

## Pengaruh penurunan konsentrasi fosfor dalam media MS terhadap pertumbuhan kalus dan produksi reserpin pule pandak *Rauvolfia verticillata* secara *in vitro*

### The effects of low phosphorus concentration in MS medium on callus growth and reserpine production of pule pandak *Rauvolfia verticillata* in vitro

SUPATMI, SOLICHATUN, ENDANG ANGGARWULAN

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 9 Februari 2007. Revisi disetujui: 27 Februari 2007.

**Abstract.** Supatmi, Solichatun, Anggarwulan E. 2007. The effects of low phosphorus concentration in MS medium on callus growth and reserpine production of pule pandak *Rauvolfia verticillata* in vitro. *Biofarmasi* 5: 16-25. This research aimed to determine the effects of low phosphorus concentration in MS medium on callus growth and reserpine production of pule pandak [*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon]. This research frame is based on the potency of *R. verticillata* as antihypertension. The phosphorus concentration on the callus growth medium would inhibit the callus growth. It also had effects on the synthesis of tryptophan amino acids. Tryptophan would produce tryptamine as a strictosidine synthase substrate. Strictosidine synthase was an enzyme that activated the reserpine production. The research used a completely randomized design with one factor, phosphorus concentration ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) in 5 replicates, i.e., 0, 42.5, 85, 127.5 and 170 (control) mg/L. The parameters of this research included callus growth (fresh weight and dry weight), morphology (texture and color) callus, and the content of reserpine (mg/gram) in *R. verticillata* callus. Quantitative data (fresh weight, dry weight, and reserpine content) were analyzed using variance analysis (ANOVA) followed by DMRT at the confidence level of 5%. The result of this research indicated that the low phosphorus concentration ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) in the MS medium affected callus growth and reserpine production of *R. verticillata*. The highest fresh weight and dry weight of callus *R. verticillata* were obtained on replicate 85 mg/L phosphorus concentration, whereas the lowest fresh weight was obtained on 0 mg/L and the lowest dry weight on 42.5 mg/L. The reserpine production under the phosphorus standard of MS medium produced the highest reserpine on *R. verticillata* callus. The highest reserpine production was obtained on replicate 127.5 mg/L phosphorus concentration, whereas the lowest reserpine production was obtained on 42.5 mg/L.

**Keywords:** Callus growth, phosphorus, *Rauvolfia verticillata*, reserpine

### PENDAHULUAN

Penggunaan obat alami saat ini terus mengalami peningkatan seiring dengan tingginya kesadaran masyarakat akan pentingnya kesehatan. Minat untuk memanfaatkan obat alami tersebut juga timbul sebagai akibat banyaknya dijumpai efek samping yang tidak dikehendaki dari penggunaan obat kimia murni, selain itu adanya anggapan masyarakat bahwa obat tradisional merupakan obat yang baik, aman, dan mudah didapat (Ediati 1997; Hargono 1997). Banyaknya kecenderungan masyarakat untuk menggunakan bahan alam menyebabkan kebutuhan bahan untuk obat alami semakin meningkat dari waktu ke waktu.

WHO melaporkan bahwa sekitar 80% dari penduduk dunia menggantungkan pengobatannya pada obat tradisional, dan sebagian besar dari pengobatan tradisional tersebut ternyata menggunakan ekstrak tanaman atau senyawa metabolit sekundernya (Soemantri 1993). Salah satu senyawa metabolit sekunder yang banyak dibutuhkan adalah reserpin. Reserpin merupakan golongan alkaloid indol monoterpene yang berpotensi sebagai antihipertensi dan memiliki efek sedatif (Singh et al. 2004). Menurut

Kulkarni dan Ravinda (1988), sebanyak 3500 kg reserpin dan ajmalisin per tahun diisolasi dari *Rauvolfia* atau *Catharanthus roseus* oleh perusahaan farmasi dunia untuk pengobatan penyakit antihipertensi dan sirkulasi darah.

Anggota dari genus *Rauvolfia* umumnya banyak mengandung alkaloid, khususnya reserpin (de Padua et al. 1999). Rowe (1989) menyatakan kandungan reserpin tidak hanya terdapat pada *Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon yang kini dalam kondisi mengkhawatirkan, bahkan terancam punah, namun juga terdapat pada spesies *Rauvolfia* lainnya. Salah satu spesies *Rauvolfia* yang potensial adalah *R. verticillata*. Di Indonesia, *R. verticillata* lebih dikenal dengan nama pule atau salung-salung. Tanaman *R. verticillata* selain mengandung alkaloid juga mengandung saponin, flavonoid, dan polifenol (de Padua et al. 1999).

Teknik kultur *in vitro* sangat menguntungkan, selain untuk perbanyakan dan pemuliaan tanaman, juga sering dimanfaatkan untuk memproduksi metabolit sekunder (Wattimena 1992). Senyawa yang diinginkan dapat ditingkatkan jumlahnya dengan cara memanipulasi media, penambahan prekursor, maupun optimasi faktor lingkungan. Pengetahuan yang baik tentang kebutuhan hara

sel dan jaringan yang dikulturkan dapat meningkatkan keberhasilan dalam memperoleh metabolit sekunder. Hara meliputi garam mineral, sumber karbon (gula), vitamin, zat pengatur tumbuh, dan komponen tambahan lain yang berpengaruh terhadap ketahanan dan perbanyakan sel (Wetter dan Constabel 1991).

Fosfor dalam tanaman berfungsi sebagai penyusun protoplasma sel dan sangat dibutuhkan dalam proses fotosintesis, yaitu dalam pembentukan ATP pada fotofosforilasi dan fosforilasi oksidatif (Jumin 1992). Fosfor berperan penting dalam menentukan total energi metabolisme dengan mengubah ester fosfat (C-P) seperti glukosa 6 fosfat yang kaya energi pada proses glikolisis, fosforilasi oksidatif, atau fotosintesis. Menurut Taiz dan Zeiger (1998), *phosphoenolpyruvic acid* pada proses glikolisis dan *D-erythrose-4-phosphate* pada jalur pentosa fosfat merupakan turunan dari prekursor karbohidrat yang mampu mensintesis asam amino aromatik, salah satunya adalah triptofan yang merupakan prekursor dari alkaloid indol monoterpenoid (reserpin).

Fosfor merupakan hara makro (hara yang dibutuhkan dalam jumlah besar) yang tersedia pada media *Murashige Skoog* (MS) dalam bentuk  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Wattimena 1992). Ramawat (1999a) menyatakan fosfat yang rendah pada media dapat meningkatkan biosintesis metabolit sekunder. Hasil penelitian dari Estime et al. (2001) menunjukkan bahwa konsentrasi fosfor yang tinggi dalam media Gamborgs (B5) mampu meningkatkan berat basah dari kultur kalus *Typha latifolia*, namun menurunkan kandungan metabolit sekundernya. Wilson dan Marron (2006) juga melaporkan bahwa pengurangan konsentrasi fosfor pada level 11  $\mu\text{g/ml}$  pada kultur suspensi *Galium mollugo* L. dapat menurunkan pertumbuhan kalus, namun meningkatkan biosintesis anthraquinon.

