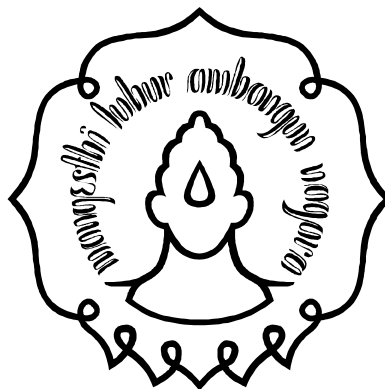


KANDUNGAN RESERPIN
KULTUR KALUS PULE PANDAK (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon)
SETELAH DIELISITASI DENGAN CENDAWAN *Pythium* sp.

Skripsi

Untuk memenuhi sebagian persyaratan
guna memperoleh gelar Sarjana Sains Jurusan Biologi



Oleh
Ninik Puji Astuti
M 0402006

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS SEBELAS MARET
SURAKARTA
2007

PERSETUJUAN

SKRIPSI

KANDUNGAN RESERPIN

**KULTUR KALUS PULE PANDAK (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon)
SETELAH DIELISITASI DENGAN CENDAWAN *Pythium* sp.**

Oleh :
Ninik Puji Astuti
M 0402006

telah disetujui untuk diujikan

Surakarta, April 2007

Menyetujui:

Pembimbing I

Pembimbing II

Solichatun, M.Si
NIP. 132 162 554

Ari Susilowati, M.Si
NIP. 132 169 255

Mengetahui
Ketua Jurusan Biologi

Drs. Wiryanto, M.Si
NIP. 131 124 613

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil penelitian saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi, serta tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila di kemudian hari dapat ditemukan adanya unsur penjiplakan, maka gelar kesarjanaan yang telah diperoleh dapat ditinjau dan/atau dicabut.

Surakarta, April 2007

Ninik Puji Astuti
NIM. M 0402006

ABSTRAK

Ninik Puji Astuti. 2007. KANDUNGAN RESERPIN KULTUR KALUS PULE PANDAK (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon) SETELAH DIELISITASI DENGAN CENDAWAN *Pythium* sp. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret.

Penelitian untuk mengkaji pengaruh elisitor yang berasal dari cendawan *Pythium* sp. terhadap kandungan reserpin kultur kalus pule pandak (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon) telah dilaksanakan pada bulan Juni-Desember 2006. Kalus diinduksi dari eksplan berupa potongan daun *R. verticillata* dan ditumbuhkan pada media *Murashige Skoog's* (media MS) dengan penambahan 2 mg/L NAA dan 2 mg/L kinetin. Kalus dielisitasi dengan cendawan *Pythium* sp. steril pada hari ke-30. Konsentrasi elisitor yang digunakan adalah: 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; dan 2,0 mg BK/ml. Pemanenan kalus yang telah dielisitasi dilakukan pada jam ke-0, 18, 36, dan 72. Data kualitatif (morfologi dan warna kalus) disajikan secara deskriptif. Data kuantitatif (berat kering kalus dan kandungan reserpin) dianalisis secara statistik menggunakan *General Linear Model Univariat* (GLM *Univariat*) dan dilanjutkan dengan uji lanjut DMRT pada taraf kepercayaan 95%.

Penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi elisitor dan lama elisitasi mempengaruhi berat kering dan kandungan reserpin kalus *R. verticillata* secara signifikan. Konsentrasi elisitor sebanyak 2,0 mg BK/ml dan waktu pemanenan 72 jam menghasilkan berat kering kalus paling rendah, yaitu sebesar 0,039 g, akan tetapi mampu menghasilkan reserpin tertinggi, yaitu 481,900 mg/g BK kalus atau meningkat sebesar 103,849% dibandingkan dengan kontrol.

Kata kunci: *Rauvolfia verticillata*, reserpin, elisitor, *Pythium* sp.

ABSTRACT

Ninik Puji Astuti. 2007. RESERPINE CONTENT OF *Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon CALLUS CULTURE ELICITED BY ELICITOR DERIVED FROM *Pythium* sp. Biology. Mathematics and Natural Science Faculty. Sebelas Maret University.

A research to study the effect of elicitor derived from *Pythium* sp. on reserpine content of *Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon callus culture has been conducted on June-December 2006. 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 concentration of elicitor were: 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 mg DW/ml. The harvesting time of the elicited callus were at 0, 18, 36, and 72 hours. Morphology of the callus (texture and color) were observed descriptively. Dry weight of callus and reserpine content were analyzed statistically using *General Linear Model Univariat (GLM Univariat)* and followed by *Duncan's Multiply Ring Test (DMRT)* at 95% of confidence.

This research showed that concentration of elicitor and harvesting time influenced the dry weight and reserpine content of *R. verticillata* callus culture significantly. Two mg DW/ml elicitor with 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.

Key words: *Rauvolfia verticillata*, reserpine, elicitor, *Pythium* sp.

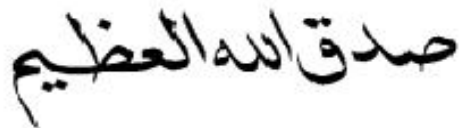
MOTTO



“Janganlah kamu bersikap lemah dan janganlah (pula) bersedih hati, kamulah orang-orang yang paling tinggi (derajatnya), jika kamu orang-orang yang beriman” (Ali ‘Imran: 139)

Dan rendahkanlah dirimu terhadap mereka berdua (Ayah dan Ibu) dengan penuh kasih sayang dan ucapkanlah: “Wahai Tuhanku, kasihilah mereka sebagaimana mereka telah mengasihi dan mendidik aku waktu kecil”
(Al Israa’: 24)

“Jika Allah SWT menolong kamu, maka tidak ada orang yang dapat mengalahkanmu. Jika Allah SWT membiarkan kamu (tidak memberi pertolongan), maka siapakah gerangan yang dapat menolong kamu (selain) dari Allah SWT sesudah itu? Karena itu hendaklah kepada Allah SWT saja orang-orang mukmin bertawakal”
(Ali ‘Imran: 160)



Do the best and never give up ! (blue_sky)

PERSEMBAHAN

Karya sederhana ini kupersembahkan khusus untuk:

Ibu yang sangat aku sayangi,

Bapak yang sangat aku banggakan,

Kakak-kakakku yang sangat menakjubkan,

Kuncoro Adi, S.Si yang selalu ada dalam suka dan duka,

dan untuk Almamater tercinta.....

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Pule Pandak (*Rauvolfia verticillata*) merupakan salah satu tanaman obat yang hampir punah. Tanaman ini mengandung beberapa senyawa kimia, salah satunya adalah reserpin yang bermanfaat sebagai antihipertensi. Kandungan reserpin yang sedikit dan keberadaan tanaman yang semakin langka tidak mampu memenuhi kebutuhan obat yang semakin meningkat. Hal ini menuntut kita untuk memecahkan permasalahan tersebut. Teknik kultur *in vitro* berperan penting dalam memperbanyak dan pemuliaan tanaman serta dalam memproduksi metabolit sekunder termasuk di dalamnya senyawa obat.

Penelitian ini mengambil tema teknik kultur *in vitro* untuk meningkatkan kandungan senyawa obat, dengan judul “Kandungan Reserpin Kultur Kalus Pule Pandak (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon) setelah Dielisisasi dengan Cendawan *Pythium* sp.” Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan pengetahuan serta bukti ilmiah mengenai cara peningkatan senyawa obat khususnya reserpin melalui teknik elisitasi secara *in vitro*.

Penulis menyadari bahwa naskah ini masih banyak kekurangan, oleh karena itu penulis selalu menantikan kritik, saran, dan koreksi dari pembaca. Terima kasih atas perhatiannya, semoga naskah ini bermanfaat bagi kita Amin...

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Surakarta, April 2007

Ninik Puji Astuti
M 0402006

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PERSETUJUAN	ii
PERNYATAAN.....	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT.....	v
MOTTO	vi
PERSEMBAHAN	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Perumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	5
D. Manfaat Penelitian	5
BAB II. LANDASAN TEORI	6
A. Tinjauan Pustaka	6
1. Pule Pandak (<i>Rauvolfia verticillata</i> (Lour.) Baillon).....	6
a. Klasifikasi.....	6

b. Morfologi	6
c. Ekologi dan Distribusi.....	7
d. Kandungan Senyawa Kimia dan Manfaat.....	7
2. Kultur <i>in vitro</i>	9
a. Pengertian dan Manfaat Kultur <i>in vitro</i>	9
b. Pertumbuhan Kalus	11
c. Produksi Metabolit Sekunder Melalui Kultur <i>in vitro</i>	12
3. Metabolit Sekunder Alkaloid Indol Monoterpenoid (AIM).....	13
4. Elisitor	16
5. <i>Pythium</i> sp.....	17
a. Klasifikasi.....	17
b. Morfologi	17
c. Reproduksi	17
d. Ekologi dan Distribusi	18
B. Kerangka Pemikiran.....	18
C. Hipotesis.....	19
BAB III. METODE PENELITIAN.....	20
A. Waktu dan Tempat Penelitian	20
B. Bahan dan Alat.....	20
1. Bahan Tanaman Sumber Eksplan	20
2. Bahan Kalus	20
3. Bahan Elisitor.....	20
4. Bahan Kimia.....	21

a. Bahan Kimia untuk Sterilisasi Eksplan	21
b. Bahan Kimia untuk Pembuatan Media	21
1) Media Inisiasi Kalus	21
2) Media Perlakuan	21
3) Media Kultur Cendawan <i>Pythium</i> sp.	21
a) Media Agar	21
b) Media Cair (<i>broth</i>)	22
c. Analisis Kandungan Reserpin	22
5. Alat	22
a. Sterilisasi Bahan dan Alat	22
b. Pembuatan Media	22
1) Media Inisiasi Kalus dan Media Perlakuan	22
2) Media Kultur Cendawan <i>Pythium</i> sp.	23
c. Penghitungan Spora Cendawan <i>Pythium</i> sp.	23
d. Persiapan Bahan Elisitor	23
e. Penanaman Eksplan	23
f. Elisitasi	23
g. Analisis Kandungan Reserpin	23
C. Rancangan Percobaan	24
D. Cara Kerja	24
1. Persiapan	25
a. Sterilisasi Alat	25
b. Pembuatan Media	25

