

Biofarmasi

Journal of Natural Products Biochemistry

**VOLUME 5
NOMOR 2
AGUSTUS 2007
ISSN: 1693-2242**

PENERBIT:

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta

ALAMAT PENERBIT/REDAKSI:

Laboratorium Pusat MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta
Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126
Tel. & Fax. +62-271-663375
E-mail: unsjournals@yahoo.com
Online: www.unsjournals.com

TERBIT PERTAMA TAHUN:

2003

ISSN:

1693-2242

PEMIMPIN REDAKSI/PENANGGUNGJAWAB:

S u t a r n o

SEKRETARIS REDAKSI:

Ahmad Dwi Setyawan

PENYUNTING PELAKSANA:

Djoko Santoso
Ratna Setyaningsih
Solichatun
Suratman
Tetri Widiyani

PENYUNTING AHLI:

Prof. Dr. Dayar Arbain – Universitas Andalas Padang
Prof. Dr. dr. Santosa, M.S. – Universitas Sebelas Maret Surakarta
Prof. Dr. Syamsul Arifin Achmad – Institut Teknologi Bandung
Prof. Drs. Suranto, M.Sc., Ph.D. – Universitas Sebelas Maret Surakarta
Dr. Chaerul, Apt. – Pusat Penelitian Biologi LIPI Bogor
Dr. C.J. Sugiharjo, Apt. – Universitas Gadjah Mada Yogyakarta
Dr. Ir. Supriyadi, M.Sc. – Balai Penelitian Tanaman Obat dan Rempah Bogor

Biofarmasi, Journal of Natural Products Biochemistry

mempublikasikan tulisan ilmiah, baik hasil penelitian asli maupun telaah pustaka (*review*) dalam lingkup ilmu-ilmu farmasi dan biologi, dengan tema khusus biokimia bahan alam (*natural product biochemistry*). Setiap naskah yang dikirimkan akan ditelaah oleh redaktur pelaksana, redaktur ahli, dan redaktur tamu yang diundang secara khusus sesuai bidangnya. Dalam rangka menyongsong pasar bebas, penulis sangat dianjurkan menuliskan karyanya dalam Bahasa Inggris, meskipun tulisan dalam Bahasa Indonesia yang baik dan benar tetap sangat dihargai. Hingga nomor ini, jurnal dikirimkan kepada institusi-institusi yang meminta tanpa biaya pengganti, sebagai bentuk pertukaran pustaka demi mendorong penelitian, pengembangan, dan pemanfaatan bahan alam. Jurnal ini terbit dua kali setahun, setiap bulan Pebruari dan Agustus.

Pengaruh penambahan daun salam (*Eugenia polyantha*) terhadap kualitas mikrobiologis, kualitas organoleptis, dan daya simpan telur asin pada suhu kamar

The influence of salam leaf (*Eugenia polyantha*) adding on the microbiological quality, organoleptic quality and salted duck egg shell-life during storage in room temperature

ANA FITRI, RATNA SETYANINGSIH, ARI SUSILOWATI

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

Manuskrip diterima: 9 April 2007. Revisi disetujui: 12 Juli 2007.

Abstract. Fitri A, Setyaningsih R, Susilowati A. 2007. The influence of salam leaf (*Eugenia polyantha*) adding on the microbiological quality, organoleptic quality and salted duck egg shell-life during storage in room temperature. *Biofarmasi* 5: 47-54. The aim of this research was to determine the influence of salam leaf (*Eugenia polyantha* Wight) concentration variation on the microbiological quality, organoleptic quality and the salted duck egg shell-life during storage in room temperature. In this research, the salam leaf concentration that added consisted of four levels. The ratio of salam leaf-water were 1:4, 2:4, 3:4, and control. The analysis of experimental parameters was carried out once in 2 weeks for 4 weeks. The experimental parameters were the presence of *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* number, organoleptic value, and total volatile bases (TVB). The presence of *Salmonella* sp. and the number of *Staphylococcus aureus* data were analyzed descriptively, while the organoleptic data were analyzed by using nonparametric test and followed with correlation and regression analysis. Data were analyzed by using a General Linear Model on TVB and followed with Duncan Multiple Range Test (DMRT) on the significance level of 5%, correlation and regression analysis. The result of this research showed that there was no *Salmonella* sp. contained in the salted egg for 4 weeks storage. The highest number of *Staphylococcus aureus* was found on the salted egg which stored for 4 weeks and ratio 1:4 of salam leaf-water. However, the result of organoleptic test showed that salam leaf addition did not influence on the accepting of salted duck egg significantly and had a negative correlation. Salam leaf concentration influenced on TVB of the salted duck egg in different storage duration at a room temperature and had a positive correlation.

Keywords: *Eugenia polyantha*, microbiological quality, organoleptic quality, salam leaf, shell-life salted duck egg

PENDAHULUAN

Keberhasilan yang dicapai di bidang peternakan unggas telah memberikan hasil panen yang berlimpah. Hasil utama yang diperoleh dari usaha tersebut selain daging adalah telur (Suprapti 2002). Telur merupakan bahan pangan yang mengandung protein cukup tinggi dengan susunan asam amino lengkap. Selain itu, telur juga mengandung lemak tak jenuh, vitamin, dan mineral yang diperlukan tubuh dan sangat mudah dicerna. Rasa yang enak, harga yang relatif murah, serta dapat diolah menjadi aneka macam produk makanan menyebabkan telur banyak dikonsumsi oleh masyarakat (Tulung et al. 2003). Meskipun ketersediaannya tidak mengenal musim, telur memiliki beberapa kelemahan, antara lain kulit telur mudah pecah atau retak dan tidak dapat menahan tekanan mekanis yang besar, sehingga telur tidak dapat diperlakukan secara kasar dalam suatu wadah. Selain itu, kelembapan relatif udara dan suhu ruang penyimpanan dapat mempengaruhi kualitas telur serta dapat menyebabkan perubahan secara kimia dan mikrobiologis. Oleh sebab itu, usaha pengawetan sangat penting untuk mempertahankan kualitas telur (Departemen Kesehatan 2005).

Salah satu jenis telur yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia adalah telur itik/bebek (*Anas platyrhynchos*). Bobot dan ukuran telur itik rata-rata lebih besar dibanding telur ayam, berkisar antara 70-80 gram per butir. Cangkang telur itik umumnya berwarna biru muda (Srigandono 1986). Meskipun kualitas telur itik hampir sama dengan telur ayam, pemanfaatannya dalam makanan tidak selalu telur ayam. Hal ini disebabkan bau amisnya yang tajam, sehingga telur itik tidak biasa bagi masyarakat di Indonesia (Rasyaf 1991).

Bentuk olahan telur itik yang sampai sekarang paling dikenal dan paling digemari oleh masyarakat Indonesia adalah telur asin. Telur asin merupakan telur yang diawetkan dengan cara diasinkan. Tujuan utama dari proses pengasinan telur itik selain untuk membuang rasa amis dan menciptakan rasa yang khas, adalah untuk memperpanjang masa simpan telur (Agus 2002). Garam yang merupakan faktor utama dalam proses pengasinan telur berfungsi sebagai bahan pengawet yang dapat mencegah pembusukan telur, sehingga meningkatkan daya simpan telur. Semakin tinggi kadar garam yang diberikan dalam proses pengasinan telur maka daya simpannya semakin meningkat. Namun di sisi lain, telur akan menjadi

tidak disukai oleh konsumen karena rasanya yang terlalu asin (Suprapti 2002).

Telur merupakan medium pertumbuhan yang baik bagi mikroorganisme karena mengandung senyawa-senyawa yang dapat menjadi sumber nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroorganisme. Mikroorganisme dapat menyebabkan kerusakan pada telur, sehingga telur menjadi busuk serta menghasilkan racun yang dapat menyebabkan terjadinya keracunan makanan. Adanya mikroorganisme, terutama jumlah dan jenis, dapat menunjukkan kualitas suatu bahan makanan ditinjau dari segi mikrobiologis (Pelczar et al. 1988). Berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI) Nomor 19-2897-1992, kualitas mikrobiologis telur asin dapat ditentukan berdasarkan ada tidaknya bakteri *Salmonella* dan jumlah bakteri *Staphylococcus aureus* pada telur asin tersebut (Direktorat Jenderal POM 1992).

Panjangnya mata rantai tata niaga dan proses penyimpanan yang kurang memadai dapat menyebabkan telur mengalami kerusakan meskipun telur sudah diawetkan dengan cara pengasinan. Untuk itu diperlukan gabungan dari metode pengawetan yang lain yang dapat mempertahankan kualitas telur asin, sehingga dapat memperpanjang masa simpan telur asin. Penyimpanan telur asin dalam suhu dingin meskipun telah terbukti efektif dalam menekan pertumbuhan mikroorganisme pembusuk, belum banyak dilakukan karena akan menambah biaya produksi sehingga secara ekonomis kurang menguntungkan. Selain itu, tidak semua produsen, pedagang, maupun konsumen memiliki lemari pendingin.

Metode pengawetan lain yang dapat dilakukan adalah penggunaan senyawa antimikrobia/antibakteri yang berfungsi sebagai bahan pengawet. Selama ini, sebagian besar bahan pengawet berasal dari bahan kimia sintetik. Berdasarkan hasil penelitian, bahan-bahan tersebut dapat menimbulkan dampak negatif bagi kesehatan, sehingga sebagai alternatif pemecahannya dapat digunakan bahan-bahan pengawet alami yang lebih aman untuk dikonsumsi.

Salam (*Eugenia polyantha* Wight) merupakan salah satu jenis tumbuhan obat yang banyak digunakan secara tradisional untuk mengobati penyakit kencing manis (diabetes mellitus), diare, sakit mag, eksim, serta menurunkan kolesterol dan tekanan darah tinggi. Beberapa riset ilmiah membuktikan bahwa salam mengandung minyak atsiri, tanin, flavonoid, dan eugenol (Purwati 2004). Penelitian secara *in vitro* membuktikan bahwa ekstrak daun salam dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen, seperti *Salmonella*, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus* (Dalimartha 2005). Bakteri-bakteri tersebut apabila mengkontaminasi suatu bahan makanan, seperti telur asin, dapat menyebabkan keracunan makanan (*food borne disease*). Berdasarkan hal tersebut, daun salam berpotensi untuk dikembangkan sebagai pengawet makanan alami karena kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri penyebab kerusakan bahan makanan. Daun salam juga lebih aman dikonsumsi karena sudah biasa dipakai sebagai bumbu penyedap masakan. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh penambahan daun salam (*E. polyantha*) terhadap kualitas mikrobiologis,

kualitas organoleptis, dan daya simpan telur asin pada suhu kamar.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan daun salam (*E. polyantha*) dengan beberapa konsentrasi terhadap kualitas mikrobiologis, kualitas organoleptis, dan daya simpan telur asin pada suhu kamar.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

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

Bahan dan alat

Alat-alat untuk pembuatan telur asin meliputi ember atau bak besar, stoples, panci, kompor, pisau, timbangan elektrik, blender, erlenmeyer, dan oven. Alat-alat untuk uji mikrobiologis meliputi tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas beker, inkubator, *hot plate*, cawan petri, jarum ose, *magnetic stirrer*, batang gelas bengkok (*drygalski*), bunsen, corong *büchner*, vorteks, *laminar air flow*, *coloni counter*, dan autoklaf. Alat-alat untuk mengukur kadar TVB meliputi gelas ukur, *aluminium foil*, kertas saring, pipet ukur, cawan *conway*, buret, klem, dan statif.

Sementara itu, bahan-bahan untuk pembuatan telur asin meliputi daun salam (*Eugenia polyantha* Wight), telur itik (*Anas platyrhynchos*) sebanyak 136 butir, garam, akuades, dan bubuk batu bata. Media untuk uji mikrobiologis meliputi *Trypticase Soy Broth* (TSB), *Vogel-Johnson Agar* (VJA), *Lactose Broth* (LB), *Selenite Cystine Broth* (SCB), *Bismuth Sulfite Agar* (BSA), *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), dan *Lysine Iron Agar* (LIA). Bahan-bahan untuk mengukur kadar TVB meliputi asam trikloroasetat, K_2CO_3 , vaselin, HCl, asam borat, alkohol 96%, alkohol 70%, NaOH, *bromocresolgreen*, *methyldred*, dan akuades.

Rancangan percobaan

Pada penelitian ini, konsentrasi campuran serbuk daun salam dengan air yang digunakan adalah:

K₀: tanpa perendaman (kontrol)

K₁: campuran serbuk daun salam dengan air (1:4)

K₂: campuran serbuk daun salam dengan air (2:4)

K₃: campuran serbuk daun salam dengan air (3:4)

Pengamatan dilakukan pada waktu penyimpanan telur asin matang selama: 1) W₀ = minggu ke-0, 2) W₁ = minggu ke-2, dan W₂ = minggu ke-4. Adapun kombinasi perlakuan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kombinasi perlakuan

Konsentrasi	Waktu penyimpanan		
	W ₀	W ₁	W ₂
K ₀	K ₀ W ₀	K ₀ W ₁	K ₀ W ₂
K ₁	K ₁ W ₀	K ₁ W ₁	K ₁ W ₂
K ₂	K ₂ W ₀	K ₂ W ₁	K ₂ W ₂
K ₃	K ₃ W ₀	K ₃ W ₁	K ₃ W ₂

Keterangan: Percobaan dilakukan masing-masing dengan 3 ulangan

Cara kerja

Pemilihan telur

Telur itik yang dipilih adalah telur dengan masa simpan kurang dari 3 hari, memiliki bentuk oval sempurna dengan cangkang berwarna biru, kondisi telur utuh (tidak retak), serta memiliki ukuran yang cukup besar dengan berat berkisar antara 70-80 gram per butir (Suprapti 2002). Telur itik yang dipilih kemudian dibersihkan. Setelah bersih, telur dikeringkan dan diletakkan pada tempat telur (*egg tray*) (Rukmana 2003).

Pembuatan adonan garam

Adonan garam dibuat dengan cara mencampurkan bubuk batu bata dan garam dengan perbandingan 1:1, kemudian ditambahkan air secukupnya dan diaduk sampai menjadi adonan.

