Kandungan reserpin kultur kalus pule pandak (*Rauvolfia verticillata*) setelah elisitasi dengan cendawan *Pythium* sp.

Reserpine content of *Rauvolfia verticillata* callus culture elicited by *Pythium* sp.

NINIK PUJI ASTUTI, SOLICHATUN, ARI SUSILOWATI

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

Manuskrip diterima: 26 April 2007. Revisi disetujui: 4 Agustus 2007.

Abstract. Astuti NP, Solichatun, Susilowati A. 2007. Reserpine content of *Rauvolfia verticillata* callus culture elicited by *Pythium* sp. *Biofarmasi* 5: 55-66. This research aimed to study the effect of elicitor derived from *Pythium* sp. on reserpine content of *Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon callus culture. Callus was induced from *R. verticillata*'s leaf segment and grew optimally on Murashige and Skoog's medium with the addition of 2 mg/L NAA and 2 mg/L kinetin. Callus was elicited with an elicitor derived from autoclaved *Pythium* sp. on the 30th day. The concentrations of elicitor were 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg DW/mL. The harvesting times of elicited callus were at 0, 18, 36, and 72 hours. The morphology of callus (texture and color) was observed descriptively. The dry weight of callus and reserpine content was analyzed statistically using General Linear Model Univariate (GLM Univariate) and followed by Duncan's Multiply Ring Test (DMRT) at a confidence level of 95%. The results showed that elicitor and harvesting time concentration significantly influenced the dry weight and reserpine content of *R. verticillata* callus culture. As much as 2 mg DW/mL elicitor with a harvesting time at 72 hours produced the lowest dry weight of callus that was 0.039 g but produced the highest reserpine content that was 481.900 mg/g DW of callus or increased 103.849% compared to the control.

Keywords: Elicitor, *Pythium*, *Rauvolfia verticillata*, reserpine

PENDAHULUAN

Perkembangan obat-obatan dimulai dari penggunaan ekstrak tumbuhan kemudian diikuti dengan senyawa kimia murni tumbuhan yang telah diketahui struktur kimianya, seperti kokain, kodein, dan morfin. Pada tahun 1940-an, seiring dengan perkembangan sintesis kimia organik, senyawa sintetik lebih populer digunakan disamping senyawa antibiotik dari mikroorganisme. Namun akhir-akhir ini, penggunaan tanaman sebagai bahan baku obat mulai diperhatikan kembali, hal ini disebabkan oleh keterbatasan cara sintetik dalam merekayasa bahan kimia baru (Achmad et al. 1995). Joko et al. (1995) mengemukakan bahwa obat modern belum terjangkau oleh sebagian masyarakat, baik dari segi distribusi maupun harga, oleh karena itu sebagian masyarakat lebih memilih mengonsumsi obat tradisional. Dampak negatif penggunaan obat sintetik, seperti rasa mual, gemetar, mengantuk, alergi, dan retensi urin, diduga menyebabkan sebagian masyarakat kembali memanfaatkan obat dari bahan alam sebagai alternatif utama dalam pengobatan (Fudholi 2001).

Salah satu jenis tanaman obat adalah pule pandak (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon). Menurut Thien dan Ziegler (2001), tanaman ini tergolong hampir punah. *Rauvolfia verticillata* mengandung beberapa senyawa kimia seperti alkaloid (reserpin, serpentin, ajmalin, dan ajmalisin), saponin, flavonoid, dan polifenol (de Padua et al. 1999; LIPI 1999). Menurut de Padua et al. (1999) dan Hill (1996), tanaman ini berkhasiat mengatasi perut kembung, menghilangkan pegal-pegal, mengobati malaria dan tipus,

melancarkan peredaran darah, serta sebagai antihipertensi. Senyawa alkaloid yang diekstrak dari tanaman *Rauvolfia* telah diperdagangkan dalam bentuk tablet, diantaranya *Rauvolfia* (nama dagang: *Raudixin*, *Rauval*, *Rauverid*, dan *Wolfina*) dan *Reserpin* (nama dagang: *Serpalan*, *Reserfia*, dan *Novoreserpin*). Obat-obatan ini beredar di Amerika dan Canada (Thomson 1998). Di Indonesia, reserpin dijual dalam bentuk tablet dengan nama dagang *Serpasil* (Depkes RI Dirjen POM 2000).

Kebutuhan obat semakin lama semakin tinggi, namun di sisi lain obat sintetik yang menjadi andalan justru semakin mahal, oleh karena itu masyarakat dapat memanfaatkan kembali obat dari alam. Permasalahannya yaitu banyak jenis tanaman obat yang mulai punah, hal ini disebabkan oleh eksploitasi yang berlebihan dan semakin menyusutnya lahan, oleh karena itu diperlukan teknologi untuk memecahkan permasalahan tersebut. Salah satu upaya pemecahannya adalah dengan memproduksi senyawa obat melalui kultur in vitro (Fitriani et al. 1999). Kultur in vitro berguna untuk melestarikan tanaman dan memproduksi senyawa obat (Aprianita 2003; Purnamaningsih et al. 1998; Lestari dan Mariska 1997). Kandungan metabolit sekunder pada kultur tanaman relatif rendah, sehingga perlu dilakukan usaha untuk meningkatkannya, salah satunya dengan teknik elisitasi (Mantell dan Smith 1983).

Menurut Buitelaar dalam Ratnasari et al. (2001), teknik elisitasi merupakan pemberian materi abiotik atau biotik ke dalam sel tumbuhan, sehingga produksi metabolit sekunder meningkat. Elisitor merupakan senyawa mediator berupa cekaman dari mikrobial (elisitor biotik) atau berupa agen

penyebab cekaman seperti sinar UV, alkalinitas, tekanan osmotik, dan ion logam berat (elisitor abiotik). Salah satu elisitor biotik adalah cendawan. Respons elisitasi pertama kali ditemukan pada tahun 1972 oleh Keen dalam percobaannya mengenai sel tanaman yang diberi ekstrak cendawan patogen, hasil yang diperoleh menunjukkan adanya peningkatan fitoaleksin. Pada pertengahan 1980, produksi alkaloid pada kultur sel tanaman meningkat setelah dielisitasi dengan berbagai cendawan patogen (Ramawat dan Sonie 1999b).

Beberapa penelitian untuk meningkatkan senyawa metabolit sekunder menggunakan elisitor cendawan telah dilakukan. Pemberian homogenat *Pythium aphanidermatum* mampu meningkatkan kandungan ajmalisin kultur kalus *Catharanthus roseus* (Fitriani et al. 1999). Mukarlina dan Sirega (2001) melakukan elisitasi kultur akar *C. roseus* dengan *P. aphanidermatum*. Hasilnya terjadi peningkatan ajmalisin hingga 306,465%. Ekstrak *Saccharomyces cerevisiae* meningkatkan gosipol kultur *Gossypium hirsutum* sebesar 13,746-207,345% (Sitinjak et al. 2000). Kandungan gosipol kultur akar kapas meningkat sebesar 38,39% setelah dielisitasi dengan *Verticillium dahliae* (Setiawati 2001). Elisitasi agregat sel *G. hirsutum* dengan *V. dahliae* dan *Rhizoctonia solani* meningkatkan kandungan gosipol (Mirfat 2004). Hasil yang sama juga diperoleh Rahayu (2004) ketika melakukan elisitasi pada berbagai tingkat subkultur *G. hirsutum* dengan *V. dahliae* dan *R. solani*.

Pythium termasuk dalam famili Pythiaceae. Genus ini memiliki beberapa spesies, antara lain *P. aphanidermatum*, *P. debaryanum*, *P. perniciusum*, dan *P. nicotianae*. Cendawan ini hidup sebagai saprofit pada serasah dan pada kondisi yang cocok dapat menyerang tanaman, oleh karena itu cendawan ini bersifat parasit fakultatif. Cendawan ini umumnya menyerang tanaman yang masih muda (*juvenile*) dan mengakibatkan rebah semai, contoh pada tembakau, Gramineae, semangka, labu, dan pepaya (Carlie dan Watkinson 1994; Triharso 1994).

Pemilihan *Pythium* sp. sebagai bahan elisitor didasarkan oleh telah adanya bukti-bukti ilmiah keberhasilan pemakaian cendawan ini untuk meningkatkan senyawa metabolit sekunder, terutama alkaloid indol monoterpenoid. Ramawat dan Sonie (1999b) mengemukakan bahwa senyawa metabolit sekunder indol alkaloid meningkat setelah dielisitasi dengan *P. aphanidermatum*. *Pythium* sp. mengandung pektin, selulosa, dan kitin (Thomas 2003). Komponen dinding sel ini dapat digunakan sebagai bahan elisitor. Radman et al. (2003) mengemukakan bahwa elisitor biotik diantaranya berasal dari cendawan. Komposisi kompleks cendawan (dinding sel miselium) dapat digunakan sebagai elisitor. Selain itu, bagian-bagian cendawan juga dapat digunakan sebagai elisitor, seperti kandungan karbohidrat pada dinding sel yang berupa polisakarida (pektin, selulosa, kitin, dan glukosa) atau oligosakarida (manuronat, guluronat dan galakturonat).

