

## Pertumbuhan dan kandungan reserpin kultur kalus *Rauvolfia verticillata* pada variasi konsentrasi sukrosa dalam media MS

### The growth and reserpine content of callus culture of *Rauvolfia verticillata* on the variation of sucrose concentration in MS medium

IRMAWATI, SOLICHATUN, ENDANG ANGGARWULAN

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

Manuskrip diterima: 30 Januari 2007. Revisi disetujui: 27 Februari 2007.

**Abstract.** Irmawati, Solichatun, Anggarwulan E. 2007. The growth and reserpine content of callus culture of *Rauvolfia verticillata* on the variation of sucrose concentration in MS medium. *Biofarmasi* 5: 38-46. The aim of this research was to study the effect of the variation of sucrose concentration on the growth and reserpine content on callus culture of *Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon. The research was conducted with the callus culture method consisting of two stages. The first stage was callus initiation to induce callus from leaf explant of *R. verticillata*, and the second stage was the reserpine production on the treatment medium. This research used a Completely Randomized Design (CRD) by one factor, i.e., the variation of sucrose concentration. The sucrose concentration consisted of five levels, i.e., 0 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L, and 40 g/L, each concentration in five replicates. The collected data consisted of qualitative and quantitative data. The qualitative data, callus morphology, were presented descriptively. The quantitative data, including fresh weight callus, dry weight callus, and reserpine content, were analyzed using ANOVA and followed by DMRT at a 5% significance level. The result of the research showed that the variation of sucrose concentration influenced fresh weight callus, dry weight callus, and reserpine content. The increase of sucrose concentration tended to raise callus growth, which could be seen from the fresh and dry weight callus. The highest fresh weight callus was found in medium with a sucrose concentration of 20 g/L, while the highest dry weight callus was found in medium with a sucrose concentration of 40 g/L. Increasing sucrose concentration until 30 g/L raised reserpine content, but the sucrose concentration over 30 g/L decreased the reserpine content.

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

### PENDAHULUAN

Kesehatan merupakan masalah yang sangat penting dalam kehidupan. Berbagai jenis penyakit sekarang ini banyak menyerang masyarakat. Sejalan dengan hal itu, berbagai jenis obat-obatan telah dimanfaatkan untuk mengatasi penyakit, baik obat sintetik maupun obat alami (tradisional). Salah satu bahan baku obat adalah senyawa-senyawa kimia yang terdapat dalam tumbuhan. Tumbuhan yang berkhasiat sebagai obat misalnya *Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon. Tumbuhan ini mengandung senyawa kimia reserpin yang bermanfaat sebagai obat tekanan darah tinggi (antihipertensi) (LIPI 1999).

Kebutuhan senyawa kimia dalam tumbuhan obat semakin meningkat, tetapi keberadaan tumbuhan yang bersangkutan semakin langka. Kelangkaan tumbuhan obat ini diantaranya disebabkan oleh penggunaan yang terus-menerus serta laju pemanenan dan pemanfaatan yang lebih tinggi dibanding laju kemampuan alam untuk memulihkan populasinya. Untuk mengatasi hal tersebut dibutuhkan suatu teknologi agar diperoleh senyawa metabolit sekunder dari tumbuhan secara optimal dengan tidak menyebabkan kepunahan tumbuhan yang bersangkutan (Mulabagal dan Tsay 2004).

Kultur in vitro merupakan salah satu teknik yang dapat digunakan untuk memproduksi metabolit sekunder hanya

dengan menggunakan bagian tertentu dari suatu tumbuhan. Dengan kultur in vitro, produksi metabolit sekunder dapat diperoleh setiap saat karena tidak tergantung pada kondisi lingkungan, seperti iklim dan kondisi tanah (Fisher et al. 1999). Menurut Ramachandra (2000), produksi metabolit sekunder yang bernilai ekonomi tinggi melalui kultur in vitro dapat diperoleh melalui beberapa metode khusus antara lain pemilihan klon sel, pemberian prekursor, elisitasi, serta manipulasi faktor lingkungan dan media.

Optimalisasi produksi metabolit sekunder dengan manipulasi media dapat dilakukan dengan cara memanipulasi faktor fisik dan optimalisasi elemen nutrisi (Choi et al. 1994 dalam Mulabagal dan Tsay 2004). Penambahan sumber karbon pada media kultur dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder. Menurut Manuhara (1995), kandungan alkaloid vinkristin *Catharanthus roseus* meningkat setelah penambahan sumber karbon berupa sukrosa pada media kultur. Penambahan kombinasi sukrosa dan glukosa juga dapat meningkatkan kandungan saponin pada kultur kalus *Talinum paniculatum* (Suskendriyati 2003).

Berdasarkan uraian tersebut di atas, penelitian ini dilakukan untuk mengkaji pengaruh pemberian variasi konsentrasi sukrosa dalam media MS terhadap pertumbuhan dan kandungan reserpin kalus *R. verticillata*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk: (1) mempelajari

pengaruh variasi konsentrasi sukrosa dalam media MS terhadap pertumbuhan kalus *R. verticillata*, dan (2) mempelajari pengaruh variasi konsentrasi sukrosa dalam media MS terhadap kandungan reserpin kalus *R. verticillata*.

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama enam bulan yaitu bulan Mei-November 2006, bertempat di Sub Laboratorium Biologi, Laboratorium Pusat MIPA Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta.

### Bahan dan alat

Bahan yang digunakan sebagai berikut. Tanaman yang digunakan sebagai sumber eksplan adalah *Rauwolfia verticillata* yang diperoleh dari Tawangmangu, Karanganyar. Daun *R. verticillata* yang digunakan adalah daun ketiga dari pucuk. Bahan yang digunakan untuk sterilisasi eksplan adalah air mengalir, akuades steril, Dithane 3%, agrape 2%, dan alkohol 70%. Bahan-bahan untuk pembuatan media inisiasi kalus terdiri dari bahan-bahan kimia pada komposisi dasar media Murashige Skoog (MS), bahan pematat berupa agar 7 g/L, KOH 1N, HCl 1N, NAA 2 mg, kinetin 2 mg, dan akuades. Media perlakuan menggunakan bahan-bahan kimia seperti pada media inisiasi kalus yang ditambah sukrosa dengan variasi konsentrasi 0 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L, dan 40 g/L (modifikasi dari Manuhara 1995; Suskendriyati 2003). Bahan kimia yang digunakan untuk analisis kandungan reserpin adalah etanol p.a., akuabides, asam sulfamat 5%, sodium nitrit 0,3%, dan senyawa reserpin murni.

Alat-alat yang digunakan sebagai berikut. Untuk sterilisasi alat dan media digunakan autoklaf yang telah diatur pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm. Peralatan yang digunakan meliputi timbangan analitik, gelas beker, gelas ukur, pipet volume, pipet tetes, spatula, pH-meter, botol kultur, *aluminium foil*, *hot plate* dengan *magnetic stirrer*, kertas label, dan karet gelang. Alat-alat yang digunakan adalah *laminar air flow cabinet*, *bunsen burner*, cawan petri, gunting, pinset, skalpel, tisu, dan *hand sprayer*. Alat yang digunakan meliputi mortar dan *pestle*, tabung reaksi, pipet volum, kertas saring, vorteks, *waterbath*, dan spektrofotometer UV-Visible (Shimadzu UV-160 IPC).

