

LAPORAN HASIL PENELITIAN

**PRODUKSI KUINOLIN SECARA CEPAT DARI
KULTUR JARINGAN TANAMAN KINA**

SURAT PERJANJIAN PELAKSANAAN KEGIATAN

NOMOR: 1891.2/LB.620/I.1/5/2009

TANGGAL: 7 MEI 2009

Oleh:

Sumaryono

Imron Riyadi

Tri Panji

Salwa Lubnan D

Diah Ratnadewi

2009

LAPORAN HASIL PENELITIAN

PRODUKSI KUINOLIN SECARA CEPAT DARI KULTUR JARINGAN TANAMAN KINA

SURAT PERJANJIAN PELAKSANAAN KEGIATAN

NOMOR: 1891.2/LB.620/I.1/5/2009

TANGGAL: 7 MEI 2009

Oleh:

Sumaryono

Imron Riyadi

Tri Panji

Salwa Lubnan D

Diah Ratnadewi

2009

LEMBAR PENGESAHAN LAPORAN HASIL PENELITIAN

1. Judul Penelitian : Produksi kuinolin secara cepat dari kultur jaringan tanaman kina.
2. Penanggung Jawab Penelitian
 - a. Nama : Ir. Sumaryono, MSc.
 - b. Pangkat/golongan : Pembina Utama Muda/ IVC
 - c. Jabatan
 - Struktural : Kepala Urusan Komersialisasi Hasil Penelitian
 - Fungsional : Peneliti Madya
3. Lokasi Penelitian : a. Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor
b. Pusat Penelitian Teh dan Kina, Gambung
c. Institut Pertanian Bogor, Bogor
4. Biaya Penelitian : Rp. 227.500.000,- (tahun 2009)
5. Sumber Dana : Dana Bantuan Sosial Penelitian

Mengetahui,
Kepala Balai Penelitian Bioteknologi
Perkebunan Indonesia



Dr. Darmono Taniwiryono
NIK. 110 400 129

Penanggungjawab Kegiatan

Ir. Sumaryono, MSc.
NIK. 110 700 258

Mengetahui,
Caretaker Direktur Eksekutif LRPI
Ub.

Dr. Gede Wibawa
Kepala Biro Riset

KATA PENGANTAR

Laporan Akhir Tahun ini disusun sebagai bagian dari kegiatan Program Sinergi Penelitian dan Pengembangan Bidang Pertanian (SINTA) tahun 2009 kerjasama antara Badan Litbang Pertanian dan Lembaga Riset Penelitian Perkebunan dengan Nomor Kontrak 1891.2/LB.620/I.1/5/2009 tanggal 7 Mei 2009. Dalam laporan ini disajikan kegiatan pelaksanaan penelitian periode Mei-Desember 2009 yang merupakan pelaksanaan penelitian tahun pertama. Selama tiga tahun akan dilakukan koleksi plasma nutfah tanaman kina, kultur suspensi sel kina, scale-up kultur sel di bioreaktor, peningkatan kandungan kuinolin, pengembangan metode ekstraksi dan analisis kuinolin, serta produksi kuinolin dari kultur jaringan kina skala pilot. Tujuan jangka panjang penelitian ini adalah produksi kuinolin secara cepat dari kultur jaringan tanaman kina.

Kegiatan penelitian yang dilaporkan pada tahun pertama ini meliputi koleksi tanaman kina, kultur sel kina pada labu Erlenmeyer dan bioreaktor, penambahan elisitor untuk meningkatkan kandungan kuinolin dan pengembangan metode ekstraksi dan analisis kuinolin. Keluaran yang diperoleh pada akhir kegiatan tahun 2009 adalah: (1) Koleksi plasma nutfah tanaman kina, (2) Prosedur kultur suspensi sel kina, (3) Metode meningkatkan kandungan kuinolin dalam kultur sel, dan (4) Metode ekstraksi dan analisis kuinolin.

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Departemen Pendidikan Nasional atas pemberian dana penelitian, kepada Lembaga Riset Perkebunan Indonesia yang mengkoordinir pelaksanaan penelitian, serta kepada semua pihak yang telah secara langsung maupun tidak langsung berperan dalam pelaksanaan kerjasama penelitian ini.

Bogor, 17 Desember 2009

Ir. Sumaryono, MSc.
Penanggungjawab Kegiatan

DAFTAR ISI

	<u>Halaman</u>
LEMBAR PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR GAMBAR.....	v
DAFTAR TABEL	vi
RINGKASAN EKSEKUTIF	1
EXECUTIVE SUMMARY	3
1. PENDAHULUAN	5
2. Tinjauan Pustaka.....	6
3. Prosedur Kerja	8
3.1. Seleksi plasma nutfah tanaman kina	8
3.2. Kultur sel kina	8
3.3. Peningkatan kandungan kuinolin.....	9
3.4. Scale up kultur sel kina dalam bioreaktor	10
3.5. Ekstraksi dan analisis kuinolin.....	10
4. Hasil dan Pembahasan	11
4.1. Seleksi plasma nutfah tanaman kina	11
4.2. Kultur sel kina	14
4.3. Peningkatan kandungan kuinolin	16
4.4. Scale up kultur sel kina dalam bioreaktor	21
4.5. Ekstraksi dan analisis kuinolin.....	22
5. Kesimpulan.....	23
6. Perkiraan Dampak Hasil Penelitian	23
7. Daftar Pustaka.....	24

DAFTAR GAMBAR

<u>Nomor</u>	<u>Halaman</u>
1. Tanaman kina <i>C. ledgeriana</i> klon QRC A, QRC B, QRC C dan QRC D di kebun Bukit Tunggul.....	13
2. (A). Koleksi tanaman kina <i>C. succirubra</i> , (B) Pembibitan tanaman kina dalam sungkup plastik, (C) Setek sambungan tanaman kina... ..	13
3. (A) Perkecambahan biji kina, (B) Kecambah kina <i>in vitro</i> , (C) Pembentukan kalus awal, (D) Kalus kina yang tumbuh-pesat.. ..	15
4. (A) Labu Erlenmeyer berisi kultur suspensi sel kina diletakkan di atas alat pengocok (<i>shaker</i>), (B) Kalus kina dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer berlekuk (kiri) dan setelah disaring dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer biasa (kanan).. ..	15
5. Pertumbuhan biomassa suspensi sel kina selama 18 hari... ..	16
6. Kurva pertumbuhan sel pada berbagai perlakuan paclobutrazol.....	17
7. Kurva pertumbuhan sel pada berbagai perlakuan triptofan (a) serta paclobutrazol dan ABA (b.....	18
8. Scale up kultur suspensi sel kina pada bioreaktor kapasitas 5 liter.....	22
9. Pertumbuhan biomassa sel kina di bioreaktor.....	22

DAFTAR TABEL

<u>Nomor</u>	<u>Judul</u>	<u>Halaman</u>
1.	Kadar SQ 7 (Kinina Sulfat) beberapa klon kina <i>ledger</i>	14
2.	Kandungan kuinolin pada sel kina dengan berbagai perlakuan pada minggu keenam dan ketujuh.....	20

RINGKASAN EKSEKUTIF

Produksi kuinolin secara cepat dari kultur jaringan tanaman kina

Oleh:

Sumaryono¹, Imron Riyadi¹, Salwa Lubnan D.², Tri Panji² & Diah Ratnadewi³

¹Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia

²Pusat Penelitian Teh dan Kina

³Jurusan Biologi, F-MIPA, Institut Pertanian Bogor

- Tanaman kina (*Cinchona ledgeriana* dan *C. succirubra*) menghasilkan lebih dari 30 jenis alkaloid dan yang terpenting adalah golongan kuinolin yakni kinin, kinidin, sinkonin dan sinkonidin. Senyawa kinin dan kinidin merupakan bahan baku obat penyakit malaria dan penyakit jantung, juga sebagai bahan penimbul rasa pahit dan pencerah dalam minuman ringan. Alkaloid lain dari kina yaitu sinkonin dan sinkonidin mulai digunakan sebagai bahan biopestisida.
- Selain diterapkan dalam perbanyakan tanaman, teknik *in vitro* dapat dimanfaatkan untuk memproduksi senyawa kimia alami (senyawa sekunder). Dalam aspek tersebut, teknik *in vitro* mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan ekstraksi langsung dari tanaman yaitu produksi berlangsung dalam lingkungan yang terkendali dan tidak tergantung pada lingkungan luar ataupun kondisi iklim sehingga senyawa sekunder dapat diproduksi secara berkelanjutan dengan mutu yang seragam dan daur produksinya sangat singkat.
- Tahapan penelitian ini dimulai dengan seleksi plasma nutfah tanaman kina baik *C. ledgeriana* maupun *C. succirubra* yang yang kandungan kuinolannya tinggi, kemudian dilanjutkan induksi kalus dari berbagai jenis eksplan untuk kultur sel, proliferasi kalus, kultur sel di labu Erlenmeyer dan bioreaktor, peningkatan kandungan kuinolin dalam kultur suspensi sel, serta pengembangan metode ekstraksi dan analisis kuinolin. Rangkaian penelitian ini direncanakan selesai dalam kurun waktu 3 tahun.
- Keluaran yang diharapkan adalah diperolehnya plasma nutfah terseleksi tanaman kina, prosedur kultur sel kina, *scale up* kultur sel kina di bioreaktor, metode ekstraksi dan analisis kuinolin, serta produksi senyawa kuinolin. Teknologi produksi kuinolin melalui kultur sel dapat memperpendek siklus produksi, yang biasanya diekstrak dari kulit pohon kina berusia 7-12 tahun di lapang menjadi hanya 4-6 minggu di laboratorium. Penerapan teknologi *in vitro* tersebut pada skala industri memungkinkan proses produksi kuinolin dilakukan sepanjang tahun.