Berdasarkan uraian tersebut maka perlu dilakukan penelitian mengenai kandungan reserpin pada kultur kalus pule pandak (*R. verticillata*) setelah dielisitasi dengan cendawan *Pythium* sp.

Tujuan penelitian ini adalah: (i) Mengkaji kandungan reserpin pada kultur kalus pule pandak (*R. verticillata*) setelah dielisitasi dengan cendawan *Pythium* sp., serta (ii) Mengkaji konsentrasi elisitor cendawan *Pythium* sp. dan waktu panen yang optimum untuk menghasilkan kandungan reserpin tertinggi pada kultur kalus pule pandak (*R. verticillata*).

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai Desember 2006 di Laboratorium Kultur Jaringan, Sub Laboratorium Biologi, Laboratorium Pusat MIPA, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Alat dan Bahan

Sumber eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kedua dari pucuk tanaman pule pandak berumur 2 tahun. Tanaman diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat (BPTO) Tawangmangu, Jl. Lawu Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Kalus yang digunakan untuk perlakuan adalah kalus dengan berat basah antara 0,7-1,0 gram. Bahan elisitor yang digunakan berupa elisitor biotik, yaitu isolat murni cendawan *Pythium* sp. Isolat diperoleh dari Laboratorium Klinik, Jurusan Hama dan Penyakit Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut. Bahan kimia untuk sterilisasi eksplan yaitu detergen cair, akuades steril, Agrept (antibakteri) 5%, Dithane (antifungi) 5%, dan etanol 70%.

Bahan kimia untuk pembuatan media yaitu: (i) Media inisiasi kalus, terdiri dari media MS, 7,5 gram/L bahan pematat (agar), 2 mg/L kinetin, 2 mg/L NAA, KOH 1 N, HCl 1 N, dan akuades; (ii) Media perlakuan, komposisi media perlakuan hampir sama dengan media inisiasi kalus, namun media perlakuan tidak menggunakan KNO₃, KH₂PO₄ dikurangi menjadi 100 mg/L, tidak menggunakan NAA, dan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan berupa kinetin 5 mg/L (Aryati et al. 2005); (iii) Media kultur cendawan *Pythium* sp.; (iv) Media agar, terdiri dari 39 gram/L *Potato Dextrose Agar* dan akuades; serta (v) Media cair *Potato Dextrose Broth* (PDB) cendawan *Pythium* sp., terdiri dari 250 g/L kentang putih, 20 g/L *dextrose*, dan 1 L akuades (Burgess et al. 1994).

Bahan yang digunakan untuk analisis kandungan reserpin yaitu etanol p.a. (*ethanol pure analysis*), akuabides (DDH₂O/*double distilled water*), asam sulfamat 0,5%, sodium nitrit 0,3%, dan senyawa reserpin murni.

Sementara itu, alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat untuk sterilisasi bahan dan alat, pembuatan media, pembuatan inokulum *Pythium* sp., persiapan bahan elisitor, penanaman eksplan, elisitasi, dan analisis reserpin.

Alat untuk sterilisasi bahan dan alat berupa autoklaf yang telah diatur pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm. Alat-alat yang digunakan untuk pembuatan media inisiasi kalus dan media perlakuan terdiri dari gelas beker volume

1 L, *hot plate*, *magnetic stirrer*, spatula, timbangan digital, pipet volume, *pipette pump*, gelas ukur, kertas lakmus untuk menentukan pH, pipet tetes, botol kultur, *aluminium foil*, dan karet gelang. Alat untuk pembuatan media kultur cendawan *Pythium* sp. yaitu gelas beker, *hot plate*, *magnetic stirrer*, spatula, timbangan digital, pipet volume, *pipette pump*, erlenmeyer, tabung reaksi, rak tabung reaksi, dan kapas penutup. Alat-alat untuk penghitungan spora cendawan *Pythium* sp. terdiri dari hemasitometer, mikroskop, pipet tetes, dan jarum inokulum. Alat-alat untuk persiapan bahan elisitor terdiri dari erlenmeyer, pipet volume, *pipette pump*, *shaker*, kertas Whatmann No.1, autoklaf, oven, kapas, *mortar*, *pestle*, *aluminium foil*, dan cawan petri. Alat-alat untuk penanaman eksplan terdiri dari skalpel, gunting *dissecting kit*, pinset, *bunsen büchner*, cawan petri, botol kultur, dan *laminar air flow cabinet*. Alat yang digunakan untuk elisitasi terdiri dari *suit* volume 1 mL, *bunsen büchner*, *aluminium foil*, karet gelang, dan *laminar air flow cabinet*. Alat-alat untuk analisis kandungan reserpin terdiri dari *mortar*, *pestle*, timbangan digital, *aluminium foil*, cawan petri, oven, tabung reaksi, *waterbath*, pipet volume, *pipette pump*, pipet tetes, vorteks, *filter glass*, kertas Whatmann No.42, dan seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1601-IPC).

Rancangan percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial dengan dua faktor perlakuan. Faktor pertama adalah lima konsentrasi elisitor cendawan *Pythium* sp., yaitu 0 (kontrol); 0,5; 1,0; 1,5; dan 2,0 mg BK/mL (miligram berat kering miselium per mililiter akuades steril). Faktor kedua adalah lama elisitasi, yaitu 0, 18, 36, dan 72 jam. Tiap perlakuan terdiri dari tiga ulangan. Rancangan Percobaan dapat diamati pada Tabel 1.

Cara kerja

Persiapan

Sterilisasi alat, Alat-alat gelas dicuci dengan detergen, dibilas dengan air kemudian disimpan di atas rak dengan mulut menghadap ke bawah dan dibiarkan kering. Gunting, skalpel, pinset, dan *cutter* dicuci dengan detergen kemudian dikeringkan dengan kertas tisu. Botol kultur dan gelas ukur yang kering ditutup dengan *aluminium foil*. Pinset, skalpel, spatula, dan pipet yang kering dibungkus dengan kertas. Erlenmeyer diisi dengan akuades sebanyak $\frac{3}{4}$ volume total, kemudian ditutup dengan *aluminium foil*. Semua alat disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan uap air 1,5 atm selama satu jam. Alat yang sudah steril disimpan di dalam inkubator sebelum digunakan (Dodds dan Roberts 1995).

Pembuatan media inisiasi kalus, Larutan stok terdiri dari makronutrien, mikronutrien, vitamin, dan asam amino seperti yang terdapat dalam komposisi media MS. Sukrosa sebanyak 30 gram dimasukkan ke dalam gelas beker volume satu liter yang telah diisi dengan 500 mL akuades dan diberi *magnetic stirrer*. Gelas beker diletakkan di atas *hot plate*. *Hot plate* dinyalakan dan *moting magnetic stirrer* diatur agar bahan-bahan yang dimasukkan larut sempurna.

Tabel 1. Rancangan percobaan penelitian

Perlakuan	K0	K1	K2	K3	K4
L0	K0L0	K1L0	K2L0	K3L0	K4L0
L1	K0L1	K1L1	K2L1	K3L1	K4L1
L2	K0L2	K1L2	K2L2	K3L2	K4L2
L3	K0L3	K1L3	K2L3	K3L3	K4L3

Keterangan: K0 = Konsentrasi elisitor 0,0 mg BK/mL, K1 = konsentrasi elisitor 0,5 mg BK/mL, K2 = konsentrasi elisitor 1,0 mg BK/mL, K3 = konsentrasi elisitor 1,5 mg BK/mL, K4 = konsentrasi elisitor 2,0 mg BK/mL, L0 = lama elisitasi 0 jam, L1 = lama elisitasi 18 jam, L2 = lama elisitasi 36 jam, L3 = lama elisitasi 72 jam.

Larutan makronutrien, mikronutrien, vitamin, dan asam amino dimasukkan satu per satu ke dalam gelas beker. Akuades ditambahkan hingga mencapai volume 800 mL. Derajat keasaman (pH) larutan diukur menggunakan kertas lakmus dan ditetapkan pada pH 5,75. Jika pH terlalu rendah, KOH 1 N ditambahkan ke dalam larutan, sebaliknya jika pH terlalu tinggi maka ditambahkan HCl 1 N. Akuades ditambahkan hingga volume larutan mencapai satu liter. NAA dan kinetin (masing-masing 2 mg) dan serbuk agar sebanyak 7,5 gram ditambahkan ke dalam larutan.

Larutan dipanaskan di atas *hot plate* dengan mengatur temperatur pada 100°C. Larutan yang telah mendidih dituang ke dalam botol kultur sebanyak seperlima bagian dari volume botol (kurang lebih 20 mL). Botol-botol yang telah berisi media ditutup rapat menggunakan *aluminium foil*, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm. Botol-botol kultur berisi media yang telah disterilisasi disimpan di rak kultur minimal tiga hari sebelum digunakan. Hal ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya kontaminan pada media (Dodds dan Roberts 1995).