### Rancangan percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan satu faktor perlakuan, yaitu penambahan sukrosa dengan lima taraf konsentrasi (0 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L, dan 40g/L) dengan lima ulangan. Penentuan taraf perlakuan ini berdasarkan pada penelitian yang telah dilakukan oleh Manuhara (1995) dan Suskendriyati (2003).

### Cara kerja

#### *Sterilisasi alat*

Alat-alat dan botol kultur dicuci dengan detergen, dibilas dengan air kemudian dikeringkan. Setelah kering,

botol kultur dan alat yang berbentuk botol atau tabung ditutup dengan *aluminium foil*, sedangkan alat-alat lainnya seperti skalpel, pinset, spatula, dan pipet dibungkus dengan kertas. Semua alat dan botol kultur disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama satu jam.

#### *Pembuatan larutan stok*

Bahan-bahan kimia untuk stok media MS ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 50 ml akuades dalam gelas beker dan diaduk dengan *magnetic stirrer*. Setelah bahan larut, volume ditetapkan hingga 100 ml, kemudian larutan dimasukkan ke dalam botol stok dan diberi label. Untuk larutan Fe EDTA, setelah larutan Na<sub>2</sub>EDTA dilarutkan baru ditambahkan serbuk Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Setelah bahan kimia larut, volume ditetapkan hingga 100 ml, kemudian dimasukkan dalam botol stok dan diberi label. Semua botol berisi larutan stok ditutup dengan *aluminium foil*, lalu disimpan dalam lemari es.

#### *Pembuatan media: Media inisiasi kalus*

Gelas beker volume 1 liter diletakkan di atas *hot plate* dan diisi dengan akuades hingga sepertiganya, kemudian masing-masing larutan stok dimasukkan sesuai dengan komposisi media MS. Sukrosa 30 g ditambahkan ke dalam gelas piala dan diaduk hingga larut sempurna. Campuran diaduk setiap kali penambahan larutan hingga larut sempurna. Kemudian akuades dimasukkan hingga  $\frac{3}{4}$  bagian dari kapasitas gelas beker. Keasaman (pH) larutan media diukur dengan pH-meter pada kisaran 5,6-5,8. Apabila pH larutan terlalu tinggi maka ditambahkan HCl 1N tetes demi tetes untuk menurunkan pH dan apabila pH larutan terlalu rendah maka ditambah dengan KOH 1N untuk menaikkan pH. Larutan diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga diperoleh pH yang diharapkan. Zat pengatur tumbuh (NAA 2 mg dan kinetin 2 mg) ditambahkan ke dalam larutan. Setelah itu, agar sebanyak 8 g dimasukkan, lalu ditambah akuades hingga volume total 1 liter. Media dimasak hingga mendidih, setelah itu dituangkan ke dalam botol kultur steril sebanyak 25 ml per botol. Botol kultur ditutup rapat dengan *aluminium foil* dan diberi label. Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Media yang telah disterilkan didinginkan dan disimpan pada rak media.

#### *Pembuatan media: Media perlakuan*

Pembuatan media perlakuan sama seperti pada media inisiasi kalus, tetapi dengan penambahan sukrosa sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan.

#### *Sterilisasi eksplan*

Daun *R. verticillata* dicuci dengan air mengalir serta dibuang bagian daun yang kotor dan mati. Setelah itu, daun direndam dalam larutan Dithane 3% selama 2 menit, lalu akuades steril selama 5 menit. Kemudian daun direndam dalam larutan agrape 2% selama 3 menit, lalu akuades steril selama 5 menit. Setelah itu, daun direndam dalam alkohol 70% selama 30 detik, lalu akuades steril tiga kali masing-masing selama 5 menit.

### Penanaman eksplan

Eksplan yang telah disterilkan ditanam dalam media inisiasi kalus. Penanaman eksplan dilakukan secara aseptik dalam *laminar air flow cabinet* yang telah disinari sinar UV minimal 1 jam sebelumnya. Botol kultur yang telah berisi eksplan ditutup rapat dengan *aluminium foil*, kemudian diinkubasi selama 30 hari.

### Pemeliharaan eksplan

Kalus yang diperoleh dari media inisiasi kalus dipindah ke media perlakuan. Pemindahan kalus dilakukan pada hari ke-30. Pemindahan dilakukan secara aseptik ke dalam *laminar air flow cabinet* dengan menggunakan pinset steril. Setelah kalus dimasukkan, botol kultur ditutup rapat dengan *aluminium foil*, kemudian diinkubasi dalam ruang kultur selama 15 hari.

### Penanaman kalus pada media perlakuan

Kalus yang diperoleh dari media inisiasi kalus dipindah ke media perlakuan. Pemindahan kalus dilakukan pada hari ke-30. Pemindahan dilakukan secara aseptik dalam *laminar air flow cabinet* dengan menggunakan pinset steril. Setelah kalus dimasukkan, botol kultur ditutup rapat dengan *aluminium foil*, kemudian diinkubasi dalam ruang kultur selama 15 hari.

### Pemeliharaan selama perlakuan

Inkubasi kalus dalam media perlakuan dilakukan selama 15 hari. Untuk mencegah terjadinya kontaminasi, botol-botol kultur disemprot dengan alkohol 70% minimal tiga hari sekali.

### Pengamatan pertumbuhan kalus

Pengamatan terhadap pertumbuhan kalus sangat penting dilakukan untuk mengetahui hubungan antara pertumbuhan dan sintesis metabolit sekunder serta akumulasinya dalam kalus. Pertumbuhan kalus ditentukan dengan mengukur berat basah dan berat kering. Pengukuran berat basah kalus dilakukan dengan menimbang berat basah kalus awal dan berat basah kalus akhir. Berat basah kalus awal diperoleh dengan menimbang kalus beserta botol kultur, media, dan *aluminium foil* pada hari ke-0, hasilnya dikurangi dengan berat botol, media, serta *aluminium foil* sebelum ditanami kalus. Berat basah akhir diperoleh dengan menimbang kalus secara langsung pada akhir pengamatan (hari ke-15 dari awal penanaman pada media perlakuan). Berat kering kalus diperoleh dengan mengukur berat kalus yang telah dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C dengan pengukuran dilakukan setiap 24 jam hingga diperoleh berat yang konstan. Pengamatan morfologi kalus dilakukan setiap hari selama 15 hari. Parameter yang diamati meliputi warna dan tekstur kalus.

### Analisis kadar reserpin

Kalus yang telah dikeringkan digerus dengan menggunakan mortar sampai berbentuk serbuk halus. Serbuk kalus dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 100 mg, ditambahkan pelarut etanol p.a sebanyak 10 ml lalu divorteks, kemudian ditambah akuabides hingga volume total 100 ml. Larutan disaring dan ditambahkan

sodium nitrit 0,3% sebanyak 1 ml, kemudian diendapkan dalam *waterbath* bersuhu 55°C selama 30 menit. Larutan didinginkan dan ditambahkan asam sulfamat 5% sebanyak 0,5 ml. Ekstrak yang diperoleh diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Visible (Shimadzu UV-160 IPC) pada panjang gelombang 399 nm dengan larutan pembanding reserpin murni (Singh et al. 2004).