1) Media Inisiasi Kalus	25
2) Media Perlakuan	27
3) Media Kultur Cendawan <i>Pythium</i> sp.	27
a) Media Agar	27
b) Media Cair	27
2. Inisiasi Kalus	28
a. Sterilisasi Eksplan	28
b. Penanaman Eksplan	28
3. Persiapan Bahan Elisitor	29
4. Penanaman Kalus pada Media Perlakuan	30
5. Perlakuan (Elisitasi)	30
6. Pengamatan dan Pengujian Hasil	31
a. Pengamatan Pertumbuhan Kalus.....	31
b. Analisis Kandungan Reserpin	31
c. Penghitungan Kandungan Reserpin	32
E. Teknik Pengumpulan Data	32
F. Analisis Data.....	32
BAB IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	33
A. Tahap Inisiasi Kalus <i>R. verticillata</i>	35
B. Pertumbuhan Kalus <i>R. verticillata</i> pada Media Perlakuan	41
1. Morfologi Kalus <i>R. verticillata</i>	41
2. Berat Kering Kalus <i>R. verticillata</i>	44
C. Analisis Kandungan Reserpin Kalus <i>R. verticillata</i>	47

BAB V. PENUTUP	53
A. Kesimpulan	53
B. Saran	53
DAFTAR PUSTAKA	55
LAMPIRAN	61
UCAPAN TERIMA KASIH	77
RIWAYAT HIDUP	80

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Rancangan Percobaan Penelitian	24
Tabel 2. Morfologi kalus <i>R. verticillata</i> berumur 30 hari pada media inisiasi	38
Tabel 3. Morfologi kalus <i>R. verticillata</i> pada media perlakuan setelah dielisitasi dengan cendawan <i>Pythium</i> sp.	43
Tabel 4. Berat kering kalus <i>R. verticillata</i> setelah dielisitasi dengan cendawan <i>Pythium</i> sp.	45
Tabel 5. Kandungan reserpin kalus <i>R. verticillata</i> setelah dielisitasi dengan cendawan <i>Pythium</i> sp.	47
Tabel 6. Persentase peningkatan kandungan reserpin kalus <i>R. verticillata</i> setelah dielisitasi dengan cendawan <i>Pythium</i> sp. dibandingkan dengan kontrol	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Struktur kimia reserpin (Ramawat, 1999c)	8
Gambar 2.	Jalur biosintesis asam mevalonat (Taiz dan Zeiger, 1998)	15
Gambar 3.	Jalur biosintesis Alkaloid Indol Monoterpenoid (AIM) (Kutchan, 1995; Rihwani dan Shank, 1998)	16
Gambar 4.	Bagan kerangka pemikiran penelitian	19
Gambar 5.	Morfologi cendawan <i>Pythium</i> sp. berumur 6 hari dalam PDA cawan.....	33
Gambar 6.	Morfologi miselium cendawan <i>Pythium</i> sp. berumur 6 hari: Miselium pada PDB (a), miselium yang telah disterilkan (b).....	34
Gambar 7.	Serbuk miselium <i>Pythium</i> sp.....	35
Gambar 8.	Morfologi kalus <i>R. verticillata</i> berumur 7 hari (a), 14 hari (b), dan 21 hari (c) pada media inisiasi.....	36
Gambar 9.	Morfologi kalus <i>R. verticillata</i> berumur 30 hari pada media inisiasi	37
Gambar 10.	Lintasan proses degradasi klorofil (Santoso dan Nursandi, 2004)	39
Gambar 11.	Rata-rata berat kering kalus <i>R. verticillata</i> pada berbagai konsentrasi elisitor dan lama elisitasi.....	45
Gambar 12.	Rata-rata kandungan reserpin kalus <i>R. verticillata</i> pada berbagai konsentrasi elisitor dan lama elisitasi.....	48
Gambar 13.	Mekanisme penghantaran sinyal ekstraseluler pada membran plasma (Srivastava dan Gupta, 1996)	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Morfologi tanaman <i>R. verticillata</i>	61
Lampiran 2.	Jalur biosintesis asam sikimat (http://www.personal.psu.edu/faculty/j/m/jmd469/Shikimate Acid_Pathway_files)	62
Lampiran 3.	Morfologi <i>Pythium</i> sp.	63
Lampiran 4.	Komposisi media Murashige dan Skoog (MS)	64
Lampiran 5.	Penghitungan jumlah spora <i>Pythium</i> sp. (Hadioetomo, 1990).	65
Lampiran 6.	Morfologi kalus <i>R. verticillata</i> sebelum dan sesudah dielisitasi dengan cendawan <i>Pythium</i> sp.	66
Lampiran 7.	Data hasil penghitungan statistik berat kering kalus <i>R. verticillata</i>	68
Lampiran 8.	Data hasil penghitungan statistik kandungan reserpin kalus <i>R. verticillata</i>	72
Lampiran 9.	Kurva standar reserpin	76

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Perkembangan obat-obatan dimulai dari penggunaan ekstrak tumbuhan, diikuti senyawa kimia murni tumbuhan yang diketahui strukturnya, antara lain: kokain, kodein, dan morfin. Pada tahun 1940-an, seiring dengan perkembangan sintesis kimia organik, senyawa sintetik lebih populer digunakan di samping senyawa antibiotik dari mikroorganisme. Akhir-akhir ini, penggunaan tanaman sebagai bahan baku obat mulai diperhatikan kembali disebabkan keterbatasan cara sintetik dalam merekayasa bahan kimia baru (Achmad dkk., 1995). Joko dkk. (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 tanaman obat adalah pule pandak (*Rauvolfia verticillata*). Menurut Thien An dan Ziegler (2001), tanaman ini tergolong hampir punah. *R. verticillata* mengandung beberapa senyawa kimia, antara lain: alkaloid (reserpin, serpentin, ajmalin, dan ajmalisin), saponin, flavonoid, dan polifenol (de Padua *et al.*, 1999; LIPI, 1999). Menurut de Padua *et al.*, (1999); 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 *Rauwolfia* telah diperdagangkan dalam bentuk tablet, yaitu: *Rauwolfia* (dengan nama dagang *Raudixin*, *Rauval*, *Rauverid*, dan *Wolfina*), dan *Reserpin* (dengan 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* (Dep Kes RI Dir Jend POM, 2000).

Kebutuhan obat semakin tinggi, di sisi lain obat sintetis yang menjadi andalan semakin mahal, oleh karena itu masyarakat memanfaatkan kembali obat dari alam. Permasalahannya, banyak tanaman obat yang mulai punah disebabkan oleh eksploitasi yang berlebihan dan semakin menyusutnya lahan, oleh karena itu diperlukan teknologi untuk memecahkan permasalahan tersebut. Salah satu pemecahannya adalah dengan memproduksi senyawa obat melalui kultur *in vitro* (Fitriani dkk., 1999). Kultur *in vitro* berguna untuk melestarikan tanaman dan memproduksi senyawa obat (Aprianita, 2003; Purnamaningsih dkk., 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 (2001), teknik elisitasi merupakan pemberian materi abiotik atau biotik ke dalam sel tumbuhan, sehingga produksi metabolit sekundernya meningkat. Elisitor merupakan senyawa mediator berupa cekaman dari mikrobial (elisitor biotik) atau berupa agen penyebab cekaman, antara lain: sinar UV, alkalinitas, tekanan osmotik, dan ion logam berat (elisitor abiotik). Salah satu elisitor biotik adalah cendawan. Respon elisitasi pertama kali

ditemukan tahun 1972 oleh Keen dalam percobaannya mengenai sel tanaman yang diberi ekstrak cendawan patogen, menunjukkan peningkatan fitoaleksin. Pada pertengahan 1980, produksi alkaloid 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* meningkatkan kandungan ajmalisin kultur kalus *Catharanthus roseus* (Fitriani dkk., 1999). Mukarlina (2001) melakukan elisitasi kultur akar *C. roseus* dengan *P. aphanidermatum*. Hasilnya terjadi peningkatan ajmalisin sebesar 306,465%. Ekstrak *Saccharomyces cerevisiae* meningkatkan gosipol kultur *Gossypium hirsutum* sebesar 13,746-207,345% (Sitinjak dkk., 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 diperoleh Rahayu (2004) ketika melakukan elisitasi 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 saprofob pada serasah dan pada kondisi yang cocok dapat menyerang tanaman, oleh karena itu bersifat parasit fakultatif. Cendawan ini umumnya menyerang tanaman yang masih muda (*juvenile*) dan mengakibatkan rebah semai, contohnya 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 dkk. (2003) mengemukakan bahwa elisitor biotik di antaranya berasal dari cendawan. Komposisi kompleks cendawan (dinding sel miselium) dapat digunakan sebagai elisitor. Selain itu, bagian-bagian cendawan juga dapat digunakan sebagai elisitor, yaitu: kandungan karbohidrat pada dinding sel yang berupa polisakarida (pektin, selulosa, kitin, dan glukukan), atau oligosakarida (manuronat guluronat, dan galakturonidat).

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu dilakukan penelitian mengenai kandungan reserpin pada kultur kalus pule pandak (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon) setelah dielisitasi dengan cendawan *Pythium* sp.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah, maka dibuat dua rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimanakah kandungan reserpin pada kultur kalus pule pandak (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon) setelah dielisitasi dengan cendawan *Pythium* sp.?
2. Berapakah konsentrasi elisitor cendawan *Pythium* sp. dan waktu panen yang optimum untuk menghasilkan kandungan reserpin tertinggi pada kultur kalus pule pandak (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon) ?

C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan perumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengkaji kandungan reserpin pada kultur kalus pule pandak (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon) setelah dielisitasi dengan cendawan *Pythium* sp.
2. Mengkaji konsentrasi elisitor cendawan *Pythium* sp. dan waktu panen yang optimum untuk menghasilkan kandungan reserpin tertinggi pada kultur kalus pule pandak (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon).

D. Manfaat Penelitian

1. Bagi peneliti, penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai:
 - a. Kandungan reserpin kultur kalus pule pandak (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon) setelah dielisitasi dengan cendawan *Pythium* sp.
 - b. Konsentrasi elisitor *Pythium* sp. dan waktu panen yang optimum untuk menghasilkan kandungan reserpin tertinggi pada kultur kalus pule pandak (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon).
2. Bagi masyarakat, penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai pentingnya peningkatan kandungan reserpin tanaman pule pandak (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon) melalui teknik elisitasi secara *in vitro*, sehingga dapat dimanfaatkan lebih lanjut sebagai bahan obat untuk meningkatkan kesehatan masyarakat.