Pengasinan telur

Telur-telur yang sudah dibersihkan, masing-masing dibungkus/dibalut dengan adonan garam secara merata di seluruh permukaannya dengan ketebalan 1-2 mm. Telur kemudian disimpan dalam ember atau bak besar yang bersih selama 15 hari. Setelah pemeraman selesai, adonan pembungkus dibuka dan telur asin dibersihkan.

Pembuatan campuran serbuk daun salam dengan air

Daun salam dicuci bersih, kemudian dikeringanginkan selama satu malam. Daun salam lalu dimasukkan ke dalam oven pada suhu 37-40°C sampai kering. Setelah kering, daun dipotong-potong dan dihaluskan dengan blender sampai menjadi serbuk.

Dalam penelitian ini, perbandingan campuran serbuk daun salam dengan air yang digunakan adalah 1:4, 2:4, dan 3:4. Perbandingan tersebut secara berturut-turut dibuat dengan cara mencampurkan sebanyak 250 gram, 500 gram, dan 750 gram serbuk daun salam masing-masing dengan 1 liter akuades panas (suhu 60-80°C), lalu diaduk dan dibiarkan hingga dingin.

Perendaman telur asin pada campuran serbuk daun salam dengan air

Telur asin bersih dimasukkan ke dalam 4 buah bak besar berisi campuran serbuk daun salam dan air pada perbandingan tertentu (tidak diisi campuran, 1:4, 2:4, dan 3:4), masing-masing stoples diisi 34 butir telur asin. Perendaman dilakukan dengan cara memasukkan/menenggelamkan seluruh permukaan telur dalam campuran selama 5 hari. Setelah selesai, telur dibersihkan kembali dan direbus selama 30 menit (Astawan dan Astawan 1989). Sebanyak 36 butir telur asin yang sudah matang dilakukan uji mikrobiologis dan daya simpan, sedangkan untuk uji organoleptis digunakan 100 butir telur asin matang.

Uji mikrobiologis

Uji mikrobiologis dilakukan setelah penyimpanan 0, 2, dan 4 minggu.

Analisis kualitatif *Salmonella*

Sebanyak 25 gram sampel dicampur dengan 225 ml medium Lactose Broth (LB) steril dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam. Setelah selesai diinkubasi,

homogenat dikocok dan sebanyak 1 ml dipindahkan ke dalam 9 ml Selenyte Cysteine Broth (SCB) sebagai media penyubur selektif. Campuran diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam. Pada tahap selanjutnya, sebanyak satu ose homogenat dari media SCB digoreskan pada media selektif Bismute Sulfite Agar (BSA) dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh kemudian diamati. Koloni diduga *Salmonella* positif apabila berwarna cokelat abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang dengan kilap logam pada media BSA. Untuk uji konfirmasi, dipilih dua atau lebih koloni spesifik dari media BSA, kemudian diinokulasikan pada media Triple Sugar Iron Agar (TSIA) dan Lysine Iron Agar (LIA). Selanjutnya, media tersebut diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam. Biakan diduga positif *Salmonella* jika: 1) Pada TSIA: terlihat warna merah pada permukaan agar miring, warna kuning pada media di dasar tabung, dengan atau tanpa pembentukan hidrogen sulfida (H_2S) yang berwarna hitam; 2) Pada LIA: terlihat warna ungu, dengan atau tanpa pembentukan warna kuning pada bagian dasar tabung. Jika dari seluruh biakan menunjukkan hasil uji *Salmonella* positif maka hasil interpretasi dinyatakan sebagai *Salmonella* positif/gram sampel (Portocarrero et al. 2002).

Analisis kuantitatif *Staphylococcus aureus* dengan metode Most Probable Number (MPN)

Sebanyak 25 gram sampel dicampur dengan 225 ml akuades steril hingga diperoleh homogenat dengan pengenceran 10^{-1} . Sebanyak 1 ml campuran dari pengenceran 10^{-1} tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 9 ml akuades steril dan dikocok sampai homogen hingga diperoleh suspensi pengenceran 10^{-2} . Dengan cara yang sama dilakukan pengenceran hingga 10^{-3} .

Dari masing-masing pengenceran diambil 1 ml secara aseptis, kemudian dimasukkan ke dalam 3 tabung (3 seri) yang berisi media TSB. Selanjutnya, tabung-tabung tersebut diinkubasikan pada suhu 36°C selama 48 jam. Dari setiap tabung yang memperlihatkan adanya kekeruhan diambil 1 ose dan ditusukkan pada media pembenihan VJA (Vogel Johnson Agar) dalam cawan petri. Cawan-cawan petri tersebut selanjutnya diinkubasi selama sekurang-kurangnya 30 jam pada suhu 36°C. Jumlah tabung yang positif dihitung kemudian dirujuk pada MPN seri 3 tabung. Hasil yang diperoleh dinyatakan dalam MPN *Staphylococcus aureus* per gram sampel (MPN/gram).

Uji organoleptik

Uji organoleptis dilakukan pada 25 panelis dengan metode hedonik, yaitu menetapkan kisaran nilai kesukaan panelis terhadap telur asin matang yang telah diberi perlakuan perendaman dalam campuran serbuk daun salam dengan air pada beberapa variasi konsentrasi. Kisaran nilai meliputi: 1 = sangat tidak suka, 2 = tidak suka, 3 = biasa, 4 = suka, 5 = sangat suka (Kartika et al. 1988). Uji organoleptik dilakukan pada 0 minggu penyimpanan.

Uji daya simpan

Uji daya simpan telur asin dilakukan dengan cara mengukur kadar TVB. Sebanyak 25 gram sampel

dimasukkan ke dalam blender dan ditambah dengan 75 ml larutan 7% asam trikloroasetat (TCA), kemudian dicampur sampai homogen. Larutan tersebut disaring menggunakan kertas saring sehingga diperoleh filtrat yang jernih. Sebanyak 1 ml filtrat yang diperoleh dimasukkan ke dalam *outer chamber* cawan conway. Larutan asam borat sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam *inner chamber* cawan conway. Bagian pinggir cawan dan tutup diolesi dengan vaselin, kemudian cawan conway diletakkan pada posisi hampir menutup, dan 1 ml K_2CO_3 jenuh ditambahkan ke dalam *outer chamber* cawan conway. Setelah itu, cawan conway segera ditutup sehingga diperoleh penutupan yang rapat.

Blanko titrat sampel dibuat dengan cara mengganti sampel dengan larutan 5% asam trikloroasetat dan dikerjakan seperti prosedur di atas.

Cawan conway digoyang perlahan-lahan selama 1 menit dan diinkubasi pada suhu kamar selama semalam. Setelah inkubasi selesai, larutan asam borat dalam *inner chamber* cawan conway blanko dan sampel masing-masing dititrasi dengan larutan 1/70 N (Normalitas) HCl hingga warna larutan asam borat berubah menjadi merah muda. Perhitungan kadar TVB menurut Ozogul dan Ozogul (1999) dan Santoso (1999) adalah sebagai berikut:

Kadar TVB = $[(\text{ml titrasi sampel} - \text{ml titrasi blanko}) \times 80 \text{ mg N (Nitrogen)}] / 100 \text{ gr bahan makanan}$.

Analisis data

Data yang diperoleh adalah data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif berupa ada atau tidaknya kontaminasi bakteri *Salmonella* sp. dan jumlah bakteri *S. aureus* pada telur asin yang disajikan secara deskriptif. Data kuantitatif meliputi hasil uji organoleptik dan kadar *Total Volatile Bases* (TVB) telur asin. Untuk uji organoleptik, data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis nonparametrik, korelasi, dan regresi. Data kuantitatif berupa kadar TVB dianalisis secara statistik dengan analisis *General Linear Model* yang dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf signifikansi 5%, analisis korelasi, dan analisis regresi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian mikrobiologis

Uji kualitatif bakteri *Salmonella* sp.

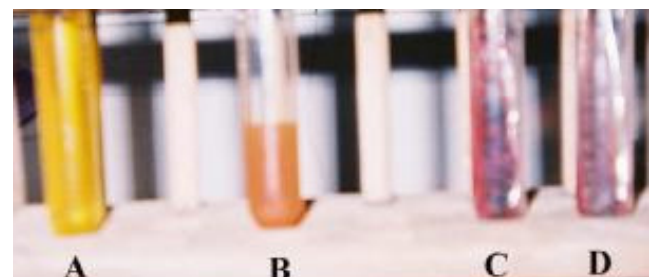
Bakteri *Salmonella* termasuk bakteri enteropatogenik, yaitu kelompok bakteri penyebab infeksi gastrointestinal. Bakteri enteropatogenik pada umumnya terdapat dalam jumlah kecil pada makanan, namun bersifat sangat infeksi. Pada uji kuantitatif, bakteri tersebut kadang-kadang tidak dapat tumbuh karena ditekan oleh bakteri lain yang ada pada makanan. Oleh karena itu, dalam penelitian ini hanya dilakukan uji kualitatif untuk mendeteksi ada tidaknya bakteri *Salmonella* pada telur asin.

Pada penelitian ini, uji kualitatif *Salmonella* dilakukan melalui 4 tahap, yaitu tahap pra-pengkayaan (*pre-enrichment*), pengkayaan (*enrichment*), seleksi, dan konfirmasi. Pada tahap *pre-enrichment*, medium yang digunakan adalah medium cair *lactose broth* (LB). Menurut

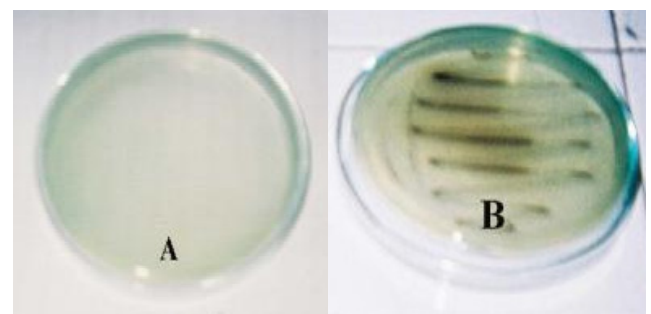
Humphrey (2000), medium LB merupakan medium yang paling sering digunakan dan telah terbukti mempunyai tingkat keberhasilan yang tinggi. *Beef extract* yang terdapat dalam medium LB mengandung karbohidrat (glukosa), nitrogen organik, dan air yang sangat baik bagi pertumbuhan bakteri (Gambar 1.A).

Tahap *enrichment* menggunakan medium cair *selenite cystine broth* (SCB) yang bersifat *selective enrichment* (Gambar 1.B). Medium SCB merupakan medium selektif untuk Enterobacteriaceae. Tahap selanjutnya adalah tahap seleksi. Pada tahap ini digunakan medium selektif *bismuth sulfite agar* (BSA) (Gambar 2.A). Kombinasi senyawa bismuth sulfit dan larutan sodium sulfit yang terdapat pada medium BSA dapat menghambat pertumbuhan bakteri koliform, *Serratia*, dan *Proteus*. Pembentukan senyawa H_2S dari kandungan sulfur dalam media oleh bakteri *Salmonella* menyebabkan koloni dan medium di sekitar koloni berwarna hitam (Gambar 2.B). Pada pengujian yang terakhir, yaitu uji konfirmasi, digunakan medium *triple sugar iron agar* (TSIA) (Gambar 1.C) dan *lysine iron agar* (LIA) (Gambar 1.D).

Pada medium TSIA yang mengandung glukosa, sukrosa, dan laktosa, *Salmonella* mampu memfermentasi glukosa dan umumnya mampu memproduksi gas dari proses fermentasi yang ditandai dengan terbentuknya rongga udara pada bagian bawah medium, medium retak, ataupun medium terangkat ke atas. Pada medium tersebut, *Salmonella* juga mampu memproduksi gas H_2S yang ditandai dengan terbentuknya warna hitam pada medium, tetapi kadang-kadang hanya sedikit sehingga tidak terlihat. Menurut Humphrey (2000), bakteri *Salmonella* mampu mendekarboksilasi lisin yang ditandai dengan terbentuknya warna ungu pada medium LIA.



Gambar 1. Media cair LB (A), SCB (B), TSIA (C), dan LIA (D) yang diinokulasi dengan bakteri *Salmonella* ATCC 10708 yang digunakan sebagai kontrol positif



Gambar 2. Media BSA yang digunakan dalam uji kualitatif bakteri *Salmonella*. A = Media BSA yang menunjukkan hasil negatif, B = media BSA sebagai kontrol positif dari *Salmonella* sp. ATCC 10708.

Tabel 2. Hasil pengujian kualitatif bakteri *Salmonella* dalam telur asin yang telah diberi daun salam dengan beberapa konsentrasi selama penyimpanan pada suhu kamar

Tahap uji	Hasil positif	Hasil uji (minggu)			Keterangan hasil uji
		Ke-0	Ke-2	Ke-4	
Tahap pra-pengkayaan pada media LB	Media berwarna coklat muda, keruh	a. +	a. +	a. +	Media berwarna coklat muda, keruh
		b. +	b. +	b. +	
		c. +	c. +	c. +	
		d. +	d. +	d. +	
Tahap pengkayaan pada media SCB	Media berwarna merah bata, keruh	a. +	a. +	a. +	Media berwarna coklat, keruh
		b. +	b. +	b. +	
		c. +	c. +	c. +	
		d. +	d. +	d. +	
Tahap seleksi pada media BSA	Koloni berwarna hitam, kadang-kadang disertai kilap logam	a. –	a. –	a. –	Pada media tidak terdapat koloni yang tumbuh
		b. –	b. –	b. –	
		c. –	c. –	c. –	
		d. –	d. –	d. –	
Tahap konfirmasi	Media TSIA: terdapat warna merah pada permukaan agar miring, warna kuning pada media di dasar tabung, dengan atau tanpa pembentukan H ₂ S yang berwarna hitam	a. –	a. –	a. –	Tidak dilakukan uji konfirmasi
		b. –	b. –	b. –	
		c. –	c. –	c. –	
		d. –	d. –	d. –	
	Media LIA: terdapat warna ungu, dengan atau tanpa pembentukan warna kuning pada media di dasar tabung	a. –	a. –	a. –	Tidak dilakukan uji konfirmasi
		b. –	b. –	b. –	
		c. –	c. –	c. –	
		d. –	d. –	d. –	

Keterangan: a = Tidak ditambah daun salam (kontrol), b = konsentrasi daun salam 1:4, c = konsentrasi daun salam 2:4, d = konsentrasi daun salam 3:4, + = hasil positif, - = hasil negatif

Dari Tabel 2 dapat dilihat bahwa tahap pra-pengkayaan pada medium LB dan tahap pengkayaan pada medium SCB, masih memperlihatkan hasil positif, sedangkan pada tahap uji selanjutnya memperlihatkan hasil negatif. Hal ini dapat terjadi karena pada tahap pra-pengkayaan, medium LB yang digunakan bukanlah medium selektif sehingga masih mampu mendukung pertumbuhan berbagai jenis bakteri. Pada tahap pengkayaan, medium selektif SCB masih mampu mendukung pertumbuhan bakteri *Proteus* dan *Pseudomonas*. Selain itu, pertumbuhan *E. coli* juga tidak terlalu terhambat, sehingga masih memberikan hasil yang positif.