Kadar reserpin (mg/L pelarut) hasil spektrofotometer kemudian dikonversi dalam bentuk mg/g kalus kering, dengan rumus:

$$R = (S \times V) / B$$

Keterangan:

R = Kadar reserpin (mg/g) berat kering kalus

S = Kadar reserpin sampel hasil spektrofotometer (mg/L) pelarut V = Volume pelarut (L)

B = Berat serbuk kalus yang dispektrofotometer (g)

### Analisis data

Data yang diperoleh berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif berupa morfologi kalus (warna dan tekstur kalus) yang disajikan secara deskriptif, sedangkan data kuantitatif meliputi berat basah kalus, berat kering kalus, dan kadar reserpin dalam kalus. Data kuantitatif dianalisis secara statistik dengan uji ANAVA dan dilanjutkan dengan uji DMRT pada taraf signifikansi 5%.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Induksi Pembentukan Kalus

Induksi pembentukan kalus merupakan tahapan penting dalam kultur jaringan tumbuhan. Melalui tahap inilah, tahapan selanjutnya (produksi metabolit sekunder) dapat dilakukan. Kalus diinduksi dalam media MS (Murashige Skoog) dengan penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT). Menurut Santoso dan Nursandi (2004), ZPT dapat merangsang terbentuknya kalus. Pada penelitian ini, eksplan ditanam pada media MS yang diberi NAA 2 mg/L dan kinetin 2 mg/L.

NAA (Asam Naftalen Asetat) adalah jenis auksin dalam kultur jaringan tumbuhan yang dikenal sebagai hormon yang memiliki kemampuan untuk menginduksi kalus. Auksin menyebabkan pembesaran dan pemanjangan sel. Sementara itu, kinetin adalah jenis sitokinin yang dapat merangsang pembelahan sel eksplan, proliferasi sel-sel kalus, dan mendorong pembentukan klorofil pada kalus (Santoso dan Nursandi 2004).

Eksplan pada media inisiasi terlihat mengalami pembengkakan pada hari ke-1 sampai hari ke-7. Hal ini terjadi karena eksplan menyerap air dari media melalui proses imbibisi sebagai tahap awal proses pertumbuhan, akibatnya sel-sel membesar. Pada tahap tersebut belum terlihat adanya kalus, karena eksplan berada pada fase lag yaitu fase adaptasi dengan media. Kalus mulai terbentuk pada hari ke-7 setelah penanaman yang ditandai dengan terbentuknya tonjolan-tonjolan berwarna keputihan pada bagian bekas luka (irisasi). Hal ini sesuai dengan pernyataan Suryowinoto (1996) bahwa timbulnya kalus

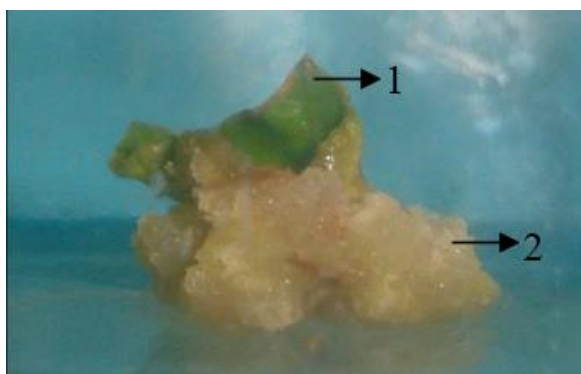
merupakan aktivitas sel-sel pada bagian eksplan yang terluka dengan cara sel-selnya menjadi meristematik lagi. Luka pada jaringan atau sel tumbuhan akan mengaktifasi mekanisme pertahanan diri tumbuhan, baik secara lokal maupun sistemik (pada jaringan yang tidak luka), dalam bentuk perubahan arah jalur metabolisme dan menginduksi ekspresi gen-gen tertentu. Hanya pada jaringan yang rusak akan terbentuk struktur sel tidak beraturan, mengalami dediferensiasi, mengeluarkan senyawa simpanan, dan kehilangan banyak air. Pembelahan sel yang terus-menerus mengakibatkan terbentuknya jaringan penutup luka. Jaringan inilah yang disebut kalus. Kalus merupakan massa sel yang tidak terdiferensiasi (Leon et al. 2001).

Morfologi kalus yang terbentuk pada media inisiasi selama 30 hari mempunyai tekstur yang kompak (Gambar 1). Menurut Street (1973), kalus yang kompak disebabkan kalus memiliki susunan sel yang rapat sehingga sulit dipisahkan.

Kalus yang terbentuk memiliki warna putih kekuningan dan sedikit kecokelatan. Warna kalus yang kurang hijau diduga erat kaitannya dengan mekanisme pertahanan diri terhadap perlakuan pada jaringan atau sel eksplan, yaitu berupa sayatan atau pengaruh dari sterilan, sehingga metabolisme terfokus untuk pertahanan diri. Menurut Leon et al. (2001), pada saat terjadi pelukaan, tumbuhan akan segera memproduksi sejenis oksigen reaktif (*reactive oxygen species*) yaitu anion superoksida pada jaringan yang rusak dan hidrogen peroksida, baik pada skala lokal maupun sistemik. Adanya oksigen reaktif berpotensi menimbulkan proses oksidasi, akibatnya terjadi pencokelatan secara cepat baik pada kalus maupun sel pada awal pertumbuhannya. Peristiwa pencokelatan merupakan proses adaptif bagian tanaman akibat adanya pengaruh fisik atau biokimia seperti memar, pengupasan, pemotongan, serangan penyakit, atau kondisi lain yang tidak normal (Santoso dan Nursandi 2004). Warna kehijauan pada kalus diduga disebabkan adanya sitokinin dalam media inisiasi yang dapat memacu terbentuknya klorofil.

#### Kalus dalam media perlakuan

Kalus umur 30 hari yang diperoleh dari media inisiasi disubkultur pada media perlakuan dengan variasi konsentrasi sukrosa yang telah ditentukan. Kalus diinkubasi selama 15 hari dalam ruang kultur.