Media perlakuan

Tahap-tahap pembuatan media perlakuan hampir sama dengan pembuatan media inisiasi kalus, akan tetapi penambahan hormon berupa kinetin sebanyak 5 mg (Ramawat 1999d).

Media kultur cendawan *Pythium* sp.

Media agar, Bubuk PDA dimasukkan ke dalam gelas beker sebanyak 39 gram. Akuades sebanyak 1 L dimasukkan ke dalam gelas beker. Gelas beker dipanaskan di atas *hot plate* dan diaduk dengan *magnetic stirrer*. Setelah bahan mencair dan mendidih, selanjutnya dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak kurang lebih 4 mL tiap tabung. Tabung reaksi ditutup rapat menggunakan kapas. Media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit. Tabung reaksi diletakkan miring dan ditunggu satu sampai dua hari sebelum digunakan (Burgess et al. 1994).

Media cair, Kentang putih sebanyak 250 gram direbus dengan akuades sebanyak 500 mL hingga mendidih. Air hasil rebusan didiamkan hingga dingin, disaring, dan

dimasukkan ke dalam gelas beker. *Dextrose* sebanyak 20 gram ditambahkan ke dalam gelas beker. Akuades ditambahkan hingga volume mencapai 1 L. Larutan dipanaskan di atas *hot plate*, kemudian dituang ke dalam erlenmeyer masing-masing sebanyak 150 mL (Burgess et al. 1994).

Inisiasi kalus

Sterilisasi eksplan. Daun *R. verticillata* dicuci bersih dengan detergen cair dalam air mengalir. Daun dipotong menjadi dua bagian menggunakan gunting *dissecting kit*, kemudian direndam dalam Dithane 5% selama lima menit. Daun dibilas dengan akuades steril sebanyak dua kali masing-masing selama lima menit. Daun direndam dalam Agrept 5% selama lima menit, kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak dua kali masing-masing selama lima menit. Daun direndam dalam etanol 70% selama 0,5 menit, kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak dua kali masing-masing lima menit.

Penanaman eksplan. Eksplan yang telah disterilisasi ditanam dalam media inisiasi kalus, yaitu media dasar MS dengan penambahan NAA 2 mg/L dan kinetin 2 mg/L. Penanaman eksplan dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* secara aseptik, dengan langkah-langkah sebagai berikut. Cawan petri yang berisi daun *R. verticillata* dilewatkan di atas api *bunsen*, dibuka tutupnya, kemudian potongan daun diambil menggunakan pinset. Eksplan daun diletakkan dalam cawan petri steril, kemudian dipotong dengan ukuran 2x2 cm² menggunakan skalpel/gunting *dissecting kit*. Potongan daun ditanam pada media inisiasi dengan bekas potongan dimasukkan ke dalam media.

Persiapan bahan elisitor

Isolat *Pythium* sp. yang ditumbuhkan pada medium PDA miring selama 14 hari pada suhu kamar diambil sporanya. Spora diambil dengan cara mensuspensikan isolat *Pythium* sp. pada agar miring dengan menambahkan 10 mL akuades steril. Spora diambil dengan jumlah sekitar 6x10⁵ spora/mL. Spora sebanyak 3 mL diinokulasikan ke dalam 150 mL medium PDB, sehingga kepadatannya menjadi 1,2x10⁴ spora/mL.

Suspensi spora dalam PDB dikocok menggunakan *shaker* pada kecepatan 150 rpm pada suhu kamar dengan intensitas cahaya rendah selama 6 hari. Miselium berumur 6 hari disaring menggunakan kertas Whatman No.1 secara aseptik di dalam *laminar airflow cabinet*, kemudian dipindahkan ke dalam 100 mL akuades steril dalam erlenmeyer, selanjutnya disterilkan dengan autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Setelah dingin, miselium disaring menggunakan kertas Whatman No. 1, kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri steril.

Miselium dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C hingga beratnya konstan. Dalam kondisi aseptik, miselium digerus hingga berbentuk serbuk menggunakan mortar dan *pestle*. Serbuk miselium dibuat homogenat dalam akuades steril dengan konsentrasi 0,5; 1,0; 1,5; dan 2,0 mg BK/mL, mg BK/mL artinya berat kering miselium (mg) tiap satu mililiter akuades (Eilert et al. dalam Fitriani et al. 1999; Roos et al. dalam Sitinjak et al. 2000).

Penanaman kalus pada media perlakuan

Kalus yang diperoleh dari media inisiasi (berumur 30 hari) dipindah ke dalam media perlakuan dengan menggunakan pinset steril di dalam *laminar air flow cabinet* secara aseptik (Aryati et al. 2005). Setelah dipindahkan ke dalam media perlakuan, kalus siap untuk dielisisasi.

Perlakuan (elisitasi)

Elisitasi dilakukan dengan menambahkan homogenat *Pythium* sp. (elisitor) sebanyak 0,25 mL/g BB kalus (0,25 mL elisitor tiap satu gram berat basah kalus). Elisitasi dilakukan dengan menggunakan *sprit* 1 mL, yaitu dengan cara menyuntikkan cairan elisitor pada kalus *R. verticillata* melalui *aluminium foil*. Setelah itu, botol kultur ditutup dengan *aluminium foil* baru. Pada kontrol ditambahkan akuades steril dengan volume sama. Perlakuan dan kontrol dilakukan dalam tiga ulangan. Variasi konsentrasi elisitor adalah 0 (kontrol); 0,5; 1,0; 1,5; dan 2,0 mg BK/mL. Kalus dan kontrol yang telah dielisisasi diinkubasi selama 0, 18, 36, dan 72 jam di atas rak kultur pada suhu kamar dan diberi cahaya berupa lampu neon 10 Watt. Untuk mencegah terjadinya kontaminasi, dilakukan penyemprotan pada botol-botol kultur menggunakan alkohol 70%. Penyemprotan dilakukan setiap hari menggunakan *hand sprayer* (Ramawat 1999d). Pemanenan dan analisis reserpin dilakukan setelah masa inkubasi selesai (Eilert et al. dalam Fitriani et al. 1999).

Pengamatan dan pengujian hasil

Pengamatan pertumbuhan kalus

Pengamatan terhadap pertumbuhan dan morfologi kalus meliputi warna kalus, tekstur kalus, dan berat kering kalus. Pengukuran berat kering kalus dilakukan dengan menimbang kalus yang telah dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C hingga beratnya konstan (Fitriani et al. 1999).

Analisis kandungan reserpin dilakukan dengan tahap-tahap sebagai berikut. Kalus dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C hingga beratnya konstan, selanjutnya digerus menggunakan mortar dan *pestle* hingga halus. Sepuluh miligram serbuk kalus dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah dengan 1 mL pelarut etanol p.a kemudian divorteks. Selanjutnya, sampel ditambah dengan akuabides hingga volumenya mencapai 10 mL. Larutan disaring dan ditambah dengan sodium nitrit 0,3% sebanyak 1 mL kemudian divorteks. Larutan dimasukkan ke dalam *waterbath* bersuhu 55°C selama 30 menit.

Larutan didinginkan dan ditambah dengan asam sulfamat 0,5% sebanyak 0,5 mL, kemudian divorteks agar larutan homogen. Nilai absorbansi dan kandungan reserpin diukur dengan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1601-IPC) pada panjang gelombang 399 nm dengan larutan pembanding berupa reserpin murni yang sebelumnya telah dibuat kurva standar (Singh et al. 2004).

Penghitungan kandungan reserpin

Kandungan reserpin pada setiap gram kalus kering dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kandungan reserpin} = \frac{\text{kandungan reserpin sampel (mg/ml)} \times v \text{ etanol (ml)}}{\text{berat kalus (g)}}$$

Teknik pengumpulan data

Data yang diamati pada penelitian ini meliputi data pertumbuhan dan kandungan reserpin kalus *R. verticillata* setelah dielisisasi dengan cendawan *Pythium* sp. yang telah disterilkan (dimatikan). Pengamatan pertumbuhan meliputi morfologi kalus (tekstur dan warna kalus) dan berat kering kalus. Pengambilan data untuk mengetahui kandungan reserpin yang dihasilkan kalus *R. verticillata* dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Analisis data

Data yang diperoleh berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif berupa morfologi kalus yang meliputi warna dan tekstur kalus, disajikan secara deskriptif. Data kuantitatif berupa berat kering kalus dan kandungan reserpin, dianalisis secara statistik dengan *General Linear Model (GLM Univariate)* dan dilanjutkan dengan uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test (DMRT)* pada taraf kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tanaman pule pandak diketahui mengandung reserpin yang bermanfaat dalam pengobatan, yaitu sebagai antihipertensi. Penelitian ini dilakukan untuk meningkatkan kandungan reserpin *R. verticillata* secara in vitro dengan teknik elisitasi. Elisitor yang digunakan berupa elisitor biotik, yaitu cendawan *Pythium* sp. yang telah disterilkan (dimatikan).