BAB II

LANDASAN TEORI

A. Tinjauan Pustaka

1. Pule Pandak (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon)

a. Klasifikasi

Menurut Backer dan van Den Brink (1965), klasifikasi *Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon adalah:

Divisio : Spermatophyta

Subdivisio : Angiospermae

Kelas : Dicotyledoneae

Ordo : Apocynales

Familia : Apocynaceae

Genus : *Rauvolfia*

Spesies : *Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon

Menurut de Padua *et al.* (1999); LIPI (1999), *Rauvolfia verticillata* memiliki sinonim *R. perakensis* King & Gamble, *R. chinensis* (Spreng.) Hemsl., dan *Dissolena verticillata* Lour. Nama daerah *R. verticillata* adalah: pule pandak (Jawa) dan salung-salung (Sumatra).

b. Morfologi

R. verticillata merupakan semak dengan ketinggian mencapai 3 m. Batangnya berkayu, berbentuk bulat, bercabang, permukaannya kasar, dan berwarna putih kotor. Daunnya tunggal, berkarang 3-4, berwarna hijau/hijau kekuningan, berbentuk bulat telur, panjangnya 10-15 cm, lebarnya 3-7,5 cm,

panjang tangkai daun mencapai 1,5 cm, tulang daun menyirip. Bunganya majemuk, berbentuk payung, terletak di ujung cabang, berwarna putih kemerahan, tabung mahkota lebih panjang daripada putik mencapai 9-18 mm. Buahnya saat muda berwarna hijau, setelah tua berwarna putih keabu-abuan, berbentuk lonjong, dan berpasangan dua-dua. Setiap buah mengandung 1-2 biji yang berbentuk pipih lonjong dan berwarna putih kekuningan. Akarnya tunggang, berbentuk bulat, dan berwarna kuning (de Padua *et al.*, 1999; LIPI, 1999). Morfologi tanaman *R. verticillata* dapat diamati pada Lampiran 1.

c. Ekologi dan Distribusi

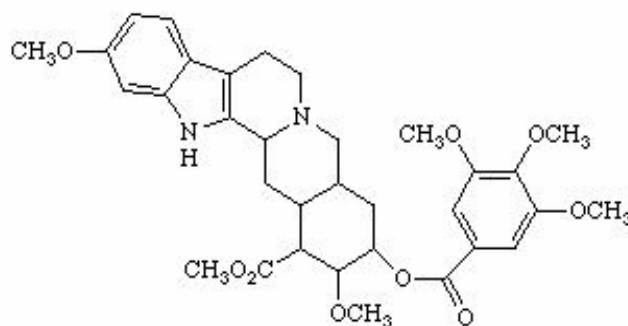
Menurut de Padua *et al.* (1999) *R. verticillata* tersebar luas di berbagai wilayah, yaitu: India, Sri Lanka, Myanmar, Thailand, Cina Selatan, Taiwan, Semenanjung Malaya, Filipina, Sumatra, Jawa, dan Lombok. *R. verticillata* tumbuh dengan baik pada daerah terbuka, baik itu di dataran rendah maupun dataran tinggi. Tanaman ini umumnya tumbuh pada ketinggian 30-2.000 m dpl, pada tanah berlempung atau berbatu kapur dengan tingkat keasaman 5-6,5 dan temperatur 10-38°C (de Padua *et al.*, 1999; LIPI, 1999).

d. Kandungan Senyawa Kimia dan Manfaat

Kandungan senyawa kimia *R. verticillata* adalah: alkaloid (reserpin, serpentin, ajmalin, dan ajmalisin), saponin, flavonoid, dan polifenol. Akar dan batang *R. verticillata* dimanfaatkan sebagai obat darah tinggi, malaria, dan tipus (de Padua *et al.*, 1999; LIPI, 1999). Tanaman ini juga bermanfaat untuk mengatasi perut kembung dan pegal-pegal, serta untuk melancarkan peredaran darah, dan sebagai penawar racun (Hill, 1996; Purnamaningsih dkk., 1998).

Reserpin merupakan obat alami yang telah digunakan selama berabad-abad di India. Reserpin diekstrak dari akar *Rauvolfia* berumur 15 bulan pada musim dingin, kemudian dikeringkan dan digunakan dalam bentuk serbuk untuk mengatasi batuk dan hipertensi (Zumaidar, 2000).

Menurut Dep Kes RI Dir Jend POM (1995), reserpin (metil 18 β -hidroksi-11,17 α -dimetoksi-3 β ,20 α -yohimban-16 β - karboksilat 3,4,5 trimetoksi benzoat (ester)/C₃₃H₄₀N₂O₉) memiliki berat molekul 608,69, berwarna putih sampai dengan kekuningan dan tidak berbau. Warnanya berubah menjadi gelap oleh cahaya matahari dan lebih cepat terjadi ketika berada dalam bentuk larutan. Struktur kimia reserpin dapat diamati pada Gambar 1 berikut:



Gambar 1. Struktur kimia reserpin (Ramawat, 1999c)

Reserpin mengatasi hipertensi dengan cara menghambat kerja saraf adrenergik. Saraf adrenergik merupakan bagian saraf simpatik yang mengatur kerja jantung dengan neurotransmitter berupa norepinefrin. Reserpin berperan menghambat pelepasan norepinefrin dari vesikel akson suatu neuron menuju dendrit neuron lainnya, sehingga penghantaran impuls saraf jantung dan pembuluh darah lebih teratur. Jantung dan pembuluh darah bekerja normal, sehingga menurunkan tekanan darah. Reserpin mampu mengurangi resistensi perifer, denyut jantung dan curah jantung (Bagian Farmakologi FK UI, 1995).

Reserpin merupakan antihipertensi yang efektif terutama dalam kombinasi dengan tiazid (suatu diuretik yang anggotanya adalah: hidroklorotiazid, bendroflumetiazid, klortalidon, dan indapamid) untuk pengobatan hipertensi ringan-sedang (Bagian Farmakologi FK UI, 1995). Tiazid mampu menurunkan konsentrasi bahan kimia darah yang menyebabkan tekanan darah naik. Bahan kimia ini adalah natrium. Natrium berperan dalam pelepasan norepinefrin dari vesikel akson suatu neuron ke dendrit neuron lain (Bagian Farmakologi FK UI, 1995; Thomson, 1998). Menurut Rahardjo dkk. (1898), hipertensi umumnya diderita oleh orang dengan asupan garam (NaCl) tinggi. Menurut Moerdowo (1984), natrium mempengaruhi resistensi perifer dengan cara meningkatkan kadar plasma darah, sehingga menyebabkan tekanan darah naik. Tiazid mampu meningkatkan ekskresi natrium, klorida, dan air, sehingga mengurangi volume plasma dan cairan ekstra sel. Tekanan darah menjadi turun akibat berkurangnya curah jantung.

3. Kultur *in vitro*

a. Pengertian dan Manfaat Kultur *in vitro*

Menurut Suryowinoto (2000), kultur *in vitro* merupakan suatu teknik mengisolasi bagian tanaman, kemudian menumbuhkannya secara aseptik pada media yang telah ditentukan nutriennya. Bagian tanaman yang masih muda dengan keadaan sel yang aktif membelah merupakan bagian yang paling baik untuk eksplan (Armini dalam Aryati dkk., 2005). Hal yang paling penting dalam kultur *in vitro* adalah merangsang sel atau jaringan tanaman agar menjadi meristematis kembali (Ignacimuthu, 1997). Teknik ini berkembang

dari konsep totipotensi sel yang dikemukakan Morgan (1940), bahwa setiap sel memiliki potensi menjadi organisme utuh. Pada tahun 1941 Haberlandt mengemukakan konsep kultur sel dan melakukan isolasi sel tanaman secara *in vitro* dalam media buatan (Ignacimuthu, 1997; Dodds dan Roberts, 1995).

Kultur *in vitro* dilaksanakan pada kondisi steril, artinya bebas dari kontaminan. Eksplan harus disterilkan dari mikroorganisme yang mungkin melekat. Eksplan yang telah steril diletakkan pada media kultur secara aseptik. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), media kultur yang umum digunakan untuk inisiasi kalus adalah media MS (*Murashige and Skoog's*). Menurut Beyl dalam Aryati dkk. (2005), media ini paling cocok sebagai media dasar kultur *in vitro* untuk regenerasi tanaman dari jaringan dan kalus. Media ini dapat digunakan untuk hampir semua jenis tanaman, memiliki kandungan garam organik lebih tinggi dibandingkan media lainnya, dan senyawa nitrogen terdapat dalam bentuk NO_3^- (nitrat) dan NH_4^+ (ammonium), sehingga dapat mempertahankan kondisi pH media (Hendaryono dan Wijayani, 1994; Salisbury dan Ross, 1995b; Husni, 1997). Komposisi utama media ini adalah: garam mineral, sumber karbon, zat pengatur tumbuh (ZPT) dan bahan pematat berupa agar (Ignacimuthu, 1997; Ramawat, 1999d; Scragg, 1997).

Manfaat kultur *in vitro* adalah: (1) mendapatkan tanaman baru dengan fisiologi dan morfologi sama dalam jumlah banyak dan waktu relatif cepat, (2) memperoleh varietas unggul dalam waktu relatif cepat, (3) melestarikan tanaman, terutama yang terancam punah, (4) menghasilkan metabolit sekunder sebagai obat, (5) menaikkan devisa negara (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

b. Pertumbuhan Kalus

Kalus merupakan massa sel yang terbentuk dari sel yang mengalami pembelahan terus menerus dan tidak terdiferensiasi dengan baik (Dodds dan Roberts, 1995; Walton *et al.*, 1999). Kalus terdiri dari jaringan meristematis yang berasal dari perlukaan bagian tanaman. Kalus merupakan wujud dari dediferensiasi sel. Dediferensiasi merupakan reversi dari sel hidup yang telah terdiferensiasi menjadi meristematis kembali. Inisiasi kalus merupakan salah satu langkah penting dalam kultur *in vitro*, selanjutnya diusahakan agar terjadi diferensiasi sel, sehingga terbentuk akar dan tunas (Suryowinoto, 2000).

Menurut Ramawat (1999c), dalam penelitian produk sekunder tanaman secara *in vitro*, kurva pertumbuhan kalus sangat penting untuk diketahui. Pengamatan pertumbuhan kalus akan memberikan informasi mengenai hubungan pertumbuhan dan sintesis produk sekunder serta akumulasinya. Hal ini bermanfaat dalam tujuan eksperimen untuk menghasilkan produk sekunder dan pemanenan jaringan pada waktu tertentu, untuk analisis produk sekunder dan mengatur pertumbuhan, serta memindahkan sel ke dalam media inisiasi.

Kalus yang stabil memiliki kurva pertumbuhan sigmoid dengan tiga fase pertumbuhan sebagai berikut:

1) Lag

Pada fase ini belum terjadi pertumbuhan kalus, merupakan masa adaptasi eksplan dengan media yang baru.