**Gambar 1.** Morfologi kalus *R. verticillata* umur 30 hari pada media inisiasi. (1) Eksplan, (2) kalus.

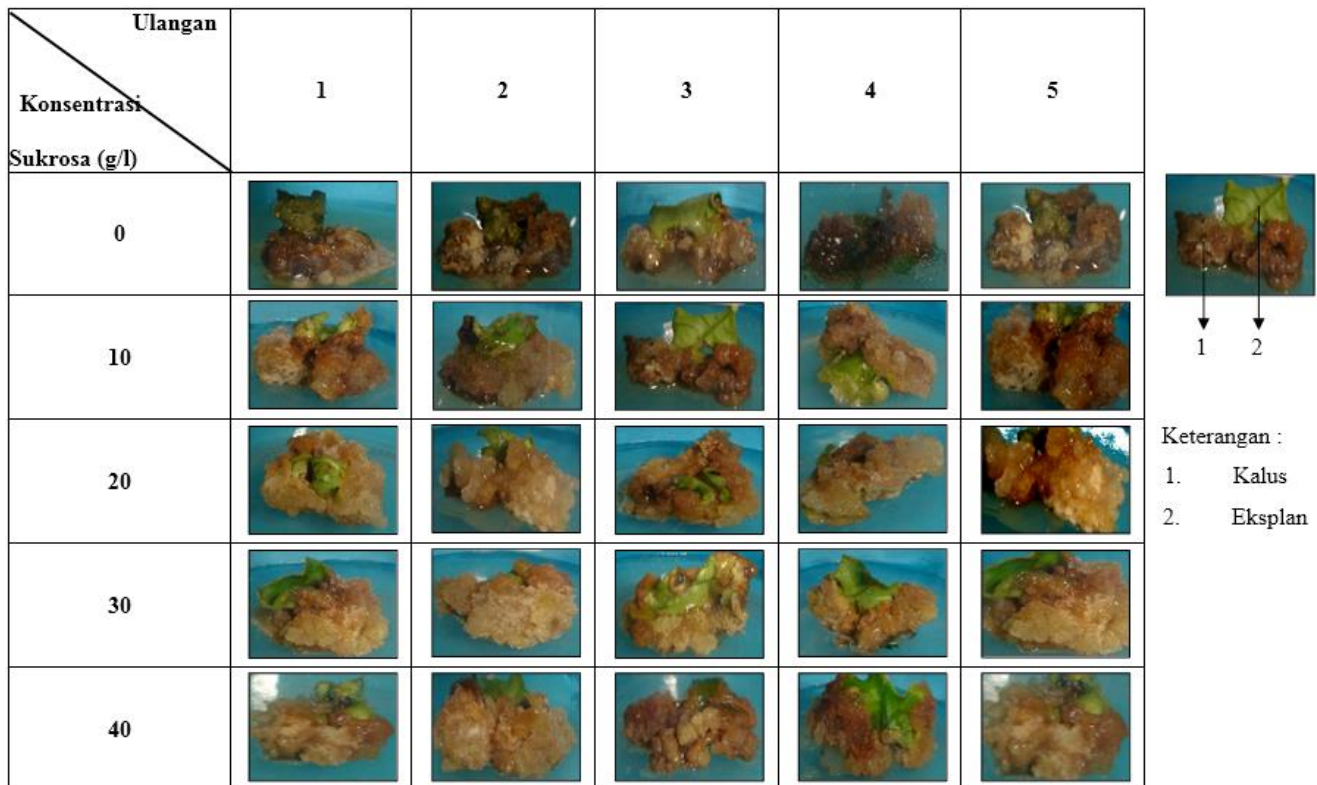
#### Morfologi kalus

Kalus yang disubkultur pada media perlakuan memiliki tekstur yang cenderung kompak (*non freeable*) hingga akhir perlakuan. Warna kalus mengalami perubahan menjadi cokelat muda dan cokelat tua. Morfologi kalus pada media perlakuan umur 15 hari disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 2.

Tekstur kalus yang kompak memiliki susunan sel yang rapat dan padat sehingga sulit dipisah-pisahkan. Kalus *non freeable* juga disebabkan sebagian sel-selnya memiliki proporsi vakuola yang lebih besar serta mempunyai dinding polisakarida yang besar pula (Street 1973). Dari Tabel 1 juga dapat dilihat bahwa kalus tidak berwarna hijau. Hal ini diduga karena adanya dekomposisi klorofil. Menurut Guilano et al. (1993) dalam Santoso dan Nursandi (2004), dekomposisi klorofil secara biokimia dapat terjadi melalui: (1) hilangnya rantai *phyton* karena enzim klorofilase, sehingga terbentuk klorofilin/klorofilid yang menghasilkan warna hijau cerah; (2) dekomposisi klorofilid lebih lanjut menjadi *phaeophorbides* (berwarna cokelat) dan klorin (tidak berwarna); serta (3) fotooksidasi sehingga  $Mg^{2+}$  hilang dan terbentuk *phaeophytin* yang berwarna cokelat dan hijau olive (keputihan).

**Tabel 1.** Morfologi kalus *R. verticillata* pada media MS dengan variasi konsentrasi sukrosa (umur 15 hari).

| Konsentrasi sukrosa (g/L) | Ulangan | Morfologi kalus |                  |
|---------------------------|---------|-----------------|------------------|
|                           |         | Tekstur         | Warna            |
| 0                         | 1       | Kompak          | Cokelat tua      |
|                           | 2       | Kompak          | Cokelat tua      |
|                           | 3       | Kompak          | Cokelat tua      |
|                           | 4       | Kompak          | Cokelat tua      |
|                           | 5       | Kompak          | Cokelat tua      |
| 10                        | 1       | Kompak          | Cokelat agak tua |
|                           | 2       | Kompak          | Cokelat tua      |
|                           | 3       | Kompak          | Cokelat tua      |
|                           | 4       | Kompak          | Cokelat muda     |
|                           | 5       | Kompak          | Cokelat tua      |
| 20                        | 1       | Agak remah      | Cokelat muda     |
|                           | 2       | Kompak          | Cokelat muda     |
|                           | 3       | Kompak          | Cokelat tua      |
|                           | 4       | Kompak          | Cokelat tua      |
|                           | 5       | Kompak          | Cokelat tua      |
| 30                        | 1       | Agak remah      | Cokelat muda     |
|                           | 2       | Agak remah      | Cokelat muda     |
|                           | 3       | Kompak          | Cokelat muda     |
|                           | 4       | Kompak          | Cokelat muda     |
|                           | 5       | Kompak          | Cokelat muda     |
| 40                        | 1       | Kompak          | Cokelat muda     |
|                           | 2       | Agak remah      | Cokelat muda     |
|                           | 3       | Kompak          | Cokelat tua      |
|                           | 4       | Kompak          | Cokelat tua      |
|                           | 5       | Kompak          | Cokelat agak tua |



**Gambar 2.** Morfologi kalus *R. verticillata* pada media MS dengan variasi konsentrasi sukrosa (umur 15 hari)

Menurut George dan Sherrington (1984), gula (sukrosa) dalam media kultur jaringan dapat menghambat sintesis klorofil dengan tingkat penghambatan yang berbeda-beda, tergantung jaringan dan spesies tumbuhan. Penimbunan gula dalam sel dapat menghambat proses fotosintesis dan menyebabkan pertumbuhan tidak normal serta daun nekrotik (Jana dan Sheen (1992) dalam Fitriyani et al. 1999). Penimbunan sukrosa disebabkan oleh absorpsi sukrosa dari media melalui bagian eksplan yang teriris. Penimbunan sukrosa dalam sel menyebabkan kebutuhan gula dalam sel sudah terpenuhi, sehingga sel-sel tidak melakukan fotosintesis, akibatnya pembentukan klorofil terhambat. Pencokelatan juga merupakan gejala proses penuaan. Pencokelatan kalus juga dapat disebabkan oleh akumulasi senyawa fenol dalam sel kalus. Menurut Santoso dan Nursandi (2004), enzim yang berperan dalam proses pencokelatan tersebut merupakan enzim kompleks polifenol oksidase yaitu fenol hidroksilase, kresolase, dan katekolase. Pembentukan senyawa fenol juga dapat didorong oleh adanya bahan-bahan kimia dalam media,

misalnya auksin. Auksin menurut Santoso dan Nursandi (2004) dapat mendorong terjadinya pencokelatan pada eksplan daun muda kelapa sawit.