Pada akhir pengujian secara kualitatif terhadap bakteri patogen *Salmonella* menunjukkan hasil yang negatif pada berbagai perlakuan penambahan serbuk daun salam dengan beberapa perbandingan, baik pada penyimpanan 0, 2, maupun 4 minggu. Hal ini dapat terjadi karena meskipun bakteri *Salmonella* merupakan penyebab utama terjadinya *food borne disease* pada telur, bakteri tersebut sangat jarang ditemukan pada pengujian makanan. Selain itu, menurut Tranter (1994), telur secara alami juga mengandung beberapa senyawa, seperti lisozim, ovotransferin, dan avidin, yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, termasuk *Salmonella*.

Lisozim atau 1,4- β -N-asetilmuramat merupakan enzim yang dapat memotong ikatan glikosida antara C1 dari asam N-asetilmuramat (NAM) dan C4 dari N-asetilglukosamin (NAG) pada membran peptidoglikan sel bakteri, serta dapat melisis sel bakteri. Ovotransferin (Otf), yang disebut juga konalbumin, merupakan suatu glikoprotein yang sebagian besar terdapat pada putih telur. Ovotransferin

dapat mengikat beberapa unsur logam yang sangat esensial bagi pertumbuhan bakteri (Tranter 1994).

Garam yang ditambahkan pada proses pembuatan telur asin juga berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Salmonella*. Adanya garam yang terlarut dalam telur asin menyebabkan tekanan osmotiknya menjadi lebih tinggi daripada tekanan osmotik di dalam sel bakteri. Perbedaan tekanan osmotik tersebut dapat menyebabkan terjadinya plasmolisis pada sel-sel bakteri tersebut. Menurut Hudaya dan Daradjat (1988), adanya penambahan garam yang bersifat higroskopis juga dapat menyerap air dan mengurangi kelarutan oksigen pada bahan yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri.

Daun salam yang ditambahkan pada proses pengasinan telur pada penelitian ini, mengandung beberapa senyawa yang bersifat antibakteri, diantaranya tanin, minyak atsiri, dan flavonoid. Menurut Pelczar et al. (1988), senyawa-senyawa antibakteri dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen melalui beberapa mekanisme, yaitu menyebabkan kerusakan pada dinding sel bakteri, mempengaruhi permeabilitas membran sitoplasma, menghambat kerja enzim, serta menghambat sintesis asam nukleat dan protein pada sel bakteri.

Adanya salah satu atau gabungan dari ketiga faktor, yaitu faktor internal dari telur, faktor eksternal seperti garam, dan senyawa antibakteri pada serbuk daun salam, menyebabkan pertumbuhan bakteri *Salmonella* pada telur asin terhambat. Oleh karena itu, pengujian kualitatif terhadap bakteri *Salmonella* memberikan hasil yang negatif sampai akhir penyimpanan.

Uji kuantitatif bakteri *Staphylococcus aureus*

Pengujian secara kuantitatif terhadap bakteri *S. aureus* dilakukan dengan teknik MPN (*Most Probable Number*) yang sesuai untuk mendeteksi adanya bakteri *S. aureus* pada makanan yang diduga terdapat dalam jumlah yang rendah (kurang dari 100 sel/gram). Prinsip dari metode MPN adalah pertumbuhan bakteri *S. aureus* pada medium pembenihan cair yang cocok dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasikan pada suhu 36°C selama 48 jam. Selanjutnya dilakukan uji konfirmasi (penegasan) pada medium agar padat selektif dan hasilnya merujuk pada tabel MPN. Adapun hasil pengujian secara kuantitatif terhadap bakteri *S. aureus* dalam telur asin yang telah ditambahkan daun salam pada beberapa konsentrasi, selama penyimpanan pada suhu kamar dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar 3.

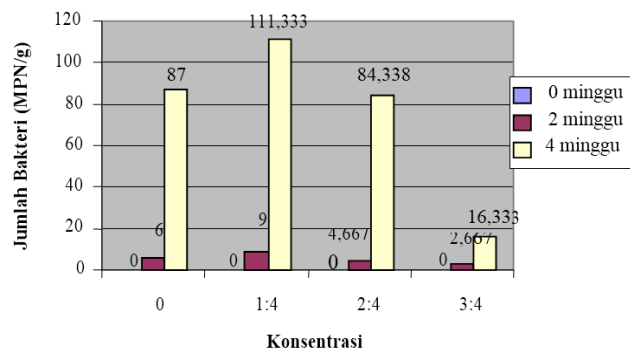
Pengujian secara kuantitatif terhadap bakteri *S. aureus* pada Tabel 3 menunjukkan bahwa semakin lama penyimpanan maka semakin meningkatkan jumlah bakteri *S. aureus* pada telur asin. Hal ini dapat disebabkan bakteri *S. aureus* termasuk bakteri tahan garam, sehingga mampu terus tumbuh dengan baik pada lingkungan berkadar garam tinggi seperti telur asin. Faktor penyebab lainnya adalah suhu ruang penyimpanan yang digunakan pada penelitian ini adalah suhu kamar yang merupakan suhu optimum bagi pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

Hasil penelitian pada Tabel 3 juga menunjukkan bahwa penambahan daun salam pada proses pembuatan telur asin dapat memperlambat peningkatan jumlah bakteri *S. aureus* pada telur asin. Semakin tinggi konsentrasi daun salam yang ditambahkan, semakin memperlambat peningkatan jumlah bakteri *S. aureus* pada telur asin. Hal ini memperlihatkan bahwa daun salam yang digunakan pada penelitian ini mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus*. Menurut Purwati (2004), daya antibakteri pada daun salam disebabkan oleh kandungan senyawanya seperti tanin, minyak atsiri, dan flavonoid.

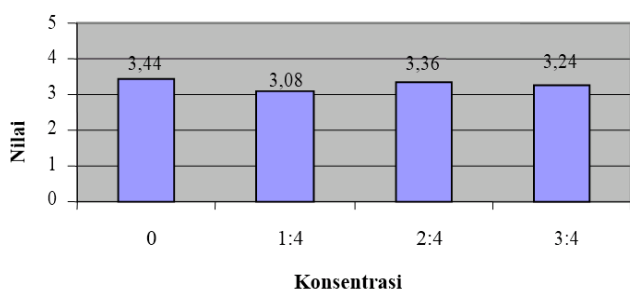
Gambar 4 menunjukkan bahwa pada penyimpanan selama 2 dan 4 minggu, jumlah bakteri *S. aureus* tertinggi terdapat pada telur asin yang ditambah daun salam dengan konsentrasi 1:4. Hal tersebut diduga terjadi karena daun salam yang ditambahkan pada perlakuan ini memiliki konsentrasi yang terendah jika dibandingkan dengan perlakuan lain yang ditambah daun salam dengan konsentrasi 2:4 dan 3:4. Oleh karena itu, senyawa-senyawa antibakteri yang tersedia untuk menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* juga lebih sedikit, sehingga jumlah bakteri *S. aureus* dalam telur asin pada perlakuan ini paling banyak. Hal ini sesuai dengan pendapat Pelczar et al. (1988) bahwa konsentrasi atau intensitas suatu zat antimikrobia dapat mempengaruhi aktivitas penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antimikrobia tersebut. Semakin tinggi konsentrasi zat antimikrobia yang ditambahkan maka akan semakin cepat atau semakin banyak sel-sel mikroorganisme yang terbunuh atau terhambat pertumbuhannya.

Berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI) Nomor 19-2897-1992, telur asin dapat dikategorikan mempunyai kualitas mikrobiologis yang masih baik dan aman untuk dikonsumsi apabila kandungan bakteri patogen *Salmonella*

adalah negatif dan kandungan bakteri *S. aureus* kurang dari 10 koloni/gram. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa telur asin sampel secara mikrobiologis memiliki kualitas yang jelek dan tidak aman untuk dikonsumsi pada penyimpanan selama 4 minggu, baik telur asin kontrol maupun telur asin yang sudah diberi perlakuan dengan penambahan daun salam, karena kandungan bakteri *S. aureus* melebihi 10 koloni/gram.



Gambar 3. Jumlah bakteri *S. aureus* (MPN/g) dalam telur asin yang telah ditambah daun salam dengan beberapa konsentrasi selama penyimpanan pada suhu kamar.



Gambar 4. Nilai kesukaan panelis terhadap telur asin yang telah ditambah daun salam dengan beberapa konsentrasi selama penyimpanan pada suhu kamar.

Tabel 3. Jumlah bakteri *Staphylococcus aureus* (MPN/g) dalam telur asin yang telah ditambah daun salam dengan beberapa konsentrasi selama penyimpanan pada suhu kamar.

Konsentrasi daun salam	Jumlah bakteri <i>S. aureus</i> (MPN/g) (minggu)		
	Ke-0	Ke-2	Ke-4
0	<3	6,000	87,000
1:4	<3	9,000	111,333
2:4	<3	4,667	84,338
3:4	<3	2,667	16,333

Tabel 4. Nilai kesukaan panelis terhadap telur asin yang telah ditambah daun salam dengan beberapa konsentrasi selama penyimpanan pada suhu kamar

Konsentrasi daun salam (g/L)	0	1:4	2:4	3:4
Rata-rata nilai kesukaan panelis	3,44 ^a	3,08 ^a	3,36 ^a	3,24 ^a

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

Tabel 5. Kadar TVB (mgN%) telur asin yang telah ditambah daun salam dengan beberapa konsentrasi selama penyimpanan pada suhu kamar

Konsentrasi daun salam	Kadar TVB (mgN%) (minggu)			Rata-rata
	Ke-0	Ke-2	Ke-4	
0	8,000	34,667	96,000	46,222 ^a
1:4	10,667	37,333	128,000	58,667 ^b
2:4	10,667	29,333	93,333	44,444 ^a
3:4	8,000	26,667	40,000	24,889 ^c

Keterangan: Angka-angka yang diikuti dengan huruf yang tidak sama dalam satu kolom menunjukkan beda nyata pada uji DMRT 5%

Pengujian organoleptik

Pengujian organoleptik dilakukan berdasarkan tingkat kesukaan konsumen terhadap telur asin tanpa penyimpanan yang telah diberi perlakuan dengan penambahan daun salam (metode hedonik). Nilai 1 untuk telur asin yang sangat tidak disukai dan nilai 5 untuk telur asin yang sangat disukai. Pengujian dilakukan terhadap 25 orang panelis yang tidak terlatih dengan mengisi kuosioner yang telah disediakan. Hasil pengujian organoleptik terhadap telur asin yang telah ditambah daun salam dengan beberapa konsentrasi selama penyimpanan pada suhu kamar dapat dilihat pada Tabel 4 dan Gambar 4.

Analisis nonparametrik terhadap hasil pengujian organoleptik berdasarkan tingkat kesukaan konsumen terhadap telur asin pada Tabel 4, menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata antara telur asin kontrol (tidak diberi perlakuan) dengan telur asin yang telah diberi perlakuan penambahan daun salam dengan perbandingan 1:4, 2:4, dan 3:4. Penambahan daun salam pada pembuatan telur asin tidak menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap tingkat kesukaan panelis karena telur dilindungi oleh cangkang telur dan beberapa selaput di dalamnya. Cangkang telur dan beberapa selaput tersebut melindungi telur dari pengaruh lingkungan serta menghalangi masuknya zat-zat asing dari luar ke dalam telur. Oleh karena itu, penambahan serbuk daun salam pada saat pembuatan telur asin tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap rasa dari telur asin.

Hasil analisis korelasi menunjukkan adanya hubungan yang sangat lemah antara konsentrasi daun salam yang ditambahkan (X) dan tingkat kesukaan panelis (Y), dengan koefisien korelasi (R) sebesar 0,043. Dari hasil analisis regresi didapatkan persamaan garis regresi: $Y = 3,360 - 3,20X$ yang berarti bahwa peningkatan konsentrasi daun salam dapat mengakibatkan penurunan tingkat kesukaan panelis terhadap telur asin sampel.

Gambar 4 menunjukkan bahwa para panelis (konsumen) memberikan skala nilai rata-rata 3,4; 3,08; 3,36; dan 3,24 secara berturut-turut untuk telur asin kontrol, telur asin yang ditambah daun salam dengan perbandingan 1:4, 2:4, dan 3:4. Berdasarkan skala nilai tersebut dapat diketahui bahwa telur asin pada semua perlakuan memiliki tingkat kesukaan yang biasa bagi para konsumen.

Pengukuran kadar TVB (*Total Volatile Bases*)

Pengukuran kadar TVB telur asin dilakukan dengan metode titrasi menggunakan larutan HCl terhadap larutan asam borat pada cawan conway. Pada saat pengukuran kadar TVB dilakukan proses inkubasi selama semalam pada suhu kamar. Selama waktu semalam tersebut diduga terjadi pengikatan basa-basa volatil telur asin yang diuji oleh asam borat. Hasil pengukuran kadar TVB telur asin yang ditambahkan daun salam dengan beberapa konsentrasi selama penyimpanan pada suhu kamar dapat dilihat pada Tabel 5.