Penelitian ini bertujuan untuk: (i) mengetahui pengaruh konsentrasi fosfor yang rendah dalam media MS terhadap pertumbuhan kalus *R. verticillata*, dan (ii) mengetahui pengaruh konsentrasi fosfor yang rendah dalam media MS terhadap produksi reserpin kultur kalus *R. verticillata*.

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai dengan November 2006 di Sub Laboratorium Biologi, Lab. Pusat MIPA, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

### Bahan dan alat

Bahan-bahan yang digunakan meliputi sumber eksplan berupa daun *R. verticillata* yang berasal dari Balai Penelitian Tanaman Obat (BPTO), Tawangmangu, Karanganyar, akuades, larutan *bleach* (mengandung  $\text{NaClO}$  5,25%), media MS (*Murashige Skoog*), bahan pematik berupa agar 7.000 mg/L, HCl 1 N, KOH 1 N, akuades, NAA 2 mg/L, kinetin 2 mg/L, fosfor ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) pada media MS dengan konsentrasi: 0 mg/L (kontrol), 42,5 mg/L, 85 mg/L, 127,5 mg/L, dan 170 mg/L, etanol p.a (pro analysis), senyawa reserpin murni, *double distilled water* (ddH<sub>2</sub>O), sodium nitrit, dan asam sulfamat.

**Tabel 1.** Konsentrasi fosfor ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) dalam media perlakuan.

Bahan Kimia	Konsentrasi (mg/L)				
	P <sub>1</sub> *	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>5</sub> **
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0	42,5	85	127,5	170

Keterangan: \* = Tanpa  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (kontrol), \*\* = konsentrasi  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sesuai standar baku media MS.

Sementara itu, alat-alat yang digunakan meliputi *autoclave* untuk sterilisasi alat dan media yang telah diatur pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm, *hot plate*, *magnetic stirrer*, pipet tetes, spatula, pH-meter, botol kultur, gelas ukur, neraca analitik, erlenmeyer, gelas beker, pipet ukur, kertas *aluminium foil* (*total wrap heavy duty*), botol kultur, cawan petri, pinset, alat diseksi, *laminar air low cabinet* (LAF), lampu Bunsen, spektrofotometer UV-Vis, *vortex*, pipet ukur, tabung reaksi, mortar, *waterbath*, *cuvet*, kertas saring, inkubator, dan gelas ukur.

### Rancangan percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan, yaitu 5 variasi konsentrasi sumber fosfor ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) yang diberikan pada media perlakuan secara in vitro (**Tabel 1**). Tiap-tiap perlakuan terdiri atas 5 ulangan.

### Cara kerja

#### Sterilisasi alat

Alat-alat gelas (erlenmeyer, botol kultur, gelas ukur, gelas beker, cawan petri, spatula, pipet tetes, pipet ukur) dicuci dengan detergen, dibilas dengan air mengalir, kemudian dikeringkan. Alat-alat diseksi (skalpel, pinset, gunting, dan *cutter*) dicuci dengan detergen dan dikeringkan dengan kertas tisu. Botol kultur dan gelas ukur yang telah kering ditutup dengan kertas *aluminium foil*. Alat-alat diseksi, pipet tetes, dan pipet ukur yang telah kering dibungkus dengan kertas. Erlenmeyer diisi dengan akuades sebanyak  $\frac{3}{4}$  volume dan ditutup dengan kertas *aluminium foil*. Semua alat tersebut disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 60 menit. Setelah selesai sterilisasi, semua peralatan dikeluarkan dari *autoclave* dan disimpan dalam oven.

#### Pembuatan media inisiasi (induksi kalus)

Larutan stok dibuat dari makronutrien, mikronutrien, vitamin, dan asam amino. Agar ditimbang sebanyak 7 g dan sukrosa 30 g. *Magnetic stirrer* dimasukkan ke dalam gelas beker dan ditambahkan akuades sebanyak kurang lebih 400 ml. Gelas beker diletakkan di atas *hot plate*. Larutan makronutrien, mikronutrien, vitamin, asam amino dan sukrosa dimasukkan satu per satu ke dalam gelas beker sesuai dengan komposisi untuk pembuatan media MS dengan penambahan NAA 2 mg/L dan kinetin 2 mg/L ke dalam larutan. Akuades ditambahkan sampai volume 900 ml. Nilai pH larutan dibuat 5,75 dengan cara menambahkan KOH 1 N untuk menaikkan pH dan HCl 1 N untuk menurunkan pH. Akuades ditambahkan sampai volume 1 L. Agar ditambahkan sebanyak 7 gram. Larutan dipanaskan

di atas *hot plate* sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* sampai larut sempurna. Larutan dituangkan ke dalam botol kultur steril sebanyak seperlima bagian. Botol kultur yang telah berisi media ditutup rapat dengan menggunakan kertas *aluminium foil*. Botol kultur diatur dalam keranjang *autoclave* dan dimasukkan ke dalam *autoclave*, kemudian disterilisasi selama 30 menit pada temperatur 121°C dan tekanan 1,5 atm. Setelah selesai disterilisasi, media dibiarkan dingin dan disimpan dalam rak kultur sampai saatnya digunakan untuk menanam eksplan.

#### *Pembuatan media perlakuan*

Larutan stok dibuat dari makronutrien, mikronutrien, vitamin, dan asam amino. Agar ditimbang sebanyak 7 g dan sukrosa 30 g. *Magnetic stirrer* dimasukkan ke dalam gelas beker dan ditambahkan akuades sebanyak kurang lebih 400 ml. Gelas beker diletakkan di atas *hot plate*. Larutan makronutrien, mikronutrien, vitamin, asam amino dan sukrosa dimasukkan satu per satu ke dalam gelas beker sesuai dengan komposisi untuk pembuatan media MS dengan penambahan NAA 2 mg/L dan kinetin 2 mg/L ke dalam larutan. Media perlakuan dibuat dengan cara sebagai berikut. Kelompok P<sub>1</sub> dibuat dengan penambahan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sebanyak 0 mg/L (kontrol), kelompok P<sub>2</sub> dibuat dengan penambahan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sebanyak 42,5 mg/L, kelompok P<sub>3</sub> dibuat dengan penambahan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sebanyak 85 mg/L, kelompok P<sub>4</sub> dibuat dengan penambahan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sebanyak 127,5 mg/L, kelompok P<sub>5</sub> dibuat dengan penambahan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sebanyak 170 mg/L sesuai standar baku konsentrasi media MS. Selanjutnya pada masing-masing media perlakuan ditambahkan akuades sampai volume 900 ml. Nilai pH larutan dibuat 5,75 dengan cara menambahkan KOH 1 N untuk menaikkan pH dan HCl 1 N untuk menurunkan pH. Akuades ditambahkan sampai volume 1 L. Agar ditambahkan sebanyak 7 gram. Larutan dipanaskan di atas *hot plate* sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* sampai larut sempurna. Larutan dituangkan ke dalam botol kultur steril sebanyak seperlima bagian. Botol kultur yang telah berisi media ditutup rapat dengan menggunakan kertas *aluminium foil*. Botol kultur diatur dalam keranjang *autoclave* dan dimasukkan ke dalam *autoclave*, kemudian disterilisasi selama 30 menit pada temperatur 121°C dan tekanan 1,5 atm. Setelah selesai disterilisasi, media dibiarkan dingin dan disimpan dalam rak kultur sampai saatnya digunakan untuk menanam eksplan. Botol kultur diberi label dengan menggunakan pensil sesuai dengan nama kelompok perlakuan.