- Koleksi tanaman kina terutama *C. ledgeriana* klon QRC dari beberapa kebun di Jawa Barat telah dilakukan. Tanaman tersebut diperbanyak dengan cara menyambung dengan batang bawah *C. succirubra*. Bibit hasil sambungan kemudian diletakkan di dalam sungkup plastik tertutup. Bahan tanam ini akan ditanam di lapang sebagai koleksi tanaman kina di Gambung. Eksplan daun muda dari koleksi ini juga akan digunakan sebagai bahan kultur *in vitro*.
- Kultur suspensi sel kina dikembangkan dari kalus yang diinisiasi dari daun kecambah kina *in vitro*. Media tumbuh yang digunakan adalah medium cair WP ditambah pikloram 15 μM , BAP 1 μM , dan fluroglusinol 1 μM . Kalus awal berwarna putih kecoklatan, setelah beberapa kali subkultur menjadi kalus yang tumbuh-pesat. Kalus ini digunakan sebagai bahan untuk kultur suspensi sel yang dilakukan di labu Erlenmeyer dan kemudian diperbesar skalanya (*scale up*) di bioreaktor volume 5 L. Biomassa sel kina di labu Erlenmeyer meningkat pesat sampai dengan 12 hari sebelum memasuki fase landai. Volume sel meningkat 4 kali dalam waktu 15 hari. Laju pertumbuhan suspensi sel dalam bioreaktor lebih rendah dibandingkan laju dalam labu Erlenmeyer, namun viabilitas sel tetap tinggi sekitar 97% setelah 18 hari.
- Untuk meningkatkan kandungan kuinolin dalam sel kina, beberapa senyawa antara lain paklobutrazol, ABA dan triptofan ditambahkan ke dalam medium. Perlakuan paklobutrazol 5 mg/L dan triptofan 2 mg/L meningkatkan kandungan kinin dan kinidin dalam suspensi sel kina pada minggu ketujuh; sedangkan triptofan 0.2 mg/L dan paklobutrazol 1 mg/L yang diberikan pada minggu kelima meningkatkan kandungan sinkonin dan sinkonidin pada minggu keenam.
- Ekstraksi kuinolin dari biomassa sel kina dan kalus dilakukan dengan pelarut akuades. Residu yang diperoleh kemudian dianalisis kandungan kuinolinnya dengan kromatografi cair keragaan-tinggi (HPLC). Penggunaan standar internal dengan metode spiking memastikan bahwa komposisi alkaloid dalam kalus dan sel kina adalah kuinolin. Ekstraksi sel dengan pelarut akuades menghasilkan kinin 2,88%, kinidin 0,02% dan sinkonin 0,19% sedangkan sinkonidin tidak terdeteksi.

[Kata kunci: kina, *Cinchona* spp., kuinolin, kultur sel, elisitor]

EXECUTIVE SUMMARY

Fast production of quinoline from tissue culture of cinchona

By:

Sumaryono¹, Imron Riyadi¹, Salwa Lubnan D.², Tri Panji² & Diah Ratnadewi³

¹Indonesian Biotechnology Research Institute for Estate Crops

²Indonesian Tea and Cinchona Research Institute

³Department of Biology, Bogor Agricultural University

- More than 30 alkaloids have been isolated from the bark of cinchona (*Cinchona ledgeriana* and *C. succirubra*) and the most economically important cinchona alkaloids are quinoline alkaloids: quinine, quinidine, cinchonine and cinchonidine. Quinine is the oldest known natural antimalarial drug and more recently as a bittering agent in soft drinks. Quinidine has been used for the treatment of cardiac arrhythmias and atrial fibrillation. Other alkaloids cinchonine and cinchonidine have been developed as biopesticides.
- *In vitro* cultures have been used to propagate crops and also to produce many natural chemicals (secondary metabolites). *In vitro* cultures are conducted in a more controlled-environment, therefore less dependent to environmental factors and weather conditions, and the compounds produced are more easily purified because of the absence of pigments normally found in plant extracts. The production cycle is very short and continuous.
- Research activities will be first conducted by collecting cinchona both *C. ledgeriana* and *C. succirubra* germplasms containing high level of quinoline, then callus initiation from different explant sources, callus proliferation, cell suspension cultures in Erlenmeyer flasks and a bioreactor, the increase of quinoline level in the cell cultures, and the development of quinoline extraction and analysis method. All the research activities will be completed in 3 years.
- The expected outputs are selected germplasms of cinchona, procedure of cell culture of cinchona, scale up of cinchona cell culture in a bioreactor, extraction and analysis method of quinoline, and production of quinoline *in vitro* through cell suspension culture. Production of quinoline via cell culture can shorten the production cycle dramatically, traditionally quinolines are extracted from the bark of cinchona trees in the field at 7-12 years old compared to only 4-6 weeks in the laboratory.

- Collection of cinchona plants especially *C. ledgeriana* clone QRC from several locations in West Java has been conducted. The plants were propagated by grafting method using *C. succirubra* as rootstocks. The grafted plants were placed inside a closed plastic tunnel in the nursery. The plants will be planted in the field as cinchona collection at Gambung. Young leaves from these plants will be used as explants for *in vitro* culture.
- Cinchona cell suspension cultures were developed from callus initiated from leaves of axenic seedlings of cinchona. Medium used was a liquid WP medium supplemented with 15 μM picloram, 1 μM BAP, and 1 μM phloroglucinol. Early callus was brown whitish, and after several cultures turned to fast-growing callus. This callus was used as material source for cell suspension culture in Erlenmeyer flasks and then was scaled-up in a 5-L bioreactor. Biomass of cinchona cells in Erlenmeyer flasks increased sharply up to 12 days and then reached leveling-off phase. Cell volume increased by 4-fold within 15 days. Growth rate of cell suspension in a bioreactor was lower than that of in Erlenmeyer flasks, but cell viability remained high at 97% after 18 days.
- In order to increase quinoline level in cells of cinchona, several substrates such as paclobutrazole, ABA and tryptophan were added into the cinchona cell culture. Paclobutrazole at 5 mg/L and tryptophan at 2 mg/L increased the level of quinine and quinidine in the cinchona cell suspension at the seventh week; whereas, tryptophan at 0.2 mg/L and paclobutrazole at 1 mg/L given at the fifth week increased the level of cinchonine and cinchonidine in the cell suspension at the sixth week.
- Extraction of quinolines have been established from cinchona callus and cell biomass in aquadest as a dissolved agent. The residues obtained were analyzed for its quinoline content with high-performance liquid chromatography (HPLC). The use of internal standards (spiking) confirmed that alkaloids in cell and callus biomass were quinolines. Extraction of cells of cinchona using aquadest as dissolved substrate produced quinine at 2,88%, quinidine at 0,02%, and cinchonine at 0.19%, while cinchonidine was undetected.

[**Key words:** *Cinchona* spp., quinoline, cell culture, elicitor]

1. PENDAHULUAN

Tanaman kina (*Cinchona* spp.) menghasilkan lebih dari 30 jenis alkaloid dan yang terpenting adalah golongan kuinolin yakni kinin, kinidin, sinkonin dan sinkonidin (McCalley, 2002). Senyawa kinin dan kinidin merupakan bahan baku obat penyakit malaria dan penyakit jantung, juga sebagai bahan penimbul rasa pahit dan pencerah dalam minuman ringan. Sinkonin dan sinkonidin mulai digunakan sebagai bahan biopestisida. Permintaan kuinolin dari kina diperkirakan akan terus meningkat di masa mendatang. Di Indonesia, produksi kina terutama dari PTPN VIII masih belum mencukupi kebutuhan bahan baku untuk produksi garam kina dalam negeri sehingga kulit kina masih harus diimpor, terutama dari negara-negara Afrika (Widayat, 2000).

Teknik *in vitro* dapat dimanfaatkan untuk memproduksi senyawa kimia alami (senyawa sekunder). Teknik *in vitro* mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan dengan ekstraksi senyawa langsung dari tanaman. Produksi senyawa sekunder *in vitro* berlangsung dalam lingkungan yang terkendali sehingga tidak tergantung pada lingkungan luar ataupun kondisi iklim. Dengan cara ini senyawa sekunder dapat diproduksi secara berkelanjutan dengan mutu yang seragam (Alfermann & Petersen, 1995). Di samping itu, daur produksi sangat singkat hanya 4-6 minggu. Ekstraksi alkaloid dari tanaman kina misalnya membutuhkan waktu 7-12 tahun.

Secara tradisional alkaloid kuinolin diekstrak dari kulit batang tanaman kina, namun akhir-akhir ini kultur sel kina telah dikembangkan untuk menghasilkan alkaloid secara *in vitro*. Hal ini dilakukan mengingat lamanya pohon kina untuk dapat dipanen kulit batangnya dan adanya keragaman kandungan alkaloid antar-tanaman (Hunter, 1988). Kuinolin telah dihasilkan dari kultur *in vitro* kina menggunakan kalus (Staba & Chung, 1981), suspensi sel (Koblitz *et al.*, 1983; Wijnsma *et al.*, 1986) dan akar transform (Hamill *et al.*, 1989; Geerlings *et al.*, 1999). Kultur suspensi sel dipilih karena laju pertumbuhan sel lebih tinggi dan kemungkinan *scale-up* di bioreaktor lebih besar dibandingkan dengan kultur *in vitro* yang lain.

Kultur sel kina di dalam labu Erlenmeyer dapat menghasilkan biomassa sel yang cukup cepat, sekitar empat kali lipat dalam waktu 2 minggu (Sumaryono & Riyadi, 2005). Namun, total volume kultur dalam labu sangat sedikit antara 10 ml sampai 100 ml. Peningkatan volume biak sel dan organ tanaman sangat penting dalam usaha komersialisasi produk (Roberts & Shuler, 1997). Masalah utama dalam biak sel tanaman skala besar adalah sel tanaman peka terhadap benturan dengan baling-baling bioreaktor, walaupun beberapa spesies tanaman diketahui tidak terpengaruh (Wilson & Hilton,

1995), dan terjadinya penggumpalan agregat sel, penempelan sel-sel pada dinding bejana, dan terbentuknya busa (*foaming*).

Teknologi produksi kuinolin melalui kultur sel dapat memperpendek siklus produksi, yang biasanya diekstrak dari kulit pohon kina berusia 7-12 tahun menjadi hanya 4-6 minggu di laboratorium. Penerapan teknologi *in vitro* pada skala industri memungkinkan proses produksi kuinolin dilakukan sepanjang tahun.