Berdasarkan hasil uji *General Linear Model* dapat diketahui bahwa pemberian daun salam memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap kadar TVB telur asin. Hasil uji lanjut menggunakan uji DMRT pada taraf signifikansi 5% menunjukkan bahwa kadar TVB yang terbentuk pada perlakuan kontrol, ditambah serbuk daun salam dengan perbandingan 1:4, 2:4, dan 3:4 sangat berbeda nyata.

Berdasarkan analisis korelasi dan regresi yang dilakukan, terdapat korelasi positif antara konsentrasi daun salam (X1) dan lama penyimpanan (X2) terhadap kadar TVB (Y) telur asin. Koefisien korelasi (R) yang diperoleh sebesar 0,862 dengan persamaan garis regresinya: $Y = 15,289 - 31,289X_1 + 20,000X_2$. Dari persamaan tersebut dapat diketahui bahwa peningkatan konsentrasi daun salam akan menurunkan kadar TVB telur asin. Sebaliknya, semakin lama penyimpanan akan semakin meningkatkan kadar TVB telur asin.

Pada semua perlakuan, kadar TVB tertinggi terlihat pada minggu ke-4 yaitu sebesar 96 mgN% untuk telur asin kontrol, 128 mgN% untuk telur asin yang ditambah dengan daun salam pada konsentrasi 1:4, 93,333 mgN% untuk telur asin yang ditambah dengan daun salam pada konsentrasi 2:4, dan 40 mgN% untuk telur asin yang ditambah dengan daun salam pada konsentrasi 3:4.

Kadar TVB tertinggi diperoleh pada telur asin yang ditambah dengan daun salam dengan konsentrasi 1:4. Hal tersebut dapat terjadi karena daun salam yang ditambahkan pada perlakuan tersebut memiliki konsentrasi yang lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan lain yang ditambahkan daun salam dengan konsentrasi 2:4 dan 3:4. Oleh karena itu, senyawa-senyawa antibakteri yang tersedia untuk menghambat aktivitas dan pertumbuhan bakteri-bakteri pembusuk juga lebih sedikit, sehingga aktivitas pembusukan yang terjadi paling tinggi. Faktor lain yang berperan adalah tingkat kelembapan pada saat perendaman telur asin dalam campuran daun salam dan air. Pada saat itu, kelembapan tertinggi terdapat pada telur asin yang direndam dalam campuran daun salam dan air dengan konsentrasi 1:4. Kelembapan yang tinggi tersebut merupakan faktor pendukung pertumbuhan mikroba pada telur asin, sehingga jumlahnya paling tinggi dibanding telur asin pada perlakuan yang lain. Jumlah bakteri yang tinggi mengakibatkan aktivitas penguraian substrat untuk pertumbuhan bakteri dan pembusukan juga akan lebih besar, sehingga kadar TVB-nya paling tinggi daripada telur asin pada perlakuan lainnya.

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa semakin lama waktu penyimpanan maka semakin meningkatkan

kadar TVB telur asin. Peningkatan kadar TVB berkaitan erat dengan pemecahan protein menjadi senyawa-senyawa sederhana yang mengandung basa-basa menguap seperti amonia dan trimetilamin (TMA) oleh enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri pembusuk. Pada tahap ini, mulai terbentuk metabolit-metabolit penyebab bau busuk seperti putresin, karbon dioksida, hidrogen sulfida, asam organik, amoniak, indol, dan skatol. Menurut Trihendrokesowo (1989), bakteri pembusuk pada telur yang paling umum adalah *Pseudomonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, dan *Citrobacter*. Pembusukan atau perusakan oleh mikroba pada bahan makanan juga dapat terjadi dengan cara menghidrolisis atau menguraikan makromolekul karbohidrat dan lemak menjadi fraksi-fraksi yang lebih kecil. Makromolekul karbohidrat dipecah menjadi gula sederhana yang selanjutnya akan dipecah lagi menjadi asam-asam dengan atom karbon rendah. Dengan terurainya karbohidrat (pati, pectin, dan selulosa), suatu bahan dapat mengalami pelunakan dan pH bahan akan menurun. Makromolekul lemak akan dipecah menjadi asam-asam lemak dan gliserol (Hudaya dan Daradjat 1988).

Dapat diketahui juga bahwa penambahan daun salam pada proses pembuatan telur asin dapat menekan kenaikan kadar TVB. Semakin tinggi konsentrasi daun salam yang ditambahkan pada proses pembuatan telur asin maka akan semakin memperlambat laju peningkatan kadar TVB telur asin. Hal ini dapat disebabkan serbuk daun salam yang ditambahkan pada proses pembuatan telur asin dalam penelitian ini memiliki aktivitas antibakteri oleh adanya kandungan senyawa tannin, minyak atsiri, dan flavonoid. Senyawa-senyawa antibakteri telah diketahui dapat menghambat aktivitas bakteri pembusuk, sehingga pembentukan basa-basa volatil juga dapat dihambat.

Telur asin dikategorikan masih layak untuk dikonsumsi apabila memiliki kadar TVB di bawah 20 mgN% (Aritonang dan Rahayu 1993). Dari hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa berdasarkan kadar TVB, telur asin dikategorikan sudah tidak layak untuk dikonsumsi sejak minggu ke-2 penyimpanan, baik pada telur asin kontrol maupun telur asin yang telah diberi perlakuan penambahan daun salam, karena kadar TVB-nya lebih dari 20 mgN%.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil kesimpulan sebagai berikut: (i) Adanya faktor internal dari telur, garam dan senyawa antibakteri pada serbuk daun salam dapat mengeliminasi keberadaan bakteri *Salmonella* sampai akhir penyimpanan. (ii) Variasi konsentrasi daun salam dapat menurunkan jumlah bakteri *Staphylococcus aureus* pada telur asin. (iii) Variasi konsentrasi daun salam dan lama penyimpanan berpengaruh secara signifikan terhadap kadar

Total Volatile Bases (TVB) telur asin, namun tidak dapat memperpanjang daya simpannya serta tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kualitas organoleptik telur asin. (iv) Berdasarkan pengujian secara mikrobiologis, telur asin sudah tidak layak dikonsumsi pada minggu ke-4, sedangkan berdasarkan pengujian TVB, telur asin sudah tidak layak dikonsumsi pada minggu ke-2. Perlu diadakan penelitian lebih lanjut dengan cara penambahan daun salam yang berbeda pada telur asin. Disarankan telur asin tidak disimpan lebih dari 2 minggu pada suhu kamar.

DAFTAR PUSTAKA

- Agus GTK. 2002. Intensifikasi beternak itik. AgroMedia Pustaka, Jakarta.
- Aritonang SN, I Rahayu HS. 1993. Pengaruh lama pengawetan dan penyimpanan telur itik diasin sebelum direbus terhadap daya simpan telur asin. Media Gizi dan Keluarga 17(2): 42-46.
- Astawan MW, Astawan M. 1989. Teknologi pangan hewani tepat guna. CV Akademika Presindo, Jakarta.
- Dalimarta S. 2005. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 1. Trubus Agriwidya, Jakarta.
- Departemen Kesehatan. 2005. Telur. <http://pusat.jakarta.go.id/> [30 September 2005].
- Direktorat Jenderal Pengawas Obat dan Makanan. 1992. Farmakope Indonesia: Batas Maksimum Cemaran Mikroba Makanan, SNI No. 19-2897-1992. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Hudaya S, Daradjat S. 1988. Dasar-dasar pengawetan I. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Jakarta.
- Humphrey T. 2000. Public health aspect of *Salmonella* infection. In: Wrey C, Wrey A (eds). *Salmonella* in Domestic Animal. CAB International, UK.
- Kartika B, Hastuti P, Supartono W. 1988. Pedoman uji inderawi bahan pangan. UGM Press, Yogyakarta.
- Ozogul F, Ozogul Y. 1999. Comparison of methods used for determination of total Volatile Bases Nitrogen (TVB-N) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Turk J Zool 24: 113-120.
- Pelczar MJ, Raid RD, Chan ECS. 1988. Dasar-dasar Mikrobiologi. Jilid ke-2. UI Press, Jakarta.
- Portocarrero SM, Newman M, Mikel B. 2002. Reduction of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli* 0157:H7 during processing of country-cured hams. J Food Sci 67(5): 1892-1898.
- Purwati A. 2004. Sembilan tanaman obat unggulan hasil uji klinis badan POM 2004. Berita Keanekaragaman Hayati. <http://www.beritabumi.or.id/> [10 Maret 2006].
- Rasyaf M. 1991. Pengelolaan produksi telur. Edisi ke-2. Kanisius, Yogyakarta.
- Rukmana HR. 2003. Ayam buras, intensifikasi, dan kiat pengembangan. Kanisius, Yogyakarta.
- Santoso U. 1999. Metode analisis hasil-hasil perikanan. *Hand Out* Hasil Pertanian. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian UGM, Yogyakarta.
- Srigandono B. 1986. Ilmu unggas air. UGM Press, Yogyakarta.
- Suprpti ML. 2002. Pengawetan telur. Kanisius, Yogyakarta.
- Tranter HS. 1994. Lysozyme, ovotransferrin and avidin. Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation. CAB International, UK.
- Trihendrokesowo. 1989. Petunjuk laboratorium mikrobiologi pangan. UGM Press, Yogyakarta.
- Tulung YLR, Suartha N, Hetharie H et al. 2003. Telur sebagai imunoterapi penyakit menular. Makalah Pengantar Falsafah Sains. Program Pascasarjana IPB, Bogor.

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 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 were analyzed statistically by 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 the concentration of elicitor and harvesting time influenced the dry weight and reserpine content of *R. verticillata* callus culture significantly. 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 *Novoreserpine*). 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 mikrobia (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 6×10^5 spora/mL. Spora sebanyak 3 mL diinokulasikan ke dalam 150 mL medium PDB, sehingga kepadatannya menjadi $1,2 \times 10^4$ 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%.

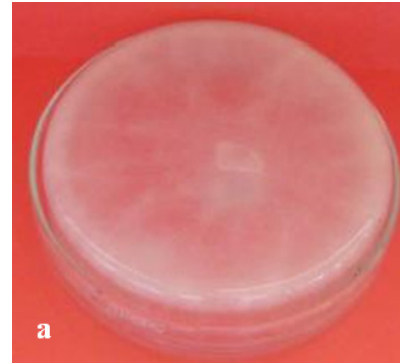
HASIL DAN PEMBAHASAN

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).

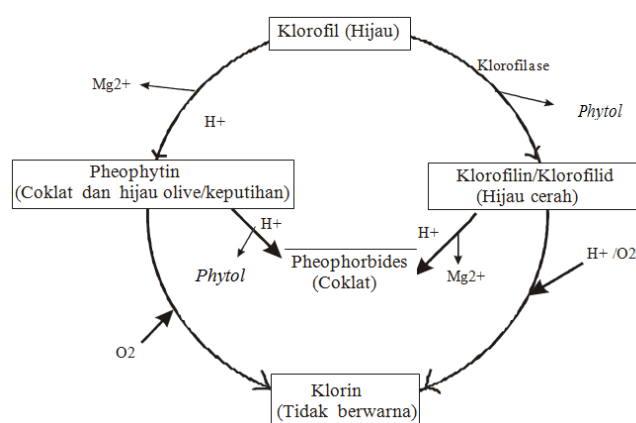
Eksplan daun *R. verticillata* pada media insiasi mulai menunjukkan pertumbuhan kalus pada hari ketujuh setelah penanaman. Awal pembentukan kalus ditandai dengan mulai berubahnya warna eksplan, yaitu dari hijau menjadi hijau keputihan dan agak mengilat. Eksplan juga mengalami pembengkakan, terutama pada 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.

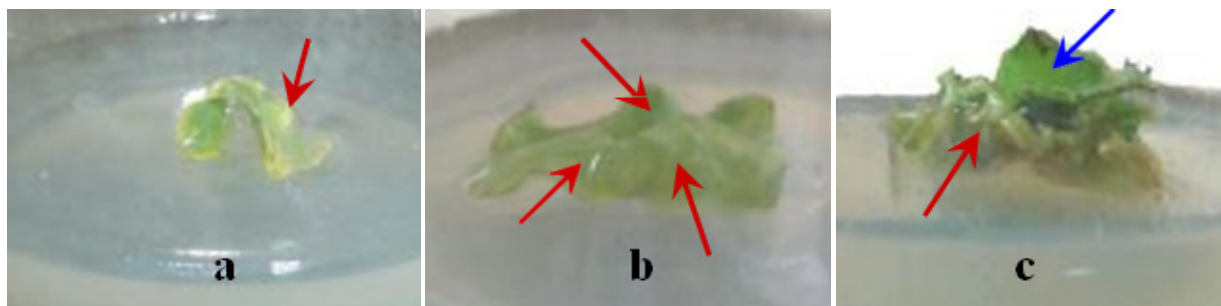
Morfologi kalus yang diamati pada penelitian ini meliputi tekstur dan warna kalus. Tekstur dan warna kalus