#### Pertumbuhan kalus

Pertumbuhan adalah suatu proses dalam kehidupan tumbuhan yang mengakibatkan perubahan ukuran, bentuk, dan jumlah sel pada kondisi-kondisi tertentu (Sitompul dan Guritno 1995). Menurut Yokota et al. (1999), pertumbuhan kalus pada media kultur biasanya ditentukan dengan mengukur berat kalus.

#### Berat basah

Parameter pertumbuhan dapat diamati dari peningkatan berat basah. Peningkatan berat basah kalus dihitung dengan cara berat basah akhir dikurangi berat basah awal. Menurut Sitompul dan Guritno (1995), berat merupakan integrasi dari hampir semua peristiwa yang dialami tumbuhan. Rata-rata peningkatan berat basah kalus disajikan pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Rata-rata peningkatan berat basah, berat kering dan kadar reserpin kalus *R. verticillata* pada media MS dengan variasi konsentrasi sukrosa (umur 15 hari)

| Konsentrasi sukrosa (g/L)             | 0                   | 10                   | 20                  | 30                  | 40                  |
|---------------------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Rata-rata peningkatan berat basah (g) | 0,40 <sup>a</sup>   | 0,80 <sup>b</sup>    | 0,92 <sup>b</sup>   | 0,90 <sup>b</sup>   | 0,76 <sup>b</sup>   |
| Rata-rata berat kering (g)            | 0,044 <sup>a</sup>  | 0,074 <sup>b</sup>   | 0,102 <sup>c</sup>  | 0,124 <sup>d</sup>  | 0,152 <sup>e</sup>  |
| Rata-rata kadar reserpin (mg/g)       | 93,204 <sup>a</sup> | 140,444 <sup>a</sup> | 302,56 <sup>b</sup> | 548,90 <sup>c</sup> | 373,24 <sup>b</sup> |

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada satu baris menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT taraf 5%.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa variasi konsentrasi sukrosa pada media perlakuan memberikan pengaruh yang signifikan terhadap peningkatan berat basah kalus. Pada Tabel 2 terlihat bahwa konsentrasi sukrosa 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L, dan 40 g/L memberikan pengaruh yang tidak signifikan terhadap peningkatan berat basah kalus, tetapi signifikan dengan media tanpa pemberian sukrosa.

Secara keseluruhan, media perlakuan mampu meningkatkan berat basah kalus. Media dengan konsentrasi sukrosa 20 g/L menghasilkan pertumbuhan kalus terbesar. Rata-rata peningkatan berat basah kalus pada media tersebut sebesar 0,92 g atau sebesar 108,85% dari berat basah awal. Hal ini dapat dikatakan bahwa konsentrasi sukrosa 20 g/L merupakan konsentrasi yang optimum untuk pertumbuhan kalus *R. verticillata* karena pada konsentrasi sukrosa 30 g/L terjadi penurunan berat basah. Peningkatan berat basah kalus terendah terjadi pada media tanpa pemberian sukrosa, dengan rata-rata peningkatan berat basah sebesar 0,4 g atau sebesar 64,85% dari berat basah awal. Hal ini disebabkan jumlah sukrosa yang dibutuhkan sebagai sumber energi dan sumber karbon untuk memacu pertumbuhan kalus tidak mencukupi. Karbohidrat sangat dibutuhkan untuk memacu pertumbuhan sel dan berperan dalam metabolisme (Wetter dan Constabel 1991). Sukrosa merupakan salah satu disakarida yang berperan penting bagi tumbuhan sebagai sumber energi, sumber karbon, dan pembentuk komponen sel (Dwidjoseputro 1994). Menurut George (1993) dalam Iraqi dan Tremblay (2001), sukrosa merupakan sumber karbon dan sumber energi yang paling sesuai untuk pertumbuhan jaringan pada kultur sel tanaman dibandingkan dengan jenis karbohidrat lainnya.

Sukrosa dalam media masuk ke dalam sel melalui proses difusi bebas, osmosis, maupun arus massa. Sukrosa dalam sel akan terhidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa oleh enzim invertase. Proses hidrolisis sukrosa oleh invertase berlangsung di sitosol, vakuola, maupun dinding sel (Salisbury dan Ross 1995). Pemecahan sukrosa menjadi monosakarida, glukosa dan fruktosa, merupakan langkah awal penggunaan sukrosa oleh sel kalus (Iraqi dan Tremblay 2001). Glukosa dan fruktosa yang terbentuk akan digunakan sebagai sumber energi maupun sumber karbon untuk pertumbuhan sel. Glukosa dan fruktosa dalam metabolisme sel akan masuk dalam glikolisis dan siklus Krebs untuk membentuk energi berupa ATP yang akan digunakan untuk pertumbuhan kalus.

Pada tumbuhan yang sedang mengalami pertumbuhan, laju respirasi meningkat sebagai akibat dari proses pertumbuhan yang membutuhkan banyak energi. Menurut Salisbury dan Ross (1995), sukrosa merupakan gula yang paling banyak ditranslokasikan dalam tumbuhan dan merupakan pemasok glukosa dan fruktosa yang paling banyak sebagai substrat respirasi. Konsentrasi sukrosa yang optimum dalam media akan memberikan energi yang optimum pula untuk pertumbuhan. Pada umumnya, sumber karbon utama bagi tumbuhan adalah CO<sub>2</sub> yang difiksasi dari udara yang akan diubah menjadi gula heksosa melalui proses fotosintesis. Pada tumbuhan yang ditumbuhkan secara *in vitro*, fotosintesis berlangsung kurang optimal,

sehingga pemberian sumber karbon dalam media sangat dibutuhkan (Marezki (1974) dalam Suskendriyati (2003).

Sukrosa yang terangkut ke dalam sel sebagian akan diubah menjadi energi dan sebagian lainnya diubah menjadi bahan-bahan yang diperlukan untuk memacu pertumbuhan kalus (Salisbury dan Ross 1995). Sukrosa juga berperan terhadap pemanjangan dan pembesaran sel. Sukrosa yang terhidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa oleh enzim invertase menyebabkan terjadinya peningkatan tekanan turgor. Tekanan turgor menyebabkan pemanjangan dan pembesaran sel. Hal inilah yang diduga menyebabkan perbedaan peningkatan berat basah kalus, sebab respons setiap sel berupa tekanan turgor terhadap kondisi cairan di sekitar sel berbeda-beda. Hal ini sesuai dengan pernyataan Marezki (1974) dalam Suskendriyati (2003) bahwa respons pertumbuhan sel terhadap penambahan karbohidrat berbeda-beda untuk setiap spesies.

#### *Berat kering kalus*

Indikator pertumbuhan kalus selain ditentukan dengan peningkatan berat basah juga dapat dilihat pada berat kering kalus. Berat kering kalus merupakan indikator pertumbuhan yang lebih representatif dibandingkan dengan berat basah kalus. Menurut Sitompul dan Guritno (1995), berat basah atau berat segar sulit digunakan sebagai indikator pertumbuhan karena berat basah masih dipengaruhi oleh kandungan air dalam sel. Kandungan air sel dipengaruhi oleh kondisi lingkungan yang tidak selalu konstan, sehingga kandungan air dalam sel, jaringan, atau keseluruhan tubuh tanaman berubah sesuai dengan kondisi lingkungan dan umur sel itu sendiri.