2. TINJAUAN PUSTAKA

Selain diterapkan dalam perbanyakan tanaman, teknik *in vitro* juga dapat dimanfaatkan untuk memproduksi senyawa kimia alami (senyawa sekunder). Dalam aspek ini, teknik *in vitro* mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan dengan ekstraksi senyawa langsung dari tanaman. Produksi senyawa sekunder *in vitro* berlangsung dalam lingkungan yang terkendali sehingga tidak tergantung pada lingkungan luar ataupun kondisi iklim. Dengan cara ini senyawa sekunder dapat diproduksi secara berkelanjutan dengan mutu yang seragam (Alfermann & Petersen, 1995). Di samping itu, daur produksi sangat singkat hanya 2-4 minggu. Ekstraksi alkaloid dari tanaman kina misalnya membutuhkan waktu 7-12 tahun.

Secara tradisional alkaloid kuinolin diekstrak dari kulit batang tanaman kina, namun akhir-akhir ini kultur sel kina telah dikembangkan untuk menghasilkan alkaloid secara *in vitro*. Hal ini dilakukan mengingat lamanya pohon kina untuk dapat dipanen kulit batangnya dan adanya keragaman kandungan alkaloid antar-tanaman (Hunter, 1988). Produksi kuinolin dari kultur *in vitro* tanaman kina telah dilakukan menggunakan kalus (Staba & Chung, 1981), suspensi sel (Anderson *et al.*, 1982; Koblitz *et al.*, 1983; Wijnsma *et al.*, 1986) dan akar transform (Hamill *et al.*, 1989; Geerlings *et al.*, 1999). Produksi alkaloid dari kultur *in vitro* tersebut beragam dan masih sangat rendah, kurang dari 1 mg/g bobot kering. Berbagai cara dapat dilakukan untuk meningkatkan kandungan senyawa sekunder dalam kultur *in vitro*. Seleksi lini sel berkadar alkaloid tinggi dan penambahan elisitor merupakan metode yang diharapkan dapat meningkatkan kandungan alkaloid dalam biak suspensi sel.

Kultur sel kina di dalam labu Erlenmeyer dapat menghasilkan biomassa sel yang cukup cepat, sekitar empat kali lipat dalam waktu 2 minggu (Sumaryono & Riyadi, 2005). Namun, total volume kultur dalam labu sangat sedikit antara 10 ml sampai 100 ml. Peningkatan volume biak sel dan organ tanaman sangat penting dalam usaha komersialisasi produk (Roberts & Shuler, 1997). Penelitian awal hampir selalu dilakukan

dalam skala kecil di labu Erlenmeyer, namun produksi komersial harus dilaksanakan di bioreaktor dalam skala besar. Sampai saat ini, suspensi sel tanaman telah berhasil dibiakkan dalam bioreaktor dengan volume 75.000 liter yaitu biak sel *Echinacea purpurea* (Ritterhaus *et al.*, 1990).

Masalah utama dalam biak sel tanaman skala besar adalah perimbangan antara kebutuhan akan pengadukan untuk mencampur medium dan mencegah sel-sel menggumpal dan adanya kenyataan bahwa sel tanaman peka terhadap benturan dengan baling-baling bioreaktor, walaupun beberapa spesies tanaman diketahui tidak terpengaruh (Wilson & Hilton, 1995). Oleh karena itu, selain bioreaktor berpengaduk (*stirred tank bioreactor*) yang umum digunakan dalam biak mikroba, dibuat desain lain misalnya bioreaktor dengan sistem kolom gelembung udara (*bubble column*), *air-lift* dan *rotating drum* (Panda *et al.*, 1989; Singh, 1997). Masalah teknis lain adalah terjadinya penggumpalan agregat sel, penempelan sel-sel pada dinding bejana, dan terbentuknya busa (*foaming*).

Prosedur ekstraksi kulit batang kina komersial yang telah lama digunakan adalah dengan cara kulit batang ditumbuk, diayak, kemudian dikeringkan pada suhu 110 °C, diikuti dengan penambahan alkali (kapur) dan ekstraksi Soxhlet dengan benzena. Metode ekstraksi ini digunakan secara luas oleh pabrik produsen kinin, sedangkan kinidin diperoleh dari isomerisasi kinin. Metode ekstraksi kuinolin yang dilakukan dari biomassa sel dan kalus kina umumnya menggunakan kloroform, HCl dan etanol yang cukup berbahaya. Oleh karena itu perlu dikembangkan prosedur ekstraksi kuinolin dari biomassa sel kina menggunakan bahan kimia yang lebih aman.

Metode ekstraksi kuinolin banyak dikembangkan untuk bahan asal kulit batang, walaupun ada beberapa prosedur yang dikembangkan untuk bahan asal kalus dan sel. Metode ekstraksi dari biomassa sel oleh Staba & Chung (1981) adalah dengan campuran larutan kloroform dan amonia dan selanjutnya diekstraksi berulang dengan HCl dan kloroform. Metode lain menggunakan etanol sebagai pelarut (Balandrin *et al.*, 1978). Kloroform dan metanol biasanya digunakan dalam salah satu tahap ekstraksi alkaloid dari tumbuhan (Harborne, 1998). Ekstraksi ini dapat dilakukan untuk analisis kandungan alkaloid, tetapi penggunaan bahan kimia berbahaya seperti kloroform sebaiknya dihindari untuk ekstraksi bahan aktif yang akan dikonsumsi. Metode ekstraksi kuinolin yang dilakukan dari biomassa sel dan kalus kina umumnya menggunakan kloroform, HCl dan etanol (Balandrin *et al.*, 1978; Staba & Chung, 1981).

Kandungan alkaloid dari ekstrak kasar dapat dideteksi secara dini dengan beberapa reagensia alkaloid seperti Dragendorff, Ehrlich, iodoplatinate, dan Marquis

(Harborne, 1998). Cara ini dapat mendeteksi adanya alkaloid secara cepat namun bersifat kualitatif. Metode analisis berikutnya yang cukup sederhana adalah menggunakan kromatografi lapis-tipis (TLC). Analisis menggunakan TLC akhir-akhir ini sudah tidak populer lagi, walaupun metode ini mempunyai keunggulan antara lain analisis contoh dilakukan serentak tidak sendiri-sendiri serta peralatannya sederhana dan tidak mahal. Kelemahannya antara lain hasil analisis bersifat kualitatif, efisiensi rendah dan tidak dapat diotomatisasi.

3. PROSEDUR KERJA

3.1. Seleksi plasma nutfah tanaman kina

Tanaman kina terdiri dari dua spesies yakni *Cinchona ledgeriana* dan *Cinchona succirubra*. Survei untuk mencari tanaman kina berproduksi kuinolin tinggi dilakukan ke berbagai lokasi pertanaman kina di daerah dataran tinggi di Jawa Barat antara lain Kebun Bukit Tunggul, Bunga Melur, Pasir Sarongge, dan Gambung. Tanaman tersebut kemudian diperbanyak dengan metode setek sambungan (*grafting*) menggunakan batang bawah *Cinchona succirubra* dan batang atas *C. ledgeriana*. Karena *C. succirubra* mengandung sinkonin dan sinkonidin yang cukup tinggi, maka dilakukan pula perbanyakan untuk *C. succirubra*. Jumlah masing-masing tanaman kina sebanyak 250 polibag, sehingga total terdapat 3000 polibag. Untuk mengetahui kadar alkaloid dari tanaman kina terpilih dilakukan analisis SQ 7.

3.2. Kultur sel kina

Sumber eksplan diambil dari beberapa klon tanaman kina *Cinchona ledgeriana* dan *C. succirubra* yang diperoleh dari Pusat Penelitian Teh dan Kina, Gambung, Bandung. Biji kina dikecambahkan dengan disterilisasi terlebih dahulu menggunakan Clorox dan Dithane. Selanjutnya biji dikecambahkan pada kertas saring yang ditambah air di cawan Petri (Gambar 3A). Setelah 2-3 minggu, kecambah yang tumbuh ditanam pada medium padat 1/2 MS di botol kultur kecil yang diletakkan di bawah cahaya (Gambar 3B). Tanaman muda *in vitro* ini digunakan sebagai bahan eksplan setelah mempunyai sedikitnya dua pasang daun.

Eksplan asal tanaman *in vitro* tidak disterilisasi. Medium inisiasi kalus adalah MS (Murashige & Skoog, 1962) dengan sukrosa 30 g/L, Gelrite 2 g/L, floriglusinol 1 μ M, kinetin 1 μ M dan 2,4-D 1 μ M. pH medium diatur 5.7 sebelum diautoklaf pada 121°C dan 1.0 kg/cm² selama 20 min. Sebanyak 10 ml medium dituang dalam cawan Petri kecil.

Potongan daun 7 mm x 7 mm ditanam pada medium sebanyak 3 eksplan per cawan Petri. Kultur kemudian diletakkan di ruang kultur di bawah lampu TL dengan suhu ruang 25°C.

Kalus remah (tidak nodular) berwarna kuning kecoklatan asal induksi kalus yang telah disubkultur satu kali digunakan sebagai bahan untuk proliferasi kalus. Kalus baru berwarna kuning tumbuh dari kalus lama yang telah berubah menjadi kehitaman. Kalus baru inilah yang disubkultur secara rutin. Medium dasar untuk proliferasi kalus adalah media Woody Plant (WP) (Lloyd & McCown, 1981) dengan sukrosa 30 g/L, Gelrite 2 g/L, floriglusinol 1 µM, sistein 100 mg/L, pikloram 15 µM dan BA 0,5 µM. Prosedur lain sama dengan yang digunakan pada inisiasi kalus.

Kalus remah kina yang berumur 8 - 10 minggu dan telah mengalami pertumbuhan pesat pada medium WP padat diseleksi sebagai bahan kultur suspensi sel. Sebanyak 5 g kalus kina dimasukkan dalam labu Erlenmeyer berlekuk (*baffle flask*) volume 100 ml yang berisi media WP cair sebanyak 30 mL, kemudian diletakkan pada pengocok (*orbital shaker*) berkecepatan 90 rpm selama 2 minggu. Suspensi yang terbentuk diambil dengan cara menyaring menggunakan filter berukuran mesh 1000 µm. Untuk mengambil sel kina berukuran kurang dari 1000 µm, digunakan filter berukuran mesh 50 µm, sehingga sedimen sel dapat tertampung dan diambil dengan sendok terus dimasukkan dalam medium baru dengan menggunakan labu Erlenmeyer biasa ukuran 100 mL dengan volume media 30 mL.