Cendawan *Pythium* sp. yang digunakan sebagai bahan elisitor diperbanyak dalam cawan petri dengan media *Potato Dextrose Agar* (PDA). Setiap enam hari dilakukan subkultur ke dalam PDA miring. Cendawan berumur 14 hari pada PDA miring diambil sporanya dengan cara disuspensikan ke dalam akuades steril. Menurut Domsch et al. (1980), cendawan *Pythium* sp. mulai membentuk spora setelah berumur enam hari dan dipacu dengan dipindahkan ke dalam media air. Morfologi cendawan *Pythium* sp. dalam PDA cawan dapat diamati pada Gambar 1.

Spora cendawan *Pythium* sp. diinokulasikan ke dalam media *Potato Dextrose Broth* (PDB) dengan kepadatan $1,2 \times 10^4$ spora/mL. Miselium cendawan *Pythium* sp. yang digunakan sebagai bahan elisitor adalah miselium pada media PDB yang berumur enam hari (Gambar 2). Menurut Paxton dalam Mukarlina dan Sirega (2001), cendawan *Pythium* sp. yang dikulturkan dalam medium cair mencapai pertumbuhan maksimum pada hari keenam. Pada kondisi tersebut, cendawan siap dipanen dan digunakan sebagai bahan elisitor, karena pada kondisi tersebut, komponen dinding sel miselium sudah terbentuk dengan sempurna. Selain itu, pada akhir fase pertumbuhan, terjadi akumulasi karbohidrat dan lipid yang berguna dalam pengenalan antara inang dan patogen.

Spora cendawan *Pythium* sp. yang ditumbuhkan dalam 150 mL PDB dengan kepadatan $1,2 \times 10^4$ spora/mL menghasilkan miselium dengan berat basah 6,119 g. Berat miselium yang dihasilkan setelah pengeringan dan mencapai berat konstan adalah 0,326 g. Miselium cendawan *Pythium* sp. yang telah dikeringkan dan dihaluskan menjadi serbuk dapat diamati pada Gambar 3.

Gambar 1. Morfologi cendawan *Pythium* sp. berumur 6 hari pada media PDA cawan

Gambar 2. Morfologi miselium cendawan *Pythium* sp. berumur 6 hari: miselium pada media PDB (A), miselium yang telah disterilkan (B)

Gambar 3. Serbuk miselium cendawan *Pythium* sp.

Tahap inisiasi kalus *R. verticillata*

Tahap inisiasi kalus merupakan tahap awal yang sangat penting dalam kultur in vitro. Pada penelitian ini digunakan eksplan berupa daun *R. verticillata* yang masih muda, yaitu daun kedua dari pucuk tanaman. Penggunaan daun yang masih muda sangat baik sebagai eksplan, karena sel-selnya masih bersifat meristematis, aktif melakukan pembelahan (Armini dalam Aryati et al. 2005).

Media inisiasi kalus yang digunakan adalah media Murashige dan Skoog (media MS) dengan penambahan 2 mg/L kinetin dan 2 mg/L NAA (*Naftalen Acetic Acid*). Penambahan kinetin (sitokinin sintetik) pada media inisiasi berperan dalam memacu pembelahan sel dan pembentukan

tunas serta menghambat perakaran. NAA yang merupakan auksin sintetik berperan dalam pemanjangan sel, pembentukan dan morfogenesis akar, serta menghambat pembentukan tunas (Armini dalam Aryati et al. 2005; Dodds dan Roberts 1995). Pemberian auksin dan sitokinin dalam jumlah yang seimbang dalam media kultur in vitro memacu terbentuknya kalus dari eksplan yang digunakan (George dan Sherington dalam Wattimena 1992; Aryati et al. 2005).

Eksplan daun *R. verticillata* pada media insiasi mulai menunjukkan pertumbuhan kalus pada hari ketujuh setelah penanaman. Awal pembentukan kalus ditandai dengan mulai berubahnya warna eksplan, yaitu dari hijau menjadi hijau keputihan dan agak mengilat. Eksplan juga mengalami pembengkakan, terutama pada bagian bekas sayatan dan bagian yang mengalami kontak langsung dengan media. Menurut Dodds dan Roberts (1995), pembentukan kalus dimulai dengan pembengkakan eksplan, sehingga strukturnya kasar dan permukaannya berkilauan jika terkena cahaya. Suryowinoto (2000), mengemukakan bahwa sel-sel eksplan yang mengalami kontak dengan media terdorong menjadi meristematis kembali dan selanjutnya aktif mengadakan pembelahan seperti jaringan penutup luka. Menurut Leon et al. (2001), luka yang dialami sel atau jaringan tumbuhan akan mengaktifkan mekanisme pertahanan diri secara lokal maupun sistemik pada jaringan atau sel tersebut. Mekanisme ini dapat berupa perubahan arah jalur metabolisme dan penginduksian ekspresi gen-gen tertentu. Pada jaringan yang rusak akan terbentuk struktur sel yang tidak beraturan, mengalami dediferensiasi, mengeluarkan senyawa simpanan, dan kehilangan banyak air. Struktur sel yang tidak beraturan inilah yang berkembang menjadi kalus. Kalus *R. verticillata* berumur tujuh hari, 14 hari, dan 21 dapat diamati pada Gambar 4.

Berdasarkan Gambar 4, dapat diamati bahwa pada hari ketujuh, bagian tepi eksplan terlihat berwarna putih kekuningan dan membengkak. Pada hari ke-14, pembengkakan eksplan semakin banyak dan hampir di seluruh bagian. Pada hari ke-21, pembengkakan eksplan semakin terlihat jelas, bagian eksplan yang berupa daun hanya tersisa sedikit.

Morfologi kalus yang diamati pada penelitian ini meliputi tekstur dan warna kalus. Tekstur dan warna kalus

R. verticillata pada hari ke-30 pada media insiasi dapat diamati pada Gambar 5 dan Tabel 2.

Tekstur kalus *R. verticillata* yang diperoleh pada media insiasi adalah kompak. Menurut Street (1973), struktur kalus yang kompak memiliki susunan sel-sel yang rapat, padat, dan sulit dipisahkan. Warna kalus mengalami perubahan seiring dengan pertambahan umur kalus, yaitu dari berwarna hijau atau hijau keputihan menjadi putih kecokelatan, putih kehijauan, cokelat muda, putih kekuningan, putih, hijau kekuningan-cokelat, kuning kecokelatan, kuning, dan cokelat. Giuliano et al. dalam Santoso dan Nursandi (2004) mengungkapkan bahwa apabila kalus yang terbentuk dari eksplan berwarna hijau adalah putih atau keputihan, dan/atau cokelat berarti telah terjadi degradasi klorofil. Degradasi klorofil terjadi akibat hilangnya rantai *phytol* oleh enzim klorofilase, sehingga terbentuk klorofilin atau klorofilid yang menghasilkan warna hijau cerah. Klorofilid didegradasi lebih lanjut menjadi *pheophorbides* (berwarna cokelat) dan klorin (tidak berwarna). Proses fotooksidasi juga menyebabkan degradasi klorofil, karena pada proses tersebut ion Mg^{2+} hilang dan membentuk *pheophytin* yang berwarna cokelat dan hijau olive (keputihan). Proses degradasi klorofil dapat diamati pada Gambar 6.

Gambar 6. Lintasan proses degradasi klorofil (Santoso dan Nursandi 2004).

Gambar 4. Morfologi kalus *R. verticillata* berumur tujuh hari (A), 14 hari (B), dan 21 hari (C) pada media insiasi. Tanda panah merah menunjukkan bagian eksplan yang mengalami pembengkakan, tanda panah biru menunjukkan sisa daun.

Gambar 5. Morfologi kalus *R. verticillata* berumur 30 hari pada media inisiasi: tekstur kompak, warna kalus bermacam-macam (ditunjukkan dengan tanda panah), yaitu: putih kecokelatan (A), putih kehijauan (B), cokelat muda (C), putih kekuningan (D), cokelat (E), putih (F), hijau kekuningan-cokelat (G), kuning kecokelatan (H), dan kuning (I).