Rata-rata berat kering kalus pada setiap perlakuan disajikan pada Tabel 2. Berat kering kalus yang digunakan adalah berat kering konstan. Untuk mendapatkan berat kering yang konstan, kalus dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C dan ditimbang setiap hari hingga diperoleh berat yang konstan. Pengeringan kalus bertujuan untuk menghentikan aktivitas metabolisme sel dengan segera (Sitompul dan Guritno 1995).

Hasil uji statistik terhadap berat kering kalus menunjukkan bahwa pemberian sukrosa dengan berbagai konsentrasi memberikan pengaruh yang signifikan terhadap berat kering kalus untuk setiap perlakuan. Dari Tabel 2 terlihat bahwa rata-rata berat kering kalus tertinggi diperoleh dari media dengan konsentrasi sukrosa 40 g/L yaitu sebesar 0,152 g. Hasil ini belum menunjukkan hasil yang optimum sebab belum terlihat adanya penurunan berat kering kalus pada penelitian ini. Sukrosa merupakan sumber energi dan karbon untuk pertumbuhan kalus serta komponen penyusun sel. Ketersediaan sukrosa yang besar memungkinkan tersedianya cukup energi serta bahan-bahan penting untuk pertumbuhan dan pembentukan biomassa.

Menurut Sitompul dan Guritno (1995), sukrosa yang terangkut ke dalam sel sebagian akan mengalami metabolisme untuk menghasilkan energi dan sebagian lainnya diubah menjadi bahan esensial seperti bahan dinding sel, protein, dan bahan lainnya yang diperlukan untuk pertumbuhan. Berat kering kalus terendah diperoleh

pada media tanpa pemberian sukrosa yaitu sebesar 0,044 g. Pada media ini, kalus tidak memperoleh cukup bahan untuk membentuk biomassa sebab jumlah karbohidrat (sukrosa) yang berfungsi sebagai sumber energi dan sumber karbon sangat kurang bahkan mungkin tidak ada.

Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan berat kering kalus seiring dengan peningkatan konsentrasi sukrosa. Hal ini diduga peningkatan konsentrasi sukrosa menyebabkan pembentukan metabolit untuk mendorong pembelahan dan pertumbuhan kalus. Sukrosa dalam media menyebabkan sel-sel kalus aktif membelah, sehingga kalus lebih banyak membentuk biomassa selama pertumbuhan (Suskendriyati 2003). Sukrosa akan terhidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa. Selain menghasilkan energi, metabolisme sukrosa juga berperan untuk menyediakan kerangka karbon antara yang dapat digunakan untuk menghasilkan produk esensial lainnya dalam tumbuhan, misalnya metabolit sekunder (Salisbury dan Ross 1995).

Pada penelitian ini, terdapat perbedaan pola antara berat basah dan berat kering kalus. Pada peningkatan berat basah kalus terlihat adanya penurunan peningkatan berat basah pada konsentrasi sukrosa 30 g/L dan 40 g/L, sedangkan pada berat kering kalus belum terlihat adanya penurunan berat kering sampai pada konsentrasi sukrosa 40 g/L (konsentrasi tertinggi). Hal ini diduga disebabkan oleh kemampuan kalus dalam menyerap dan menyimpan air. Berat basah dipengaruhi kandungan air dalam kalus, sedangkan berat kering merupakan berat konstan yang tidak dipengaruhi oleh kandungan air. Kalus yang memiliki berat basah tinggi tetapi berat kering rendah disebabkan kalus mampu menyerap dan menyimpan air dalam jumlah banyak, sehingga ketika dikeringkan, banyak air yang hilang dan menyebabkan berat kering kalus rendah. Pada berat basah kalus yang rendah tetapi berat kering tinggi disebabkan kalus hanya mampu menyerap dan menyimpan air sedikit, sehingga ketika dikeringkan, air yang hilang hanya sedikit dan diperoleh berat kering yang tinggi.

Kemampuan kalus dalam menyerap dan menyimpan air dipengaruhi oleh tekstur kalus. Menurut Abidin (1990), sel yang berada pada lapisan luar dan kontak dengan media lebih mudah menyerap air daripada sel yang berada di lapisan dalam. Tekstur kalus yang tidak rata menyebabkan tidak semua sel kalus mampu menyentuh media terutama sel kalus bagian dalam, akibatnya kemampuan kalus untuk menyerap dan menyimpan air tidak sama. Sel kalus yang memiliki vakuola lebih besar akan menyimpan air lebih banyak dibanding sel dengan vakuola kecil. Hal inilah yang diduga menyebabkan adanya perbedaan pola antara berat basah dan berat kering kalus.

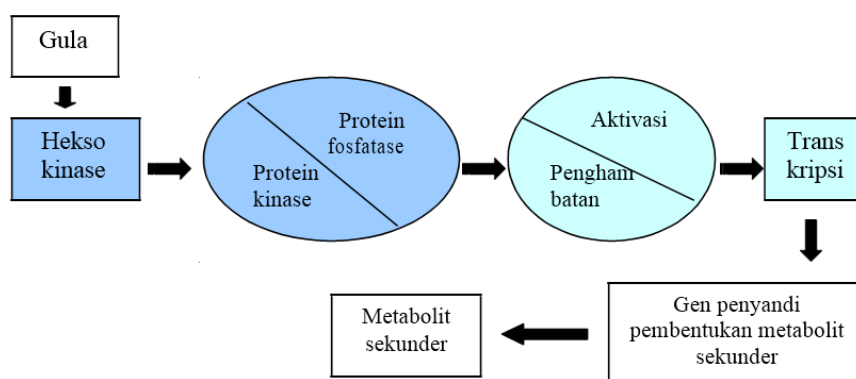
#### Analisis kandungan reserpin dalam kalus

Kadar reserpin dalam kalus *R. verticillata* yang ditanam pada media MS dengan variasi konsentrasi sukrosa dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 399 nm. Rata-rata kadar reserpin dalam kalus disajikan pada Tabel 4.

Hasil uji statistik menunjukkan variasi konsentrasi sukrosa memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar reserpin kalus *R. verticillata*. Dari Tabel 4 diketahui bahwa kadar reserpin terendah diperoleh pada media perlakuan tanpa sukrosa yaitu 93,204 mg/g kalus kering dan kadar reserpin tertinggi diperoleh pada media dengan konsentrasi sukrosa 30 g/L yaitu sebesar 548,9 mg/g kalus kering. Kadar reserpin yang rendah pada media tanpa sukrosa diduga disebabkan oleh sumber karbon yang tersedia hanya cukup untuk pertumbuhan sehingga untuk membentuk metabolit sekunder tidak mencukupi. Pada konsentrasi sukrosa yang rendah, sel akan kekurangan sumber karbon untuk proses asimilasi. Pada media dengan penambahan sukrosa yang cukup tinggi, sumber karbon dan energi yang tersedia selain mencukupi untuk pertumbuhan kalus juga cukup untuk pembentukan metabolit sekunder, sehingga reserpin yang terbentuk tinggi.