Parameter yang diamati adalah laju pertumbuhan biomassa sel [menggunakan alat ukur berupa CVS (*cell volume after sedimentation*) yang dapat memperkirakan volume sel] setiap 3 hari; viabilitas sel menggunakan staining Evan's Blue 0,05% (Baker & Mock, 1994) serta perkembangan morfologi sel menggunakan mikroskop (*inverted microscope*) pada perbesaran 10 X 10 pada saat umur 30 hari.

3.3. Peningkatan kandungan kuinolin

Kultur sel kina yang tumbuh dengan pesat digunakan sebagai bahan penelitian peningkatan kandungan kuinolin. Perlakuan khusus diberikan untuk menginduksi pembentukan kuinolin dalam kultur sel *in vitro*, yaitu dengan mencampurkan zat penghambat tumbuh: paclobutrazol (Paclo) dan asam absisat (ABA) pada beberapa taraf konsentrasi (1, 3, dan 5 mg/L) ke dalam medium dasar. Perlakuan Paclo dan ABA diberikan dalam dua waktu yang berbeda, yaitu langsung pada saat pemindahan sel ke medium perlakuan (Paclo 1, Paclo 3, Paclo 5), dan pada minggu ke lima setelah pemindahan sel (Paclo 1-5, Paclo 3-5, Paclo 5-5, ABA 1-5, ABA 3-5). Di samping itu,

dicobakan pemberian asam amino triptofan yang dikenal sebagai prazat dalam pembentukan kuinolin (Triptofan 0.2 dan 2 mg/L).

Sel remah hasil penyaringan (500–1000 μm), sebanyak 0.6-1 mL dipindahkan ke Erlenmeyer 100 mL berisi 20 mL medium cair. Komposisi medium dasar tersebut sama dengan medium untuk proliferasi kalus, yakni Woody Plant (WP) (Lloyd & McCown, 1981) yang mengandung sukrosa 30 g/L, floriglusinol 1 μM , pikloram 15 μM dan BA 0,5 μM . Kultur sel dalam medium cair tersebut dikocok di atas *shaker* dengan kecepatan 100 rpm, masing-masing 10 ulangan. Kultur dipelihara dalam ruang bersuhu $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ di bawah cahaya redup, hingga minggu ke tujuh.

Pengukuran pertumbuhan sel dilakukan setiap minggu. Pada minggu ke 6 dan ke 7 setelah penerapan perlakuan (dan 1 dan 2 minggu untuk sebagian perlakuan Paclo dan ABA yang diberikan pada minggu ke 5), sel dipanen. Selanjutnya, kadar alkaloid suspensi sel diukur dengan HPLC.

3.4. Scale up kultur sel kina dalam bioreaktor

Kumpulan sel dalam labu Erlenmeyer dijadikan sebagai sumber bahan untuk kultur di bioreaktor. Medium kultur yang digunakan sama dengan penelitian kultur sel. Bioreaktor yang digunakan merek Aplikon dengan kapasitas volume 5 L. Perangkat sensor kendali kultur diatur sebagai berikut: suhu $25\text{ }^{\circ}\text{C}$; pH 5,7; tekanan udara pada skala 5 (mB) dan kecepatan agitator (pengaduk) sebesar 50 rpm. Kultur ditempatkan dalam ruang terang di bawah lampu TL dengan suhu ruangan $26 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 18 hari.

Parameter bobot basah sel, *packed cell volume* (PCV), dan viabilitas sel diamati dari contoh suspensi sel sebanyak 10 ml yang diambil setiap tiga hari. Viabilitas sel diamati dengan melakukan pewarnaan menggunakan larutan Evans blue 0.5% selama 5 min dan diamati di bawah mikroskop (Baker & Mock, 1994). Kecepatan agitasi di bioreaktor diatur 60 rpm dengan suhu kultur sekitar $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Setelah 18 hari dalam kultur, biomassa sel dipanen dan diamati.

3.5. Ekstraksi dan analisis kuinolin

Sebagian biomassa kalus dan sel suspensi yang tumbuh pesat dikumpulkan dalam botol tertutup rapat dan disimpan di freezer sebelum digunakan untuk keperluan ekstraksi. Biomassa kalus dan sel kina dikeringkan di dalam oven pada suhu $60\text{--}70\text{ }^{\circ}\text{C}$ sampai berat konstan, kemudian dihaluskan sampai ukuran partikel kurang dari 60 mesh. Contoh serbuk kalus kina kering ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam gelas piala yang telah diberi batu didih, di mana berat gelas piala dan batu didih telah diketahui. Ke

dalam gelas piala ditambahkan akuades dan campuran dididihkan selama 25 menit. Campuran kemudian didinginkan dan ditambah akuades. Diambil cairan tersebut dengan cara dekantasi, kemudian disaring dengan penyaring berukuran 0.45 μm . Filtrat yang diperoleh siap diinjeksikan ke dalam HPLC. Pelarut lain untuk ekstraksi alkaloid yang dicoba adalah etanol p.a. dengan jumlah yang sama dengan akuades. Sebagai standar digunakan larutan campuran empat jenis alkaloid kina yaitu kinin, kinidin, sinkonin, dan sinkonidin masing-masing 50 $\mu\text{g/mL}$.

Untuk analisis kuinolin digunakan alat HPLC merek Varian dengan kolom Pursuit XRs, 3 u C₁₈, panjang kolom 150 cm X 4,6 mm id, pada suhu 30 °C. Eluen yang digunakan adalah campuran Air : Acetonitril : Asam asetat glasial = 81 : 18 : 1 dengan laju alir 0,6 mL/menit dan atenuasi 6. Kecepatan kertas diatur 5 mm/menit. Detektor yang digunakan adalah UV-Vis = 250 nm dengan volume injeksi 5 μl .

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Seleksi plasma nutfah tanaman kina

Di Bukit Tunggul, terdapat beberapa tanaman yang termasuk dalam klon QRC, hanya saja belum diketahui serinya. Tanaman kina *C. ledgeriana* pada Gambar 1 adalah sebagian dari koleksi klon QRC yang terdapat di perkebunan Bukit Tunggul. Kedua jenis klon QRC A dan B (Gambar 1A dan 1B) mempunyai ciri yang menonjol yaitu warna daun yang dominan merah, terutama pada saat daun masih muda. Bentuk dan ukuran daun juga berbeda dengan yang lain.

Tanaman kina di kebun Bunga Melur milik PTPN VIII cukup luas mencapai sekitar 300 ha. Di kebun ini ditanam koleksi sekaligus untuk kebun produksi klon kina berkadar SQ 7 yang tinggi termasuk seri QRC. Di kebun Bunga Melur terdapat pula tanaman kina *ledgeriana* dari klon seri CKB (Cikembang) yang sudah terseleksi mempunyai potensi garam kina yang tinggi antara 11,23 – 14,51% dibandingkan dengan klon KP 105 yang berkadar SQ 7 sebesar 10,08%.

Di Kebun Gambung milik Pusat Penelitian Teh dan Kina terdapat areal kina seluas 40 ha terdiri dari kebun produksi dan koleksi plasma nutfah. Sebenarnya ada 300 aksesori tanaman kina tetapi akibat kurangnya pemeliharaan, koleksi aksesori terus berkurang. Gambung mempunyai koleksi tanaman kina yang paling lengkap, *C. ledgeriana* dan *C. succirubra* (Gambar 2A) yang sudah terseleksi.

Kondisi tanaman kina seluas 1 ha yang terdapat di kebun Pasir Sarongge sangat memprihatinkan. Dari areal tersebut jumlah tanaman kina yang ada hanya sebanyak 15

tanaman. Sebelumnya pada areal ini selain berfungsi sebagai kebun percobaan, juga merupakan kebun koleksi plasma nutfah yang ada.

Sampai saat ini, tanaman kina secara umum masih diperbanyak dengan cara penyambungan. Kina *succi* yang digunakan sebagai batang bawah mempunyai sifat pertumbuhan yang cepat, daya perakaran yang dalam dan tahan terhadap penyakit jamur akar, tetapi kadar garam kinanya rendah.

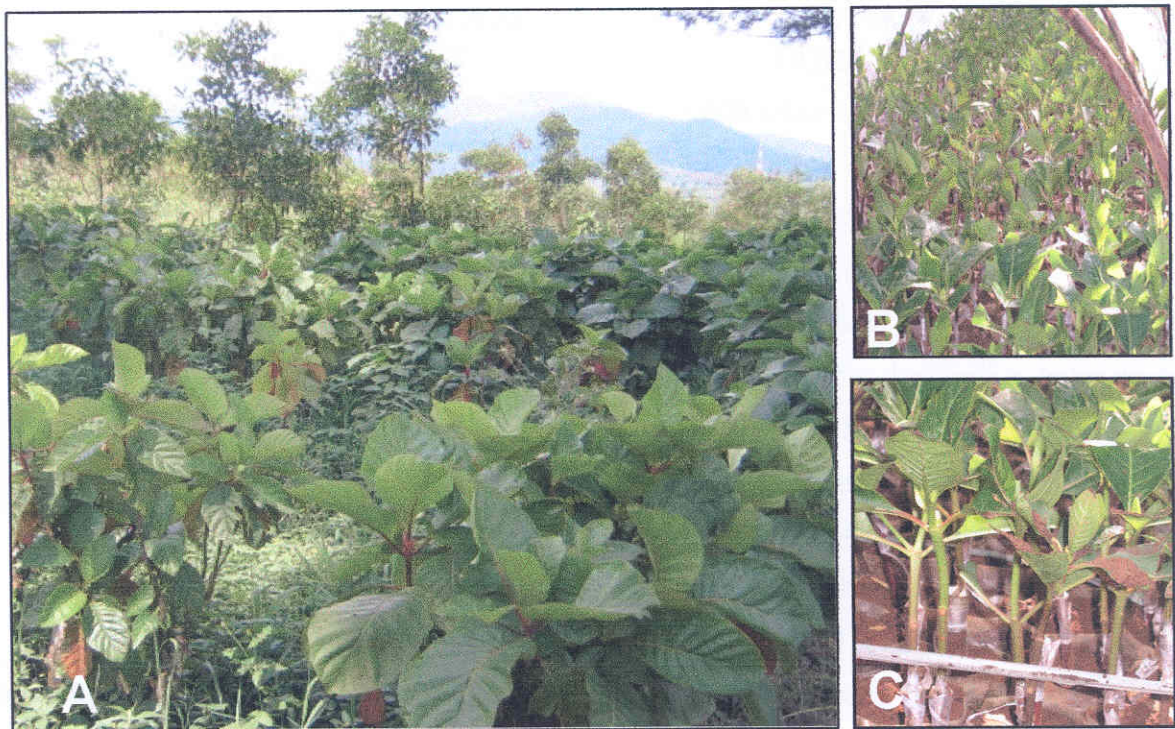
Variasi tanaman kina *succi* di lapangan sangat tinggi karena berasal dari biji hasil penyerbukan silang, termasuk sifat kesesuaiannya sebagai batang bawah bila disambung dengan batang atas kina *ledger*. Hasil seleksi kina *succi* untuk batang bawah dari 20 jenis kina *succi* telah ditemukan 3 klon kina *succi* yang dapat dipakai sebagai batang bawah yaitu SG 1, SG 2 dan SG 3 dengan tingkat keberhasilan lebih dari 90 % dengan sistem perakaran yang baik (Gambar 2A).

