

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\*

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  $5 \cdot 10^{-5}$  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). Qualitative 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 walker (Culvenor, 1968) sehingga senesionin ini mempunyai potensi sebagai obat kanker.

---

\* Reviewer: Sari Wulari Diana  
Jurusan Pendidikan Biologi  
FPMIPA UPI.

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\*

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  $5 \cdot 10^{-5}$  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). Qualitative data showed that senesionin could be detected in the CGS extract by appearance of spot (Rf=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 walker (Culvenor, 1968) sehingga senesionin ini mempunyai potensi sebagai obat kanker.

---

\* Reviewer: Sari Wulari Diana  
Jurusan Pendidikan Biologi  
FPMIPA UPI.

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 dimasukkan sebanyak 1 g berat basah ke dalam 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 dikeringkan dengan oven pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  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 diubah 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.



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 ke dalam 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 2 cm 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 di dalam 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 parijang integrasi yang sebanding dengan kadar senesionin.

## Hasil Dan Pembahasan

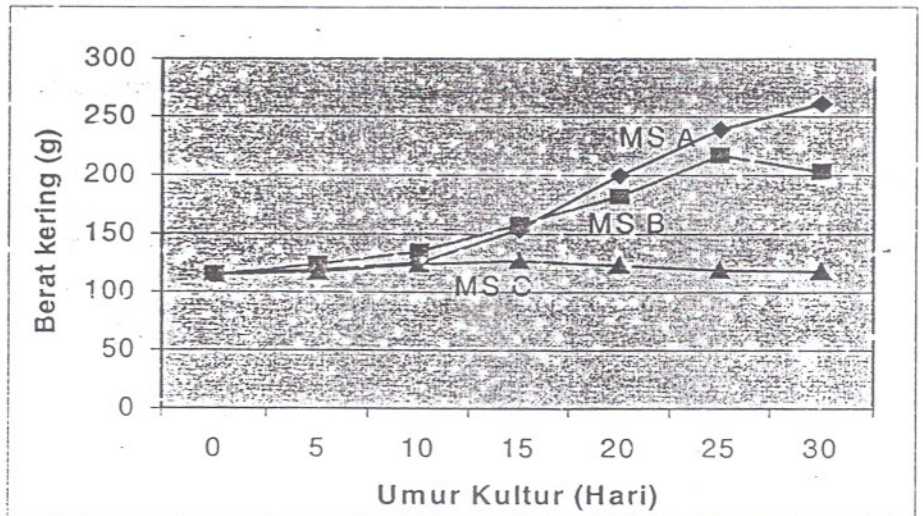
### Pertumbuhan Kultur CGS

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 yang berasal dari amonium. Amonium diperlukan oleh sel tanaman untuk pembentukan asam amino dan protein, tetapi

apabila terlalu banyak dapat menyebabkan tertimbunnya di dalam 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).

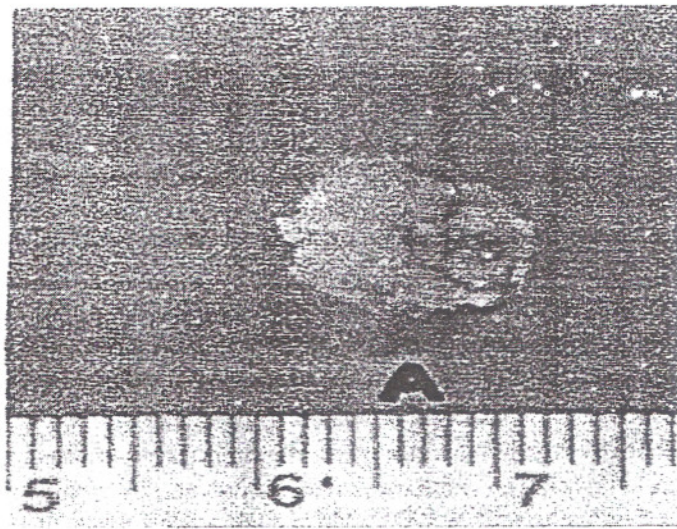
Tabel.1. Berat kering kultur CGS *Crotalaria anagyroides*

| 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 standar 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.

Peristiwa yang terjadi pada MS A dan MS B merupakan peristiwa kebalikan pada MS C. 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 diperlihatkan 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.<br>(Hari) | Kadar rata-rata senesionin (µg/ g BK) |            |            |
|-----------------|---------------------------------------|------------|------------|
|                 | MS A                                  | MS B       | MS C       |
| 0               | 2688±23,45                            | 2688±23,45 | 2688±23,45 |
| 5               | 1361±34,55                            | 2493±45,67 | 2371±30,11 |
| 10              | 727±21,55                             | 2424±43,33 | 2346±12,24 |
| 15              | 1181±13,13                            | 1611±9,87  | 2291±31,22 |
| 20              | 1091±21,98                            | 1898±32,12 | 2217±32,41 |
| 25              | 1369±11,11                            | 1508±32,75 | 3667±32,41 |
| 30              | 1393±12,22                            | 2597±30,00 | 4623±2143  |