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

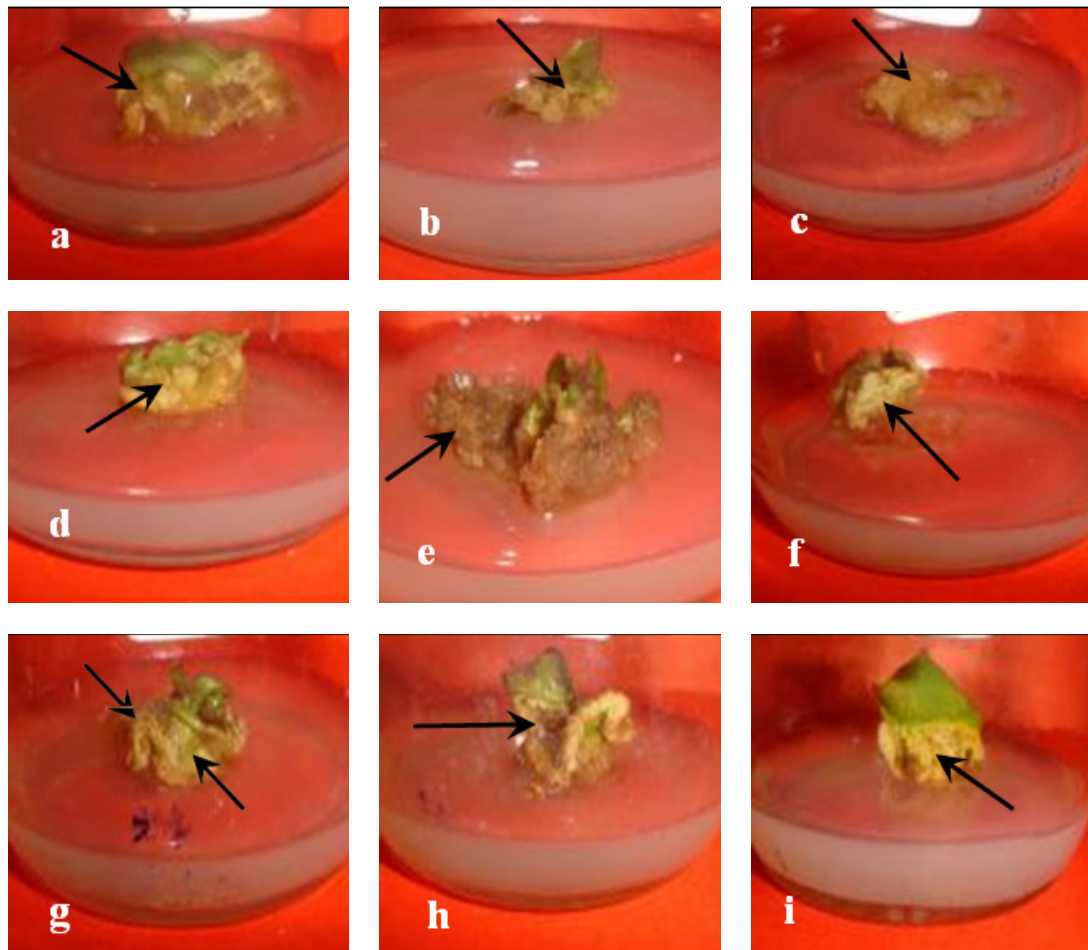
Tekstur kalus *R. verticillata* yang diperoleh pada media insiasi adalah kompak. Menurut Street (1973), struktur kalus yang kompak memiliki susunan sel-sel yang rapat, padat, dan sulit dipisahkan. Warna kalus mengalami perubahan seiring dengan pertambahan umur kalus, yaitu dari berwarna hijau atau hijau 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 muda (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 coklat selain disebabkan oleh degradasi klorofil, juga disebabkan mekanisme pertahanan diri akibat perlukaan 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 perlukaan, 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 hidrosilase, kresolase, dan katekolase. Warna coklat pada kalus juga dapat disebabkan oleh penuaan. Abdullah et al. (1998) menyebutkan bahwa sel-sel muda yang sehat berwarna kuning, namun akan berubah menjadi coklat 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 dielisisasi 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 dielisisasi mengalami perubahan. Kalus mengalami pencokelatan seiring dengan peningkatan konsentrasi elisitor dan lama elisitasi. Menurut Sitingjak et al. (2000), kalus yang dielisisasi 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 dielisisasi dengan cendawan *Pythium* sp. menunjukkan respons pada warna dan pertumbuhan. Menurut Isaac dalam Fitriani et al. (1999), kalus yang dielisisasi 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 dielisisasi 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

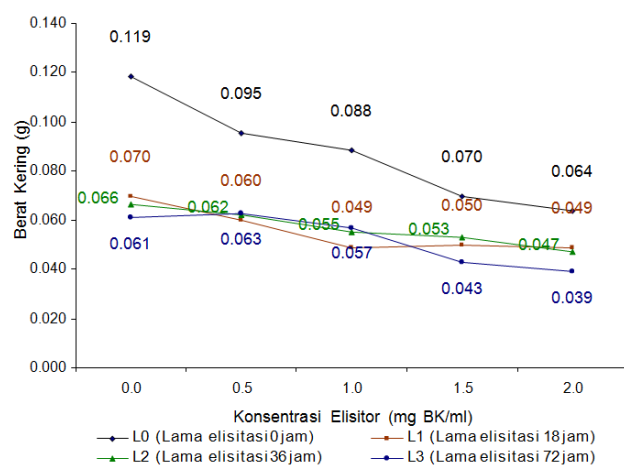
menghentikan aktivitas metabolisme di dalamnya. Bahan tersebut idealnya dikeringkan pada suhu 80°C hingga berat yang dicapai konstan (Sitompul dan Guritno 1995; Salisbury dan Ross 1995b). Pada penelitian ini, kalus dikeringkan pada suhu 50°C karena senyawa alkaloid mudah mengalami dekomposisi, terutama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

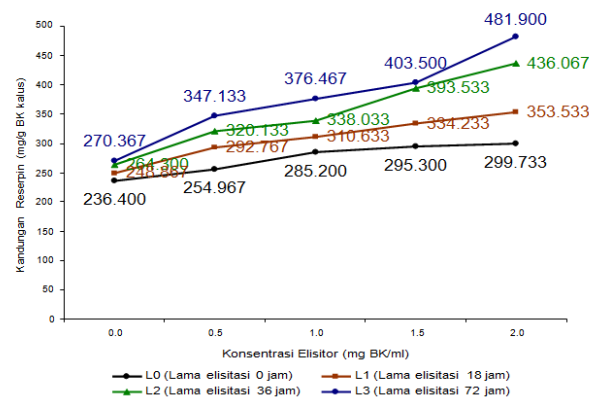
Menurut Sitinjak et al. (2000), lama elisitasi mempengaruhi kandungan reserpin dengan adanya efek *post binding*. Efek *post binding* merupakan efek yang terjadi setelah efektor diterima reseptor. Efek *post binding* dapat diamati pada mekanisme penghantaran sinyal ekstraseluler (Gambar 9). Sinyal ekstraseluler (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.

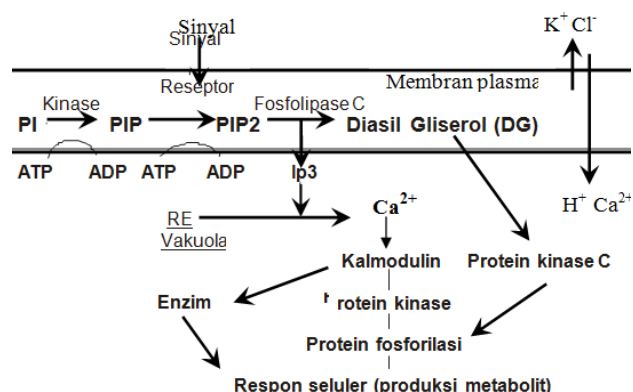
Konsentrasi elisitor (mg BK/mL)	Rata-rata kandungan reserpin kalus (mg/g BK kalus) pada pemanenan jam ke-			
	0	18	36	72
0,0	236,400 ^a	248,867 ^a	264,300 ^{abc}	270,367 ^{abcd}
0,5	254,967 ^{ab}	292,767 ^{abcde}	320,133 ^{abcdef}	347,133 ^{cdefg}
1,0	285,200 ^{abcd}	310,633 ^{abcdef}	338,033 ^{bcdefg}	376,467 ^{efgh}
1,5	295,300 ^{abcde}	334,233 ^{bcdefg}	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 sekuens *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, Bunyapraphatsara 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, Sugiarto 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 *Rauvolfia* 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. *Rauvolfia* 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.

Karakteristik klorofil pada daun sebagai material *photodetector organic*

Study of chlorophyll characteristic on leaves as photodetector organic material

ARROHMAH, AGUS SUPRIYANTO, KUSUMANDARI

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

Manuskrip diterima: 16 Juli 2007. Revisi disetujui: 20 Agustus 2007.

Abstract. Arrohmah, Supriyanto A, Kusumandari. 2007. *Study of chlorophyll characteristic on leaves as photodetector organic material.* Biofarmasi 5: 67-72. The aim of research was to determine the chlorophyll characteristic optically and electrically on the leaves such as spinach (*Amaranthus* sp.), *Morinda citrifolia* and cassava leaves. The measurement of optic is absorbance with UV-Vis spectrophotometer and the electric is conductivity with two point probe methods. The absorbance of spinach was higher than the others. Data showed the conductivity on the dark of spinach, *M. citrifolia* and cassava leaves were $(3.8133 \pm 0.0007) \times 10^{-3} (\Omega m)^{-1}$, $(3.2761 \pm 0.0006) \times 10^{-3} (\Omega m)^{-1}$ and $(1.893 \pm 0.001) \times 10^{-3} (\Omega m)^{-1}$, respectively, while the conductivity on the lighted of spinach, *M. citrifolia* and cassava leaves were $(4.1947 \pm 0.0007) \times 10^{-3} (\Omega m)^{-1}$, $(3.4061 \pm 0.0007) \times 10^{-3} (\Omega m)^{-1}$ and $(2.0973 \pm 0.0006) \times 10^{-3} (\Omega m)^{-1}$, respectively. The increasing of conductivity on the lighted spinach was higher than the others, i.e. $(0.38 \pm 0.06) \times 10^{-3} (\Omega m)^{-1}$. The total chlorophyll of spinach was 27 mg/L, *M. citrifolia* was 22 mg/L and cassava was 16 mg/L. The reducing of total chlorophyll happened by a degradation of chlorophyll molecules become its generation molecules.

Keywords: Absorbance, chlorophyll, conductivity, degradation, extraction

PENDAHULUAN

Suplai energi surya dari cahaya matahari yang diterima oleh permukaan bumi sebenarnya sangat besar yaitu mencapai 3×10^{24} joule per tahun (Yuliarto 2006). Sedikitnya 10^{17} kkal energi bebas dihasilkan oleh tumbuhan dengan memanfaatkan energi dari cahaya matahari. Jumlah ini 10 kali lebih besar dibanding dengan semua energi bahan bakar fosil yang digunakan per tahun oleh manusia di seluruh dunia. Bahan bakar fosil, seperti batu bara, minyak bumi, dan gas alam, merupakan produk fotosintesis yang terjadi jutaan tahun yang lalu. Mekanisme fotosintesis merupakan hal yang mendasar dalam memenuhi kebutuhan energi dan makanan bagi makhluk hidup. Oleh karena mekanisme fotosintesis pada kloroplas sangat efisien dalam mengubah energi surya menjadi energi kimia ATP dan NADPH, banyak penelitian dilakukan untuk menstimulasi proses tersebut dengan sistem molekul buatan yang lebih sederhana, dengan harapan dapat memanfaatkan energi surya yang (Lehninger 1982).

Fotosintesis terjadi ketika klorofil pada tanaman menyerap energi foton dari cahaya matahari. Klorofil yang terdiri dari ikatan karbon, hidrogen, nitrogen, dan magnesium memiliki aktivitas utama yaitu mengubah zat organik dari zat anorganik sederhana dengan bantuan cahaya matahari. Dengan demikian, klorofil mengubah tenaga radiasi matahari menjadi tenaga kimia melalui proses fotosintesis atau dengan kata lain menyimpan tenaga matahari dalam tumbuh-tumbuhan berupa makanan dan bahan bakar yang nantinya akan muncul sebagai tenaga kalori pada saat terjadi pembakaran (Chudrin 2006).

Hampir semua tumbuhan tingkat tinggi mengandung sejumlah besar klorofil yang mampu menyerap energi foton dari cahaya matahari secara maksimal. Bayam merupakan salah satu tumbuhan tingkat tinggi yang saat ini banyak diteliti. Bayam sebagai salah satu tumbuhan hijau dinilai sangat efisien, dilihat dari jumlah energi yang dihasilkan dibandingkan dengan berat dan ukuran bayam itu sendiri. Saat ini, para ilmuwan AS ingin mendapatkan energi dari bayam dengan memanfaatkannya untuk mengubah energi cahaya matahari menjadi energi listrik. Dengan menggunakan sebuah piranti elektronik khusus, Zhang dari *Massachusetts Institute of Technology* dan rekan-rekannya, menggabungkan protein kompleks yang diambil dari kloroplas bayam dengan semikonduktor organik untuk membuat sel tenaga surya yang dapat menghasilkan tenaga listrik. Sel tenaga surya yang dihasilkan dari bayam lebih tipis dan ringan dibanding panel-panel surya yang sudah ada dan dapat digunakan untuk membuat panel yang lebih efisien (Kompas 2004). Kloroplas terdapat dalam setiap tanaman hijau. Dengan demikian, pada dasarnya setiap tanaman, tidak hanya bayam yang berpotensi untuk dijadikan sebagai sumber listrik, sehingga pada penelitian ini juga dibandingkan dengan jenis tanaman yang lain.

Elektron-elektron dari molekul klorofil akan tereksitasi ketika terkena cahaya yang memiliki energi yang besarnya sama dengan selisih antara tingkat energi dasar dan tingkat energi eksitasinya. Tanaman menggunakan gerakan elektron tersebut untuk memberi tenaga pada saat terjadi proses fotosintesis. Adapun piranti yang dikembangkan Zhang memanfaatkan proses serupa untuk menggerakkan elektron ke semikonduktor organik yang diijarkan pada

lapisan atas kaca. Atau dengan kata lain, tanaman menggunakan elektron bebas tersebut untuk menghasilkan karbohidrat, sedangkan sel surya menggunakan elektron untuk menghasilkan arus listrik. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui hubungan antara kandungan klorofil terkait sifat optik dan sifat listrik melalui proses konversi tersebut.

Klorofil bersifat labil dan mudah mengalami proses degradasi menjadi molekul-molekul turunannya. Proses degradasi klorofil dapat terjadi akibat pengaruh suhu dan oksigen. Molekul hasil degradasi tidak efektif untuk proses fotosintesis, sehingga diduga juga kurang efektif pada sel surya. Oleh karena itu, pada penelitian ini perlu diamati juga adanya perubahan kestabilan klorofil dari larutan ekstrak klorofil yang dibuat untuk mengetahui apakah setelah sekian hari, klorofil akan mengalami kerusakan. Salah satu cara yang dapat digunakan untuk memperlambat proses degradasi adalah dengan penambahan bahan kimia, seperti CaCO_3 dan MgCO_3 .