Tanaman kina jenis *C. ledgeriana* dari klon QRC merupakan jenis kina yang mengandung SQ 7 yang cukup tinggi (> 7). Untuk menambah dan mempertahankan koleksi tanaman kina yang ada, dilakukan pembibitan dengan menyambung batang bawah kina *C. succirubra* dengan batang atas berbagai klon *C. ledgeriana* seri QRC (Gambar 2C). Hasil sambungan kemudian diletakkan di dalam sungkup plastik transparan yang berada di pesemaian kina (Gambar 2B).

Adapun bahan tanaman *C. ledgeriana* yang diperbanyak berasal dari klon QRC 208, QRC 230, QRC 231, QRC 237, QRC 260, QRC 347, QRC 354, QRC 391, QRC 400 dan QRC X (asal Kebun Bukit Tunggul) masing-masing sebanyak 250 tanaman. Tanaman hasil sambungan ini direncanakan akan ditanam di Gambung sebagai koleksi tanaman kina dan masing-masing sepuluh tanaman dibawa ke Bogor untuk dijadikan sebagai sumber eksplan untuk kultur *in vitro*.



Gambar 1. Tanaman kina *C. ledgeriana* klon QRC A, QRC B, QRC C dan QRC D di kebun Bukit Tunggul.



Gambar 2. (A). Koleksi tanaman kina *C. succirubra*, (B) Pembibitan tanaman kina dalam sungkup plastik, (C) Setek sambungan tanaman kina.

Tanaman kina *ledger* yang ada di Indonesia memiliki asal usul tetua yang sama yaitu tanaman seedling nomor 23 dan 38 dengan kadar SQ 7 nya masing-masing 11,01 % dan 9,41 %. Klon-klon kina *ledger* saat ini banyak yang mempunyai potensi kadar garam kina yang tinggi (Tabel 1) dan mempunyai peluang yang besar untuk

mendapatkan klon yang lebih unggul dibandingkan dengan klon-klon yang sudah ditanam secara luas seperti Cib 5, GA 22 dan KP 105.

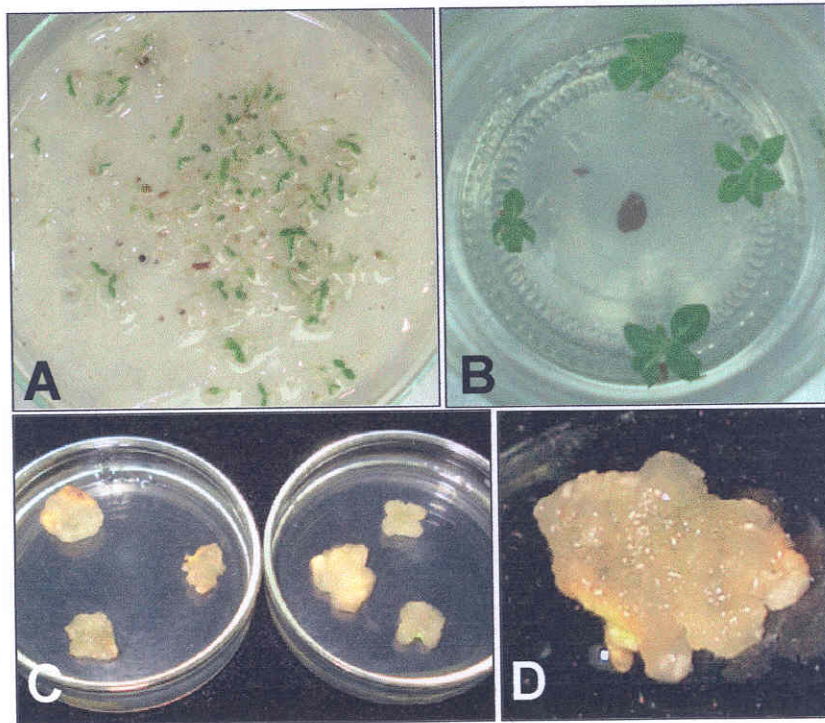
Tabel 1. Kadar SQ 7 (Kinina Sulfat) beberapa klon kina *ledger**

No	Klon	Kadar SQ 7 (%)
1.	QRC 208	12,78
2.	QRC 230	14,60
3.	QRC 231	14,27
4.	QRC 237	14,71
5.	QRC 247	16,50
6.	QRC 254	15,25
7.	QRC 260	12,82
8.	CKB 24	13,59
9.	Cib 5	11,39
10.	GA 22	11,27
11.	KP 105	10,08

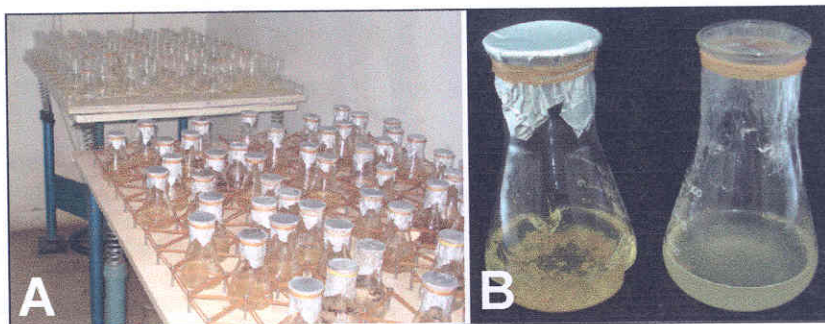
*Berdasarkan pengukuran kulit kering pada umur 12 tahun.

4.2. Kultur sel kina

Kalus awal yang terbentuk dari eksplan daun kecambah *in vitro* (Gambar 3B) berwarna putih kecoklatan (Gambar 3C). Setelah dua sampai tiga kali kultur, kalus mulai tumbuh dengan pesat (Gambar 3D). Kalus ini selanjutnya digunakan sebagai bahan untuk kultur cair suspensi sel kina. Kalus yang masih berbentuk agregat ini dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer berlekuk (*baffle flask*) (Gambar 4B) untuk memecah dan menghancurkan agregat kalus menjadi lebih kecil-kecil. Bahan kalus ini selanjutnya disaring dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer biasa (Gambar 4B) sehingga diperoleh suspensi sel yang relatif seragam. Kultur suspensi sel kina pada labu Erlenmeyer diletakkan di atas alat pengocok datar (*orbital shaker*) dengan kecepatan sekitar 90 rpm (Gambar 4A).

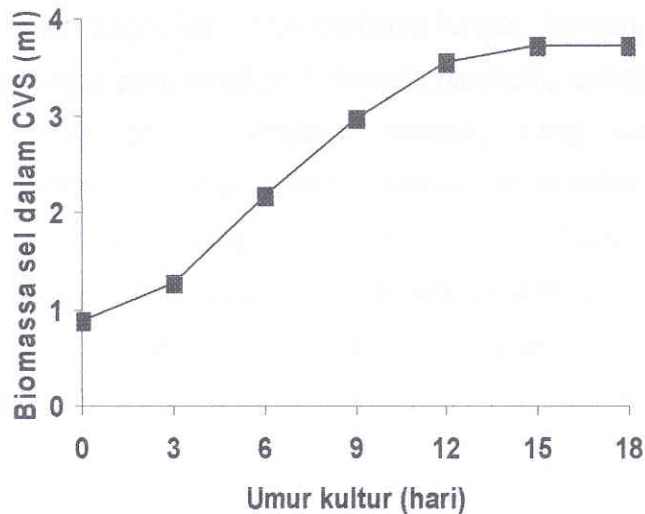


Gambar 3. (A) Perkecambahan biji kina, (B) Kecambah kina *in vitro*, (C) Pembentukan kalus awal, (D) Kalus kina yang tumbuh-pesat.



Gambar 4. (A) Labu Erlenmeyer berisi kultur suspensi sel kina diletakkan di atas alat pengocok (*shaker*), (B) Kalus kina dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer berlekuk (kiri) dan setelah disaring dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer biasa (kanan).

Laju pertumbuhan suspensi sel kina cukup tinggi, hampir 4 kali lipat dalam waktu 15 hari (Gambar 5). Pertumbuhan biomassa sel kina terpesat pada umur 3 – 12 hari. Setelah umur 15 hari pertumbuhan sel mulai landai (*levelling-off*). Laju pertumbuhan sel kina tersebut mirip dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Sumaryono & Riyadi (2005), yang menghasilkan laju pertumbuhan sel kina sebesar 4 kali lipat selama dua minggu.



Gambar 5. Pertumbuhan biomassa suspensi sel kina selama 18 hari.

