- Wiermann R. 1981. *The Biochemistry of Plants*. Academic press. Hlm 85
- Yoshikawa M, Sugimoto K. 1993. A Specific Binding Site on Soybean Membranes for a Phytoalexin Elicitor Released from Fungal Cell Wall by b-1,3 Endoglucanase. *Plant Cell Physiology* 34 (8): 1229-1237.
- Yu KW, Gao WY, Son SH, Paek KY. 2000. Improvement of Ginsenoside Production by Jasmonic Acid and Some Other Elicitor in Hairy Root Culture of Ginseng (*Panax ginseng* CA Meyer). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 36(5): 424-427.
- Zabetakis I, Edwards R, O'Hagan D. 1999. Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry (United Kingdom)* 50(1): 53-56.
- Vasconsuelo A and Boland R. 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Science Direct. Plant Science* 172 (2007): 861-875. <http://www.elsevier.com/locate/plantsci> [20 Maret 2007]