2) Eksponensial

Pada fase ini terjadi peningkatan produksi metabolit primer dan proliferasi sel secara cepat.

3) Stasioner

Pada fase ini produksi metabolit primer dan pertumbuhan kalus berhenti, Proliferasi sel berhenti karena nutrisi di dalam media telah habis.

Pada fase ini terjadi peningkatan sintesis metabolit sekunder. Jika pada fase ini kalus tidak dipanen, maka akan terjadi degradasi metabolit sekunder (Ramawat, 1999c).

c. Produksi Metabolit Sekunder Melalui Kultur *in vitro*

Pada awalnya, teknik kultur *in vitro* hanya digunakan dalam usaha memperbanyak tanaman. Dalam perkembangannya, teknik ini lebih diarahkan untuk mempelajari aspek biokimia dan fisiologi tanaman sebagai alternatif memperoleh senyawa obat (Scragg, 1997; Ernawati, 1992). Kultur *in vitro* dapat menghasilkan senyawa spesifik dalam jumlah banyak, jika dibandingkan dari tanaman utuh (Dalimoenthe, 1987; Kurz dan Constabel, 1991). Menurut Ramawat (1999c), senyawa metabolit sekunder umumnya diakumulasi pada usia tertentu dan atau setelah tanaman tua, sebagai contoh pada tanaman *Rauvolfia*, *Chinchona*, dan *Ochrosia*. Hal-hal tersebutlah yang menyebabkan sulitnya meningkatkan produksi metabolit sekunder, sehingga diperlukan suatu metode bioteknologi yang mampu meningkatkan produksi metabolit sekunder tanpa harus menunggu usia tanaman tersebut tua.

Kultur *in vitro* dapat mengakumulasi metabolit sekunder hanya dalam kondisi yang spesifik. Usaha untuk memaksimalkan produksi dan akumulasi metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* terus dilakukan dengan manipulasi media, seleksi klon sel, penambahan prekursor, dan teknik elisitasi (Mulabagal dan Tsay, 2004). Elisitasi merupakan salah satu cara yang efektif untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder (Sevon dan Caldentey, 2002).

4. Metabolit Sekunder Alkaloid Indol Monoterpenoid (AIM)

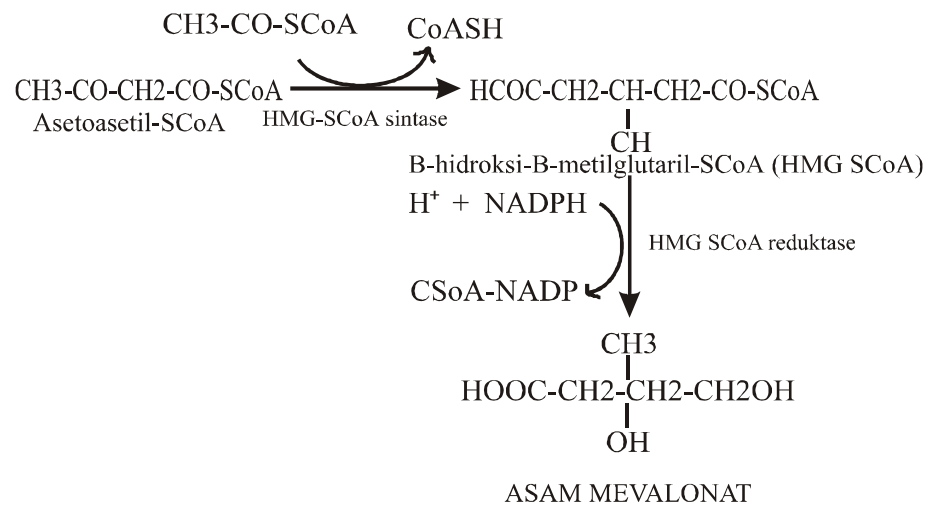
Sel tanaman menghasilkan dua jenis metabolit, yaitu metabolit primer dan sekunder. Metabolit primer merupakan hasil fotosintesis yang selanjutnya terlibat dalam sintesis komponen sel dan berperan secara langsung dalam pertumbuhan dan metabolisme, misalnya: karbohidrat, lemak, dan protein. Metabolit sekunder merupakan produk akhir metabolit primer dan secara umum tidak terlibat dalam metabolisme, misalnya: alkaloid, fenol, minyak esensial, steroid, lignin, dan tanin. Metabolit sekunder sangat terbatas jumlahnya dan terbatas pula pada beberapa golongan tanaman (famili, genus, atau spesies tertentu). Metabolit sekunder disintesis pada sel tertentu dan tahap pertumbuhan tertentu. Hal ini menyulitkan kegiatan ekstraksi, karena harus menunggu tahap pertumbuhan tertentu. Sebagai contoh, jika senyawa diakumulasi pada bunga, maka harus menunggu sampai tanaman tersebut berbunga (Ramawat dan Merillon, 1999a).

Salah satu metabolit sekunder yang dihasilkan tanaman adalah alkaloid. Alkaloid digolongkan menjadi beberapa golongan, di antaranya berdasarkan struktur kimianya digolongkan menjadi sepuluh, yaitu: 1) *Phenylalkylamines*, 2) *Pyrrolidines-Piperidines and Pyridines*, 3) *Tropane alkaloids*, 4) *Quinolizidine*

and pyrrolizidines, 5) *Quinoline alkaloids of Cinchona*, 6) *Indole alkaloids*, 7) *Purine alkaloids*, 8) *Tropolon alkaloids*, 9) *Isoprenoid alkaloids*, dan 10) *Diterpenoid alkaloids* (Ramawat, 1999c).

Alkaloid indol merupakan senyawa yang paling beragam dan rumit, karena memiliki struktur kimia yang kompleks dan banyak mengandung bagian asimetris. Alkaloid indol yang dimanfaatkan sebagai bahan obat di antaranya adalah: reserpin dan vinkristin (Croteu *et al.*, 2000; Robinson, 1995). Alkaloid indol monoterpenoid (AIM) ditemukan pada Loganiaceae, Apocynaceae, dan Rubiaceae (Ramawat dan Merillon, 1999a). Biosintesis alkaloid indol dimulai dari asam amino terutama triptofan yang merupakan prekursor dari sebagian besar alkaloid indol, prekursor lainnya adalah: tirosin, fenilalanin, lisin, dan arginin. AIM dibentuk dari satu unit triptamin dan satu unit terpenoid C₉ atau C₁₀ (*Secologenin*) (Ramawat dan Merillon, 1999a).

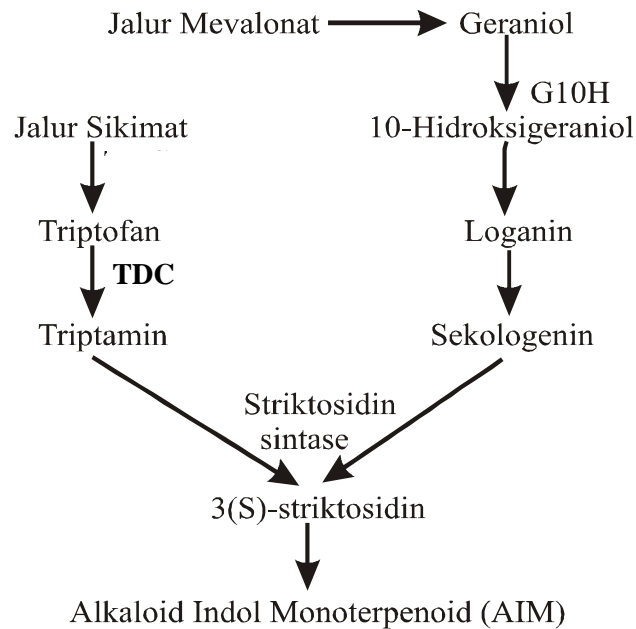
Menurut St-Pierre *et al.* (1999) dan Endt *et al.* (2002), alkaloid indol dibentuk melalui jalur mevalonat (Gambar 2) dan jalur sikimat (Lampiran 2). Asam mevalonat dibentuk dari tiga molekul asetil CoA yang berkondensasi melalui pembentukan β -hidroksil- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Tahap reaksi tersebut, dikatalisis oleh enzim HMG-CoA Sintase dan HMG-CoA reduktase. Dalam setiap tahap dilepaskan satu molekul koenzim A (CoASH) bebas. Dua molekul NADPH dipakai sebagai koenzim pada tahap reaksi kedua yang dikatalisis oleh HMG-CoA reduktase (Dalimoenthe, 1987).



Gambar 2. Jalur biosintesis asam mevalonat (Taiz dan Zeiger, 1998)

Triptamin dihasilkan dari jalur sikimat melalui reaksi dekarboksilasi triptofan yang dikatalisis oleh triptofan dekarboksilase (TDC). Triptamin berperan sebagai substrat enzim striktosidin sintase. Sekologenin dibentuk melalui jalur mevalonat yang dikatalisis oleh geraniol 10-hydrolase (G10H). Enzim tersebut mengkatalisis pembentukan geraniol menjadi 10-hydroxygeraniol, kemudian membentuk sekologenin (Gambar 3) (St-Pierre *et al.*, 1999 dan Endt *et al.*, 2002).

Stochkight dan Zenk dalam Kutchan (1995) serta Shanks *et al.* (1998) mengemukakan bahwa striktosidin sintase mengkatalisis kondensasi kelompok amino primer pada triptamin dan gugus aldehid dari sekologenin untuk membentuk AIM yang pertama, yaitu 3 α (S)-striktosidin yang digunakan sebagai prekursor pembentukan AIM. Menurut Whitmer, *et al.* (1998), striktosidin merupakan senyawa antara yang paling umum untuk biosintesis alkaloid indol. Jalur biosintesis AIM dapat diamati pada Gambar 3 berikut:



Gambar 3. Jalur biosintesis AIM (Kutchan, 1995; Rijhwani dan Shank, 1998).

5. Elisitor

Menurut Buitelaar dalam Ratnasari (2001), teknik elisitasi adalah teknik pemberian materi abiotik/biotik ke dalam sel tumbuhan, sehingga produksi metabolit sekundernya meningkat sebagai respon pertahanan diri. Elisitor adalah senyawa mediator berupa mikrobial yang dapat memberikan cekaman (*microbial stress*) yang dikenal dengan elisitor biotik atau dapat berupa agen penyebab cekaman (elisitor abiotik), seperti: sinar UV, alkalinitas, tekanan osmotik, dan ion logam berat. Ketika elisitor masuk ke dalam tubuh tanaman, terjadi peningkatan produksi senyawa spesifik (Radman *et al.*, 2003; Ramawat dan Sonie, 1999b).