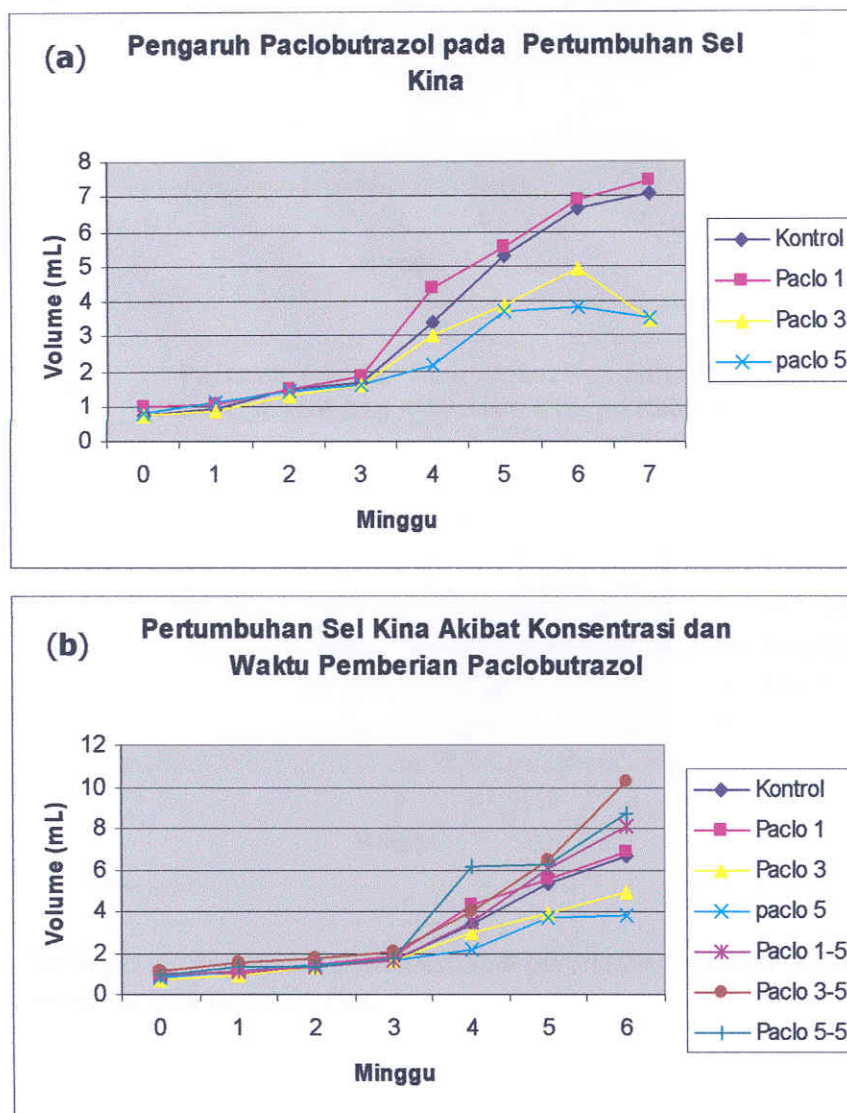
Selama kultur suspensi, sel kina memiliki viabilitas tinggi yaitu sebesar 97%. Hal ini berarti sel kina tersebut mempunyai potensi pertumbuhan dan perkembangan yang baik untuk dikulturkan pada tahap selanjutnya. Bentuk sel kina bermacam-macam yaitu bulat, oval dan memanjang. Pada umur 18 hari, jumlah agregat sel kina semakin banyak dengan jumlah sel per agregat 5 sel sampai lebih dari 50 sel per agregat. Semakin banyak jumlah sel per agregat, maka semakin besar ukuran agregat sehingga semakin tebal.

4.3. Peningkatan kandungan kuinolin

Kurva pertumbuhan sel, baik pada medium kontrol maupun medium perlakuan, menunjukkan bahwa mulai minggu ke tiga, pertumbuhan sel meningkat pesat; dan sampai minggu ke enam, pada umumnya pertumbuhan masih menanjak kecuali pada perlakuan Paclo 3 dan 5 (Gambar 6a). Perlakuan zat penghambat tumbuh Paclo 1 yang diberikan sejak awal tidak menunjukkan penghambatan sehingga laju pertumbuhannya masih menyamai pertumbuhan sel dalam medium kontrol. Namun, konsentrasi paclo yang lebih tinggi (Paclo 3 dan 5) secara nyata menurunkan pertumbuhan sel.

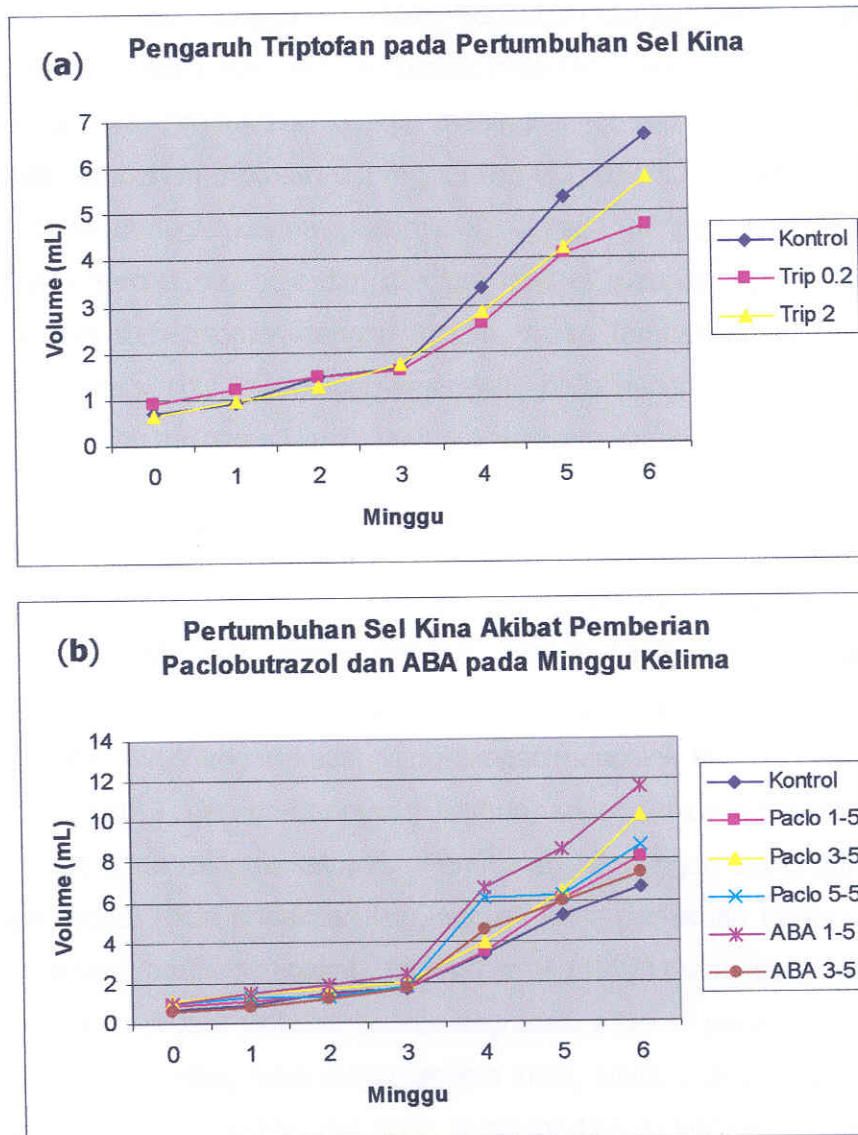
Pemberian paclo pada minggu ke lima (Paclo 1-5, 3-5, 5-5) menunjukkan efek sebaliknya (Gambar 6b); laju pertumbuhan sel lebih tinggi daripada kontrol. Hal yang sama diperlihatkan oleh ABA (ABA 1-5; 3-5), yang juga diberikan pada minggu ke lima (Gambar 7a). Peningkatan laju tersebut bahkan cenderung menghentak sejak paclo atau ABA ditambahkan ke dalam medium pada minggu ke lima tersebut.

ABA dan paclobutrazol dikenal sebagai zat penghambat tumbuh. ABA secara alami diproduksi oleh tumbuhan untuk berbagai fungsi. Namun, pemberian ABA dari luar diketahui menghambat pertumbuhan koleoptil, hipokotil, epikotil, dan daun (Srivastava, 2002). Paclobutrazol adalah senyawa sintetik, yang banyak digunakan untuk mengerdilkan tanaman. Paclo diketahui menghambat oksidasi antara kauren dan asam kaurenat dalam lintasan sintesis giberelin (Salisbury & Ross, 2002). Tampaknya, efek menghambat ABA dan paclo tidak terjadi setelah sel mencapai taraf pertumbuhan cepat yang dimulai sejak minggu ketiga, sedangkan apabila zat penghambat tersebut diterapkan sejak awal kultur, efek penghambatannya lebih nyata.



Gambar 6. Kurva pertumbuhan sel pada berbagai perlakuan paclobutrazol.

Triptofan adalah asam amino yang menjadi prazat (*precursor*) bagi pembentukan alkaloid kompleks seperti kuinolin. Maka triptofan dicoba untuk diberikan dalam medium kultur sel kina ini. Pemberian triptofan tetap menaikkan pertumbuhan sel, walaupun lajunya tidak sebesar sel pada medium kontrol (Gambar 7b).



Gambar 7. Kurva pertumbuhan sel pada berbagai perlakuan triptofan (a) serta paclobutrazol dan ABA (b).

Kuinolin adalah alkaloid, yang merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh berbagai spesies tanaman *Cinchona* spp. Tidak semua metabolit sekunder dapat disintesis secara *in vitro* oleh sel yang dikulturkan, namun ternyata kuinolin dapat dihasilkan dari kultur sel tanaman kina ini. Kejadian ini sangat menguntungkan dalam

upaya memproduksi kuinolin dalam skala industri. Toruan-Mathius *et al.* (2006) juga mendeteksi adanya peningkatan produksi kuinolin pada kultur akar rambut *in vitro* dengan memberikan elisitor berupa enzim pektinase dan pektoliase.