Tabel 2. Morfologi kalus *R. verticillata* berumur 30 hari pada media inisiasi

Perlakuan	Tekstur kalus	Warna kalus		
		1	2	3
1	Kompak	Putih kekuningan	Putih kehijauan	Putih
2	Kompak	Cokelat	Putih kecokelatan	Putih
3	Kompak	Cokelat muda	Putih kecokelatan	Putih kehijauan
4	Kompak	Cokelat muda	Putih kecokelatan	Putih kehijauan
5	Kompak	Putih kekuningan	Putih kecokelatan	Putih
6	Kompak	Putih kehijauan	Hijau kekuningan-cokelat	Cokelat
7	Kompak	Putih kehijauan	Kuning kecokelatan	Putih kehijauan
8	Kompak	Putih kekuningan	Putih kecokelatan	Hijau
9	Kompak	Cokelat muda	Kuning	Putih kehijauan
10	Kompak	Putih kekuningan	Putih kecokelatan	Kuning kecokelatan
11	Kompak	Putih	Putih kecokelatan	Kuning
12	Kompak	Cokelat muda	Putih kecokelatan	Putih kehijauan
13	Kompak	Putih kekuningan	Putih kecokelatan	Putih kehijauan
14	Kompak	Putih kecokelatan	Putih kecokelatan	Putih kehijauan
15	Kompak	Kuning	Putih kecokelatan	Putih kehijauan
16	Kompak	Cokelat	Putih	Kuning kecokelatan
17	Kompak	Hijau kekuningan-cokelat	Cokelat muda	Kuning kecokelatan
18	Kompak	Kuning kecokelatan	Putih kekuningan	Putih kekuningan
19	Kompak	Putih kekuningan	Putih kehijauan	Kuning kecokelatan
20	Kompak	Cokelat muda	Putih kehijauan	Kuning kecokelatan

Kalus yang berwarna cokelat selain disebabkan oleh degradasi klorofil, juga disebabkan mekanisme pertahanan diri akibat perlakuan pada jaringan atau sel eksplan. Luka tersebut dapat disebabkan oleh sayatan maupun sterilan yang digunakan. Leon et al. (2001) dan Wojtaszek (1997) menyatakan bahwa pada saat terjadi perlakuan, sel atau jaringan akan segera memproduksi jenis oksigen reaktif (*reactive oxygen species*), yaitu hidrogen peroksida (H_2O_2), anion superoksida (O_2^-), dan hidroksi radikal ($OH^\cdot$). Produksi anion superoksida akan terjadi beberapa menit setelah perlakuan, sedangkan hidrogen peroksida diproduksi maksimal setelah 4-6 jam. Menurut Fitriani et al. (1999) dan Whitmer et al. (1998), pencokelatan kalus juga disebabkan oleh adanya akumulasi senyawa fenolik.

Sintesis senyawa fenolik menyebabkan teroksidasinya fenol menjadi kuinon fenolik oleh enzim fenol oksidase (Hendaryono dan Wijayani 1994). Santoso dan Nursandi (2004) menyebutkan bahwa proses pencokelatan terjadi melalui reaksi enzimatis. Enzim yang berperan adalah polifenol oksidase, merupakan enzim kompleks yang meliputi fenol hidroksilase, kresolase, dan katekolase. Warna cokelat pada kalus juga dapat disebabkan oleh penuaan. Abdullah et al. (1998) menyebutkan bahwa sel-sel muda yang sehat berwarna kuning, namun akan berubah menjadi cokelat seiring dengan pertumbuhan kalus yang semakin tua. Menurut Suryowinoto (2000) serta Santoso dan Nursandi (2004), peristiwa pencokelatan yang salah satunya disebabkan oleh degradasi klorofil merupakan permasalahan yang umum terjadi pada kultur in vitro. Hal ini dapat mengganggu pertumbuhan dan perkembangan kalus. Peristiwa ini sulit diatasi, tetapi dapat diatasi antara lain dengan penambahan vitamin C, mengurangi

karbohidrat media, mengurangi kontak dengan oksigen, dan menambahkan arang aktif.

Kalus yang berwarna hijau disebabkan oleh adanya cahaya yang memacu pembentukan klorofil. Sintesis klorofil distimulasi terutama oleh cahaya merah. Protoklorofilid (prekursor klorofil) yang memiliki absorbansi maksimum pada panjang gelombang 634 nm diubah oleh cahaya merah menjadi klorofil (berwarna hijau). Penambahan sitokinin mendorong pembentukan enzim-enzim fotosintesis dan klorofil pada kalus (Armini dalam Aryati et al. 2005). Pemberian sitokinin memacu perkembangan etioplas menjadi kloroplas, khususnya dengan mendorong pembentukan grana, serta meningkatkan laju pembentukan klorofil. Sitokinin juga mendorong terbentuknya protein, tempat menempelnya klorofil. Kemampuan sitokinin dalam mengaktifkan sintesis protein yang mengikat klorofil a dan b disebabkan sitokinin mampu meningkatkan jumlah molekul mRNA yang menyandikan protein pengikat klorofil a dan b pada bagian tilakoid (Salisbury dan Ross 1995c).

Pertumbuhan kalus *R. verticillata* pada media perlakuan

Tahap perlakuan diawali dengan memindahkan kalus berumur 30 hari dari media inisiasi ke dalam media perlakuan yang dilakukan secara aseptis. Kalus yang telah dipindahkan ke dalam media perlakuan selanjutnya dielisisasi dengan homogenat *Pythium* sp. sebanyak 0,25 mL/g berat basah kalus, dengan konsentrasi 0; 0,5; 1,0; 1,5; dan 2,0 mg BK/mL serta lama elisitasi 0, 18, 36, dan 72 jam.

Tabel 3. Morfologi kalus *R. verticillata* pada media perlakuan setelah dielisisasi dengan cendawan *Pythium* sp.

Perlakuan	Tekstur Kalus	Warna kalus awal			Warna kalus akhir		
		1	2	3	1	2	3
K ₀ L ₀	Kompak	Putih kekuningan	Putih kehijauan	Putih	Putih kekuningan	Putih kehijauan	Putih
K ₁ L ₀	Kompak	Cokelat	Putih kecokelatan	Putih	Cokelat	Putih kecokelatan	Putih kecokelatan
K ₂ L ₀	Kompak	Cokelat muda	Putih kecokelatan	Putih kehijauan	Cokelat	Putih kecokelatan	Putih kehijauan
K ₃ L ₀	Kompak	Cokelat muda	Putih kecokelatan	Putih kehijauan	Cokelat	Cokelat muda	Cokelat muda
K ₄ L ₀	Kompak	Putih kekuningan	Putih kecokelatan	Putih	Putih kecokelatan	Putih kecokelatan	Cokelat muda
K ₀ L ₁	Kompak	Putih kehijauan	Hijau kekuningan-cokelat	Cokelat	Cokelat muda	Cokelat, hijau	Cokelat
K ₁ L ₁	Kompak	Putih kehijauan	Kuning kecokelatan	Putih kehijauan	Cokelat	Cokelat muda	Putih kehijauan
K ₂ L ₁	Kompak	Putih kekuningan	Putih kecokelatan	Hijau	Cokelat	Cokelat	Hijau, cokelat
K ₃ L ₁	Kompak	Cokelat muda	Kuning	Putih kehijauan	Cokelat	Cokelat muda	Cokelat muda
K ₄ L ₁	Kompak	Putih kekuningan	Putih kecokelatan	Kuning kecokelatan	Cokelat	Cokelat	Cokelat
K ₀ L ₂	Kompak	Putih	Putih kecokelatan	Kuning	Cokelat	Putih kecokelatan	Cokelat muda
K ₁ L ₂	Kompak	Cokelat muda	Putih kecokelatan	Putih kehijauan	Cokelat	Cokelat	Cokelat muda
K ₂ L ₂	Kompak	Putih kekuningan	Putih kecokelatan	Putih kehijauan	Putih kecokelatan	Putih kecokelatan	Cokelat muda
K ₃ L ₂	Kompak	Putih kecokelatan	Putih kecokelatan	Putih kehijauan	Cokelat	Cokelat	Cokelat muda
K ₄ L ₂	Kompak	Kuning	Putih kecokelatan	Putih kehijauan	Cokelat	Cokelat	Cokelat muda
K ₀ L ₃	Kompak	Cokelat	Putih	Kuning kecokelatan	Cokelat	Cokelat muda	Kuning kecokelatan
K ₁ L ₃	Kompak	Hijau kekuningan-cokelat	Cokelat muda	Kuning kecokelatan	Cokelat muda	Cokelat	Cokelat
K ₂ L ₃	Kompak	Kuning kecokelatan	Putih kekuningan	Putih kekuningan	Cokelat	Cokelat muda	Cokelat
K ₃ L ₃	Kompak	Putih kekuningan	Putih kehijauan	Kuning kecokelatan	Cokelat	Cokelat	Cokelat
K ₄ L ₃	Kompak	Cokelat muda	Putih kehijauan	Kuning kecokelatan	Cokelat	Cokelat	Cokelat

Keterangan: K₀ = Konsentrasi elisitor 0,0 mg BK/mL, K₁ = konsentrasi elisitor 0,5 mg BK/mL, K₂ = konsentrasi elisitor 1,0 mg BK/mL, K₃ = konsentrasi elisitor 1,5 mg BK/mL, K₄ = konsentrasi elisitor 2,0 mg BK/mL, L₀ = lama elisitasi 0 jam, L₁ = lama elisitasi 18 jam, L₂ = lama elisitasi 36 jam, L₃ = lama elisitasi 72 jam, 1 = ulangan pertama, 2 = ulangan kedua, 3 = ulangan ketiga.

