



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Pyrrolizidine alkaloid variation in Jacobaea plants : from plant organ to cell level

Nuringtyas, T.R.

Citation

Nuringtyas, T. R. (2013, November 6). *Pyrrolizidine alkaloid variation in Jacobaea plants : from plant organ to cell level*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/22118>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/22118>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22118> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Nuringtyas, Tri Rini

Title: Pyrrolizidine alkaloid variation in *Jacobaea* plants : from plant organ to cell level

Issue Date: 2013-11-06

Ringkasan

Tumbuhan mensintesis berbagai macam senyawa yang dapat diklasifikasikan menjadi metabolit primer dan sekunder. Salah satu karakter dari MS adalah keanekaragamannya yang sangat tinggi (Hartmann, 1986). Karakter ini dapat ditemukan baik antar spesies maupun dalam satu spesies. Distribusi spatial MS bahkan dapat ditemukan dalam satu individu baik pada tingkat organ, jaringan maupun sel. Keanekaragaman MS merupakan konsekuensi dari metabolisme tumbuhan yang dinamis untuk merespon perubahan yang terjadi di lingkungan biotik dan abiotik. Serangga herbivora termasuk dalam lingkungan biotik. Berbagai hipotesis telah diajukan untuk menerangkan keanekaragaman ini. Salah satu penjelasan dari sudut pandang evolusi adalah hipotesis ko-evolusi (Ehrlich dan Raven, 1964). Hipotesis ini menjelaskan bahwa interaksi antara tumbuhan dengan serangga memberi kontribusi yang penting terhadap keanekaragaman MS. Tumbuhan menghasilkan senyawa baru untuk mengatasi serangga, selanjutnya serangga beradaptasi untuk menetralkan senyawa baru tersebut. Siklus ini selalu berulang kembali (Ehrlich and Raven, 1964; Rhoades and Cates, 1976). Hipotesis lain menyatakan bahwa MS yang berbeda mempunyai efek yang berlainan terhadap berbagai jenis serangga (Berenbaum and Feeny, 1981).

Dalam disertasi ini dipelajari variasi MS pada tingkatan organ, jaringan dan sel dalam satu tumbuhan. Alkaloid pirolisidin (AP) dari genus *Jacobaea* dipilih sebagai model sistem karena AP memiliki keanekaragaman yang tinggi baik dari segi konsentrasi maupun komposisi. Alkaloid ini memiliki distribusi yang luas dan dapat ditemukan pada tumbuhan yang tidak berkerabat dekat. Alkaloid pirolisidin di alam dapat ditemukan dalam dua bentuk yaitu basa bebas dan *N*-oksida. Pada genus *Jacobaea*, AP dibagi menjadi empat grup yaitu AP tipe senesonin, jakobin, erusifolin dan otosenin. Tujuan dari disertasi ini adalah untuk memahami lebih mendalam keanekaragaman AP pada genus *Jacobaea* mencakup distribusi secara spatial di dalam satu individu dan konsekuensi dari keanekaragaman dan distribusi tersebut terhadap serangga polifagus.

Pada bab 1 dijabarkan keanekaragaman struktur, sintesis dan toksisitas AP. metabolomik NMR dan mikrodiseksi laser (LMD) sebagai salah satu pendekatan terkini dalam fikokimia juga diperkenalkan.

Pengaruh lingkungan biotik dan abiotik terhadap keanekaragaman AP telah banyak diketahui. Jamur endofit merupakan bagian dari lingkungan biotik. Sampai saat ini efek jamur endofit terhadap AP dari genus *Jacobaea* belum diketahui. Pada bab 2 diteliti pengaruh jamur endofit terhadap keanekaragaman AP. Pada percobaan ini, jamur endofit dieliminasi dengan memperlakukan tumbuhan dengan tiga macam fungisida sistemik, yaitu Folicur, Prontoplus dan Switch. Hasil penelitian menunjukkan bahwa baik tumbuhan perlakuan maupun kontrol mampu memproduksi AP. Hasil ini menunjukkan bahwa sintesis AP *de novo* dapat dilakukan secara mandiri oleh genus *Jacobaea*. Hasil tidak terduga ditemukan pada tumbuhan yang diperlakukan dengan Folicur. Pada tumbuhan ini ditemukan jamur endofit yang memiliki kesamaan yang tinggi dengan jamur genus *Glomus* yaitu sejenis jamur mikoriza yang tergolong dalam Glomeromycota. Kelompok perlakuan ini mempunyai kandungan AP total yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Rendahnya kandungan AP terjadi pada AP tipe senesonin dan jakobin dan tidak pada tipe otosenin dan erusifolin. Hasil analisis metabolomik pada semua sampel menunjukkan bahwa tumbuhan yang diperlakukan dengan Folicur tidak menunjukkan perbedaan profil metabolom dengan kontrol sehingga rendahnya kandungan AP terutama

tipe jakobin bukan disebabkan oleh perlakuan fungisida akan tetapi karena keberadaan jamur *Glomus*.