Enzim kunci biosintesis alkaloid (striktosidin sintase) dapat dipacu dengan elisitor. Sebagian besar elisitor berupa produk cendawan (Robinson, 1995). Menurut Reichling (1999), elisitor dapat diisolasi dari dinding sel spora atau hifa cendawan patogen maupun nonpatogen, berupa: oligosakarida dan glikoprotein.

6. *Pythium* sp.

a. Klasifikasi

Menurut Sastrahidayat (1990), klasifikasi *Pythium* sp. adalah:

Divisio : Mycota
 Subdivisio : Eumycotina
 Kelas : Oomycetes
 Ordo : Peronosporales
 Famili : Pythiaceae
 Genus : *Pythium*
 Spesies : *Pythium* sp.

b. Morfologi

Pythium sp. umumnya membentuk koloni dan pertumbuhannya sangat cepat, umumnya tidak berwarna, panjang hifa mencapai 10 µm, miselium senositik dan bercabang (Erwin dan Ribeiro, 1996). Menurut Triharso (1994), sporangiofor tidak berbeda dengan hifa somatis, sporangium berbentuk bulat, saat reproduksi bagian ujungnya membentuk buluh yang menggelembung disebut vesikel. Morfologi *Pythium* sp. dapat diamati pada Lampiran 3.

c. Reproduksi

Reproduksi seksual dengan oogonia yang terletak di bagian ujung atau interkalari hifa. Oogonium terdiri dari satu oospora berbentuk pipih. Fertilisasi dengan satu atau beberapa anteridium yang berasal dari tangkai oogonium pada satu hifa (*monoclinous*) atau dari hifa lain (*diclinous*) yang berasal dari

miselium lain (heterotalik/dioseus). Reproduksi aseksual dengan zoospora yang dihasilkan sporangia (Erwin dan Ribeiro, 1996; Triharso, 1994).

d. Ekologi dan distribusi

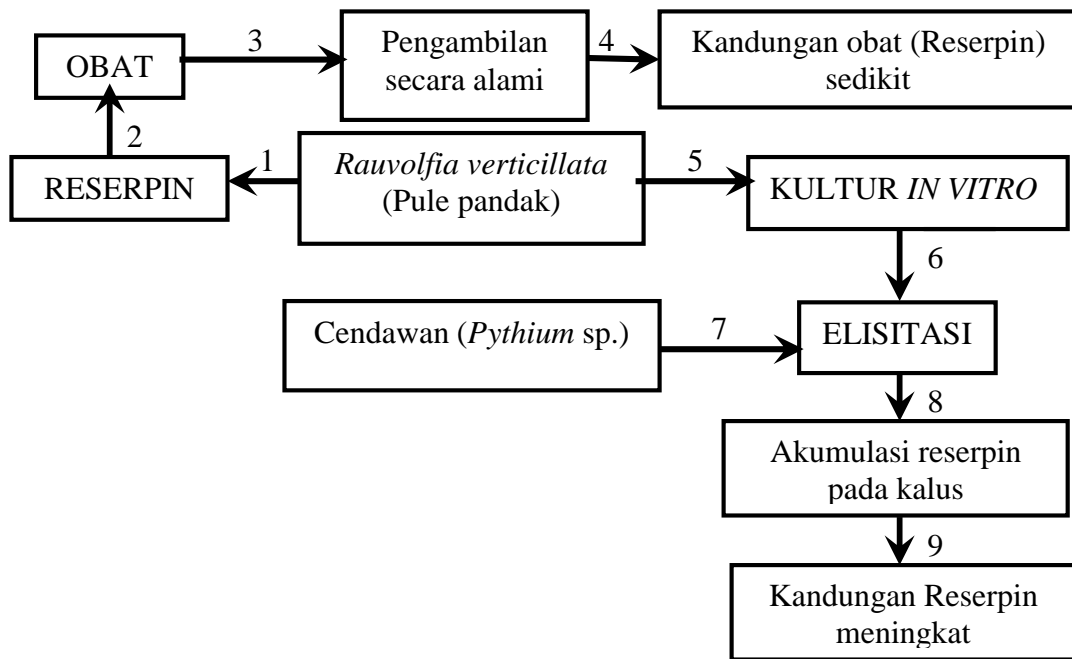
Pythium hidup di tanah, baik itu sebagai saprofit pada serasah maupun sebagai oospora. Inang cendawan ini sangat luas, di antaranya adalah: buncis (*Phaseolus vulgaris*), kacang hijau (*Vigna radiata*), semangka (*Citrus vulgaris*), dan kacang panjang (*Pisum sativum*) (Agrawal dan Prasad, 1997).

Anggota *Pythium* antara lain: *P. aphanidermatum*, *P. ultimum*, *P. debaryanum*, *P. irregulare*, dan *P. sylvaticum* menyebabkan rebah semai dan busuk akar tanaman kapas, jagung, kentang, tembakau, kacang-kacangan, dan pepaya. Cendawan ini juga menimbulkan penyakit layu pada tanaman jahe. *Pythium* menyerang paling fatal pada bagian korteks hipokotil tanaman semai dan aktif pada kondisi lingkungan dengan suhu 15-20°C. Infeksi tanaman disebabkan tingginya kelembaban tanah, terjadinya rebah semai didukung oleh suhu yang rendah (Balfas *et al.*, 2000; Cook, 1981; Sastrahidayat, 1990).

B. Kerangka Pemikiran

Pengambilan reserpin dari *R. verticillata* sering dilakukan secara alami dengan mengambil langsung bagian-bagian tanamannya (daun, akar, kulit kayu), sehingga senyawa yang diperoleh sedikit. Produksi reserpin tanaman *R. verticillata* dapat dilakukan melalui kultur *in vitro* dengan teknik elisitasi. Cendawan yang telah dimatikan dapat dimanfaatkan sebagai elisitor untuk mempengaruhi sintesis metabolit sekunder sebagai respon pertahanan diri (Stockigt dan Zenk dalam

Kutchan, 1995). Melalui elisitasi, reserpin akan disintesis dan diakumulasikan pada kalus *R. verticillata*. Kerangka pemikiran disajikan pada Gambar 4 berikut:



Gambar 4. Bagan kerangka pemikiran penelitian

C. Hipotesis

Dalam penelitian ini diajukan dua hipotesis, yaitu:

1. Produksi reserpin pada kultur kalus pule pandak (*R. verticillata* (Lour.) Baillon) akan meningkat setelah dielisitasi dengan cendawan *Pythium sp.*
2. Pada konsentrasi elisitor dan waktu panen yang optimum, kultur kalus pule pandak (*R. verticillata* (Lour.) Baillon) dapat menghasilkan senyawa reserpin dengan konsentrasi paling tinggi.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

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

B. Bahan dan Alat

1. Bahan Tanaman Sumber Eksplan

Sumber eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun ke dua dari pucuk tanaman pule pandak (*R. verticillata* (Lour.) Baillon) berumur 2 tahun. Tanaman diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat (BPTO) Tawangmangu, Jl. Lawu Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Bahan Kalus

Kalus yang digunakan untuk perlakuan dalam penelitian adalah kalus dengan berat basah antara 0,7-1,0 gram.

3. Bahan Elisitor

Bahan elisitor yang digunakan dalam penelitian ini 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.

4. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini meliputi:

- a. Bahan kimia untuk sterilisasi eksplan, yaitu: deterjen cair, aquades steril, agrept (anti bakteri) 5%, dithane (anti fungi) 5%, dan etanol 70%.
- b. Bahan kimia untuk pembuatan media, yaitu:

- 1) Media inisiasi kalus

Bahan yang digunakan untuk membuat satu liter media inisiasi kalus adalah: komposisi bahan kimia yang terdapat dalam media MS (Lampiran 4), 7,5 gram bahan pematat (agar), 2 mg kinetin, 2 mg NAA, KOH 1 N, HCl 1 N, dan aquades.

- 2) Media perlakuan

Bahan yang digunakan untuk membuat satu liter media perlakuan adalah seperti yang digunakan dalam pembuatan media inisiasi kalus. Media perlakuan sedikit berbeda dengan media inisiasi kalus, yaitu tanpa menggunakan KNO_3 , KH_2PO_4 dikurangi menjadi 100 mg/L, tidak menggunakan NAA, dan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan adalah kinetin 5 mg/L (Aryati *et al.*, 2005).

- 3) Media kultur cendawan *Pythium* sp.

- a) Media agar

Bahan yang digunakan untuk membuat satu liter media agar adalah: 39 gram *Potato Dextrosa Agar* dan aquades.

b) Media cair (*broth*)

Bahan yang digunakan untuk membuat satu liter media cair *Potato Dextrose Broth* (PDB) cendawan *Pythium* sp. adalah: 250 g kentang putih, 20 g dextrose, dan 1L aquades (Burgess *et al.*, 1994).

c. Analisis kandungan reserpin

Bahan yang digunakan untuk analisis kandungan reserpin adalah: etanol p.a. (*ethanol pure analysis*), akuabides ($\text{DDH}_2\text{O}/\text{double distilled water}$), asam sulfamat 0,5%, sodium nitrit 0,3%, dan senyawa reserpin murni.

5. Alat

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.

a. Sterilisasi bahan dan alat

Untuk sterilisasi bahan dan alat digunakan autoklaf yang telah diatur pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm.

b. Pembuatan media

1) Media inisiasi kalus dan media perlakuan

Alat-alat yang digunakan adalah: 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.

2) Media kultur cendawan *Pythium* sp.

Alat-alat yang digunakan adalah: gelas beker, *hot plate*, *magnetic stirrer*, spatula, timbangan digital, pipet volume, *pipette pump*, erlenmeyer, tabung reaksi, rak tabung reaksi, dan kapas penutup.

c. Penghitungan spora cendawan *Pythium* sp.

Alat-alat yang digunakan adalah: hemasitometer, mikroskop, pipet tetes, dan jarum inokulum.

d. Persiapan bahan elisitor

Alat-alat yang digunakan adalah: erlenmeyer, pipet volume, *pipette pump*, *shaker*, kertas Whatmann No. 1, autoklaf, oven, kapas, *mortar*, *pestle*, aluminium foil, dan cawan petri.

e. Penanaman eksplan

Alat-alat yang digunakan adalah: skalpel, gunting *dissecting kit*, pinset, *bunsen buchner*, cawan petri, botol kultur, dan *laminar air flow cabinet*.

f. Elisitasi

Alat-alat yang digunakan adalah: *sprit* volume 1 ml, *bunsen buchner*, aluminium foil, karet gelang, dan *laminar air flow cabinet*.

g. Analisis kandungan reserpin

Alat-alat yang digunakan adalah: *mortar*, *pestle*, timbangan digital, aluminium foil, cawan petri, oven, tabung reaksi, *water bath*, pipet volume, *pipette pump*, pipet tetes, vortek, *filter glass*, kertas Whatmann No. 42, dan seperangkat alat spektrofotometer *UV-visible* (*Shimadzu UV-1601-IPC*).