Tujuan dari penelitian ini adalah: (i) Mengetahui karakteristik sifat optik serta hubungannya dengan kandungan klorofil, (ii) Mengetahui karakteristik sifat listrik serta hubungannya dengan kandungan klorofil, serta (iii) Meneliti kestabilan klorofil dari larutan ekstrak setelah beberapa hari.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pusat Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret, Surakarta. Penelitian dimulai dari bulan Oktober 2006 sampai Februari 2007. Pengukuran nilai absorbansi dilaksanakan di Laboratorium Pusat Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Sebelas Maret, Surakarta, sedangkan uji konduktivitas gelap terang dilaksanakan di Laboratorium Pusat Jurusan Fisika, FMIPA, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Bahan dan alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi satu set alat ekstraksi untuk mengambil pigmen-pigmen dari bahan tanaman yang digunakan, Spektrofotometer UV-Vis 1601 PC untuk mengukur absorbansi larutan ekstraksi, *Two Point Probe Keithley* Tipe 6517 A sebagai sumber tegangan dalam pengukuran konduktivitas larutan klorofil, *stopwatch* untuk mengukur waktu konduktivitas. Neraca digital spesifikasi Neraca XY-200A merek Aslep untuk menimbang bahan-bahan yang akan diekstrak, multimeter untuk mengukur arus yang melalui larutan klorofil pada saat pengukuran konduktivitas, *vortex stirrer* untuk mengaduk larutan dalam tabung reaksi, *illuminator* sebagai sumber cahaya, *luxmeter* untuk mengukur intensitas cahaya, kabel penghubung, tabung reaksi, gelas ukur, dan pipet tetes.

Sementara itu, bahan yang digunakan meliputi daun bayam segar dari jenis *Amaranthus* sp., daun mengkudu segar, dan daun singkong segar masing-masing 0,1 gr, aseton 80% sebagai pelarut pigmen klorofil daun, tembaga

dengan ketebalan 0,1 mm sebagai elektroda, kertas saring Whatman No.42 untuk menyaring larutan ekstrak, kertas Abrasif 2000, dan tisu.

Cara kerja

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap yaitu persiapan, pembuatan larutan ekstrak, karakterisasi larutan yang meliputi karakterisasi sifat optik (absorbansi), pengamatan kestabilan klorofil, dan karakterisasi sifat listrik (konduktivitas), analisis data, dan kesimpulan.

Pembuatan larutan ekstrak

Ekstraksi dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut. Larutan aseton 80% disiapkan, kemudian ditimbang sebanyak 0,1 gr daun segar. Daun dihancurkan dengan mortar kemudian ditambahkan 10 ml aseton 80%. Larutan didiamkan beberapa saat sehingga klorofil larut. Larutan ekstrak kemudian diaduk menggunakan pengaduk *vortex* hingga semua bahan larut. Larutan disaring dengan kertas saring Whatman No.42 agar sisa daun tertinggal. Filtrat diukur volumenya dan ditambahkan aseton 80% hingga volumenya mencapai 10 ml.

Uji absorbansi

Pengujian absorbansi larutan dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis 1601 PC dengan tahapan-tahapan sebagai berikut. Larutan klorofil dimasukkan ke dalam kuvet sebanyak 3 ml kemudian dimasukkan ke dalam spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 1601 PC. Sumber cahaya dinyalakan. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 645 nm dan 663 nm dalam sel 1 cm. Kandungan klorofil di hitung dengan rumus menurut Harborne (1973) sebagai berikut:

Klorofil a = $12,7 (A_{663}) - 2,69 (A_{645})$ mg/L

Klorofil b = $22,9 (A_{645}) - 4,68 (A_{663})$ mg/L

Klorofil total = $8,02 (A_{663}) + 20,2 (A_{645})$ mg/L

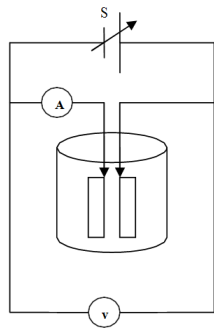
Uji konduktivitas

Pengukuran konduktivitas larutan dapat dilakukan dengan mengalirkan arus pada dua elektroda. Kedua elektroda tersebut dicelupkan ke dalam larutan klorofil, sehingga jika *Keithley* dihidupkan, arus akan mengalir pada larutan tersebut. Pengukuran resistansi larutan klorofil dilakukan dengan menggunakan metode dua titik (*two point probe*).

Berdasarkan hukum ohm, nilai resistansi bergantung pada kuat arus yang terukur melalui Amperemeter dan tegangan yang terukur oleh Voltmeter. Hukum ohm dapat dituliskan dengan persamaan sebagai berikut:

$$V = I R$$

Dimana R merupakan resistansi dalam ohm (Ω), V adalah tegangan dalam volt, dan I adalah arus listrik yang mengalir dalam ampere (A). Skema *two point probe* dapat dilihat pada **Gambar 1**. Pada **Gambar 1**, A adalah amperemeter yang digunakan untuk mengukur besarnya arus yang mengalir melalui larutan klorofil, V adalah voltmeter yang digunakan untuk mengukur besarnya tegangan, dan S adalah *Keithley* sebagai sumber arus. Skema pengukuran resistansi tersebut dilakukan dengan mengabaikan tahanan dalam alat ukur.



Gambar 1. Skema pengukuran resistansi larutan klorofil

Dalam metode ini digunakan *Keithley 6517 A* dalam rangkaian dengan tahapan-tahapan sebagai berikut. Alat percobaan dirangkai sesuai dengan skema pada Gambar 1. *Keithley* dinyalakan kemudian arus diatur dalam satuan μA . Tombol *operate* pada *Keithley 6517 A* ditekan. Tegangan sumber dinaikkan kemudian arus dan tegangan yang terukur pada multimeter dicatat.

Uji kestabilan

Pengujian kestabilan larutan dilakukan dengan membandingkan puncak grafik nilai absorbansi larutan klorofil setelah beberapa hari. Uji kestabilan juga dapat dilakukan dengan membandingkan perubahan warna larutan ekstrak setelah beberapa hari. Uji kestabilan ini dilakukan untuk mengetahui besarnya perubahan kandungan klorofil dan kemungkinan terjadinya proses degradasi klorofil menjadi molekul turunannya.

Analisis data

Dari pengukuran dengan *two point probe Keithley 6517 A* diperoleh nilai tegangan (V) dan arus (I), kemudian dari data V - I tersebut dibuat plot grafik hubungan V - I dengan V sebagai sumbu x dan I sebagai sumbu y .

Dengan menggunakan persamaan linier $y = mx + n$ maka didapat nilai *slope* m , dimana $m = 1/R$. Besarnya nilai konduktivitas ditentukan oleh:

$$o = \frac{1}{R} \frac{L}{A} \quad o = m \frac{L}{A}$$

dimana $A = 1,5 \times 10^{-4} \text{ m}^2$ dan $L = 1,3 \times 10^{-2} \text{ m}$, sehingga $o = m \times 86,667$.

Besarnya ketidakpastian (S_m) dihitung dengan menggunakan simpangan baku (Djonoputro 1984):

$$s_y = \frac{1}{n-2} \left[\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n} - \frac{2 \sum x_i \sum y_i \sum (x_i y_i) + N (\sum x_i y_i)^2}{N \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \right]$$

$$s_m = s_y \sqrt{\frac{N}{N \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}}$$

Ketidakpastian Δo diperoleh dari perbandingan m dan S_m sebagai berikut:

$$\Delta o = \frac{s_m}{m} o$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi sifat optik

Karakterisasi sifat optik ini dilakukan di Sub Laboratorium Biologi, Laboratorium Pusat, Universitas Sebelas Maret, Surakarta dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Dari pengukuran sifat optik tersebut diperoleh nilai absorbansi dari tiap panjang gelombang sehingga dapat diketahui nilai absorbansi maksimum dari masing-masing sampel.

Absorbansi larutan klorofil

Absorbansi merupakan besarnya cahaya yang diserap suatu bahan. Sampel yang berupa daun yang mengandung pigmen klorofil akan menyerap maksimum pada panjang gelombang tertentu, terutama pada spektrum biru dan merah. Gambar 2 menunjukkan absorbansi dari sampel daun bayam, daun mengkudu, dan daun singkong. Gambar 2 merupakan grafik yang memperlihatkan besarnya absorbansi dari masing-masing sampel dengan rincian nilai absorbansi maksimum pada panjang gelombang masing-masing seperti yang tertera dalam Tabel 1.

Dari Gambar 2 terlihat bahwa nilai puncak absorbansi tertinggi adalah dari sampel daun bayam, puncak kedua untuk absorbansi daun mengkudu, dan puncak ketiga untuk absorbansi daun singkong. Kurva absorbansi sampel daun bayam memiliki lima puncak panjang gelombang, sampel daun mengkudu memiliki enam puncak, dan sampel daun singkong memiliki enam puncak.

Puncak-puncak tersebut mengindikasikan jenis klorofil tertentu yang berperan dalam proses penyerapan foton dengan berbagai panjang gelombang yang mengenai sampel tersebut. Molekul-molekul penyusun klorofil daun tumbuhan antara lain klorofil a, klorofil b, dan karotenoid. Klorofil a sebagai pigmen utama yang paling banyak jumlahnya dan satu-satunya molekul klorofil yang berperan dalam reaksi terang fotosintesis, sedangkan klorofil b dan karotenoid sebagai pigmen pelengkap. Setiap pigmen dibedakan berdasarkan spectrum absorpsinya yaitu pada panjang gelombang yang diserap, bukan panjang gelombang yang dipantulkan ataupun yang diteruskan.

Gambar 2 merupakan grafik perpaduan berbagai komponen penyusun pigmen klorofil, yaitu klorofil a, klorofil b, dan betakaroten. Klorofil a memiliki absorbansi maksimum pada panjang gelombang 662 nm, 430 nm, dan 410 nm. Dari Tabel 1 dapat diketahui bahwa spektrum absorbansi klorofil a dicapai sampel pada panjang gelombang yang sama yaitu 663 nm dan sedikit berbeda untuk absorpsi pada daerah 430 nm. Spektrum absorpsi klorofil a pada sampel daun bayam, daun mengkudu, dan daun singkong masing-masing adalah 1,9; 1,4; dan 1,1 pada panjang gelombang 663 nm serta 2,9; 2,6; dan 2,0 pada panjang gelombang di sekitar 430 nm. Dengan demikian, sampel daun bayam memiliki kemampuan menyerap foton yang lebih baik daripada daun mengkudu maupun daun singkong. Klorofil b memiliki absorbansi maksimum pada panjang gelombang 642 nm dan 453 nm. Spektrum absorpsi klorofil b berimpit dengan klorofil a, sehingga puncak-puncaknya tidak tampak, kecuali pada sampel daun mengkudu dan daun singkong pada panjang

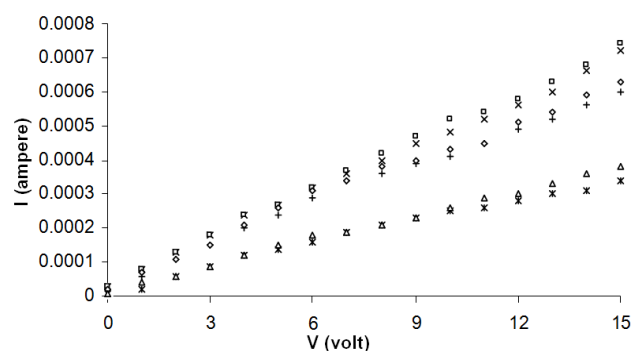
gelombang di sekitar 453 nm dan 452 nm mempunyai absorbansi sebesar 1,7 dan 1,3, sedangkan untuk keberadaan pigmen karotenoid pada daun tidak nampak karena adanya pigmen klorofil. Spektrum absorpsi klorofil a pada panjang gelombang 663 nm menunjukkan bahwa pada panjang gelombang tersebut klorofil a menyerap maksimum warna merah, sedangkan absorpsinya pada panjang gelombang 430 nm menunjukkan bahwa klorofil a menyerap maksimum warna biru. Spektrum warna merah dan biru berperan penting dalam proses fotosintesis tumbuhan karena tumbuhan dapat memperoleh seluruh kebutuhan energinya dari spektrum merah dan biru. Klorofil a yang berwarna hijau-biru akan memantulkan warna hijau dan menyerap warna merah, karena spektrum warna merah memiliki panjang gelombang yang panjang dan spektrum warna biru memiliki energi yang besar, sehingga kedua spektrum warna inilah yang mampu menembus lapisan atmosfer bumi dan diserap secara maksimal oleh molekul klorofil daun. Untuk puncak-puncak lain yang berada di antara panjang gelombang 500-600 nm sangat sedikit cahaya yang diserap karena spektrum warna hijau akan dipantulkan oleh molekul klorofil. Secara umum, Gambar 2 menunjukkan bahwa sampel daun bayam memiliki absorbansi lebih tinggi dibanding kedua sampel yang lain.

Kandungan klorofil dari beberapa sampel

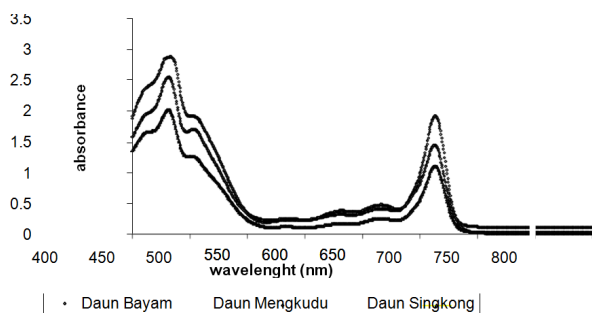
Molekul-molekul klorofil adalah bagian aktif yang menyerap cahaya matahari. Tingkat energi cahaya tampak sesuai dengan tingkat energi yang diperlukan untuk

mengaktifkan molekul pigmen. Cahaya matahari diserap oleh molekul-molekul klorofil dalam bentuk energi foton yang digunakan oleh elektron-elektron untuk bertransisi ke tingkat energi yang lebih tinggi.