#### *Sterilisasi eksplan*

Daun *R. verticillata* direndam dalam larutan encer detergen selama 3 menit lalu dibilas dengan air mengalir. Eksplan selanjutnya direndam dalam larutan *bleach* 45-50% selama 3 menit dan direndam dalam akuades steril selama 5 menit. Eksplan direndam dalam larutan *Dethan* 50% selama 5 menit dan direndam dalam akuades steril selama 5 menit. Eksplan direndam dalam larutan *Agrape* 50% selama 5 menit dan direndam dalam akuades steril selama 5 menit. Eksplan direndam dalam larutan alkohol 70% selama 10 detik dan direndam dalam akuades steril 3 kali masing-masing selama 5 menit.

#### *Induksi pembentukan kalus*

Eksplan daun yang telah steril ditanam dalam media inisiasi kalus. Media yang digunakan berupa media MS yang ditambah dengan NAA 2 mg/L dan kinetin 2 mg/L.

#### *Penanaman kalus pada media perlakuan*

Kalus yang diperoleh pada media inisiasi kalus dipindahkan (disubkultur) ke dalam media perlakuan dengan menggunakan pinset steril pada hari ke-31 (Aryati et al. 2005). Botol kultur selanjutnya ditutup dengan kertas *aluminium foil* dan diletakkan pada rak kultur. Botol kultur diinkubasi pada suhu kamar 25-27°C dan diberi cahaya berupa lampu neon 10 watt di dalam ruang kultur.

#### *Pengamatan pertumbuhan*

Pertumbuhan dan morfologi kalus diamati. Pengamatan tersebut meliputi warna kalus, tekstur kalus, dan berat basah kalus. Pemanenan kalus dilakukan pada hari ke-15 dari awal penanaman kalus pada media perlakuan dan dilakukan pengukuran berat basah akhir kalus, berat kering kalus, serta analisis kandungan reserpin.

Pengukuran berat basah kalus dilakukan dengan menimbang berat basah kalus awal (W<sub>1</sub>) dan berat basah kalus akhir (W<sub>2</sub>). Berat basah kalus awal diperoleh dengan menimbang kalus beserta botol kultur, media, dan *aluminium foil* pada hari ke-0 kemudian hasilnya dikurangi dengan berat botol, media, dan *aluminium foil* sebelum dilakukan penanaman. Berat basah kalus akhir diperoleh dengan menimbang kalus secara langsung pada akhir pengamatan yaitu pada hari ke-15 pada media perlakuan. Sementara itu, pengukuran berat kering kalus dilakukan dengan menimbang kalus segar yang telah dikeringkan di dalam inkubator pada suhu 38°C hingga beratnya konstan.

#### *Uji kandungan alkaloid reserpin*

Kalus segar dikeringkan dalam inkubator pada suhu 38°C selama 48 jam. Kalus yang sudah kering digerus dengan mortar, kemudian sebanyak 100 mg serbuk kalus dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml etanol p.a. dan divorteks sampai larutan homogen. Setelah larutan homogen, ddH<sub>2</sub>O dimasukkan ke dalam tabung reaksi sampai volume menjadi 100 ml. Ke dalam larutan ditambahkan 1 ml 0,3% sodium nitrit lalu divorteks sampai larutan homogen. Larutan dipanaskan dengan *waterbath* pada suhu 55°C selama 30 menit. Setelah dingin, larutan ditambah dengan 0,5 ml 5% larutan asam sulfamat.

#### **Teknik pengumpulan data**

Data yang diamati dalam penelitian ini meliputi pertumbuhan kalus dan produksi alkaloid reserpin yang terkandung dalam kalus tanaman *R. verticillata* pada setiap perlakuan yang diberikan. Pengamatan pertumbuhan kalus meliputi berat basah kalus, berat kering kalus, dan morfologi kalus (warna dan tekstur kalus), sedangkan pengambilan data untuk mengetahui produksi reserpin dilakukan secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

### Analisis data

Analisis kuantitatif dilakukan pada pengamatan parameter pertumbuhan kalus yang meliputi berat basah kalus, berat kering kalus, dan kandungan reserpin pada tiap perlakuan. Data kuantitatif dianalisis secara statistik dengan Analisis Varians (ANOVA) dilanjutkan dengan uji lanjut DMRT pada taraf 5%. Sementara itu, analisis kualitatif digunakan dalam pengamatan morfologi kalus yang meliputi warna dan tekstur kalus yang disajikan secara deskriptif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Induksi pembentukan kalus

Induksi kalus merupakan tahap awal yang harus dilakukan dalam kultur *in vitro*. Pada penelitian ini, eksplan yang digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus diambil dari daun muda (daun ke-2 atau ke-3 dari atas) tanaman *R. verticillata*. Umur fisiologis eksplan sangat penting dalam keberhasilan kultur *in vitro*, karena eksplan yang berasal dari jaringan muda (*juvenile*) masih aktif melakukan pembelahan sel untuk membentuk jaringan kalus dan inilah yang dibutuhkan sebagai eksplan dalam induksi kalus.

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media MS dengan penambahan NAA 2 mg/L dan kinetin 2 mg/L. Penggunaan NAA dan kinetin dengan konsentrasi yang seimbang mampu menginduksi terbentuknya kalus. Hal ini sesuai dengan pendapat George dan Sherington dalam Wattimena (1992) bahwa keseimbangan auksin dan sitokinin dalam kultur *in vitro* akan memacu terbentuknya kalus. Sitokinin memacu pembelahan sel dan auksin mempunyai efek membesarkan sel (Santoso dan Nursandi 2002).

Eksplan daun *R. verticillata* mulai menunjukkan pertumbuhan kalus pada hari ke-7 setelah penanaman pada media induksi kalus. Pembentukan kalus dimulai dengan pembengkakan eksplan dan terbentuknya struktur berwarna putih mengilat pada daerah-daerah bekas pelukaan. Bagian eksplan yang terinisiasi membentuk kalus, menurut Suryowinoto (1996), terjadi karena sel-sel yang kontak dengan media terutama pada bagian yang terluka terdorong menjadi bersifat meristematik dan aktif mengadakan pembelahan seperti jaringan penutup luka.