Reserpin merupakan senyawa metabolit sekunder yang termasuk dalam kelompok Alkaloid Indol Monoterpenoid (AIM). Kelompok alkaloid ini pada dasarnya merupakan turunan dari satu unit asam amino triptamin dan satu unit C9 dan C10 dari terpenoid (secologanin) (Ramawat dan Merillon 1999). Kandungan reserpin dipengaruhi oleh konsentrasi dan metabolisme nitrogen dalam sel. Metabolisme nitrogen sendiri membutuhkan energi yang diperoleh dari metabolisme karbohidrat. Nitrogen merupakan unsur penyusun asam amino yang merupakan prekursor metabolit sekunder. Menurut Bloom dalam Palaniswamy et al. (2002), penyerapan nitrogen oleh tumbuhan dapat dalam bentuk  $\text{NH}_4^+$  dan  $\text{NO}_3^-$ . Keberadaan karbohidrat yang tinggi akan meningkatkan penyerapan  $\text{NH}_4^+$ . Sumber nitrogen dalam bentuk  $\text{NH}_4^+$  dapat langsung dipakai untuk membentuk asam amino tanpa harus direduksi sehingga tidak membutuhkan banyak energi. Hal ini berarti karbohidrat yang tersedia dapat dipakai sebagai sumber energi dan sumber karbon untuk membentuk metabolit sekunder. Konsentrasi karbohidrat yang rendah menyebabkan penyerapan  $\text{NH}_4^+$  menjadi terhambat, sehingga sumber nitrogen yang banyak digunakan adalah  $\text{NO}_3^-$ . Penggunaan  $\text{NO}_3^-$  harus melalui proses reduksi yang membutuhkan sekitar 25% energi dari hasil fotosintesis, akibatnya energi yang dibutuhkan untuk pembentukan metabolit sekunder tidak optimal.

Sukrosa selain sebagai sumber karbon dan energi dalam pembentukan metabolit sekunder juga berfungsi mengatur sinyal yang mempengaruhi ekspresi gen dalam proses pembentukan metabolit sekunder (Jang dan Sheen 1997 dalam Ramawat dan Merillon 1999). Menurut Ramawat dan Merillon (1999), heksokinase dalam sel tumbuhan berfungsi sebagai sensor gula. Sukrosa yang tinggi akan mengaktifkan heksokinase. Heksokinase akan mengaktifkan protein fosfatase dan protein kinase yang mengatur proses transkripsi protein, sehingga terbentuk gen pengeksresi pembentukan metabolit sekunder (Gambar 3).



**Gambar 3.** Sinyal transduksi gula pada tumbuhan (Ramawat dan Merillon 1999)

Sukrosa dalam sel kalus akan terhidrolisis membentuk glukosa dan fruktosa. Sukrosa mempengaruhi pembentukan metabolit sekunder melalui jalur glikolisis dan siklus Krebs. Dengan adanya enzim heksokinase, monosakarida hasil hidrolisis sukrosa membentuk gula terfosforilasi yang akan masuk jalur glikolisis membentuk asam piruvat. Melalui proses oksidasi asam piruvat, terbentuk asetil Ko-A yang akan masuk siklus Krebs untuk menghasilkan energi berupa ATP dan NADH yang digunakan untuk pembentukan metabolit sekunder. Asetil Ko-A dari glikolisis mengalami kondensasi membentuk hidrosimetil glutaril Ko-A (HMG-CoA) yang kemudian tereduksi membentuk asam mevalonat (MVA). Dengan energi ATP dari siklus Krebs, asam mevalonat diubah menjadi asam mevalonat 5 pirofosfat (MVA PP) dengan penambahan fosfat inorganik (Pi). Asam mevalonat 5 pirofosfat diubah menjadi isopentenil pirofosfat (IPP) oleh enzim anhidrokarboksilase dengan energi ATP dan melepaskan CO<sub>2</sub>, Pi, dan ADP. Melalui proses isomerase, isopentenil pirofosfat diubah menjadi dimetil alil pirofosfat yang kemudian berkondensasi dengan isopentenil pirofosfat membentuk geranil pirofosfat yang dikatalisis oleh enzim prenil transferase. Geranil pirofosfat diubah menjadi geranil difosfat. Geranil difosfat diubah menjadi geraniol dengan melepaskan fosfat inorganik. Geraniol diubah menjadi 10-hidroksigeraniol dengan katalisator enzim geraniol 10-hidroksilase (G10H), selanjutnya terbentuk loganin dan secologanin. Secologanin merupakan kelompok terpenoid yang dalam pembentukan AIM akan berkondensasi dengan triptamin membentuk 3 $\alpha$ (s)-striktosidin (Shank et al. 1998; Manitto 1981).

Pembentukan metabolit sekunder melalui jalur shikimat dimulai dari fosfoenol piruvat (PEP) yang mengalami kondensasi tipe aldo stereospesifik dengan D-eritrose-4-fosfat membentuk 3-deoksi-D-arabinoheptulosonat-7-fosfat (DAHP). Adanya penutupan cincin DAHP menyebabkan terbentuknya asam dehidrokinat (DHQ). Asam dehidrokinat mengalami dehidrasi reversibel membentuk asam dehidrosikimat, kemudian dengan adanya NADPH membentuk asam shikimat. Penambahan fosfat pada asam shikimat dan eliminasi air membentuk enamin yang akan berkondensasi dengan PEP membentuk asam isokhorismat.

Eliminasi 1,4-konjugat asam fosfor dari asam isokhorismat menghasilkan asam khorismat. Dengan adanya proses aminasi terbentuk asam anthranilat yang kemudian membentuk triptofan. Triptofan diubah menjadi triptamin dengan katalisator enzim triptofan dekarboksilase (Herbert 1995; Manitto 1981). Triptamin merupakan substrat enzim striktosidin sintase (SSS) pada pembentukan AIM. Triptamin dari jalur shikimat akan berkondensasi dengan secologanin dari jalur mevalonat membentuk 3 $\alpha$ (s)-striktosidin dengan katalisator enzim striktosidin sintase. Senyawa 3 $\alpha$ (s)-striktosidin digunakan sebagai prekursor pembentukan AIM (Shank et al. 1998), salah satunya reserpin (Verpoorte et al. 2002; Shank et al. 1998).

Peningkatan kadar reserpin terjadi seiring dengan peningkatan konsentrasi sukrosa sampai pada konsentrasi sukrosa 30 g/L lalu menurun pada konsentrasi sukrosa 40 g/L. Konsentrasi sukrosa yang rendah dalam media diduga tidak digunakan untuk membentuk metabolit sekunder, tetapi dioptimalkan untuk pertumbuhan dan perkembangan sel. Pada media dengan nutrisi yang optimal, sel-sel kalus dapat menggunakan nutrisi dalam media untuk pertumbuhan dan pembentukan biomassa serta untuk pembentukan metabolit sekunder, sehingga pada kondisi ini dapat diperoleh biomassa yang besar serta kadar reserpin yang tinggi pula. Konsentrasi sukrosa lebih dari 30 g/L memang memacu pertumbuhan sel sehingga diperoleh laju pertumbuhan kalus yang tinggi, tetapi menghambat pembentukan metabolit sekunder dalam sel (Mantell dan Smith 1986). Penghambatan pembentukan metabolit sekunder juga dapat disebabkan oleh sukrosa yang tersisa dari proses pertumbuhan terkonversi menjadi hasil samping berupa senyawa-senyawa lain, misalnya asam-asam organik dan CO<sub>2</sub>. Hal inilah yang menyebabkan kadar reserpin pada media dengan konsentrasi sukrosa 40 g/L lebih rendah daripada kadar reserpin pada media dengan konsentrasi sukrosa 30 g/L. Hal ini serupa dengan penelitian yang dilakukan Manuhara (1995) bahwa kandungan alkaloid vinkristin kalus daun *Catharantus roseus* (L.) G. Don dipengaruhi oleh konsentrasi sukrosa.