Untuk lebih memahami mekanisme pengaruh lingkungan terhadap keanekaragaman AP, maka dilakukan evaluasi kemampuan setiap organ dari tumbuhan *Jacobaea* dalam mensintesis AP. Studi yang mempelajari kapasitas organ tumbuhan dalam memproduksi AP dilakukan dengan membandingkan tunas daun yang berasal dari tumbuhan berbunga dengan kultur akar *in vitro* (Hartmann et al., 1989). Pada bab 3 ini dikembangkan kultur *in vitro* akar, tunas dan tumbuhan utuh dari genus *Jacobaea*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kultur tunas ternyata mampu menghasilkan AP walaupun literatur yang ada menyatakan bahwa produksi AP hanya terjadi di akar (Hartmann & Toppel, 1987). Kultur akar mempunyai konsentrasi AP paling rendah, disusul oleh kultur tunas sebanyak 1,5 kali dari kultur akar dan kultur utuh dengan kandungan AP paling tinggi yaitu 3 kali dari kultur akar. Tingginya konsentrasi AP pada kultur utuh menunjukkan bahwa untuk keberlangsungan sintesis AP diperlukan organ akar dan tunas. Absennya tunas pada kultur akar mungkin menyebabkan hilangnya organ untuk mengakumulasi AP. Akumulasi AP pada kultur akar dapat menginisiasi penghambatan umpan-balik sehingga produksi AP *de novo* terhenti. Kompositi utama AP pada kultur akar terdiri dari AP tipe senesonin dan otosenin. Pada kultur tunas dan kultur utuh diketahui AP tipe jakobin dan erusifolin mempunyai proporsi yang lebih tinggi dibanding dua tipe yang lainnya. Diversifikasi AP dari senesonin *N* oksida menjadi berbagai jenis AP terjadi di dalam tunas (Hartmann and Dierich, 1998). Dalam penelitian ini, proporsi AP tipe otosenin terutama onetin dalam kultur akar diketahui dua kali lebih tinggi dibandingkan dalam kultur tunas dan kultur utuh. Hasil ini menunjukkan bahwa kultur akar mampu melakukan diversifikasi struktur basa retronesin menjadi otonesin. Kultur tunas dan utuh mempunyai kandungan AP tipe jakobin dan erusifolin yang tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa proses epoksidasi pembentukan cincin eter secara spesifik hanya terjadi di organ bagian atas tanah.

Tumbuhan adalah organisme komplek yang memiliki kurang lebih empat puluh jenis sel dan dua belas diantaranya adalah sel penyusun daun. Berbagai jenis sel ini memiliki fungsi dan peran yang berbeda dalam pertumbuhan, perkembangan, reproduksi dan pertahanan. Oleh karena itu, setiap tipe sel diharapkan memiliki komposisi kimia yang unik. Pada bab 4 dipelajari profil metabolomik jaringan penyusun daun yaitu epidermis dan mesofil dengan metabolomic NMR. Hasil analisa deskriptif dengan *Orthogonal Partial Least-Squares-Discriminant Analysis* (OPLS-DA) menunjukkan pemisahan yang jelas antara ekstrak epidermis dan mesofil. Lapisan epidermis mengandung lebih tinggi senyawa jakaronon dan fenilpropanoid, terutama asam klorogenat (AKG) dan asam ferulat dibanding lapisan mesofil. Lapisan mesofil mangandung lebih tinggi AP terutama jakobin dan jakonin. Asam klorogenat dan AP telah diketahui aktifitasnya sebagai pengusir serangga. Asam klorogenat berfungsi sebagai *anti feedant* yang mengurangi daya cerna tumbuhan oleh serangga pengunyah seperti ulat, kumbang daun dan bahkan serangga pengisap seperti apid dan trip. Akumulasi MS pada dua lapisan jaringan daun yang berbeda ini merupakan contoh menarik bagaimana tumbuhan memperkuat dirinya secara berlapis untuk memperkuat sistem pertahanannya.