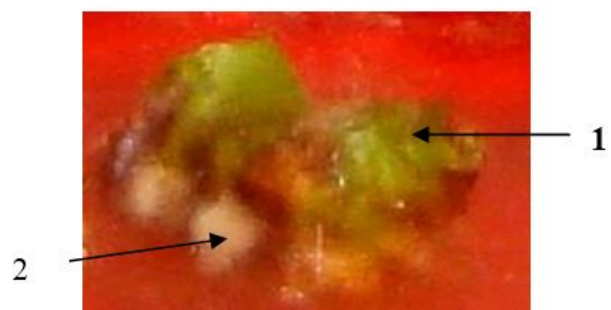
Tekstur kalus dari awal (hari ke-7) sampai akhir pengamatan (hari ke-31) adalah kompak (Gambar 1-2). Menurut Street (1973), tekstur kalus yang kompak mempunyai susunan sel-sel kalus yang rapat, padat, dan sel-selnya sulit untuk dipisahkan atau pecah menjadi klon sel tunggal. Warna kalus pada hari ke-7 relatif sama yaitu berwarna putih hijau kekuningan (Gambar 1), namun pada hari ke-31 terdapat kalus yang berubah warna menjadi kuning, kuning keputihan, coklat keputihan, dan kuning kecokelatan (Gambar 2). Menurut Giuliano et al. (1993) dalam Santoso dan Nursandi (2002), perubahan warna yang terjadi pada eksplan yang semula berwarna hijau lalu membentuk kalus berwarna putih atau putih kecokelatan

terjadi akibat proses dekomposisi klorofil yang secara biokimia dapat melalui: (i) hilangnya rantai *phyton* karena enzim klorofilase, sehingga terbentuk klorofilin/klorofilid yang menghasilkan warna hijau cerah; (ii) klorofilid dapat didekomposisi lebih lanjut menjadi *pheophorbides* (berwarna coklat) dan klorin (tidak berwarna); (iii) dapat terjadi karena fotooksidasi, sehingga  $Mg^{2+}$  hilang dan terbentuk *pheophytin* berwarna coklat dan hijau olive (keputihan). Kemungkinan yang lain dapat disebabkan oleh sumber eksplan yang tidak sama. Menurut Wattimena (1992), sel-sel yang berasal dari permukaan daun yang berbeda kadang-kadang memiliki daya regenerasi yang berbeda, sehingga kemampuan sel membentuk kloroplas juga berbeda. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), warna kalus yang bermacam-macam juga dapat disebabkan oleh adanya pigmentasi dari cahaya dan asal eksplan. Kalus yang dihasilkan dari daun biasanya lebih halus dan berwarna kecokelatan dan setelah lama di dalam media, kalus akan mati (Bajaj 1996).

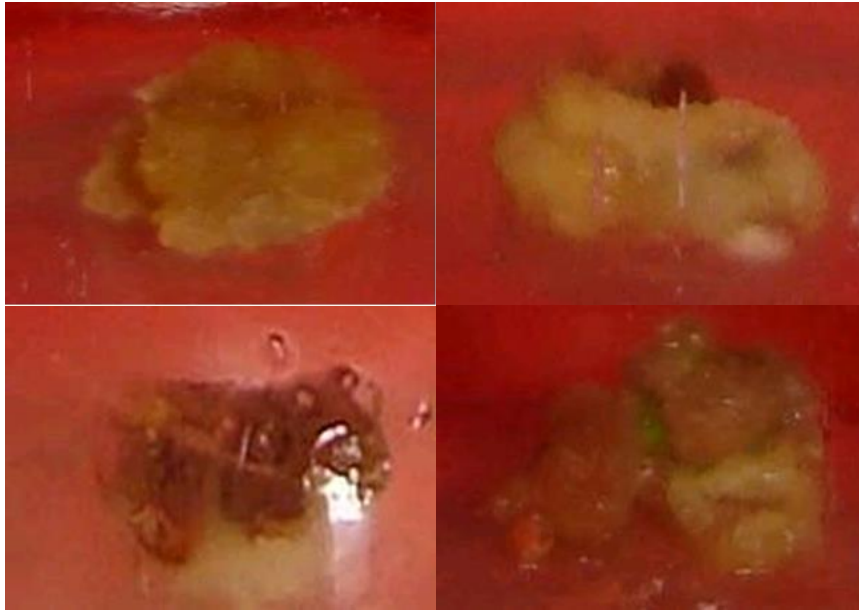
### Pertumbuhan kalus pada media perlakuan

Penanaman kalus pada media perlakuan merupakan tahap kedua yang harus dilakukan setelah induksi kalus. Kalus yang dipanen (setelah 31 hari) dari tahap induksi kalus langsung dipindah ke media perlakuan. Pengamatan pertumbuhan kalus pada media perlakuan meliputi morfologi, berat basah, berat kering, serta kandungan reserpin dalam kalus *R. verticillata*.

Tekstur kalus pada media perlakuan dari hari ke-0 sampai hari ke-15 tetap kompak, sedangkan warna kalus mengalami perubahan (Tabel 2). Warna kalus yang semula kuning kehijauan menjadi kuning kecokelatan, coklat muda menjadi coklat tua keputihan. Umumnya pada akhir perlakuan (hari ke-15) kalus berubah warna menjadi kecokelatan. Warna coklat pada kalus diduga karena kalus mengalami penuaan. Menurut Abdullah et al. (1998), sel-sel muda yang sehat akan menunjukkan warna kuning bening, namun akan berubah warna menjadi coklat seiring dengan pertumbuhan kalus yang semakin tua. Santoso dan Nursandi (2002) juga menyatakan bahwa peristiwa pencokelatan merupakan gejala alamiah dari proses penuaan.



**Gambar 1.** Morfologi kalus *R. verticillata* umur 7 hari pada media inisiasi. Warna = putih, hijau kekuningan. 1= Eksplan berupa daun yang belum membentuk kalus, 2 = eksplan yang mulai membentuk kalus.



**Gambar 2.** Morfologi kalus *R. verticillata* umur 31 hari pada media inisiasi. A = Kuning, B = kuning keputihan, C = coklat keputihan, D = kuning kecokelatan.



**Gambar 3.** Eksplan yang mengalami pencokelatan (*browning*), (A) dan eksplan yang tidak mengalami proses pencokelatan setelah 15 hari dalam media perlakuan (B).

Peristiwa pencokelatan juga dapat disebabkan karena sintesis senyawa fenolik. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), perubahan warna pada kalus menjadi coklat disebabkan adanya sintesis senyawa fenolik oleh kalus. Senyawa fenolik tersebut oleh pengaruh cahaya menyebabkan teroksidasinya fenol menjadi kuinon fenolik. Sintesis senyawa fenolik menurut Vickery-Vickery dalam Fitriani et al. (1999) terjadi karena adanya kondisi cekaman yang disebabkan oleh adanya luka dan media. Hal ini terlihat dari kalus umur-31 hari yang berasal dari media inisiasi sebagian besar sudah berwarna kecokelatan sebelum dipindahkan ke media perlakuan (umur 0 hari). Gambaran eksplan yang mengalami pencokelatan dan mampu terhindar dari proses pencokelatan setelah 15 hari dalam media perlakuan disajikan pada Gambar 3.

Santoso dan Nursandi (2002) menyatakan proses perubahan warna pada kalus merupakan peristiwa alamiah yang biasa terjadi pada sistem biologi sebagai suatu proses perubahan adaptif bagian tanaman akibat adanya pengaruh fisik atau biokimia (memar, pengupasan, pemotongan,

serangan penyakit, atau kondisi lain yang tidak normal) yang menyebabkan stress pada jaringan. Pada penelitian ini, media perlakuan yang digunakan berupa media MS dengan konsentrasi fosfor ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) yang diturunkan konsentrasinya menjadi 0 (kontrol),  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , dan  $\frac{3}{4}$  dari standar baku media MS. Kondisi media tersebut merupakan salah satu kondisi tidak normal (stres) yang diduga menyebabkan terjadinya proses perubahan warna kalus.