C. 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: 0,0/kontrol; 0,5; 1,0; 1,5; dan 2,0 mg BK/ml (miligram berat kering miselium per mililiter aquades steril). Faktor kedua adalah lama elisitasi, yaitu: 0, 18, 36, dan 72 jam. Tiap perlakuan dengan tiga ulangan. Rancangan Percobaan dapat diamati pada Tabel 1 berikut:

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

D. Cara Kerja

Penelitian ini dilaksanakan dalam enam tahap, meliputi: (1) persiapan, (2) inisiasi kalus, (3) persiapan bahan elisitor, (4) penanaman kalus pada media perlakuan, (5) perlakuan (elisitasi), (6) pengamatan dan pengujian hasil.

1. Persiapan

a. Sterilisasi alat

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

(Dodds dan Roberts, 1995).

b. Pembuatan media

1) Media inisiasi kalus

- a) Larutan stok dibuat dari bahan-bahan, yaitu: makronutrien, mikronutrien, vitamin, dan asam amino seperti yang terdapat dalam komposisi media MS pada Lampiran 4.
- b) Sukrosa sebanyak 30 gram dimasukkan ke dalam gelas beker volume satu liter yang telah diisi 500 ml aquades dan diberi *magnetic stirrer*.
- c) Gelas beker tersebut diletakkan di atas *hot plate*.

- d) *Hot plate* dinyalakan dan *moting magnetic stirrer* diatur agar bahan-bahan yang dimasukkan larut sempurna.
- e) Larutan makronutrien, mikronutrien, vitamin, dan asam amino (volume sesuai dengan media MS pada Lampiran 4) dimasukkan satu per satu ke dalam gelas beker.
- f) Aquades ditambahkan hingga mencapai volume 800 ml.
- g) Derajat keasaman (pH) larutan diukur menggunakan kertas lakmus dan ditetapkan pada 5,75. KOH 1 N ditambahkan pada larutan, jika pH terlalu rendah atau ditambahkan HCl 1 N, jika pH terlalu tinggi.
- h) Aquades ditambahkan hingga volume larutan mencapai satu liter.
- i) NAA dan kinetin (masing-masing 2 mg) dan serbuk agar sebanyak 7,5 gram ditambahkan ke dalam larutan.
- j) Larutan dipanaskan di atas *hot plate* dengan mengatur temperatur pada 100°C. Larutan yang telah mendidih dituang ke dalam botol kultur sebanyak 1/5 bagian dari volume botol (kurang lebih 20 ml).
- k) 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.
- l) 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).

2) Media perlakuan

Butir-butir dalam pembuatan media inisiasi kalus diulangi, akan tetapi untuk butir i) tidak dilakukan dan diganti dengan melakukan penambahan kinetin sebanyak 5 mg (Ramawat, 1999d).

3) Media kultur cendawan *Pythium* sp.

a) Media agar

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

b) Media cair

- i. Kentang putih sebanyak 250 gram direbus dengan aquades sebanyak 500 ml hingga mendidih
- ii. Air hasil rebusan didiamkan hingga dingin, disaring dan dimasukkan ke dalam gelas beker
- iii. Dextrose sebanyak 20 gram ditambahkan ke dalam gelas beker

- iv. Aquades ditambahkan hingga volume mencapai 1 L
- v. Larutan dipanaskan di atas *hot plate*, kemudian dituang ke dalam erlenmeyer masing-masing sebanyak 150 ml (Burgess *et al.*, 1994).

2. Inisiasi Kalus

a. Sterilisasi eksplan

- 1) Daun *R. verticillata* dicuci bersih dengan deterjen cair dalam air mengalir.
- 2) Daun dipotong menjadi dua bagian menggunakan gunting *dissecting kit*, kemudian direndam dalam dithane 5% selama lima menit
- 3) Daun dibilas dengan aquades steril sebanyak dua kali masing-masing selama lima menit.
- 4) Daun direndam dalam agrept 5% selama lima menit, kemudian dibilas dengan aquades steril sebanyak dua kali masing-masing selama lima menit
- 5) Daun direndam dalam etanol 70% selama 0,5 menit, kemudian dibilas dengan aquades steril sebanyak dua kali masing-masing lima menit.

b. Penanaman eksplan

Eksplan yang telah disterilisasi ditanam di 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:

- 1) Cawan petri yang berisi daun *R. verticillata* dilewatkan di atas api *bunsen*, dibuka tutupnya, kemudian potongan daun diambil menggunakan pinset.
- 2) Eksplan daun diletakkan dalam cawan petri steril, kemudian dipotong dengan ukuran 2x2 cm menggunakan skalpel/gunting *dissecting kit*.

- 3) Potongan daun ditanam pada media inisiasi dengan bekas potongan dimasukkan ke dalam media.

3. Persiapan Bahan Elisitor

Persiapan bahan elisitor meliputi langkah-langkah sebagai berikut :

- a) 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 aquades steril. Spora diambil dengan jumlah sekitar 6×10^5 spora/ml. Spora sebanyak 3 ml diinokulasikan ke dalam 150 ml medium PDB, sehingga kepadatannya adalah $1,2 \times 10^4$ spora/ml. Cara penghitungan spora *Pythium* sp. dapat dilihat pada Lampiran 5.
- b) Suspensi spora dalam PDB dikocok menggunakan *shaker* pada kecepatan 150 rpm pada suhu kamar dengan intensitas cahaya rendah selama 6 hari.
- c) Miselium yang berumur 6 hari disaring menggunakan kertas Whatmann No. 1 secara aseptik di dalam *laminar airflow cabinet*, kemudian dipindahkan ke dalam 100 ml aquades steril dalam erlenmeyer, selanjutnya disterilkan dengan autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm.
- d) Setelah dingin, miselium disaring menggunakan kertas Whatmann No. 1, kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri steril.
- e) Miselium dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C hingga beratnya konstan.
- f) Dalam kondisi aseptik, miselium digerus hingga berbentuk serbuk menggunakan *mortar* dan *pestle*.

g) Serbuk miselium dibuat homogenat dalam aquades 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 aquades (Eilert *et al.* dalam Fitriani *et al.*, 1999; Roos *et al.* dalam Sitinjak *et al.*, 2000).

4. Penanaman Kalus pada Media Perlakuan

Kalus yang telah 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.

5. 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 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 aquades steril dengan volume sama. Perlakuan dan kontrol dilakukan dalam tiga ulangan. Variasi konsentrasi elisitor adalah: 0,0/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, maka 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, 1999).

6. Pengamatan dan Pengujian Hasil

a. Pengamatan pertumbuhan kalus

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

b) Analisis kandungan reserpin

- 1) Kalus dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C hingga beratnya konstan, selanjutnya digerus menggunakan *mortar* dan *pestle* hingga halus.
- 2) Sepuluh miligram serbuk kalus dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah dengan 1 ml pelarut etanol p.a kemudian divortek. Selanjutnya, ditambah dengan aquabides hingga volumenya mencapai 10 ml.
- 3) Larutan disaring dan ditambah dengan sodium nitrit 0,3% sebanyak 1 ml kemudian divortex.
- 4) Larutan dimasukkan ke dalam *water bath* bersuhu 55°C selama 30 menit.
- 5) Larutan didinginkan dan ditambah dengan asam sulfamat 0,5% sebanyak 0,5 ml, kemudian divortex agar larutan homogen.
- 6) Nilai absorbansi dan kandungan reserpin diukur dengan spektrofotometer *UV-visible* (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).

c) Penghitungan kandungan reserpin

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

$\text{Kandungan reserpin: } \frac{\text{kandungan reserpin sampel preparasi (mg/ml) x volume etanol (ml)}}{\text{berat kalus yang digunakan (g)}}$

(Wardani, 2003)

E. 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.

F. Analisis Data

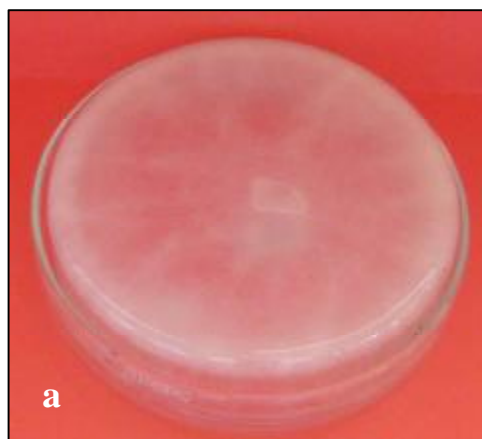
Data yang diperoleh berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif berupa morfologi kalus, meliputi warna dan tekstur kalus, disajikan secara deskriptif. Data kuantitatif berupa berat kering kalus dan kandungan reserpin, dianalisis secara statistik dengan *General Linear Model (GLM Univariat)*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

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

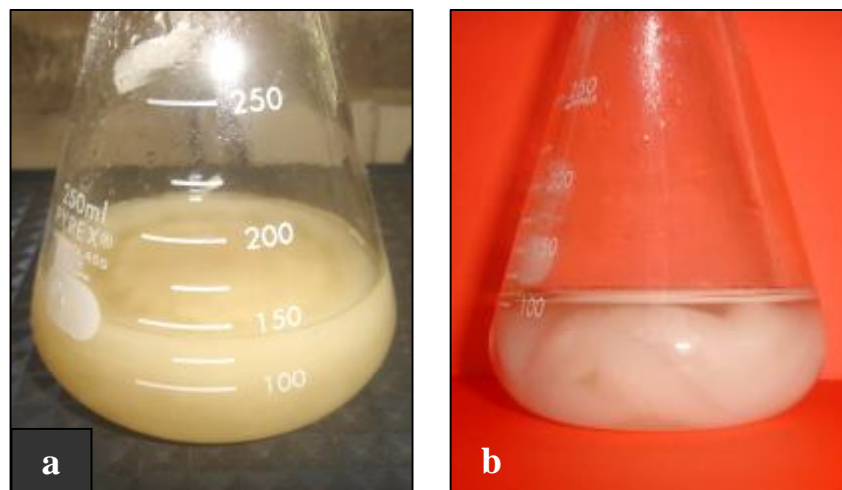
Tanaman pule pandak (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon) diketahui mengandung reserpin yang bermanfaat dalam pengobatan, yaitu sebagai anti hipertensi. Penelitian ini dilakukan untuk meningkatkan kandungan reserpin *R. verticillata* secara *in vitro* dengan teknik elisitasi. Elisitor yang digunakan 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 yang berumur 14 hari pada PDA miring diambil sporanya dengan cara mensuspensikan ke dalam aquades steril. Menurut Domsch *et al.* (1980), cendawan *Pythium* sp. mulai membentuk spora setelah berumur enam hari dan dipacu dengan memindahkannya ke dalam media berupa air. Morfologi cendawan *Pythium* sp. dalam PDA cawan dapat diamati pada Gambar 5 berikut:



Gambar 5. Morfologi cendawan *Pythium* sp. berumur 6 hari dalam PDA cawan

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 6). Menurut Paxton dalam Mukarlina dkk. (2001), cendawan *Pythium* sp. yang dikulturkan dalam medium cair mencapai pertumbuhan maksimum pada hari ke enam. Pada saat itu 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.