Dengan menggunakan teknologi terkini untuk isolasi sel tunggal, pada bab 5 dipelajari profil metabolomik tiga tipe sel yang berbeda pada daun yaitu sel epidermis, mesofil palisade dan mesofil spon dengan menggunakan LMD dan metabolomik NMR. Dua macam genotip *Jacobaea* yang resisten dan rentan terhadap serangga trip *Frankliniella occidentalis* digunakan sebagai sampel. Hasil penelitian ini mengkonfirmasi akumulasi AKG yang tinggi dalam sel

epidermis dan jakobin *N*-oksida dalam sel mesofil palisade. Pada genotipe yang resisten terhadap trip dideteksi akumulasi jakobin *N*-oksida lebih tinggi dibanding pada tumbuhan yang rentan. Sejauh ini, AP tipe jakobin telah dilaporkan sebagai AP yang berperan penting dalam pertahanan genus *Jacobaea* terutama untuk menghadapi herbivora polifagus seperti trip *F. occidentalis*.

Pada bab 3 telah ditunjukkan bahwa diversifikasi senesionin *N*-oksida menjadi AP tipe jakobin dan erusifolin ditemukan terutama dalam daun. Hal ini mungkin merupakan hasil adaptasi tumbuhan untuk mempertahankan diri dari tekanan serangga. Bukti yang mendukung pendapat tersebut sampai saat ini diperoleh dari hasil analisa statistik korelasi. Pada bab 6 dilakukan pengujian secara *in vitro* dua macam AP yaitu jakobin dan erusifolin pada serangga polifagus. Kedua macam AP tersebut tidak tersedia secara komersial sehingga terlebih dahulu dilakukan isolasi. Selanjutnya, kedua AP tersebut dan beberapa AP yang tersedia secara komersial diujikan pada *Spodoptera exigua*. Semua AP yang diujikan dalam dua bentuk yaitu basa bebas dan *N*-oksida. Selain itu, AKG juga diujikan baik secara individual maupun berkombinasi dengan AP. Pengujian mencakup uji *in vitro* dengan kultur sel dan uji injeksi pada larva. Pada kedua uji ini, diketahui jakobin merupakan AP yang paling toksik diikuti dengan erusifolin dan senkirkin. Baik senesionin maupun AKG tidak menunjukkan efek toksik pada konsentrasi uji. Untuk semua pengujian, AP dalam bentuk basa bebas mempunyai aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan bentuk *N*-oksidanya. Kombinasi antara AKG dengan AP ternyata menurunkan toksitas AP. Hasil ini menunjukkan bahwa selain karena basa nesinya, toksitas AP dipengaruhi oleh gugus fungsional pada struktur asam nesiknya. Jakobin dan erusifolin, keduanya adalah AP yang paling toksik dan keduanya mempunyai gugus epoksi sebagai gugus fungsionalnya. Gugus fungsional ini mungkin memudahkan pembentukan senyawa antara pirol yang reaktif, yang bersifat toksik. Pada akhirnya, disertasi ini telah berhasil mengungkapkan adanya pola distribusi AP spesifik dalam satu individu tumbuhan genus *Jacobaea*. Spesifitas distribusi ini mendukung munculnya penjelasan baru tentang dilema pertahanan tanaman dalam menghadapi serangga polifagus dan monofagus. Alkaloid pirolisidin yang berperan penting untuk pertahanan menghadapi serangga polifagus diakumulasi dalam lapisan mesofil sehingga mengurangi kemampuan serangga monofagus untuk mengenali senyawa tersebut. Strategi ini cocok digunakan untuk pertahanan tumbuhan dalam menghadapi serangga berukuran besar seperti ulat maupun serangga polifagus berukuran lebih kecil yang hanya menyerang lapisan mesofil daun. Akumulasi AKG di lapisan epidermis berperan sebagai pertahanan awal sebelum serangga bertemu dengan senyawa yang lebih toksik yaitu AP. Lebih lanjut, AKG diketahui mengurangi toksitas AP. Untuk itu pemisahan kedua jenis MS ini penting untuk menjaga aktivitas AP. Hasil ini mungkin akan berpengaruh besar terhadap penelitian interaksi serangga dan tumbuhan. Telah diketahui bahwa setiap tipe sel akan mempunyai profil kimiawi yang khas, sehingga penelitian mengenai metabolit sekunder pada tingkatan jaringan dan sel harus dipertimbangkan apabila mempelajari serangga yang hanya menyerang suatu jaringan atau sel tertentu saja. Dalam disertasi ini, peran AP tipe jakobin pada pertahanan tumbuhan menghadapi serangga polifagus menjadi semakin jelas. Senyawa AP tipe jakobin adalah AP yang dipengaruhi oleh keberadaan jamur mikorizae. Alkaloid tipe ini pula yang menjadi ciri dari kultur tunas dan bukan kultur akar. Lebih lanjut, AP tipe ini terakumulasi lebih tinggi pada daun tumbuhan yang resisten terhadap trip. Dengan menggunakan uji *in vitro* kultur sel dan injeksi larva, diketahui bahwa AP tipe jakobin yang paling toksik untuk serangga polifagus. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk memahami toksitas jakobin terhadap serangga polifagus lainnya.