Fosfor merupakan komponen struktural dari sejumlah senyawa penting yaitu molekul pentransfer energi ADP dan ATP, NAD, NADPH, dan senyawa sistem informasi genetik DNA dan RNA (Gardner et al. 1999; Hopkins 1999). Menurut Dwijoseputro (1994), fosfor dan nitrogen mempunyai pengaruh timbal balik. Jika fosfat yang tersedia tidak cukup banyak maka nitrogen juga berkurang. Berdasarkan pernyataan tersebut dapat dinyatakan bahwa metabolisme nitrogen dalam sel tanaman melibatkan peran fosfor. Menurut Loveless (1991), reduksi nitrogen dalam proses metabolisme nitrogen berbentuk nitrat yang semuanya bersifat endergonik tidak hanya membutuhkan

donor electron, tetapi juga sumber ATP. ATP diperoleh melalui proses respirasi yang melibatkan fosfor inorganik dalam pembentukannya. Demikian juga dengan proses sintesis asam glutamat yang menduduki posisi penting dalam metabolisme nitrogen sekaligus sebagai penghasil asam  $\delta$ -aminolevulinat yang merupakan prekursor dari klorofil (Lea 1993). Menurut Loveless (1991), pembentukan asam glutamat membutuhkan donor hidrogen dari NADH atau NADPH pada proses respirasi maupun fotosintesis yang melibatkan fosfor dalam pembentukannya.

Defisiensi fosfor menyebabkan proses metabolisme nitrogen tidak berjalan lancar yang berakibat pada

menurunnya jumlah asam  $\delta$ -aminolevulinat yang merupakan prekursor klorofil, sehingga terjadi reduksi pembentukan klorofil. Reduksi pembentukan klorofil menyebabkan reduksi warna hijau pada kalus. Hal ini terlihat dari kalus pada perlakuan 0, 42,5, 85, dan 127,5 mg/L fosfor yang menunjukkan tidak adanya dominansi warna hijau. Kalus pada konsentrasi fosfor 170 mg/L (standar baku  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dalam media MS) seharusnya didominasi warna hijau yang menunjukkan cukup tersedianya fosfor, namun kenyataannya tidak. Hal ini diduga karena terjadinya degradasi klorofil sejak kalus berumur 31 hari pada media inisiasi, sehingga pada media perlakuan warna hijau kalus semakin berkurang.

**Tabel 2.** Warna dan tekstur kalus *R. verticillata* pada awal dan akhir perlakuan

Perlakuan	Ulangan	Tekstur kalus		Warna kalus	
		Hari ke-0	Hari ke-15	Hari ke-0	Hari ke-15
P1	1	Kompak	Kompak	Cokelat keputihan	Cokelat tua kehijauan
	2	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Kuning kehijauan
	3	Kompak	Kompak	Cokelat muda keputihan	Cokelat keputihan
	4	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Kuning kecokelatan
	5	Kompak	Kompak	Hijau muda	Cokelat kekuningan
P2	1	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Putih kekuningan
	2	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Kuning keputihan
	3	Kompak	Kompak	Cokelat muda keputihan	Cokelat tua keputihan
	4	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Kuning keputihan
	5	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Cokelat keputihan
P3	1	Kompak	Kompak	Cokelat muda	Cokelat keputihan
	2	Kompak	Kompak	Cokelat muda	Cokelat keputihan
	3	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Kuning kehijauan
	4	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Kuning kehijauan
	5	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Kuning kecokelatan
P4	1	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Kuning kehijauan
	2	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Cokelat kehijauan
	3	Kompak	Kompak	Kuning keputihan	Cokelat kekuningan
	4	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Cokelat
	5	Kompak	Kompak	Cokelat muda keputihan	Cokelat tua keputihan
P5	1	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Kuning kecokelatan
	2	Kompak	Kompak	Cokelat muda keputihan	Cokelat tua keputihan
	3	Kompak	Kompak	Kuning keputihan	Kuning kehijauan
	4	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Kuning kecokelatan
	5	Kompak	Kompak	Kuning keputihan	Kuning kecokelatan

Keterangan: P = Konsentrasi  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , P<sub>1</sub> = 0 mg/L (kontrol), P<sub>2</sub> = 42,5 mg/L, P<sub>3</sub> = 85 mg/L, P<sub>4</sub> = 127,5 mg/L, P<sub>5</sub> = 170 mg/L (standar baku media MS).

**Tabel 3.** Rata-rata berat basah, berat kering dan kadar reserpin kalus *R. verticillata* setelah 15 hari pada media perlakuan

	Perlakuan Variasi Konsentrasi Fosfor				
	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>5</sub>
Rata-rata berat basah (gram)	0,1777 <sup>a</sup>	0,288 <sup>a</sup>	0,921 <sup>b</sup>	0,4954 <sup>ab</sup>	0,456 <sup>ab</sup>
Rata-rata berat kering (gram)	0,067 <sup>ab</sup>	0,0614 <sup>a</sup>	0,1188 <sup>b</sup>	0,0822 <sup>ab</sup>	0,0674 <sup>ab</sup>
Rata-rata kadar reserpin (mg/g)	0,22494 <sup>b</sup>	0,13278 <sup>a</sup>	0,24882 <sup>bc</sup>	0,3279 <sup>c</sup>	0,07002 <sup>a</sup>

Keterangan: P = Konsentrasi  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , P<sub>1</sub> = 0 mg/L (kontrol), P<sub>2</sub> = 42,5 mg/L, P<sub>3</sub> = 85 mg/L, P<sub>4</sub> = 127,5 mg/L, P<sub>5</sub> = 170 mg/L (standar baku media MS). Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada baris yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5%.

### Berat basah kalus

Berat basah kalus diperoleh dengan cara menimbang kalus pada awal dan akhir perlakuan. Berat basah dapat digunakan untuk mengukur pertumbuhan kalus, namun tidak dapat dijadikan standar karena berat basah dipengaruhi oleh status air yang berada di dalam sel, metabolisme tanaman, dan kondisi kelembapan tanaman (Sitompul dan Guritno 1995). Dodds dan Robert (1995) juga menyatakan bahwa penambahan berat basah kalus tidak dapat digunakan dalam memperkirakan rata-rata jumlah sel dan pembelahan sel yang terjadi, namun dapat dijadikan sebagai parameter pertumbuhan karena merupakan metode tercepat untuk mengikuti pertumbuhan massa jaringan dan menunjukkan aktivitas metabolisme dalam kalus.

Hasil analisis varians dan uji DMRT pada taraf signifikansi 5% menunjukkan bahwa konsentrasi fosfor  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  yang diberikan pada tiap perlakuan berpengaruh nyata terhadap berat basah kalus. Rata-rata berat basah kalus tertinggi diperoleh pada media  $P_3$  (konsentrasi  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  85 mg/L), sedangkan rata-rata berat basah terendah diperoleh pada media  $P_1$  (kontrol) (Tabel 3). Media  $P_1$  merupakan media perlakuan tanpa penambahan fosfor ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Hal ini serupa dengan penelitian Estime et al. (2001) tentang pengaruh konsentrasi fosfor dalam media Gamborg pada *Typha latifolia* yang menunjukkan bahwa pada media perlakuan tanpa fosfor terjadi penurunan berat basah kalus sebesar 42% dari standar baku media Gamborg. Secara umum, terjadi peningkatan berat basah kalus mulai dari awal perlakuan sampai akhir perlakuan meskipun peningkatan berat basah dari masing-masing perlakuan tidak sama. Perbedaan tinggi rendahnya berat basah kalus pada tiap perlakuan diduga disebabkan oleh kemampuan jaringan dalam menyimpan air dan unsur hara yang berbeda-beda.