Sel pada medium kontrol mampu menghasilkan kuinolin kinin, kinidin, sinkonin dan sinkonidin sejak minggu keenam (Tabel 2), walaupun kinidin baru terbentuk pada minggu ketujuh. Pada minggu ke enam, perlakuan dengan zat penghambat tumbuh (paclobutrazol atau ABA) atau dengan prazat triptofan, menurunkan produksi kinin dan sinkonin. Sebaliknya, produksi sinkonidin meningkat 43 kali lipat dibandingkan dengan kontrol akibat pemberian triptofan 0.2 mg/L (Trip 0.2) dan 5 kali oleh paclo 1 mg/L yang diterapkan pada minggu kelima (Paclo 1-5). Pada minggu keenam, kinidin tidak terdeteksi pada semua sel, baik dari medium kontrol maupun dari medium perlakuan. Karena kinin ber-stereoisomer dengan kinidin, maka tampak bahwa kinin lebih awal terbentuk daripada kinidin. Seminggu kemudian, pada minggu ketujuh, pada umumnya kandungan kinin dan terutama kinidin meningkat secara drastis.

Sinkonidin adalah stereoisomer dari sinkonin. Tabel 2 menunjukkan bahwa sinkonidin lebih dominan daripada sinkonin; bahkan sinkonin tidak terdeteksi samasekali pada sel dengan perlakuan Paclo 5, Paclo 3-5 dan ABA 3-5. Pada beberapa perlakuan, sinkonin baru muncul pada minggu ketujuh, namun pada perlakuan lainnya sinkonin justru menghilang pada minggu ketujuh. Semua perlakuan menghasilkan sinkonidin pada minggu keenam, dengan kadar yang sangat mencolok terlihat dari perlakuan Trip 0.2, Paclo 1-5, Trip 2, dan dari kontrol. Namun, kadar sinkonidin yang tinggi tersebut menurun drastis pada minggu ketujuh. Penurunan kandungan sinkonidin pada minggu ketujuh juga terjadi pada perlakuan lain, kecuali pada perlakuan Paclo 1, Paclo 3, dan Paclo 5 yang justru masih meningkat. Richard *et al.* (1987) menengarai bahwa pada saat bersamaan dengan proses sintesis, proses degradasi alkaloid pada *Cinchona pubescens* juga terjadi. Trip 0.2 yang tidak menghasilkan kinin, kinidin, dan sinkonin pada minggu keenam, ternyata memfokuskan diri pada pembentukan sinkonidin, dengan kadar yang jauh melebihi perlakuan lainnya.

Perlakuan ABA menghasilkan kinin lebih tinggi tapi kinidin yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Namun, pada minggu ketujuh, gabungan kinin dan kinidin yang dihasilkan ABA 3-5 serta ABA 1-5 masih lebih tinggi dari kontrol. Hasil sinkonin dan sinkonidin dari perlakuan ABA lebih rendah dibandingkan dengan kontrol.

Untuk hasil kinin dan kinidin yang tinggi, perlakuan terbaik berturut-turut adalah Paclo 5, Paclo 1-5, dan Trip 2, dipanen pada minggu ketujuh; sedangkan untuk hasil

sinkonin dan sinkonidin, perlakuan terbaik berturut-turut adalah Trip 0.2 dan Paclo 1-5, dipanen pada minggu ke-enam.

Tabel 2. Kandungan kuinolin pada sel kina dengan berbagai perlakuan pada minggu keenam dan ketujuh

Perlakuan	Kinin (µg/g)		Kinidin (µg/g)		Sinkonin (µg/g)		Sinkonidin (µg/g)	
	Mg-6	Mg-7	Mg-6	Mg-7	Mg-6	Mg-7	Mg-6	Mg-7
Kontrol	72.58	108.38	Ttd	349.38	104.84	Ttd	649.22	136.56
Paclo 1	38.3	151.06	Ttd	510.58	Ttd	51.32	24.04	115.52
Paclo 3	19.84	158.9	Ttd	522.74	Ttd	132	97.12	133.28
paclo 5	18.96	1206.7	Ttd	8078.44	Ttd	Ttd	50.68	243.28
Trip 0.2	Ttd	57.38	Ttd	32.2	Ttd	97.92	27864	10.2
Trip 2	14.7	875.48	Ttd	899.22	Ttd	21.38	799.36	17.58
Paclo 1-5	62.8	1129.24	Ttd	2771.68	Ttd	129.72	3421.8	56.08
Paclo 3-5	50.86	15.36	Ttd	Ttd	Ttd	Ttd	69.46	12.52
Paclo 5-5	65.34	208.48	Ttd	234.68	83.76	Ttd	21.22	12.24
ABA 1-5	45.06	663.4	Ttd	290.32	114.38	Ttd	256.14	25.34
ABA 3-5	28.6	872.32	Ttd	277.38	Ttd	Ttd	25.88	20.98

Metabolit sekunder, termasuk alkaloid, lazimnya disintesis oleh sel tumbuhan dalam jumlah kecil, hanya untuk memenuhi beberapa fungsi tertentu. Biasanya, metabolit sekunder diproduksi lebih banyak dalam kondisi sel atau tumbuhan mengalami stres, baik stres biotik maupun abiotik, atau ketika laju pertumbuhannya mulai menurun. Maka, untuk menginduksi pembentukan senyawa sekunder yang diharapkan, sel atau tumbuhan tersebut secara sengaja dikenai kondisi stres. Kondisi stres dalam penelitian ini diberikan dengan mencampurkan zat penghambat tumbuh yaitu paclobutrazol atau ABA. Pencampuran zat tersebut dilakukan sejak awal pemindahan sel remah hasil penyaringan, agar kondisi tidak menguntungkan bagi proses metabolisme normal tersebut, dan karenanya menurunkan pertumbuhan sel, memacu pembentukan senyawa sekunder yang lebih banyak di dalam sel. Karena menurut Sumaryono dan Riyadi (2005), pertumbuhan kalus *Cinchona ledgeriana* mencapai puncaknya pada minggu ke enam setelah dikulturkan, maka paclobutrazol dan ABA juga dicoba diberikan menjelang penurunan pertumbuhan itu, yakni pada minggu kelima.

Bila pertumbuhan kultur sel (Gambar 6 dan 7) dibandingkan dengan hasil ekstraksi kandungan kuinolinnya (Tabel 2), maka kaitan antara penghambatan tumbuh sel dan kadar kuinolin yang dihasilkan tidak selalu sesuai dengan kaidah di atas. Paclo 5 dan Trip 0.2 serta Trip 2 memang menurunkan pertumbuhan sel, sehingga kuinolin yang dihasilkan termasuk yang paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Namun, Paclo 1-5 yang tidak menunjukkan efek menghambat pada kultur sel, bahkan mampu memacu produksi ke empat komponen kuinolin (kinin, kinidin, sinkonin dan sinkonidin) pada taraf yang cukup tinggi pula.

Triptofan yang diberikan lebih dari 2 mM ke dalam medium kultur sel *Cinchona pubescens* memperlihatkan efek toksik yang mengakibatkan kematian sel (Richards *et al.*, 1987). Mereka juga melaporkan bahwa pemberian prazat triptofan tidak memperbaiki tingkat produksi alkaloidnya. Dalam penelitian ini, triptofan yang digunakan hanya sebesar 0.2 dan 2 mg/L (setara dengan 1 dan 10 μ M). Kedua konsentrasi tersebut sudah mampu menurunkan pertumbuhan sel, tetapi tidak sampai mematikan. Pada konsentrasi serendah itu, triptofan mampu sangat meningkatkan kadar kinin/kinidin (Trip 2) dan sinkonin/sinkonidin (Trip 0.2). Dengan demikian, prazat triptofan yang dibutuhkan untuk memacu proses sintesis kuinolin oleh *Cinchona ledgeriana* hanya kecil saja.

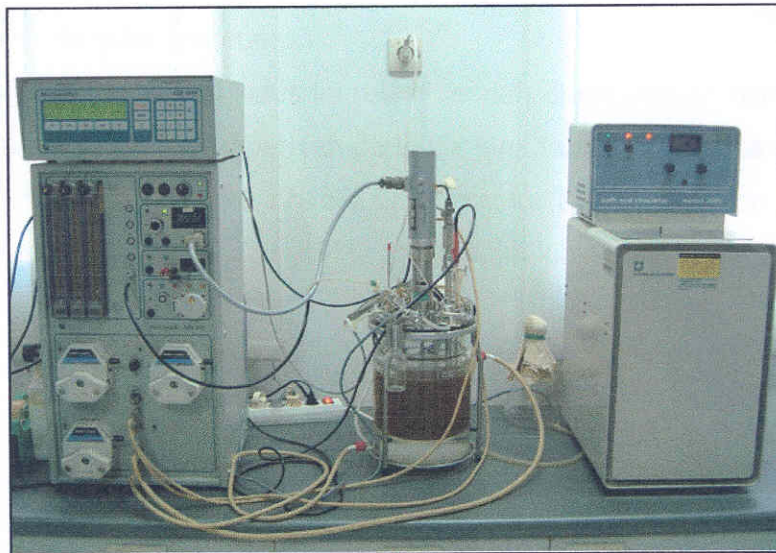
4.4. Scale up kultur sel kina dalam bioreaktor

Suspensi sel di labu Erlenmeyer yang tumbuh cepat digunakan sebagai bahan untuk kultur sel kina di dalam bioreaktor kapasitas volume 5 L (Gambar 8). Dari hasil pengamatan terlihat bahwa pertumbuhan biomassa sel kina mulai meningkat pada umur 6 hari. Peningkatan biomassa sel kina sampai umur 18 hari terlihat relatif seragam sekitar 0,3% PVC (Gambar 9). Mulai umur 12 hari terlihat adanya agregat sel dalam bejana bioreaktor dengan ukuran relatif besar (tampak seperti butiran) yang menumpuk di bagian bawah bejana, sehingga suspensi dalam bejana sudah tidak homogen antara bagian atas dan bawah. Hal ini berpengaruh terhadap pengambilan sampel suspensi sel yakni tidak bisa terambil secara sempurna sehingga tidak mewakili kerapatan suspensi.