Gambar 6. Morfologi miselium cendawan *Pythium* sp. berumur 6 hari: miselium pada PDB (a), miselium yang telah disterilkan (b).

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 7.



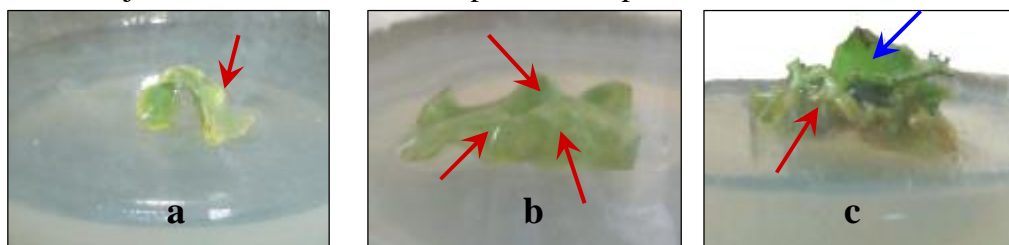
Gambar 7. Serbuk miselium cendawan *Pythium* sp.

A. 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, merupakan daun ke dua dari pucuk tanaman. Penggunaan daun yang masih muda sangat baik sebagai eksplan, karena sel-selnya masih bersifat meristematis, aktif melakukan pembelahan (Armini dalam Aryati dkk., 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 dkk., 2005; Dodds dan Roberts, 1995). Pemberian auksin dan sitokinin dalam jumlah yang seimbang dalam media kultur *in vitro* akan memacu terbentuknya kalus dari eksplan yang digunakan (George dan Sherington dalam Wattimena, 1992; Aryati dkk., 2005).

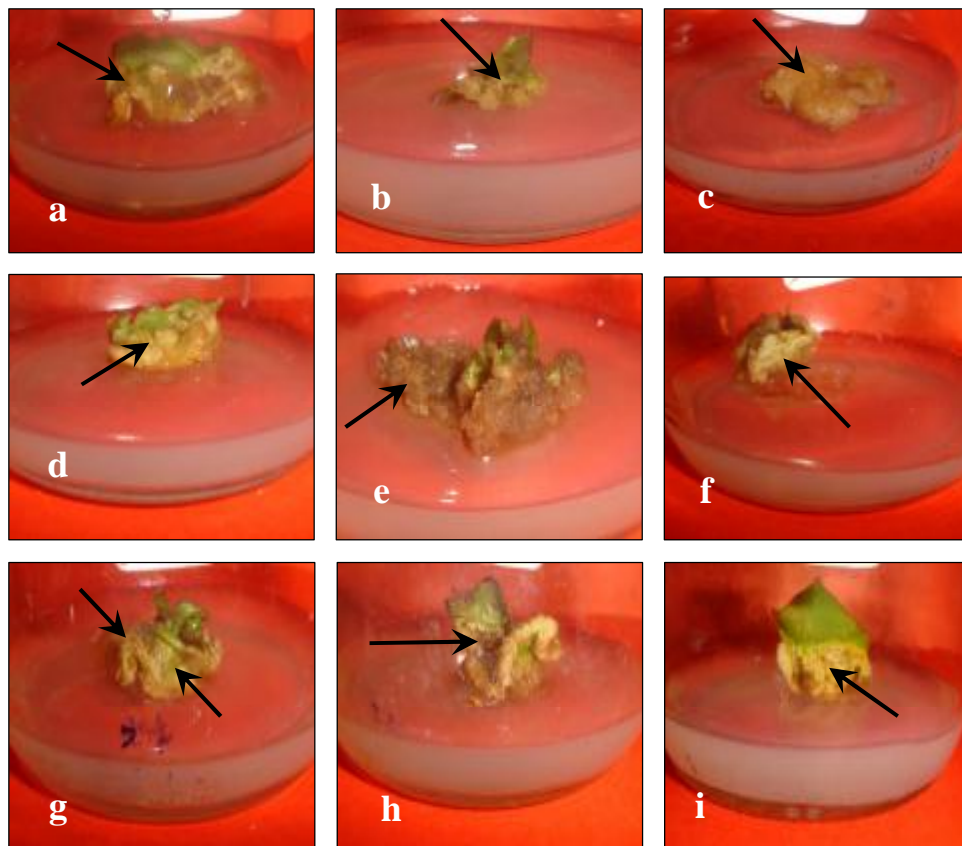
Eksplan daun *R. verticillata* pada media inisiasi mulai menunjukkan pertumbuhan kalus pada hari ke tujuh setelah penanaman. Awal pembentukan kalus ditandai dengan mulai berubahnya warna eksplan, yaitu dari hijau menjadi hijau keputihan dan agak mengkilat. Eksplan juga mengalami pembengkakan, terutama 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* yang berumur tujuh hari, 14 hari, dan 21 dapat diamati pada Gambar 8 berikut:



Gambar 8. Morfologi kalus *R. verticillata* berumur tujuh hari (a), 14 hari (b), dan 21 hari (c) pada media inisiasi (tanda panah merah menunjukkan bagian eksplan yang mengalami pembengkakan, tanda panah biru menunjukkan sisa daun).

Berdasarkan Gambar 8, dapat diamati bahwa pada hari ke tujuh 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 inisiasi dapat diamati pada Gambar 9 dan Tabel 2 berikut ini:



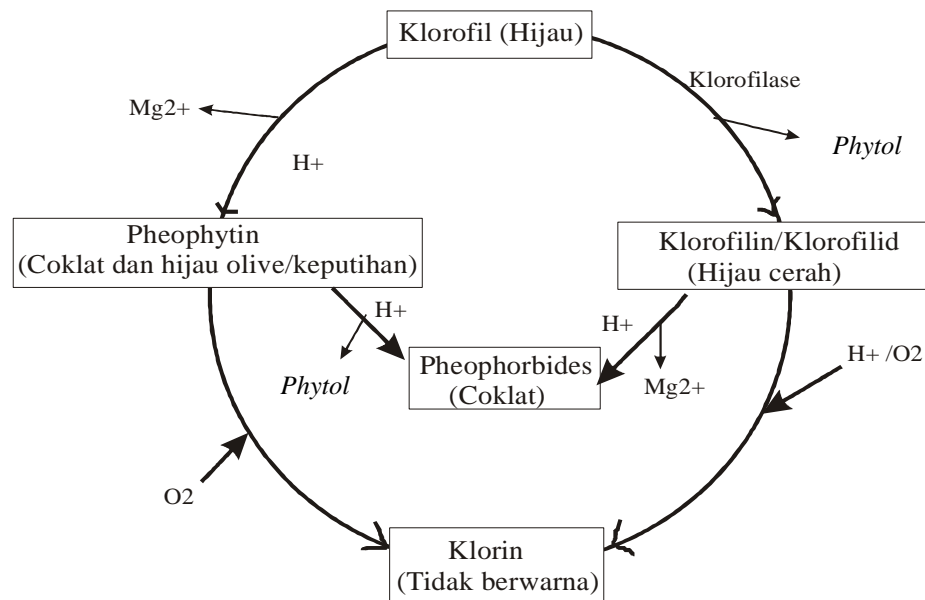
Gambar 9. Morfologi kalus *R. verticillata* berumur 30 hari pada media inisiasi: tekstur kompak, warna kalus bermacam-macam (ditunjukkan dengan tanda panah), yaitu: putih kecoklatan (a), putih kehijauan (b), coklat muda (c), putih kekuningan (d), coklat (e), putih (f), hijau kekuningan-coklat (g), kuning kecoklatan (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	Coklat	Putih kecoklatan	Putih
3	Kompak	Coklat muda	Putih kecoklatan	Putih kehijauan
4	Kompak	Coklat muda	Putih kecoklatan	Putih kehijauan
5	Kompak	Putih kekuningan	Putih kecoklatan	Putih
6	Kompak	Putih kehijauan	Hijau kekuningan- coklat	Coklat
7	Kompak	Putih kehijauan	Kuning kecoklatan	Putih kehijauan
8	Kompak	Putih kekuningan	Putih kecoklatan	Hijau
9	Kompak	Coklat muda	Kuning	Putih kehijauan
10	Kompak	Putih kekuningan	Putih kecoklatan	Kuning kecoklatan
11	Kompak	Putih	Putih kecoklatan	Kuning
12	Kompak	Coklat muda	Putih kecoklatan	Putih kehijauan
13	Kompak	Putih kekuningan	Putih kecoklatan	Putih kehijauan
14	Kompak	Putih kecoklatan	Putih kecoklatan	Putih kehijauan
15	Kompak	Kuning	Putih kecoklatan	Putih kehijauan
16	Kompak	Coklat	Putih	Kuning kecoklatan
17	Kompak	Hijau kekuningan- coklat	Coklat muda	Kuning kecoklatan
18	Kompak	Kuning kecoklatan	Putih kekuningan	Putih kekuningan
19	Kompak	Putih kekuningan	Putih kehijauan	Kuning kecoklatan
20	Kompak	Coklat muda	Putih kehijauan	Kuning kecoklatan

Tekstur kalus *R. verticillata* yang diperoleh pada media inisiasi 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 kecoklatan, putih kehijauan, coklat muda, putih kekuningan, putih, hijau kekuningan-coklat, kuning kecoklatan, kuning, dan coklat. Giuliano *et al.* dalam Santoso dan Nursandi (2004) mengungkapkan bahwa apabila kalus yang terbentuk dari eksplan yang berwarna hijau adalah putih atau keputihan, dan/atau coklat 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 coklat) dan

klorin (tidak berwarna). Proses fotooksidasi juga menyebabkan degradasi klorofil, karena pada proses ini ion Mg^{2+} hilang dan membentuk *pheophytin* yang berwarna coklat dan hijau olive (keputihan). Proses degradasi klorofil dapat diamati pada Gambar 10 berikut:



Gambar 10. Lintasan proses degradasi klorofil (Santoso dan Nursandi, 2004).