Berat basah kalus dipengaruhi oleh kemampuan sel dalam melakukan proses difusi, osmosis, dan tekanan turgor (Sriyanti 2000). Menurut Abidin (1990), sel-sel yang berada pada lapisan luar dan kontak dengan media lebih mudah untuk menyerap air daripada sel yang berada pada lapisan dalam. Dalam penelitian ini, struktur kalus yang diperoleh tidak rata, sehingga tidak semua sel mampu menyentuh media. Hal ini terlihat pada perlakuan  $P_5$  (konsentrasi  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  170 mg/L) yang merupakan standar baku media MS dan ternyata berat basah yang diperoleh lebih rendah daripada  $P_3$  dan  $P_4$ . Menurut Wattimena (1992), pengaruh fosfor bekerja sama dengan ion  $\text{K}^+$ .

Berat basah kalus dipengaruhi oleh jumlah air dalam kalus dan masuknya air ke dalam sel dipengaruhi oleh ion  $\text{K}^+$ . Kalium (K) merupakan penentu utama potensial osmotik sel dan tekanan turgor sel (Salisbury dan Ross 1995). Pengambilan  $\text{K}^+$  mengurangi potensial air di dalam sel, akibatnya air mudah masuk ke dalam sel dan sel akan membesar. Ion  $\text{K}^+$  dalam  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  berperan dalam pengambilan air oleh sel kalus, sehingga pengurangan konsentrasi fosfor ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) dalam media diduga dapat mengurangi masuknya air ke dalam sel-sel kalus.

Sumber eksplan dari tanaman yang berbeda diduga juga turut mempengaruhi berat basah kalus meskipun sama-

sama berasal dari daun ke-2 dan ke-3. Kedudukan bagian tanaman yang berbeda diduga memiliki jumlah auksin endogen yang tidak sama antara daun satu dengan daun lainnya. Auksin dapat meningkatkan permeabilitas sel terhadap air, sehingga kandungan auksin endogen yang tidak sama dapat menyebabkan permeabilitas sel terhadap air yang juga berbeda.

### Berat kering kalus

Berat kering merupakan parameter pertumbuhan yang dapat digunakan sebagai ukuran global pertumbuhan tanaman dengan segala peristiwa yang dialaminya. Menurut Sitompul dan Guritno (1995), bahan kering merupakan manifestasi dari semua proses dan peristiwa yang terjadi dalam pertumbuhan tanaman. Berat kering kalus didapatkan dengan pengurangan kadar air dan penghentian aktivitas metabolisme hingga mencapai berat konstan.

Hasil analisis varians dan uji DMRT pada taraf signifikansi 5% menunjukkan bahwa konsentrasi fosfor ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) yang diberikan pada tiap perlakuan menunjukkan perbedaan yang tidak nyata terhadap berat kering kalus. Rata-rata berat kering kalus tertinggi diperoleh pada media  $P_3$  (konsentrasi  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  85 mg/L) dan berat kering terendah diperoleh pada media  $P_2$  (konsentrasi  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  42,5 mg/L) (Tabel 3). Secara umum, terjadi fluktuasi berat kering dengan kisaran yang tidak terlalu jauh pada tiap-tiap perlakuan ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ). Besarnya berat kering berhubungan dengan proses fotosintesis dan respirasi. Penurunan berat kering disebabkan oleh rendahnya laju fotosintesis dan meningkatnya respirasi untuk menyediakan prekursor dan energi dalam pembentukan metabolit sekunder. Menurut Gardner et al. (1991), hasil berat kering tanaman merupakan keseimbangan antara fotosintesis dan respirasi. Fotosintesis mengakibatkan peningkatan berat kering tanaman karena pengambilan karbon dioksida, sedangkan respirasi mengakibatkan penurunan berat kering karena pengeluaran karbon dioksida. Hopkins (1999) menyatakan proses fotosintesis dipengaruhi oleh berbagai faktor, salah satunya adalah suplai nutrisi dalam tanaman. Fosfor sangat dibutuhkan dalam proses fotosintesis dan respirasi, terutama dalam pembentukan ATP pada fotofosforilasi dan fosforilasi oksidatif (Jumin 1992). Pengurangan fosfor dalam media menyebabkan terhambatnya laju fotosintesis dan respirasi sehingga mempengaruhi berat kering kalus.

Fosfor juga mempunyai pengaruh timbal balik dengan nitrogen. Menurut Prawiranata et al. (1995), asimilasi nitrogen dalam tanaman mempengaruhi penggunaan karbohidrat yang dihasilkan dari proses fotosintesis, sehingga jumlah karbohidrat yang telah ada atau karbohidrat yang akan dibentuk menjadi berkurang. Dalam proses asimilasi nitrogen, dibutuhkan energi pereduksi yang berasal dari proses respirasi berupa NADH untuk mereduksi nitrat menjadi asam amino. Pembentukan NADPH dan NADH dalam proses respirasi membutuhkan peran fosfor, sehingga konsentrasi fosfor dalam tanaman secara tidak langsung mempengaruhi asimilasi nitrogen untuk menghasilkan asam amino.

### Analisis alkaloid reserpin dalam kalus *R. verticillata*

Hasil analisis varian dan uji DMRT pada taraf signifikansi 5% juga menunjukkan bahwa konsentrasi fosfor berpengaruh nyata terhadap produksi reserpin dalam kalus *R. verticillata*. Rata-rata kadar reserpin tertinggi diperoleh pada media P<sub>4</sub> (konsentrasi KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 127,5 mg/L) (Tabel 3). Menurut Wattimena (1992), ekspresi senyawa metabolit sekunder tidak hanya tergantung pada diferensiasi sel-sel yang aktif membelah, dapat menyebabkan kenaikan biomassa jaringan dalam pertumbuhan kalus, melainkan juga tergantung pada aktivitas enzim. Jumlah enzim yang aktif dalam metabolisme sekunder merupakan resultan dari sintesis dan degradasi enzim yang terjadi selama proses metabolisme. Peningkatan jumlah enzim yang terlibat dalam metabolisme sekunder akan meningkatkan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan. Ramawat (1999b) juga menyatakan bahwa jalur metabolisme sekunder pada sel eukariotik dan prokariotik dihambat oleh level Pi (fosfor inorganik) yang mampu mengoptimalkan pertumbuhan. Konsentrasi Pi yang rendah menguntungkan dalam proses pembentukan metabolit sekunder.