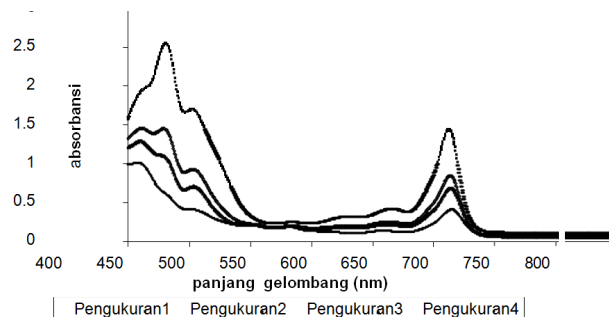
Cahaya yang datang digunakan untuk membawa elektron, sehingga terjadi proses eksitasi elektron-elektron ke tingkat yang lebih tinggi. Semakin banyak cahaya yang diserap maka semakin banyak aliran elektron. Semakin banyak elektron-elektron yang tereksitasi berarti kemampuan untuk menghasilkan listrik semakin baik, sehingga material yang memiliki kandungan klorofil terbanyak akan mampu menyerap foton cahaya secara maksimal dan menghasilkan listrik secara maksimal pula.



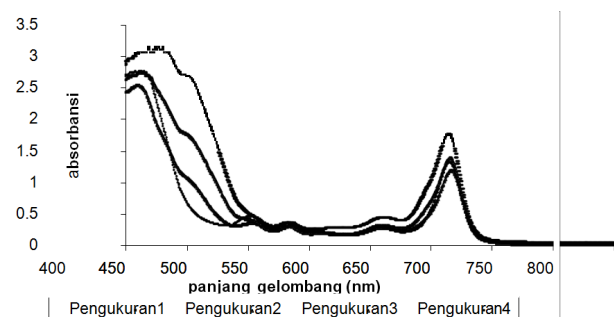
Gambar 3. Grafik I-V saat kondisi gelap-terang pada beberapa sampel.



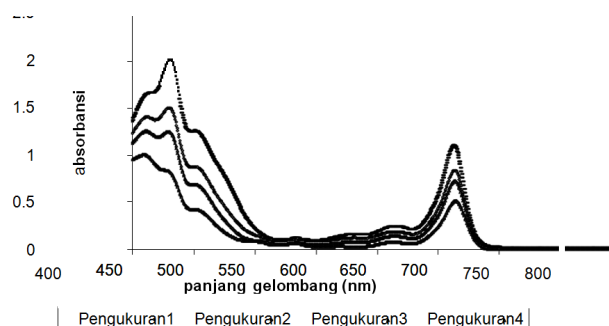
Gambar 2. Kurva absorbansi sampel daun bayam, daun mengkudu, dan daun singkong.



Gambar 5. Kurva absorbansi daun mengkudu yang diukur pada hari ke-1, hari ke-31, hari ke-46, dan hari ke-53.



Gambar 4. Kurva absorbansi daun bayam yang diukur pada hari ke-1, hari ke-31, hari ke-46, dan hari ke-53.



Gambar 6. Kurva absorbansi daun singkong yang diukur pada hari ke-1, hari ke-31, hari ke-46, dan hari ke-53.

Tabel 2 memperlihatkan besarnya kandungan klorofil dari beberapa sampel yang diujikan. Jumlah kandungan klorofil tersebut mempengaruhi jumlah foton yang diabsorpsi oleh molekul klorofil sehingga akan mempengaruhi nilai absorbansi masing-masing sampel. Prinsip dasar penyerapan cahaya adalah bahwa setiap molekul hanya dapat menyerap satu foton pada waktu tertentu dan foton tersebut akan menyebabkan terjadinya eksitasi pada satu elektron dalam suatu molekul. Semakin besar kandungan klorofil suatu bahan, semakin banyak energi foton yang diserap, sehingga semakin banyak elektron bergerak yang menghasilkan aliran elektron efektif yang dapat dikonversi menjadi aliran listrik.

Dari Tabel 2 dapat diketahui bahwa sampel daun bayam memiliki kandungan klorofil paling banyak, sehingga daun bayam memiliki kemampuan menyerap energi foton lebih baik daripada kedua sampel lainnya. Sampel yang memiliki kandungan klorofil maksimal berarti memiliki jumlah molekul penyerap foton maksimal. Ketika energi foton yang diserap maksimal maka energi yang disimpan akan maksimal pula. Energi foton tersebut dapat dikonversi menjadi energi elektrik pada aplikasi sel surya.

Karakterisasi sifat listrik

Pengukuran resistansi larutan klorofil dilakukan di Sub Laboratorium Fisika, Laboratorium Pusat, Universitas Sebelas Maret, Surakarta. Metode yang digunakan adalah metode *two point probe* dan *Keithley 6517 A* yang menghasilkan arus dan tegangan. Nilai resistansi diperoleh berdasarkan perhitungan gradien yang dihasilkan oleh grafik I-V yaitu grafik hubungan arus dan tegangan yang terukur. Grafik I-V ditunjukkan pada Gambar 3.

Pengukuran resistansi dilakukan dengan dua kondisi yaitu kondisi terang dan kondisi gelap. Nilai tegangan yang diberikan berkisar antara 0-15 volt, sehingga arus yang tercatat akan meningkat dengan bertambahnya tegangan. Dengan memberikan beda tegangan pada kedua ujung plat tembaga maka terjadi aliran arus melewati larutan klorofil yang dapat diukur dengan rangkaian *two point probe* yang terhubung dengan *Keithley 6517 A*. Pada pengujian saat kondisi terang, intensitas cahaya yang mengenai sampel adalah 180 lumen yang setara dengan $585,36 \text{ mW/m}^2$ yang dihasilkan dari sebuah *illuminator*. Pengukuran ini dilakukan untuk mengetahui respons cahaya dengan mengukur I-V pada saat gelap dan pada saat disinari. Hasil pengukuran respons cahaya terhadap klorofil dapat ditunjukkan pada Gambar 3, sedangkan hasil perhitungan resistansi dan konduktivitas larutan klorofil ditunjukkan pada Tabel 3.

Pada kondisi gelap, nilai resistansi sampel lebih besar daripada saat kondisi terang. Perbedaan nilai resistansi pada dua kondisi tersebut dikarenakan jumlah elektron yang tereksitasi pada kondisi gelap lebih sedikit karena elektron-elektron tersebut tidak memiliki cukup energi untuk bertransisi ke orbital lain yang memiliki energi lebih tinggi. Semakin sedikit elektron-elektron yang tereksitasi maka nilai resistansinya semakin besar, sehingga arus yang mengalir akan semakin kecil. Sampel daun bayam memiliki kandungan klorofil yang lebih banyak sehingga memiliki elektron bebas yang lebih banyak pula dibandingkan

dengan sampel yang lain. Nilai resistansi sampel daun bayam lebih kecil dibandingkan kedua sampel yang lain. Sampel daun bayam bersifat lebih konduktif karena memiliki nilai resistansi terkecil dibandingkan sampel yang lain, baik pada kondisi gelap maupun kondisi terang.

Dari Gambar 3 tampak bahwa pada saat terang, arus yang terukur lebih tinggi daripada larutan klorofil yang diukur saat gelap. Hal ini dikarenakan klorofil merupakan material yang bersifat reseptor cahaya yang menyerap cahaya tampak. Ketika cahaya atau foton diserap, akan terjadi eksitasi elektron. Semakin banyak elektron yang tereksitasi, arus terukur juga semakin besar, sehingga ketika larutan dikenai cahaya, arus yang terukur semakin besar.

Konduktivitas larutan klorofil dihitung berdasarkan data arus (I) dan tegangan (V) dari *two point probe*. Nilai konduktivitas larutan untuk masing-masing sampel ditunjukkan pada Tabel 3. Dari Tabel 3 dapat diketahui bahwa besarnya konduktivitas larutan klorofil berbanding terbalik dengan resistansi larutan. Selisih nilai konduktivitas gelap-terang menunjukkan bahwa bahan bersifat konduktif yang baik meskipun tanpa pengaruh sumber tegangan dari luar.

Tabel 1. Puncak absorbansi beberapa sampel daun

Daun bayam		Daun mengkudu		Daun singkong	
Z (nm)	Absorb.	Z (nm)	Absorb.	Z (nm)	Absorb.
663	1,9	663	1,4	663	1,1
616	0,5	616	0,4	616	0,2
582	0,4	581	0,3	582	0,2
536	0,2	535	0,2	534	0,1
433	2,9	453	1,7	452	1,3
-	-	432	2,6	431	2,0

Keterangan: Z = Panjang gelombang (nm)

Tabel 2. Kandungan klorofil beberapa sampel daun

Sampel	Klorofil a (mg/L)	Klorofil b (mg/L)	Klorofil total (mg/L)
Bayam	21	5,8	27
Mengkudu	16	6,7	22
Singkong	12	3,4	16

Tabel 3. Resistansi dan konduktivitas klorofil beberapa sampel daun

Sampel	$R \times 10^3 (\Omega)$		$\sigma \times 10^{-3} (\Omega\text{m})^{-1}$		$\Delta \sigma \times 10^{-3} (\Omega\text{m})^{-1}$
	Gelap	Terang	Gelap	Terang	
Daun bayam	2,27	2,07	3,81	4,20	0,39
Daun mengkudu	2,58	2,54	3,28	3,40	0,13
Daun singkong	4,59	4,13	1,89	2,10	0,21

Tabel 4. Penurunan kandungan klorofil beberapa sampel daun

Pengukuran ke-	Daun bayam	Daun mengkudu	Daun singkong
1	0%	0%	0%
2	29%	41%	25%
3	43%	54%	38%
4	61%	68%	56%

Konduktivitas sampel daun bayam saat gelap sebesar $(3,8133 \pm 0,0007) \times 10^{-3} (\Omega m)^{-1}$ dan saat diterangi konduktivitasnya sebesar $(4,1947 \pm 0,0007) \times 10^{-3} (\Omega m)^{-1}$. Sampel daun mengkudu saat gelap memiliki konduktivitas sebesar $(3,2761 \pm 0,0006) \times 10^{-3} (\Omega m)^{-1}$ dan saat diterangi konduktivitasnya sebesar $(3,4061 \pm 0,0007) \times 10^{-3} (\Omega m)^{-1}$, sedangkan sampel daun singkong saat gelap memiliki konduktivitas sebesar $(1,893 \pm 0,001) \times 10^{-3} (\Omega m)^{-1}$ dan saat diterangi konduktivitasnya sebesar $(2,0973 \pm 0,0006) \times 10^{-3} (\Omega m)^{-1}$. Dengan demikian, sampel daun bayam memiliki konduktivitas yang sangat baik karena mampu menghantarkan arus listrik secara maksimal. Hal ini dikarenakan sampel tersebut memiliki sejumlah besar molekul klorofil yang mampu menyerap foton secara maksimal.

Kurva kestabilan

Dari hasil yang diperoleh dapat diketahui bahwa sampel daun bayam pada hari pertama memiliki serapan maksimum klorofil a pada panjang gelombang 664,50 yaitu sebesar 1,723 dan menurun menjadi 1,392 pada pengukuran kedua dan pengukuran selanjutnya sesuai pertambahan waktu. Hal ini juga terlihat pada pergeseran panjang gelombang dari 664,50 menjadi 665,50; 665,50; dan 666,50.

Dari hasil yang diperoleh dapat diketahui bahwa pengukuran absorbansi pada hari pertama diperoleh tiga puncak yang cukup tajam, misalnya pada panjang gelombang 534,5 nm, 611,5 nm, dan 664,5 nm dengan besar absorbansi masing-masing sebesar 1,7723, 0,4396, dan 0,3667. Pada pengukuran kedua, selang tiga puluh hari didapatkan penurunan puncak absorbansi serta pergeseran panjang gelombang yaitu sebesar 0,3126, 0,3229, dan 1,3920 masing-masing pada panjang gelombang 533,5 nm, 609,5 nm, dan 665,5 nm. Demikian halnya pada pengukuran-pengukuran berikutnya. Beberapa penurunan puncak tersebut mengindikasikan adanya penurunan kualitas serapan molekul klorofil terhadap cahaya yang mengenainya. Dari perhitungan kandungan klorofil diperoleh penurunan kandungan klorofil total sebesar 29% pada pengukuran kedua, yaitu setelah 30 hari. Penurunan sebesar 43% setelah 45 hari dan 61% setelah 52 hari. Adanya penurunan kandungan klorofil juga mengakibatkan adanya penurunan jumlah molekul klorofil yang berfungsi menyerap cahaya.

Setelah sekian hari, kualitas serapan klorofil terhadap cahaya yang semakin menurun tersebut dapat menyebabkan kualitas yang kurang baik terhadap divais yang dibuat. Agar divais fotodetektor dapat beroperasi secara optimal maka kerusakan klorofil tersebut harus diminimalkan.

Dari hasil yang diperoleh nampak bahwa pengukuran absorbansi pada hari pertama diperoleh tiga puncak yang cukup tajam, misalnya pada panjang gelombang 431,5 nm, 453 nm, dan 662,5 nm dengan besar absorbansi masing-masing adalah sebesar 2,5518, 1,6949, dan 1,4376. Pada pengukuran kedua didapatkan penurunan puncak absorbansi sebesar 1,4492, 0,9261, dan 0,8439 pada panjang gelombang 429,5 nm, 453 nm, dan 663,5 nm. Dari

perhitungan kandungan klorofil diperoleh penurunan kandungan klorofil total sebesar 41% pada pengukuran kedua, yaitu setelah 30 hari. Penurunan kandungan klorofil pada sampel ini mengakibatkan penurunan jumlah molekul klorofil yang akan menyerap cahaya. Besarnya penurunan kandungan klorofil sampel daun mengkudu ini lebih besar daripada sampel daun bayam, sehingga divais dari sampel daun bayam akan bekerja lebih baik daripada divais dari sampel kedua lainnya.