Morfologi kalus *R. verticillata*

Morfologi kalus *R. verticillata* meliputi tekstur dan warna kalus setelah dielisitasi dengan cendawan *Pythium* sp. dapat diamati pada Tabel 3. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa hingga akhir perlakuan, tekstur kalus tetap kompak. Menurut Street (1973), tekstur kalus yang kompak memiliki susunan sel-sel yang rapat, padat, dan sulit dipisahkan menjadi klon-klon tunggal. Sel-sel kalus dapat dipisahkan menjadi klon tunggal (struktur kalus remah/*friable*) ketika inisiasi dilakukan dalam media cair, seperti dalam kultur suspensi dengan aerasi secara kontinu (Dodds dan Roberts 1995). Dalam penelitian ini, tahap inisiasi kalus menggunakan media padat, oleh karena itu struktur kalus yang diperoleh kompak. Warna kalus *R. verticillata* pada media perlakuan tanpa pemberian elisitor tidak mengalami perubahan, sedangkan kalus yang dielisitasi mengalami perubahan. Kalus mengalami pencokelatan seiring dengan peningkatan konsentrasi elisitor dan lama elisitasi. Menurut Sitinjak et al. (2000), kalus yang dielisitasi berwarna lebih gelap (cokelat/kekuning-kuningan) apabila dibandingkan kontrol. Hal ini diduga sebagai respons hipersensitif yang ditunjukkan jaringan akibat adanya cekaman. Menurut Wojtaszek (1997), respons hipersensitif merupakan mekanisme yang baik untuk membatasi penyebaran patogen. Respons hipersensitif tersebut berupa mekanisme mematikan sel yang terinfeksi patogen, dalam hal ini berupa elisitor, agar tidak menyebar ke sel-sel yang lain.

Kalus yang dielisitasi dengan cendawan *Pythium* sp. menunjukkan respons pada warna dan pertumbuhan. Menurut Isaac dalam Fitriani et al. (1999), kalus yang dielisitasi mengalami pencokelatan dan hambatan pertumbuhan. Munculnya warna cokelat pada kalus diduga karena terjadi sintesis senyawa fenolik akibat luka yang ditimbulkan oleh elisitor. Menurut Vickery dan Vickery dalam Fitriani et al. (1999) serta Santoso dan Nursandi (2004), kondisi cekaman yang disebabkan oleh perlakuan yang terjadi pada kalus memacu sintesis senyawa fenolik. Santoso dan Nursandi (2004) mengemukakan bahwa proses perubahan warna kalus merupakan peristiwa alamiah yang terjadi pada sistem biologi sebagai suatu proses perubahan adaptif bagian tanaman akibat pengaruh fisik atau biokimia, seperti memar, pematangan, serangan penyakit, atau kondisi abnormal lainnya, yang menyebabkan cekaman pada jaringan. Pada penelitian ini, kalus dielisitasi dengan cendawan *Pythium* sp. Elisitor dikenal sebagai zat asing oleh kalus dan mengakibatkan cekaman. Adanya cekaman berupa elisitor inilah yang diduga menyebabkan perubahan warna kalus.

Berat kering kalus *R. verticillata*

Elisitasi berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus. Pertumbuhan kalus dapat diamati dengan cara melakukan pengukuran berat kering, karena bahan kering dianggap sebagai manifestasi semua proses dan peristiwa yang terjadi dalam pertumbuhan tanaman (Sitompul dan Guritno 1995). Berat kering diperoleh melalui proses pengurangan kadar air dan penghentian aktivitas metabolisme, hingga mencapai berat konstan. Pengeringan bahan bertujuan untuk menghilangkan semua kandungan air dan

menghentikan aktivitas metabolisme di dalamnya. Bahan tersebut idealnya dikeringkan pada suhu 80°C hingga berat yang dicapai konstan (Sitompul dan Guritno 1995; Salisbury dan Ross 1995b). Pada penelitian ini, kalus dikeringkan pada suhu 50°C karena senyawa alkaloid mudah mengalami dekomposisi, terutama oleh panas (Sastrohamidjojo 1996).

Hasil analisis statistik dengan *General Linear Model Univariate/GLM Univariate* menunjukkan bahwa pemberian elisitor dan lama waktu elisitasi berpengaruh secara signifikan terhadap rata-rata berat kering kalus, tetapi interaksi keduanya tidak memberikan pengaruh yang signifikan. Artinya, masing-masing faktor perlakuan dapat bertindak sebagai faktor tunggal. Data rata-rata berat kering kalus *R. verticillata* setelah dielisitasi dengan cendawan *Pythium* sp. tersaji pada Tabel 4.

Konsentrasi elisitor dan lama elisitasi menyebabkan rata-rata berat kering kalus menjadi rendah (Gambar 7). Rata-rata berat kering kalus semakin rendah seiring dengan penambahan konsentrasi elisitor cendawan *Pythium* sp. dan lama elisitasi (Tabel 4). Berat kering kalus paling rendah terjadi pada penambahan konsentrasi elisitor 2,0 mg BK/mL dan lama elisitasi 72 jam, yaitu sebesar 0,039 g.

Tabel 4. Berat kering kalus *R. Verticillata* setelah dielisitasi dengan *Pythium* sp.

Konsentrasi elisitor (mg BK/mL)	Rata-rata berat kering kalus (g) pada pemanenan jam ke-			
	0	18	36	72
0,0	0,119 ^d	0,070 ^{abc}	0,066 ^{abc}	0,061 ^{abc}
0,5	0,095 ^{cd}	0,060 ^{abc}	0,062 ^{abc}	0,063 ^{abc}
1,0	0,088 ^{bcd}	0,049 ^a	0,055 ^{ab}	0,057 ^{ab}
1,5	0,070 ^{abc}	0,050 ^a	0,053 ^{ab}	0,043 ^a
2,0	0,064 ^{abc}	0,049 ^a	0,047 ^a	0,039 ^a

Gambar 7. Rata-rata berat kering kalus *R. verticillata* pada berbagai konsentrasi elisitor dan lama elisitasi.

Rendahnya berat kering kalus terjadi karena kalus berada pada masa adaptasi terhadap cekaman berupa elisitor cendawan *Pythium* sp. Kalus berusaha mempertahankan diri. Sel-sel kalus diduga mengalami kematian, sehingga berat kering kalus menjadi rendah. Berdasarkan Tabel 4 juga dapat diketahui bahwa pada pemanenan kalus jam ke-36 beberapa kalus mengalami peningkatan berat kering. Hal ini diduga karena sebagian sel kalus masih mampu melakukan pertumbuhan. Pada pemanenan kalus jam ke-72 terlihat bahwa berat kering kalus mengalami penurunan. Hal ini terjadi karena cekaman yang ditimbulkan elisitor cendawan *Pythium* sp. berlangsung lebih lama, sehingga menyebabkan sel-sel kalus yang mengalami kematian semakin banyak.

Berat kering kalus berhubungan dengan laju fotosintesis dan respirasi. Rendahnya berat kering diduga disebabkan oleh rendahnya laju fotosintesis dan tingginya respirasi untuk menyediakan prekursor dan energi dalam pembentukan metabolit sekunder. Respirasi menggunakan energi yang berasal dari hasil fotosintesis. Fotosintesis meningkatkan berat kering karena adanya pengambilan karbon dioksida, sedangkan respirasi menyebabkan penurunan berat kering karena pengeluaran karbon dioksida (Gardner et al. 1991).

Rendahnya berat kering kalus menunjukkan bahwa penambahan elisitor cendawan *Pythium* sp. bersifat menghambat pertumbuhan. Menurut Radman et al. (2003), masuknya elisitor ke dalam sel yang diawali dengan pengikatan oleh reseptor yang terdapat pada membran plasma menyebabkan perubahan aliran ion melalui membran plasma. Ion Ca^{2+} dari lingkungan ekstraseluler dan intraseluler (retikulum endoplasma dan vakuola) akan masuk ke dalam sitoplasma, hal ini memacu ion K^+ dan Cl^- untuk keluar dari sitoplasma. Menurut Alaoui-Sosse et al. (2004), kalium berperan penting di dalam vakuola untuk memelihara potensial osmotik dan tekanan turgor sel. Sel yang kehilangan tekanan turgor mengalami hambatan dalam proses pemanjangan sel. Salisbury dan Ross (1995a) dan Alaoui-Sosse et al. (2004) mengemukakan bahwa kalium berperan dalam mengaktifkan enzim yang diperlukan untuk membentuk pati dan protein. Sel yang kekurangan kalium akan mengakumulasi karbohidrat dan akan terjadi penurunan kadar pati di dalamnya, sehingga menyebabkan penghambatan proses fotosintesis. Penghambatan proses fotosintesis menyebabkan pertumbuhan kalus menjadi terhambat, sehingga berat kering yang dihasilkan rendah.