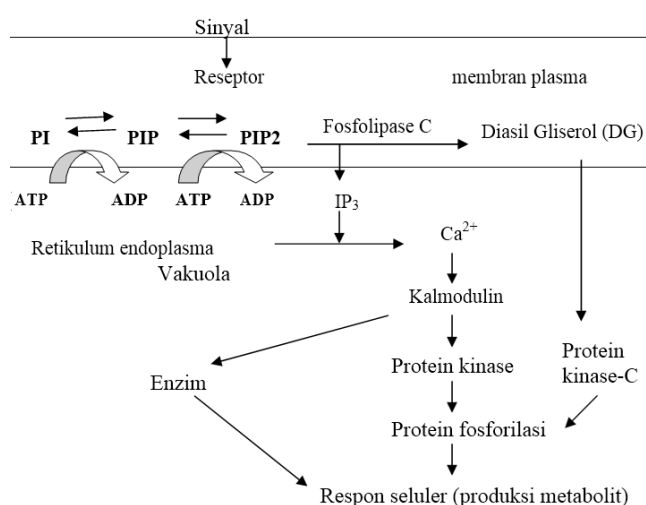
Pada media P<sub>2</sub> dengan konsentrasi KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 42,5 mg/L, hasil yang diperoleh menunjukkan produksi reserpin yang lebih rendah dibandingkan dengan P<sub>1</sub> dan P<sub>3</sub>. Menurut Luckner (1980) dalam Toruan et al. (1990), produksi metabolisme sekunder di dalam sel pada dasarnya dikontrol oleh serangkaian faktor, salah satunya adalah lokalisasi serangkaian enzim yang diperlukan untuk sintesis. Shank et al. (1998) dan Ruyter et al. (1990) juga menyatakan bahwa cara yang optimal dalam meningkatkan metabolit sekunder adalah dengan melakukan identifikasi, isolasi, dan karakterisasi enzim-enzim yang terlibat dalam jalur biosintesis metabolit sekunder. Enzim spesifik dalam sintesis reserpin selama ini belum diketahui dengan pasti, sehingga optimalisasi produksi reserpin belum dapat dilakukan secara spesifik dengan mengarahkan perlakuan atau manipulasi media langsung pada pengaktifan enzim yang memproduksi reserpin. Hasil penelitian Shank et al. (1998) pada kultur rambut akar *Catharanthus roseus* dalam media Gamborg yang ditumbuhkan dalam kondisi gelap, suhu 26°C dan penambahan sukrosa 3% mampu meningkatkan produksi *lechnericine*, namun menurunkan produksi tabersonin. Rendahnya kadar reserpin pada P<sub>2</sub> diduga terjadi karena konsentrasi fosfor 42,5 mg/L kurang efektif dalam mengaktifkan enzim yang berperan dalam sintesis reserpin, namun mengaktifkan enzim alkaloid indol monoterpenoid lain yang juga terdapat pada kalus *R. verticillata*. Perbedaan kepekaan sel diduga juga turut berpengaruh terhadap metabolit sekunder dan pertumbuhan kalus. Toruan et al. (1990) melaporkan radiasi dengan dosis 2500 rad dapat meningkatkan kandungan diosgenin kalus *Costus speciosus* lebih tinggi dari eksplan asalnya.

Secara umum, konsentrasi fosfor yang rendah dalam media MS menyebabkan terjadinya peningkatan reserpin. Kandungan reserpin dipengaruhi oleh besarnya sumber fosfor yang ditambahkan ke dalam media. Menurut Ramawat (1999b), pengurangan nutrisi dalam media menyebabkan terjadinya stres pada jaringan yang menyebabkan pertumbuhan kalus memasuki fase stasioner.

Pada fase stasioner, metabolit primer diubah menjadi metabolit sekunder. Menurut Salisbury dan Ross (1995), sel mengalami tahap resistensi atau masa adaptasi terhadap faktor cekaman (konsentrasi fosfor). Pada tahap adaptasi, sel berusaha mempertahankan diri dengan cara mensintesis metabolit sekunder.

Defisiensi fosfor dalam media berpengaruh terhadap kandungan reserpin. Wilson dan Marron (2006) yang meneliti tentang produksi anthraquinon pada kultur suspensi *Galium mollugo* L. menyatakan bahwa produksi anthraquinon dipengaruhi oleh konsentrasi fosfor yang rendah dalam media kultur. Dougal dan Weyrarch dalam Wattimena (1992) juga menyatakan bahwa produksi antosianin pada kultur suspensi sel wortel dikontrol oleh konsentrasi fosfat dalam media.

Ketersediaan sumber fosfor dalam media mempengaruhi proses sintesis metabolit sekunder. Martin (2004) menyatakan bahwa fosfat mampu mengontrol sinyal dalam biosintesis antibiotik. Kontrol fosfat terhadap metabolit sekunder (sintesis antibiotik) tersebut terjadi pada proses transkripsi dan sesudah transkripsi. Fosfor berperan sangat penting dalam proses fotosintesis, terutama dalam pembentukan karbohidrat (sukrosa) (Gardner et al. 1991; Jumin 1992). Menurut Wattimena (1992), pengaruh fosfor dalam membentuk metabolit sekunder diduga bekerja sama dengan sukrosa. Menurut Jang dan Sheen dalam Merillon dan Ramawat (1999), gula selain sebagai sumber energi dan komponen struktural, juga mampu bertindak dalam pengaturan sinyal yang berpengaruh terhadap ekspresi gen pada beberapa proses penting dalam sel, salah satunya adalah sintesis metabolit sekunder. Sel tanaman menggunakan heksokinase sebagai sensor gula dan fosfatase protein serta protein kinase dipengaruhi oleh sinyal tersebut. Mekanisme penghantaran sinyal ditunjukkan pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Mekanisme penghantaran sinyal ekstraseluler pada membran plasma (Srivastava dan Gupta 1996)

Sinyal dari luar (stres fosfor) ditangkap oleh reseptor yang terdapat pada membran plasma. Fosfatidilinositol (PI) yang merupakan *second messenger* difosforilasi menjadi fosfatidil inositol bifosfat (PIP) oleh kinase. Fosfoinositid didegradasi menjadi inositol trifosfat (IP<sub>3</sub>) dan diasilgliserol oleh fosfolipase-C dan IP<sub>3</sub> dapat mengeluarkan kalsium dari retikulum endoplasma atau vakuola masuk ke sitosol. Naiknya Ca<sup>2+</sup> di sitosol akan mengaktifkan beberapa enzim tertentu, termasuk protein kinase. Protein kinase memfosforilasi protein/enzim yang mengatur berbagai tahap metabolisme, termasuk produksi metabolit sekunder (Merillon dan Ramawat 1999).