Manuhara (1995) telah melakukan penelitian tentang pengaruh manipulasi media terhadap kandungan alkaloid vinkristin kalus daun *Catharantus roseus*. Pada penelitian

tersebut, salah satu perlakuan yang diberikan adalah variasi konsentrasi sukrosa (20, 30, 40, 50, dan 60 g/L). Kadar alkaloid vinkristin tertinggi pada media dengan konsentrasi sukrosa 40 g/L. Kalus pada media yang mengandung sukrosa 50 g/L mengandung alkaloid vinkristin lebih sedikit, sedangkan penambahan sukrosa 20, 30, dan 60 g/L pada media tidak menunjukkan adanya alkaloid vinkristin. Hal ini diduga disebabkan sukrosa sebagai sumber karbon, hidrogen, dan oksigen dalam jumlah 20 dan 30 g/L tidak digunakan untuk pembentukan vinkristin, tetapi hanya dipakai untuk pertumbuhan kalus. Penambahan sukrosa lebih dari 50 g/L diduga dapat menghambat pembentukan alkaloid vinkristin (Manuhara 1995).

Variasi konsentrasi sukrosa pada penelitian ini mempengaruhi pertumbuhan dan kandungan reserpin kalus daun *R. verticillata*. Pertumbuhan kalus cenderung meningkat yang ditunjukkan pada berat basah dan berat kering kalus. Penambahan sukrosa sampai dengan 20 g/L pada media meningkatkan berat basah kalus, sedangkan pada konsentrasi sukrosa di atas 20 g/L, peningkatan berat basah kalus mengalami penurunan. Berat kering kalus meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi sukrosa. Berat kering kalus tertinggi diperoleh pada media dengan konsentrasi sukrosa 40 g/L. Hal ini berarti belum diketahui adanya penurunan berat kering kalus. Kandungan reserpin meningkat sampai pada konsentrasi sukrosa 30 g/L, kemudian mengalami penurunan pada konsentrasi sukrosa 40 g/L. Konsentrasi sukrosa 30 g/L adalah konsentrasi yang optimum untuk meningkatkan kandungan reserpin kalus daun *R. verticillata*.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil beberapa kesimpulan sebagai berikut: (1) Peningkatan konsentrasi sukrosa dalam media MS cenderung meningkatkan pertumbuhan kalus *R. verticillata* yang ditunjukkan pada berat basah dan berat kering kalus. (2) Peningkatan konsentrasi sukrosa dalam media MS cenderung meningkatkan kandungan reserpin kalus *R. verticillata*. Penambahan sukrosa sampai dengan 30 g/L meningkatkan kandungan reserpin, sebaliknya konsentrasi sukrosa di atas 30 g/L menurunkan kandungan reserpin.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abidin Z. 1990. Dasar-dasar pengetahuan tentang zat pengatur tumbuh. Penerbit Angkasa, Bandung.
- Dwidjoseputro D. 1994. Pengantar fisiologi tumbuhan. PT Gramedia, Jakarta.
- Fischer R, Liao YC, Hoffmann K et al. 1999. Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Biol Chem* 380: 825-839.
- Fitriyani I, Margono B, Dahlia. 1999. Pengaruh asam 2,4-D diklorofenoksi asetat terhadap klorofil dan glukosa kalus *Morinda citrifolia* L. *Chimera* 4(1): 37-46.
- George EP, Sherington PD. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetic Limited, Eversley.
- Herbert RB. 1995. Biosintesis metabolit sekunder. Jilid ke-2. (Diterjemahkan oleh: Srigandono B). Chapman and Hall, London and New York.
- Iraqi D, Tremblay FM. 2001. Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugar and protein during spruce somatic embryogenesis suggest a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *J Exp Bot* 52: 2301-2311.
- Leon J, Pojo E, Sanchez-Serano JJ. 2001. Wound signalling in plants. *J Exp Bot* 52(34): 1-3.
- LIPI [Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia]. 1999. Koleksi tumbuhan obat Kebun Raya Bogor. UPT Balai Pengembangan Kebun Raya Bogor (LIPI), Bogor.
- Manitto P. 1981. Biosintesis produk alami. (Diterjemahkan oleh: Koensoemardiyah). IKIP Semarang Press, Semarang.
- Mantell SH, Smith H. 1986. Plant biotechnology. Cambridge University Press, Great Britain.
- Manuhara YSW. 1995. Pengaruh manipulasi media terhadap kandungan alkaloid vinkristin kalus daun *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Berkala Penelitian Hayati 1: 1-7.
- Mulabagal V, Tsay HS. 2004. Plant cell culture – An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *Int J Appl Sci Eng* 2(1): 29-48.
- Palaniswamy UR, Bernard BB, Richard JM. 2002. Effect of nitrate: Ammonium nitrogen ratio on oxalate levels of purslane. In: Janick J, Whipkey A (eds). Trends in New Crops and New Uses. ASHS Press, Alexandria VA.
- Ramachandra RS. 2000. Biotechnological production of phyto-pharmaceuticals. *J Biochem Mol Biol Biophys* 4: 73-102.
- Ramawat KG, Merillon JM. 1999. Biotechnology secondary metabolites. Science Publisher, Inc., New Hampshire.
- Salisbury FB, Ross CW. 1995. Fisiologi tumbuhan. Jilid ke-3. (Diterjemahkan oleh: Lukman DR, Sumaryono). Penerbit ITB, Bandung.
- Santoso U, Nursandi F. 2004. Kultur jaringan tanaman. Universitas Muhammadiyah Malang, Malang.
- Shank JB, Bhadra J, Morgan J et al. 1998. Quantification of metabolites in the indole alkaloid pathways of *Catharanthus roseus*: Implication of metabolites engineering. *Biotechnol Bioeng* 58(2-3): 333-338.
- Singh DK, Srivastava B, Sahu A. 2004. Spectrophotometric determination of *Rauwolfia* alkaloid: Estimation of reserpin in pharmaceuticals. *Analytical Sciences. The Japan Society for Analytical Chemistry* 20: 571-573.
- Sitompul SM, Guritno B. 1995. Analisis pertumbuhan tanaman. UGM Press, Yogyakarta.
- 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.
- Suskendriyati H. 2003. Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kultur Kalus *Talinum paniculatum* Gaertn. dengan Variasi Pemberian Sumber Karbon. [Skripsi]. Jurusan Biologi F MIPA UNS, Surakarta.
- Verpoorte R, Contin A, Memelink J. 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem Rev* 1: 13-25.
- Wetter LR, Constabel F. 1991. Metode kultur jaringan tanaman. (Diterjemahkan oleh: Widianto MB). Edisi kedua. ITB, Bandung.
- Yokota T, Tutumi N, Takahasi K. 1999. Growth rate estimation of in vitro primarily induced carrot callus by a fractal based model. *Biochem Eng J* 3: 231-234.