Kurva kestabilan daun singkong

Dari Gambar 6 terlihat adanya tiga puncak utama pada pengukuran absorbansi pada hari pertama yaitu pada panjang gelombang 431 nm, 451,5 nm, dan 663 nm dengan absorbansi masing-masing sebesar 2,1035, 1,257, dan 1,0999. Penurunan kandungan klorofil dari ketiga sampel yang diujikan pada penelitian ini ditunjukkan dalam Tabel 4.

Dari ketiga sampel yang diujikan pada penelitian ini, terdapat beberapa penurunan puncak yang mengindikasikan adanya penurunan kualitas serapan molekul klorofil terhadap cahaya yang mengenainya, sehingga dalam hal ini dapat dikatakan bahwa setelah sekian hari, molekul-molekul klorofil tidak mampu menyerap cahaya secara optimal untuk dapat dikonversi menjadi energi yang lain. Larutan klorofil secara umum akan mengalami perubahan fisik setelah beberapa hari. Perubahan fisik meliputi perubahan warna, yaitu warna berubah menjadi kecokelatan, namun perubahan fisik tersebut tidak mempengaruhi perubahan kimiawi. Secara kimiawi, struktur dasar klorofil akan tetap, hanya saja terjadi degradasi atom Mg dan rantai sampingnya.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan dapat diperoleh kesimpulan sebagai berikut: (i) Absorbansi klorofil sampel daun bayam lebih tinggi daripada absorbansi daun mengkudu maupun daun singkong; (ii) Kandungan klorofil sampel daun bayam lebih besar daripada kedua sampel lainnya; (iii) Konduktivitas sampel daun bayam lebih besar dari kedua sampel lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Chudrin T. 2006. Makanan dalam perspektif Al-Quran dan ilmu gizi. Balai Penerbit FKUI, Jakarta.
- Djonoputro D. 1984. Teori ketidakpastian. ITB, Bandung.
- Harborne YB. 1973. Metode fitokimia: Penuntun cara modern menganalisa tumbuhan. Alih bahasa: Padmawinata K, Soediro I. ITB, Bandung.
- Kompas. 2004. Bayam hasilkan sel tenaga surya yang lebih baik. www.kompas.com. [27 april 2007].
- Lehninger AL. 1982. Dasar-dasar biokimia. Alih bahasa: Thenawidjaja M. Erlangga, Jakarta.
- Yuliarto B. 2006. Teknologi sel surya untuk energi masa depan. www.beritaipstek.com. [1 April 2007].

PEDOMAN UNTUK PENULIS

Format penulisan pada nomor ini merupakan acuan utama bagi para penulis, adapun pedoman ini hanya merupakan ringkasannya. Setiap naskah harus disertai surat pengantar yang menyatakan bahwa tulisan merupakan hasil karya penulis atau para penulis dan belum pernah dipublikasikan. Penulis diminta mengirimkan dua kopi naskah dan satu disket ukuran 3½", kecuali naskah yang dikirim melalui e-mail. Pada koreksi terakhir kembali diminta satu disket untuk pencetakan.

Tulisan diketik pada satu sisi kertas putih, ukuran A4 (210x297 mm²), dalam satu kolom, menggunakan spasi ganda, jenis huruf *Times New Roman*, ukuran 12 point, dengan jarak tepi 2 cm di semua sisi. Program pengolah kata atau jenis huruf tambahan dapat digunakan, namun harus *PC compatible* dan berbasis *Microsoft Word*. **Nama ilmiah** (genus, spesies, author), dan kultivar atau strain disebutkan secara lengkap pada penyebutan pertama kali. Nama genus dapat disingkat setelahnya penyebutan yang pertama, kecuali menimbulkan kerancuan. Nama author dapat dihilangkan setelah penyebutan pertama. Misalnya pertama kali ditulis *Rhizopus oryzae* L. UICC 524, selanjutnya ditulis *R. oryzae* UICC 524. Nama daerah dapat dicantumkan apabila tidak menimbulkan makna ganda. Penyebutan nama ilmiah secara lengkap dapat diulang pada bagian Bahan dan Metode. **Tata nama kimia dan biokimia** mengikuti aturan IUPAC-IUB. Simbol-simbol kimia standar dan penyingkatan untuk nama kimia dapat dilakukan apabila jelas dan umum digunakan, misalnya pertama kali ditulis lengkap butirat hidrositoluen (BHT) selanjutnya ditulis BHT. **Ukuran metrik** menggunakan satuan SI, penggunaan satuan lain harus diikuti nilai ekuivalen dengan satuan SI pada penyebutan pertama. Penyingkatan satuan, seperti g, mg, ml, dan sebagainya tidak diikuti titik. Indeks minus (m⁻², l⁻¹, h⁻¹) disarankan untuk digunakan, kecuali dalam hal-hal seperti "per-tanaman" atau "per-plot". **Persamaan matematika** tidak selalu dapat dituliskan dalam satu kolom dengan teks, untuk itu dapat ditulis secara terpisah. **Angka** satu hingga sepuluh dinyatakan dengan kata-kata, kecuali apabila berhubungan dengan pengukuran, sedangkan nilai di atasnya dituliskan dalam angka, kecuali di awal kalimat. Pecahan sebaiknya dinyatakan dalam desimal. Dalam teks digunakan "%" bukannya "persen". Pengungkapan ide dengan kalimat yang rumit dan bertele-tele perlu dihindari, sebaiknya digunakan kalimat yang efektif dan efisien. Naskah hasil penelitian diharapkan tidak lebih dari 25 halaman (termasuk gambar dan tabel), naskah telaah pustaka menyesuaikan, masing-masing halaman berisi 700-800 kata, atau sebanding dengan naskah dalam nomor penerbitan ini.

Judul ditulis secara padat, jelas, dan informatif, maksimum 20 kata. Judul ditulis dalam bahasa Indonesia dan Inggris untuk naskah dalam bahasa Indonesia atau bahasa Inggris saja untuk naskah dalam bahasa Inggris. Naskah yang terlalu panjang dapat dibuat berseri, tetapi naskah demikian jarang diterbitkan jurnal ini. **Judul pelari** (*running title*) sekitar 5 kata. **Nama penulis** atau para penulis pada naskah kelompok ditulis secara lengkap dan tidak disingkat. **Nama dan alamat institusi** ditulis lengkap dengan nama dan nomor jalan (lokasi), kode pos, nomor telepon, nomor faksimili, alamat e-mail dan website. Pada naskah kelompok perlu ditunjukkan penulis untuk korespondensi beserta alamat dengan urutan seperti di atas. **Abstract** sebaiknya tidak lebih dari 200 kata, ditulis dalam bahasa Indonesia dan Inggris untuk naskah dalam bahasa Indonesia atau bahasa Inggris saja untuk naskah dalam bahasa Inggris. **Kata kunci** (*Keywords*) sekitar 5 kata, meliputi nama ilmiah dan daerah (apabila ada), topik penelitian, dan metode-metode khusus yang digunakan.

Pendahuluan (*Introduction*) sekitar 400-600 kata, meliputi latar belakang, tinjauan pustaka, dan tujuan penelitian. **Bahan dan Metode** (*Materials and Methods*) sebaiknya ditekankan pada cara kerja dan cara analisis data. **Hasil dan Pembahasan** (*Results and Discussion*) ditulis sebagai satu rangkaian, pada tulisan yang cukup panjang sebaiknya dibuat beberapa sub judul. Pembahasan merupakan jawaban pertanyaan *mengapa* dan *bagaimana* hasil penelitian dapat terjadi, bukan sekedar mengungkapkan kembali hasil penelitian dalam bentuk kalimat. Pembahasan yang lengkap dan menyeluruh lebih disukai dari pada pembahasan yang tidak tuntas. Naskah telaah pustaka tanpa sub judul Bahan dan Metode, serta Hasil dan Pembahasan. **Kesimpulan** (*Conclusion*) sebaiknya tetap diberikan, meskipun biasanya sudah terungkap pada Hasil dan Pembahasan. **Ucapan terima kasih** (*Acknowledgments*) apabila diperlukan ditulis secara singkat. **Gambar dan Tabel** maksimum 3 halaman, dapat dibuat dengan tinta cina atau printer laser. Judul gambar ditulis di bawah gambar, sedangkan judul tabel ditulis di atas tabel. Foto dicetak pada kertas *glossy* dan diberi keterangan. Gambar berwarna dapat diterima apabila informasi ilmiah dalam naskah dapat hilang tanpa gambar tersebut. Setiap gambar dan foto

sebaiknya menyertakan file digital. Penulis dianjurkan menyertakan foto atau gambar untuk sampel depan meskipun tidak dimuat dalam naskah sendiri. **Tidak ada lampiran**, semua data atau analisis data dimasukkan dalam Hasil dan Pembahasan.

Pustaka dalam naskah ditulis dalam bentuk nama belakang penulis dan tahun. Pada kalimat yang diacu dari beberapa penulis, nama penulis diurutkan berdasarkan kebaruan pustaka. Pada naskah yang ditulis oleh dua penulis, nama keduanya disebutkan, sedangkan pada naskah yang ditulis oleh tiga penulis atau lebih, hanya nama penulis pertama yang ditulis diikuti et al. atau dkk., misalnya: Sprent dan Sprent (1990) atau (Suranto et al. 1998; Baker and Manwell 1991; Smith 1982a, b). Pada sitasi bertingkat digunakan kata *cit* atau dalam, misalnya (Gyorgy 1991 *cit* Coward 1999) atau Gyorgy (1991, dalam Coward 1999).

Daftar Pustaka diketik dengan spasi ganda. Sitasi mengikuti CBE-ELSE-Vancouver style dengan modifikasi sebagai berikut:

Jurnal:

Suranto S, Gough KH, Shukla DD et al. 1998. Coat protein sequence of Krish-infecting strain of Johnson-grass mosaic potyvirus. Arch Virol 143: 1015-1020.

Buku:

Sprent JI, Sprent P. 1990. Nitrogen fixing organisms: Pure and applied aspects. Chapman and Hall, London.

Bab dalam buku:

Baker CMA, Manwell C. 1991. Population genetics, molecular markers and gene conservation of bovine breeds. In: Hickman CG (ed). Cattle Genetic Resources. Elsevier, Amsterdam.

Abstrak:

Liu Q, Salih S, Ingersoll J et al. 2000. Response of transgenic 'Royal Gala' apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoots, containing the modified cecropin MB39 gene to *Erwinia amylovora* [084]. Abstracts of 97th Annual International Conference of the American Society for Horticultural Science. Lake Buena Vista, FL, 23-26 July 2000.

Prosiding:

Alikodra HS. 2000. Keanekaragaman hayati bagi pembangunan daerah otonom. In: Setyawan AD, Sutarno (eds). Menuju Taman Nasional Gunung Lawu, Prosiding Semiloka Nasional Konservasi Biodiversitas untuk Perlindungan dan Penyelamatan Plasma Nutfah di Pulau Jawa. Surakarta, 17-20 Juli 2000.

Skripsi, Tesis, Disertasi:

Purwoko T. 2001. Biotransformasi Isoflavon oleh *Rhizopus oryzae* UICC 524 dan Aktivitas Antioksidan Isoflavon Aglikon dari Tempe terhadap Oksidasi Minyak Kedelai. [Tesis]. Universitas Indonesia, Jakarta.

Informasi dari Internet:

Rosauer D. 1998. Forest disturbance and succession. <http://www.anu.edu.au/Forestry/silviculture/daniel/chapter1/1.1.html>

Naskah publikasi "*in press*" dapat disitasi dan dicantumkan dalam daftar pustaka. "Komunikasi pribadi" dapat disitasi, tetapi tidak dapat dicantumkan dalam daftar pustaka. Penelitian yang tidak dipublikasikan atau sedang dalam tahap pengajuan publikasi tidak dapat disitasi.

Beberapa catatan tambahan. Naskah diketik tanpa tanda hubung (-), kecuali kata ulang. Penggunaan huruf "I" (el) untuk "1" (satu) atau "O" (oh) untuk "0" (nol) perlu dihindari. Simbol α , β , χ , dan lain-lain dimasukkan melalui fasilitas insert, bukan mengubah jenis huruf. Kata-kata dan tanda baca sesudahnya tidak diberi spasi.

Kemajuan Naskah. Pemberitahuan naskah dapat diterima atau ditolak akan diberitahukan sekitar satu bulan setelah pengiriman. Naskah dapat ditolak apabila materi yang dikemukakan tidak sesuai dengan misi jurnal, kualitas materi rendah, format tidak sesuai, gaya bahasa terlalu rumit, terjadi ketidakjujuran keaslian penelitian, dan korespondensi tidak ditanggapi. Penulis atau penulis pertama pada naskah kelompok akan mendapatkan satu eksemplar jurnal yang memuat tulisannya selambat-lambatnya sebulan setelah naskah diterbitkan. Penulis akan kembali mendapatkan satu eksemplar jurnal nomor penerbitan berikutnya.

PENTING: Penulis atau para penulis dalam naskah kelompok masih memegang hak cipta (*copyright*) dan mempertahankan hak penerbitan tanpa pembatasan atas naskah yang diterbitkan **Biofarmasi**. Penulis atau pihak lain diperkenankan memperbanyak naskah dalam jurnal ini selama tidak untuk tujuan komersial. Untuk penemuan baru, penulis disarankan mengurus hak patennya sebelum mempublikasikan dalam jurnal ini.

Pengaruh penambahan daun salam (*Eugenia polyantha*) terhadap kualitas mikrobiologis, kualitas organoleptis, dan daya simpan telur asin pada suhu kamar 47-54

• ANA FITRI, RATNA SETYANINGSIH, ARI SUSILOWATI

Kandungan reserpin kultur kalus pule pandak (*Rauvolfia verticillata*) setelah elisitasi dengan cendawan *Pythium* sp. 55-66

• NINIK PUJI ASTUTI, SOLICHATUN, ARI SUSILOWATI

Karakteristik klorofil pada daun sebagai material photodetector organic 67-72

• ARROHMAH, AGUS SUPRIYANTO, KUSUMANDARI