Hasil dan pembahasan pada penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi fosfor berpengaruh terhadap pertumbuhan dan kandungan reserpin kalus *R. verticillata*. Rata-rata berat basah dan kering kalus tertinggi diperoleh pada konsentrasi fosfor 85 mg/L, sedangkan berat basah kalus terendah diperoleh pada konsentrasi 0 mg/L (kontrol) dan berat kering kalus terendah pada 42,5 mg/L. Kadar fosfor (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) di bawah standar media MS menghasilkan kadar reserpin yang lebih tinggi, semakin rendah kadar fosfor pada media MS maka kadar reserpin semakin rendah. Kadar reserpin tertinggi dihasilkan oleh kalus *R. verticillata* pada kadar fosfor 127,5 mg/L, sedangkan kadar reserpin terendah diperoleh pada kadar fosfor 42,5 mg/L.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil pengamatan dan pembahasan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut. Konsentrasi fosfor (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) yang rendah dalam media MS menghambat pertumbuhan kalus. Rata-rata berat basah dan kering kalus tertinggi diperoleh pada konsentrasi fosfor 85 mg/L, sedangkan berat basah kalus terendah diperoleh pada konsentrasi 0 mg/L dan berat kering kalus terendah pada konsentrasi 42,5 mg/L. Sementara itu, kadar fosfor (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) di bawah standar media MS menghasilkan kadar reserpin yang lebih tinggi, semakin rendah kadar fosfor pada media MS maka kadar reserpin semakin rendah. Kadar reserpin tertinggi dihasilkan oleh kalus *R. verticillata* pada kadar fosfor 127,5 mg/L, sedangkan kadar reserpin terendah diperoleh pada kadar fosfor 42,5 mg/L. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh konsentrasi fosfor yang rendah dalam media MS pada rentang konsentrasi antara 0 mg/L dan 42,5 mg/L, sehingga didapatkan konsentrasi terbaik untuk meningkatkan produksi reserpin kalus *R. verticillata* dengan kultur kalus atau kultur suspensi sel.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah MA, Marziah M, Lajis NH et al. 1998. Establishment of cell suspension cultures of *M. elliptica* for the production of anthraquinones. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 54: 173-182.
- Abidin Z. 1994. Dasar-dasar pengetahuan tentang zat pengatur tumbuh. Penerbit Angkasa, Bandung.
- Aryati H, Solichatun, Anggarwulan E. 2005. Pengaruh penambahan DL triptofan terhadap pertumbuhan kalus dan produksi alkaloid-reserpin pule pandak [*Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex. Kruz]. *Biofarmasi* 3(2): 52-56.
- Bajaj YPS. 1986. *Biotechnology in agriculture and forestry, Volume 37. Medicinal and Aromatic Plants IX*. Springer-Verlag, Berlin.
- De Padua LS, Bunyapraphatsara N, Lemmens RHMJ. 1999. Pule pandak. PROSEA: Plant Resources of South-East Asia, Bogor.
- Dodds JH, Roberts LW. 1995. *Experiments in plants tissue culture*. Cambridge University Press, New York.
- Dwijoseputro AR. 1994. *Pengantar fisiologi tumbuhan*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Ediati. 1997. Kelarutan batu ginjal, kolesterol, asam urat, dan kalsium dalam ekstrak buah kejobong dan tempuyung in vitro. *Majalah Farmasi Indonesia* 8(2): 9-11.
- Estime L, O'Shea M, Borst M. 2001. Effect of phosphorus concentration on the growth of cattail callus cells. *Environmental Protection Agency* 3: 290.
- Fitriani A, Siregar A, Esyanti RR. 1999. Pengaruh pemberian homogenat *Phythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. terhadap kandungan ajmalisin dalam kultur kalus tapak dara. *Hayati* 6(3): 65-69.
- Gardner FP, Pearce RB, Mitchell RI. 1991. *Fisiologi tanaman budidaya*. (Diterjemahkan oleh: Susilo H). UI Press, Jakarta.
- Hargono DJ. 1997. Obat tradisional dalam zaman teknologi. *Majalah Kesehatan Masyarakat* 56: 3-6.
- Hendaryono DPS, Wijayani A. 1994. *Teknik kultur jaringan*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Hopkins WG. 1999. *Introduction to plant physiology*. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Jumin HB. 1992. *Ekologi tanaman, suatu pendekatan fisiologis*. Rajawali Pers, Jakarta.
- Kulkarni RN, Ravinda NS. 1988. Resistance to *Pythium aphanidermatum* in diploids and induced autotetraploids of *Catharanthus roseus*. *Planta Med* 54(4): 356-359.
- Lea JP. 1993. Nitrogen metabolism. In: Lea JP, Leegood RC (eds). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York.
- Loveless AR. 1991. *Prinsip-prinsip biologi tumbuhan untuk daerah tropik 1*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Martin JF. 2004. Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: An unfinished story. *J Bacteriol* 186(16): 5197-5201.
- Merillon JM, Ramawat KG. 1999. Mechanism and control. In: Ramawat KG, Merillon JM (eds). *Biotechnology Secondary Metabolites*. Science Publishers, New Hampshire.
- Prawiranata W, Harran S, Tjondronegoro P. 1995. *Dasar-dasar fisiologi tumbuhan*. Jilid ke-2. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Ramawat KG. 1999a. Production in culture optimization. In: Ramawat KG, Merillon JM (eds). *Biotechnology Secondary Metabolites*. Science Publishers, New Hampshire.
- Ramawat KG. 1999b. Secondary plant product in nature. In: Ramawat KG, Merillon JM (eds). *Biotechnology Secondary Metabolites*. Science Publishers, New Hampshire.
- Rowe JW. 1989. *Natural products of woody plants I*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Ruyter CM, Akram M, Illahi I et al. 1990. Investigation of the alkaloid content of *Rauwolfia serpentina* roots from regenerated plants. *Planta Med* 62: 350-355.
- Salisbury FB, Ross CW. 1995. *Fisiologi tumbuhan*. (Diterjemahkan oleh: Padmawinata K). Penerbit ITB, Bandung.
- Santoso U, Nursandi F. 2002. *Kultur jaringan tanaman*. Penerbit UMM Press, Malang.
- Shanks JV, Bhadra R, Morgan J et al. 1998. Quantification of metabolites in the indole alkaloid pathways of *Catharanthus roseus*: Implication for metabolic engineering. *Biotechnol Bioeng* 58: 333-338.
- Singh KD, Sahu A, Srivastava B. 2004. Spectrophotometric determination of *Rauwolfia* alkaloid: Estimation of reserpine in pharmaceuticals. *Analytical Sciences*. The Japan Society for Analytical Chemistry 20, Japan.
- Sitompul SM, Guritno B. 1995. *Analisis pertumbuhan tanaman*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Soemantri. 1993. *Masalah Pengembangan Teknologi Sediaan Fitofarmaka*. Warta Tumbuhan Obat Indonesia.
- Srivastava PC, Gupta UC. 1996. *Trace elements in crop production*. Science Publishers Inc., New Delhi.
- Sriyanti DP. 2000. Pelestarian tanaman nilam (*Pogostemon heyneanus* Benth.) melalui kultur mikrostek. *Biosmart* 2 (2): 19-22.
- Street HE. 1973. *Plant tissue and cell culture*. University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
- Suryowinoto M. 1996. *Pemuliaan tanaman secara in vitro*. Kanisius, Yogyakarta.
- Taiz L, Zeiger E. 1998. *Plant physiology*. Sineur Associates, Inc. Publishers, Massachusetts.

- Toruan N, Solahuddin S, Winata L et al. 1990. Pengaruh 2,4-D, kolesterol dan radiasi Co-60 terhadap pertumbuhan dan kandungan diosgenin dalam kultur jaringan *Costus speciosus*. Forum Pascasarjana 13(1): 1-14.
- Wattimena GA. 1992. Bioteknologi tanaman. Penerbit ITB, Bandung.
- Wetter LR, Constabel F. 1991. Plant cell suspension culture and their biosynthetic potential. Metode Kultur Jaringan Tanaman. (Diterjemahkan oleh: Widiyanto MB). Penerbit ITB, Bandung.
- Wilson G, Marron P. 2006. Growth and antithraquinone biosynthesis by *Galium molluga* L. cells in batch and chemostat culture. Department of Botany, University College, Dublin, Ireland. [www.anthraquinonei.co.id](http://www.anthraquinonei.co.id). [25 Juni 2006].