Analisis kandungan reserpin pada kalus *R. verticillata*

Hasil analisis statistik dengan *General Linear Model Univariate/GLM Univariate* menunjukkan bahwa pemberian elisitor dan lama waktu elisitasi berpengaruh secara signifikan terhadap kandungan reserpin, tetapi interaksi keduanya tidak memberikan pengaruh yang signifikan. Artinya, masing-masing faktor perlakuan dapat bertindak sebagai faktor tunggal. Data rata-rata kandungan reserpin kalus *R. verticillata* tersaji pada Tabel 5.

Konsentrasi elisitor dan lama elisitasi berperan dalam meningkatkan rata-rata kandungan reserpin kalus *R. verticillata* (Gambar 8). Rata-rata kandungan reserpin kalus

meningkat seiring dengan penambahan konsentrasi elisitor cendawan *Pythium* sp. Peningkatan kandungan reserpin juga terjadi seiring dengan lama elisitasi. Peningkatan kandungan reserpin tertinggi terjadi pada penambahan elisitor cendawan *Pythium* sp. sebanyak 2,0 mg BK/mL dengan lama elisitasi 72 jam, yaitu meningkat sebesar 103,849% dibandingkan dengan kontrol (Tabel 6).

Menurut Sitinjak et al. (2000), lama elisitasi mempengaruhi kandungan reserpin dengan adanya efek *post binding*. Efek *post binding* merupakan efek yang terjadi setelah efektor diterima reseptor. Efek *post binding* dapat diamati pada mekanisme penghantaran sinyal ekstraseluler (Gambar 9). Sinyal ekstraseluler (elisitor) diterima reseptor pada membran plasma. Fosfatidil inositol (PI) yang merupakan *second messenger* difosforilasi menjadi fosfatidil inositol bifosfat atau fosfoinositid (PIP₂) oleh enzim kinase. PIP₂ didegradasi menjadi inositol trifosfat (IP₃) dan diasil gliserol oleh fosfolipase C. IP₃

Tabel 5. Kandungan reserpin kalus *R. verticillata* setelah dielisitasi dengan cendawan *Pythium* sp.

Konsentrasi elisitor (mg BK/mL)	Rata-rata kandungan reserpin kalus (mg/g BK kalus) pada pemanenan jam ke-			
	0	18	36	72
0,0	236,400 ^a	248,867 ^a	264,300 ^{abc}	270,367 ^{abcd}
0,5	254,967 ^{ab}	292,767 ^{abcde}	320,133 ^{abcde}	347,133 ^{cdefg}
1,0	285,200 ^{abcd}	310,633 ^{abcde}	338,033 ^{bcd}	376,467 ^{efgh}
1,5	295,300 ^{abcde}	334,233 ^{bcde}	393,533 ^{fgh}	403,500 ^{gh}
2,0	299,733 ^{abcde}	353,533 ^{defg}	436,067 ^{hi}	481,900 ⁱ

Tabel 6. Persentase peningkatan kandungan reserpin kalus *R. verticillata* setelah dielisitasi dengan cendawan *Pythium* sp. dibandingkan dengan kontrol.

Konsentrasi elisitor (mg BK/mL)	Persentase peningkatan kandungan reserpin (%) pada pemanenan jam ke-			
	0	18	36	72
0,0	0,000	5,274	11,802	14,368
0,5	7,854	23,844	35,420	46,842
1,0	20,643	31,402	42,992	59,250
1,5	24,915	41,385	66,469	70,685
2,0	26,791	49,549	84,461	103,849

Gambar 8. Rata-rata kandungan reserpin kalus *R. verticillata* pada berbagai konsentrasi elisitor dan lama elisitasi.

Gambar 9. Mekanisme penghantaran sinyal ekstraseluler pada membran plasma (Srivastava dan Gupta 1996).

mengeluarkan kalsium dari retikulum endoplasma dan vakuola yang selanjutnya masuk ke sitosol. Naiknya Ca^{2+} dalam sitosol mengaktifkan beberapa enzim, termasuk protein kinase. Protein kinase memfosforilasi enzim yang mengatur berbagai metabolisme, termasuk produksi metabolit sekunder (Ramawat dan Merillon 1999a). Produksi reserpin memerlukan waktu, karena setelah pengikatan elisitor oleh reseptor terjadi serangkaian proses untuk meningkatkan aktivitas enzim yang berperan dalam produksi reserpin.

Menurut Endt et al. (2002), pengaturan jalur biosintesis metabolit sekunder dilakukan oleh faktor transkripsi spesifik. Faktor transkripsi ini berupa sekuen *DNA-binding protein* yang mengatur inisiasi mRNA dan yang berhubungan dengan daerah promoter gen target. Protein tersebut mengatur transkripsi gen berdasarkan tipe jaringan dan/atau dalam hal respons terhadap sinyal internal (hormon tanaman), dan sinyal eksternal (elisitor biotik atau sinar UV). Promoter yang terlibat dalam ekspresi gen yang responsif terhadap elisitor telah diidentifikasi pada gen yang menyandikan *strictosidine synthase* dalam biosintesis Alkaloid Indol Terpenoid. Promoter pada gen *strictosidine synthase* memiliki daerah yang disebut dengan *Jasmonate and Elicitor-Responsive Element (JERE)*. Asam jasmonat dan elisitor akan mengaktifkan protein yang berperan sebagai faktor transkripsi dengan mengikatnya secara langsung pada *JERE* yang kemudian akan meningkatkan ekspresi gen yang menyandi enzim *strictosidine synthase*.

Peningkatan reserpin pada kalus *R. verticillata* setelah dielisitasi dengan cendawan *Pythium* sp. diduga disebabkan oleh peningkatan sintesis protein atau enzim yang terlibat langsung dalam sintesis reserpin. Yoshikawa et al. (1993) dalam Fitriani et al. (1999) mengemukakan bahwa elisitor merupakan efektor yang akan berinteraksi dengan reseptor yang ada pada sel tumbuhan, antara lain pada membran plasma. Pengenalan antara efektor dengan reseptor akan menginduksi serangkaian proses yang melibatkan transkripsi dan translasi gen-gen tertentu yang kemudian menginduksi sintesis enzim yang diperlukan dalam biosintesis metabolit sekunder. Menurut Pasquali dalam Fitriani et al. (1999), penambahan elisitor meningkatkan transkripsi mRNA untuk sintesis enzim *tryptophan*

decarboxylase (TDC) dan *strictosidine synthase* (SS). TDC berperan mengubah triptofan menjadi triptamin, sedangkan SS berperan untuk mengkondensasikan triptamin dan sekologenin menjadi striktosidin. Striktosidin merupakan prekursor dalam pembentukan reserpin. Peningkatan TDC dan SS dapat meningkatkan sintesis reserpin.

Sintesis reserpin pada kalus *R. verticillata* diduga juga berkaitan dengan laju fotosintesis dan respirasi. Pada penelitian ini, kalus diduga memiliki laju respirasi lebih tinggi dibandingkan laju fotosintesis. Hal ini disebabkan oleh telah tersedianya sukrosa dalam jumlah yang cukup pada media kultur dan sedikitnya kandungan klorofil yang ditandai dengan sedikitnya warna hijau pada kalus. Tingginya laju respirasi berperan dalam menyediakan asam amino yang berperan sebagai prekursor pembentukan reserpin. Menurut Salisbury dan Ross (1995b), sukrosa merupakan produk fotosintesis yang menjadi sumber dalam respirasi. Respirasi menghasilkan produk esensial yang dihasilkan dari pemecahan kerangka karbon, yaitu berupa asam amino yang berfungsi dalam pembentukan protein, nukleotida yang berperan dalam pembentukan asam nukleat, prazat karbon untuk porfirin, lemak, dan karotenoid. Menurut Kutchan (1995), asam amino triptofan berperan sebagai prekursor dalam pembentukan alkaloid indol monoterpenoid.

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat diketahui bahwa pemberian elisitor cendawan *Pythium* sp. dengan konsentrasi 0; 0,5; 1,0; 1,5; dan 2,0 mg BK/mL dengan lama elisitasi 0, 18, 36, dan 72 jam berpengaruh secara signifikan terhadap berat kering dan kandungan reserpin kalus *R. verticillata*. Peningkatan konsentrasi elisitor dan lama elisitasi menyebabkan semakin rendahnya berat kering kalus *R. verticillata* yang dihasilkan, tetapi mampu meningkatkan kandungan reserpin. Berat kering kalus paling rendah diperoleh pada penambahan elisitor 2,0 mg BK/mL dan lama elisitasi 72 jam, yaitu 0,039 g. Kandungan reserpin paling tinggi juga diperoleh pada penambahan elisitor 2,0 mg BK/mL dan lama elisitasi 72 jam, yaitu 481,900 mg/g BK kalus atau meningkat sebesar 103,849% dibandingkan dengan kontrol.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil kesimpulan sebagai berikut: (i) Kandungan reserpin pada kultur kalus pule pandak (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon) meningkat setelah dielisitasi dengan cendawan *Pythium* sp. (ii) Konsentrasi elisitor dan waktu panen yang optimum untuk menghasilkan kandungan reserpin tertinggi pada kultur kalus pule pandak belum dapat dicapai. Kandungan reserpin tertinggi diperoleh pada konsentrasi elisitor 2,0 mg BK/mL dan waktu panen 72 jam, yaitu 481,900 mg/g BK kalus, meningkat 103,849% dibandingkan kontrol.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah MA, Marziah M, Arif AB. 1998. Establishment of cell suspension cultures of *M. elliptica* for the production of anthraquinones. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 54: 173-182.