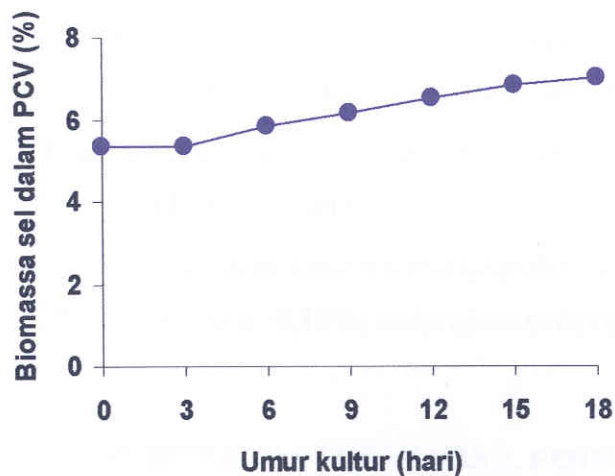
Viabilitas sel kina mulai awal sampai umur 18 hari menunjukkan nilai yang cukup tinggi dan konstan yaitu rata-rata 97%. Hal ini berarti bahwa sel yang dikulturkan dalam bioreaktor selama 18 hari tetap viabel dan dapat beradaptasi dalam kondisi kultur bioreaktor. Dengan demikian, sel kina tersebut berpotensi tinggi untuk dikulturkan pada tahap selanjutnya.

Setiap pengamatan tampak adanya perkembangan morfologi sel kina. Pada awal kultur, sebagian besar sel berbentuk bulat dan lonjong. Agregat sel yang terbentuk

semakin besar. Pada pengamatan berikutnya, jumlah agregat sel kina semakin banyak dengan jumlah sel lebih dari 40 sel per agregat.



Gambar 8. Scale up kultur suspensi sel kina pada bioreaktor kapasitas 5 liter.



Gambar 9. Pertumbuhan biomassa sel kina di bioreaktor.

4.5. Ekstraksi dan analisis kuinolin

Dari data analisis hasil ekstraksi dengan pelarut akuades terlihat alkaloid paling dominan adalah kinin yaitu sebanyak 2,88% sedangkan alkaloid lainnya yaitu kinidin 0,02%, sinkonin 0,19%, sedangkan sinkonidin tidak terdeteksi. Untuk hasil ekstraksi dengan pelarut etanol, alkaloid yang terekstrak terlihat lebih banyak. Alkaloid yang

0,02%, sinkonin 0,19%, sedangkan sinkonidin tidak terdeteksi. Untuk hasil ekstraksi dengan pelarut etanol, alkaloid yang terekstrak terlihat lebih banyak. Alkaloid yang terekstrak dengan pelarut ini adalah kinin 2,88%, kinidin 0,02% dan sinkonin 0,07% sedangkan sinkonidin tidak terdeteksi.

Kandungan alkaloid dari kalus ini relatif rendah dibandingkan dengan kandungan alkaloid yang sama yang dapat diperoleh dari kulit kina tanaman dewasa. Pada kulit kina ini kandungan kinin sulfat sebesar 12,13% dari berat kulit 1,43 kg/pohon (Nana Subarna, 1985), sedangkan menurut Boesday (1975) kandungan kinin sulfat sebesar 3,0%.

5. KESIMPULAN

- a. Koleksi *C. ledgeriana* klon QRC dan *C. succirubra* telah dilakukan, beberapa di antaranya mempunyai kadar SQ 7 lebih dari 11%.
- b. Sel kina tumbuh pesat dalam kultur suspensi dan mencapai volume biomassa tertinggi pada umur 12 hari.
- c. Laju pertumbuhan suspensi sel kina dalam bioreaktor lebih rendah dibandingkan dengan dalam labu Erlenmeyer. Viabilitas sel tetap tinggi sekitar 97%.
- d. Perlakuan Paclobutrazol 1 mg/L yang diberikan pada minggu kelima (Paclo 1-5) serta triptofan 2 mg/L menghasilkan kinin dan kinidin tertinggi.
- e. Perlakuan triptofan 0.2 mg/L dan Paclo 1-5 meningkatkan kandungan sinkonin dan sinkonidin pada kultur suspensi sel kina.
- f. Ekstraksi sel dengan pelarut akuades menghasilkan kinin yaitu sebanyak 2,88%, kinidin 0,02%, dan sinkonin 0,19%, sedangkan sinkonidin tidak terdeteksi.

6. PERKIRAAN DAMPAK HASIL PENELITIAN

Tersedianya paket teknologi yang memungkinkan kuinolin dihasilkan melalui kultur *in vitro* suspensi sel kina dalam konsentrasi yang memadai maka siklus produksi kuinolin dapat diperpendek secara drastis menjadi hanya 4 - 6 minggu dan dapat dilakukan secara terus menerus tanpa gangguan keadaan iklim atau faktor lingkungan lainnya. Namun, sampai saat ini kandungan kuinolin dalam suspensi sel kina masih sangat rendah, perlakuan terbaik hanya menghasilkan total kuinolin kurang dari 1%. Oleh karena itu penelitian selanjutnya adalah mendapatkan kultur suspensi sel kina yang mempunyai kandungan kuinolin lebih tinggi.

7. DAFTAR PUSTAKA

- Alfermann, A.W., M. Petersen. 1995. Natural product formation by plant cell biotechnology: results and perspectives. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 43:199-205.
- Anderson, L.A., A.T. Keene, J.D. Phillipson. 1982. Alkaloid production by leaf organ, root organ and cell suspension cultures of *Cinchona ledgeriana*. *Plant. Med.* 46:25-27.
- Baker, C.J., N.M. Mock. 1994. An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using evans blue. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 39:7-12.
- Balandrin, M.F., A.D. Kinghorn, S.J. Smolenski, R.H. Dobberstein. 1978. Reversed-phase high-pressure liquid chromatography of some tryptamine derivatives. *J. Chromatogr.* 57:365-370.
- Boesday, M. 1975. Sistim penjarangan dan sistim ratoon pada tanaman kina. *Warta BPTK, I*: 245-258.
- Geerlings, A., D. Hallard, A. M. Caballero, I. L. Cardoso, R. van der Heijden, R. Verpoorte. 1999. Alkaloid production by a *Cinchona officinalis* 'Ledgeriana' hairy root culture containing constitutive expression constructs of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase cDNAs from *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.* 19:191-196.
- Hamill, J.D., R.J. Robins, M.J.C. Rhodes. 1989. Alkaloid production by transformed root cultures of *Cinchona ledgeriana*. *Plant. Med.* 55:354-357.
- Harborne J.B. 1998. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. 3rd ed. Chapman & Hall, London. 302p.
- Hunter, C.S. 1988. *Cinchona* spp.: micropropagation and in vitro production of quinine and quinidine. In: Y.P.S. Bajay (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 4: Medicinal and Aromatic Plants I, 367-387.
- Koblitz, H., D. Koblitz, H.P. Schmauder, D. Groger. 1983. Studies on tissue cultures of the genus *Cinchona* spp.: alkaloid production in cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 2:122-125.
- Lloyd, G., B. McCown. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* 30:421-427.
- McCalley, D.V. 2002. Analysis of the Cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques. *J. Chromatogr. A* 967:1-19.
- Murashige, T., F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-479.
- Panda, A.K., S. Mishra, V.S. Bisaria, S.S. Bhojwani. 1989. Plant cell reactors - a perspective. *Enzyme Microb. Technol.* 11:386-397.
- Richards J.R., A.B. Hanley, S.R. Richards, G.R. Fenwick, M.J.C. Rhodes. 1987. Uncharacteristic alkaloid synthesis by suspension cultures of *Cinchona pubescens* fed with L-tryptophan. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 9(1): 49-59.
- Ritterhaus, E., J. Ulrich, K. Weasphal. 1990. Large-scale production of plant cell cultures. *Intl. Assn. Plant Tissue Cult. News* 61:2-10.
- Roberts, S.C., M.L. Shuler. 1997. Large-scale plant cell culture. *Curr. Opinion in Biotechnol.* 8:154-159.

- Salisbury F.B., C.W. Ross. 2002. Plant Physiology. Ed. 5. Wadsworth Publ.
- Singh, G. 1997. Reactor design for plant cell culture of food ingredients and additives. Food Technol. 51:62-66.
- Srivastava L.M. 2002. Plant Growth and Development: Hormones and Environment. Academic Press. London.
- Staba, E.J., A.C. Chung. 1981. Quinine and quinidine production by *Cinchona* leaf, root and unorganized cultures. Phytochem. 20(11):2495-2498.
- Subarna, N. 1985. Pertimbangan ekonomi penentuan saat optimum dan penebangan kina sistem stumping, klon Cib 5. Tesis S-2, Universitas Padjajaran, Bandung. 125 hal.
- Sumaryono, I. Riyadi. 2005. Pertumbuhan biak kalus dan suspensi sel tanaman kina (*Cinchona ledgeriana* Moens). Menara Perkebunan 73(1):1-9.
- Toruan-Mathius N, N. Haris, J. Santoso, A. Heri. 2006. Pengaruh elisitasi terhadap pertumbuhan dan produksi alkaloida kinolin dari akar rambut tanaman kina (*Cinchona succirubra* Pavon ex Klotzsch). Menara Perkebunan, 74(1): 10-22.
- Widayat, W. 2000. Peluang pasar dan perkembangan industri kina Indonesia. In: M. Martanto et al. (eds.) Pros. Seminar Sehari Pengembangan Perkebunan Indonesia, Buku II: Pengembangan Kina Nasional, Bandung. 4-10.
- Wijnsma, R., R. Verportee, P.A.A. Harkes, T.B. van Vliet, H.J.G. Ten Hoopen, A.B. Svendsen. 1986. The influence of initial sucrose and nitrate concentrations on the growth of *Cinchona ledgeriana* cell suspension cultures and the production of alkaloids and anthraquinones. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 7:21-29.
- Wilson, P.D.G., M.G. Hilton. 1995. Plant cell bioreactors. In: J.A. Asenjo & J.C. Merchuk (eds.) Bioreactor System Design, Marcel Dekker, Inc. 413-439.