- Achmad SA, Hakim EH, Juliawaty LD et al. 2004. Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationship with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Sci* 30: 1-6.
- Aprianita ERR, Siregar AH. 2003. Pengaruh pemberian elisitor jamur *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. terhadap kandungan ajmalisin pada kultur kalus berakar *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Berita Biologi* 6 (4): 543-547.
- Aryati H, Anggarwulan E, Solichatun. 2005. Pengaruh penambahan DL-triptofan terhadap pertumbuhan kalus dan produksi alkaloid reserpin pule pandak (*Rauvolfia serpentina* (L.) Bentham ex Kurz.) secara in vitro. *Biofarmasi* 3 (2): 52-56.
- Burgess LW, Summerell BA, Bullock S et al. 1994. Laboratory manual for *Fusarium* research. 3rd edition. University of Sydney, Sydney.
- Carlie MJ, Watkinson SC. 1994. The Fungi. Academic Press, London.
- de Padua LS, Bunyapaphtsara N, Lemmens RHMJ. 1999. Medicinal and poisonous plants 1. Plant Resources of South-East Asia. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Depkes RI Dirjen POM. 2000. Informatorium Obat Nasional Indonesia 2000. Depkes RI, Jakarta.
- Dodds JH, Roberts LW. 1995. Experiments in plants tissue culture, 3rd edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Domsch KH, Gams W, Anderson T. 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press, London.
- Endt DV, Kijnei JW, Memelink J. 2002. Transcription factor controlling plant secondary metabolism: What regulates the regulator? *Phytochemistry* 61: 107-114.
- Fitriani A, Siregar AH, Esyanti RR. 1999. Pengaruh pemberian homogenat *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. terhadap kandungan ajmalisin dalam kultur kalus tapak dara. *Hayati* 6 (3): 65-69.
- Fudholi A. 2001. Teknologi dan formulasi sediaan obat bahan alam dan permasalahannya. *Pharmakon* 2 (1): 25-29.
- Gardner FP, Pearce RB, Mitchell RI. 1991. Fisiologi tanaman budidaya. Diterjemahkan oleh: Susilo H. UI Press, Jakarta.
- Hendaryono DPS, Wijayani A. 1994. Teknik kultur jaringan: Pengenalan dan petunjuk perbanyakan tanaman secara vegetatif-modern. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Hill AF. 1996. Economic botany. Tata Mc. Graw-Hill, New Delhi.
- Joko PW, Sugiarso S, Widiyastuti Y et al. 1995. Beberapa tumbuhan obat penyusun jamu setelah melahirkan di Desa Pengasih Kulonprogo. Prosiding dan Lokakarya Nasional Etnobotani II: Buku I Tumbuhan Obat. Ikatan Pustakawan Indonesia (IPI), Jakarta.
- Kutchan TM. 1995. Alkaloid biosynthesis - The basic for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell* 7 (7): 1059-1070.
- Leon J, Rojo E, Sanchez-Serrano JJ. 2001. Wound signalling in plants. *J Exp Bot* 52 (354): 1-9.
- Lestari EG, Mariska I. 1997. Kultur in vitro sebagai metode pelestarian tumbuhan obat langka. *Buletin Plasma Nutfah* 2 (1): 1-8.
- LIPI [Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia]. 1999. Koleksi tumbuhan obat Kebun Raya Bogor. LIPI, Bogor.
- Mantell SH, Smith H. 1983. Cultural factor that influence secondary metabolites accumulation in plant cell and tissue cultures. *Plant Biotechnology*. Cambridge University, London.
- Mirfat. 2004. Pengaruh pemberian elisitor dari *Verticillium dahliae* dan *Rhizoctonia solani* terhadap produksi gosipol pada agregat sel *Gossypium hirsutum*. www.digilib.bi.itb.ac.id. [14 Desember 2005].
- Mukarlina ERR, Sirega AH. 2001. Pengaruh pemberian elisitor homogenat jamur *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. terhadap kandungan ajmalisin dalam kultur akar *Catharanthus roseus* (L) G. Don. *Jurnal Matematika dan Sains* 11 (2): 44-49.
- Purnamaningsih R, Mariska I, Gati E et al. 1998. Proliferasi tunas dan penekanan masalah penguningan daun sebagai usaha pelestarian tumbuhan pule. *Plasma Nutfah* 3 (1): 1-7.
- Radman R, Saez T, Bucke C et al. 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol Appl Biochem* 37: 91-102.
- Rahayu S. 2004. Pengaruh elisitasi dengan *Verticillium dahliae* dan *Rhizoctonia solani* terhadap kandungan gosipol kalus *Gossypium hirsutum* pada beberapa tingkat subkultur. www.digilib.bi.itb.ac.id. [14 Desember 2005].
- Ramawat KG, Merillon JM. 1999a. Introduction: Research need. In: Ramawat KG, Merillon JM (eds). *Biotechnology Secondary Metabolites*. Sciences Publisher, Inc., USA.
- Ramawat KG, Sonie KC. 1999b. Production under stress. In: Ramawat KG, Merillon JM (eds). *Biotechnology Secondary Metabolites*. Sciences Publisher, Inc., USA.
- Ramawat KG. 1999d. Production in culture optimization. In: Ramawat KG, Merillon JM (eds). *Biotechnology Secondary Metabolites*. Sciences Publisher, Inc., USA.
- Ratnasari J, Siregar H, Rizkita RE. 2001. Pengaruh pemberian elisitor ekstrak khamir *Saccharomyces cerevisiae* Hansen terhadap kandungan ajmalisin dalam kultur agregat sel *Catharanthus roseus* (L) G. Don. *Berita Biologi* 5 (4): 349-355.
- Salisbury FB, Ross CW. 1995a. Fisiologi tumbuhan. Jilid ke-1. Diterjemahkan oleh: Padmawinata K. Penerbit ITB, Bandung.
- Salisbury FB, Ross CW. 1995b. Fisiologi tumbuhan. Jilid ke-2. Diterjemahkan oleh: Padmawinata K. Penerbit ITB, Bandung.
- Salisbury FB, Ross CW. 1995c. Fisiologi tumbuhan. Jilid ke-3. Diterjemahkan oleh: Padmawinata K. Penerbit ITB, Bandung.
- Santoso U, Nursandi F. 2004. Kultur jaringan tanaman. UMM Press, Malang.
- Sastrohamidjojo H. 1996. Sintesis bahan alam. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Setiawati T. 2001. Pengaruh Pemberian Elisitor yang Berasal dari *Verticillium dahliae* terhadap Produksi Gosipol Kultur Kapas (*Gossypium hirsutum*). [Thesis]. ITB Press, Bandung.
- Singh DK, Srivastava B, Sahu A. 2004. Spectrophotometric determination of *Rauwolfia* alkaloids: Estimation of reserpine in pharmaceuticals. *Anal Sci* 20: 571-573.
- Sitinjak RR, Siregar AH, Rizkita RE. 2000. Pengaruh pemberian ekstrak *Saccharomyces cerevisiae* Hansen terhadap kandungan gosipol pada kultur kalus *Gossypium hirsutum* L. *Berita Biologi* 5 (2): 131-135.
- Sitompul SM, Guritno B. 1995. Analisis pertumbuhan tanaman. UGM Press, Yogyakarta.
- Street HE. 1973. Plant tissue and cell culture. University of California Press, Los Angeles.
- Suryowinoto M. 2000. Pemuliaan tanaman secara in vitro. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Thien AT, Ziegler S. 2001. Utilization of medicinal plants in Bach Ma National Park, Vietnam. *Medicinal Plant Conversation* 7.
- Thomas RC. 2003. Compositon of fungus hyphae III: The Pythiaceae. *Amer Jour Bot*. www.amerj.com. [12 September 2006].
- Thomson. 1998. *Rauwolfia* alkaloids. www.nlm.nih.gov. [8 April 2006].
- Triharso. 1994. Dasar-dasar perlindungan tanaman. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Wattimena GA. 1992. Bioteknologi tanaman. Penerbit ITB, Bandung.
- Whitmer S, Canel C, Hallard D et al. 1998. Influence of precursor availability on alkaloid accumulation by transgenic cell line of *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol* 116: 853- 857.
- Wojtaszek P. 1997. Oxidative burst: An early plant response to pathogen infection. *Biochem J* 322: 681-692.