Kalus yang berwarna coklat selain disebabkan oleh degradasi klorofil juga disebabkan mekanisme pertahanan diri akibat perlukaan pada jaringan atau sel eksplan. Luka tersebut bisa 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 akan diproduksi maksimal setelah 4-6 jam. Menurut Fitriani dkk. (1999) dan Whitmer *et al.* (1998), pencoklatan kalus juga diakibatkan 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 pencoklatan terjadi melalui reaksi enzimatis. Enzim yang berperan adalah polifenol oksidase, merupakan enzim kompleks yang anggotanya adalah: fenol hidroksilase, kresolase, dan katekolase. Warna coklat pada kalus juga bisa 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); Santoso dan Nursandi (2004), peristiwa pencoklatan 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 kadang-kadang dapat diatasi 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 dkk., 2005). Pemberian sitokinin memberikan dua efek utama, yaitu: memacu perkembangan etioplas menjadi kloroplas (khususnya dengan mendorong pembentukan grana) dan meningkatkan laju pembentukan klorofil. Sitokinin 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).

B. 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; 0,5; 1,0; 1,5; dan 2,0 mg BK/ml serta lama elisitasi 0, 18, 36, dan 72 jam.

1. 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 terus menerus (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 pencoklatan seiring dengan peningkatan konsentrasi

elisitor dan lama elisitasi. Menurut Sitinjak dkk. (2000), kalus yang dielisitasi berwarna lebih gelap (coklat/kekuning-kuningan) bila dibandingkan kontrol. Hal ini diduga sebagai respon hipersensitif yang ditunjukkan jaringan akibat adanya cekaman. Menurut Wojtaszek (1997), respon hipersensitif merupakan mekanisme yang baik untuk membatasi penyebaran patogen. Respon hipersensitif ini berupa mekanisme mematikan sel yang terinfeksi patogen (dalam hal ini adalah elisitor) agar tidak menyebar ke sel-sel yang lain. Morfologi kalus *R. verticillata* sebelum dan sesudah dielisitasi dapat diamati pada Lampiran 6.

Kalus yang dielisitasi dengan cendawan *Pythium* sp. menunjukkan respon pada warna dan pertumbuhan. Menurut Isaac dalam Fitriani dkk (1999), kalus yang dielisitasi mengalami pencoklatan dan hambatan pertumbuhan. Munculnya warna coklat pada kalus diduga karena terjadi sintesis senyawa fenolik akibat luka yang ditimbulkan oleh elisitor. Menurut Vickery dan Vickery dalam Fitriani dkk. (1999); Santoso dan Nursandi (2004), kondisi cekaman yang disebabkan oleh perlukaan 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 (memar, pemotongan, serangan penyakit atau kondisi abnormal lainnya) yang menyebabkan cekaman pada jaringan. Pada penelitian ini, kalus dielisitasi dengan cendawan *Pythium* sp. Elisitor dikenal sebagai zat asing oleh kalus dan mengakibatkan cekaman. Adanya cekaman berupa elisitor inilah yang diduga menyebabkan perubahan warna kalus.

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

Perlakuan	Tekstur kalus (awal-akhir)	Warna kalus					
		Awal			Akhir		
		1	2	3	1	2	3
K0L0	Kompak	Putih kekuningan	Putih kehijauan	Putih	Putih kekuningan	Putih kehijauan	Putih
K1L0	Kompak	Coklat	Putih kecoklatan	Putih	Coklat	Putih kecoklatan	Putih kecoklatan
K2L0	Kompak	Coklat muda	Putih kecoklatan	Putih kehijauan	Coklat	Putih kecoklatan	Putih kehijauan
K3L0	Kompak	Coklat muda	Putih kecoklatan	Putih kehijauan	Coklat	Coklat muda	Coklat muda
K4L0	Kompak	Putih kekuningan	Putih kecoklatan	Putih	Putih kecoklatan	Putih kecoklatan	Coklat muda
K0L1	Kompak	Putih kehijauan	Hijau kekuningan- coklat	Coklat	Coklat muda	Coklat, hijau	Coklat
K1L1	Kompak	Putih kehijauan	Kuning kecoklatan	Putih kehijauan	Coklat	Coklat muda	Putih kehijauan
K2L1	Kompak	Putih kekuningan	Putih kecoklatan	Hijau	Coklat	Coklat	Hijau, coklat
K3L1	Kompak	Coklat muda	Kuning	Putih kehijauan	Coklat	Coklat muda	Coklat muda
K4L1	Kompak	Putih kekuningan	Putih kecoklatan	Kuning kecoklatan	Coklat	Coklat	Coklat
K0L2	Kompak	Putih	Putih kecoklatan	Kuning	Coklat	Putih kecoklatan	Coklat muda
K1L2	Kompak	Coklat muda	Putih kecoklatan	Putih kehijauan	Coklat	Coklat	Coklat muda
K2L2	Kompak	Putih kekuningan	Putih kecoklatan	Putih kehijauan	Putih kecoklatan	Putih kecoklatan	Coklat muda
K3L2	Kompak	Putih kecoklatan	Putih kecoklatan	Putih kehijauan	Coklat	Coklat	Coklat muda
K4L2	Kompak	Kuning	Putih kecoklatan	Putih kehijauan	Coklat	Coklat	Coklat muda
K0L3	Kompak	Coklat	Putih	Kuning kecoklatan	Coklat	Coklat muda	Kuning kecoklatan
K1L3	Kompak	Hijau kekuningan- coklat	Coklat muda	Kuning kecoklatan	Coklat muda	Coklat	Coklat
K2L3	Kompak	Kuning kecoklatan	Putih kekuningan	Putih kekuningan	Coklat	Coklat muda	Coklat
K3L3	Kompak	Putih kekuningan	Putih kehijauan	Kuning kecoklatan	Coklat	Coklat	Coklat
K4L3	Kompak	Coklat muda	Putih kehijauan	Kuning kecoklatan	Coklat	Coklat	Coklat

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

2. Berat kering kalus *R. verticillata*

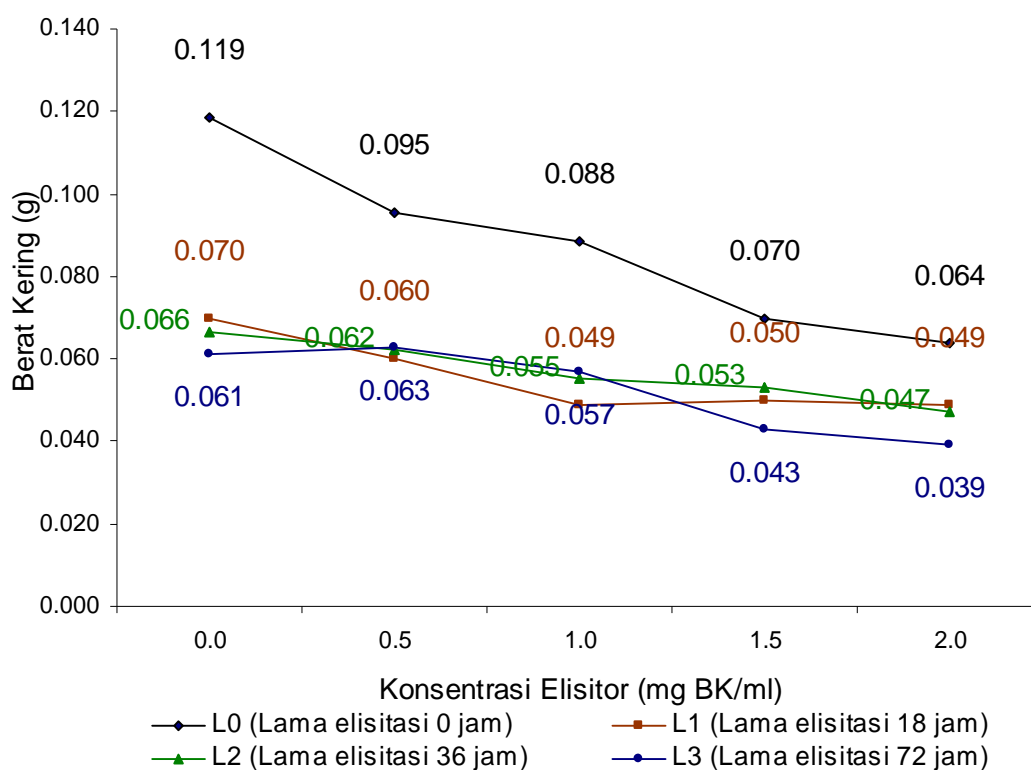
Elisitasi berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus. Pertumbuhan kalus dapat diamati dengan cara melakukan pengukuran berat kering, karena bahan kering dianggap sebagai manifestasi semua proses dan peristiwa yang terjadi dalam pertumbuhan tanaman (Sitompul dan Guritno, 1995). Berat kering diperoleh melalui 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 sifat senyawa alkaloid mudah mengalami dekomposisi terutama oleh panas (Sastrohamidjojo, 1996).

Hasil analisis statistik dengan *General Linear Model Univariat/GLM Univariat* (Lampiran 7) menunjukkan bahwa pemberian elisitor dan lama waktu elisitasi berpengaruh secara signifikan terhadap rata-rata berat kering kalus, tetapi interaksi keduanya tidak memberikan pengaruh yang signifikan. Artinya, masing-masing faktor perlakuan dapat bertindak sebagai faktor tunggal. Data rata-rata berat kering kalus *R. verticillata* setelah dielisitasi dengan cendawan *Pythium* sp tersaji pada Tabel 4 berikut ini:

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

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

Angka dalam baris maupun kolom yang diikuti oleh huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf kepercayaan 95%.

Gambar 11. Rata-rata berat kering kalus *R. verticillata* pada berbagai konsentrasi elisitor dan lama elisitasi.

Konsentrasi elisitor dan lama elisitasi menyebabkan rata-rata berat kering kalus menjadi rendah (Gambar 11). 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.

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 kemungkinan mengalami kematian, sehingga berat kering kalus menjadi rendah. Berdasarkan Tabel 4 juga diketahui bahwa pada pemanenan kalus jam ke-36 beberapa kalus mengalami peningkatan berat kering. Hal ini dimungkinkan 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 karbondioksida, sedangkan respirasi menyebabkan penurunan berat kering karena pengeluaran karbondioksida (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 yang 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); 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.

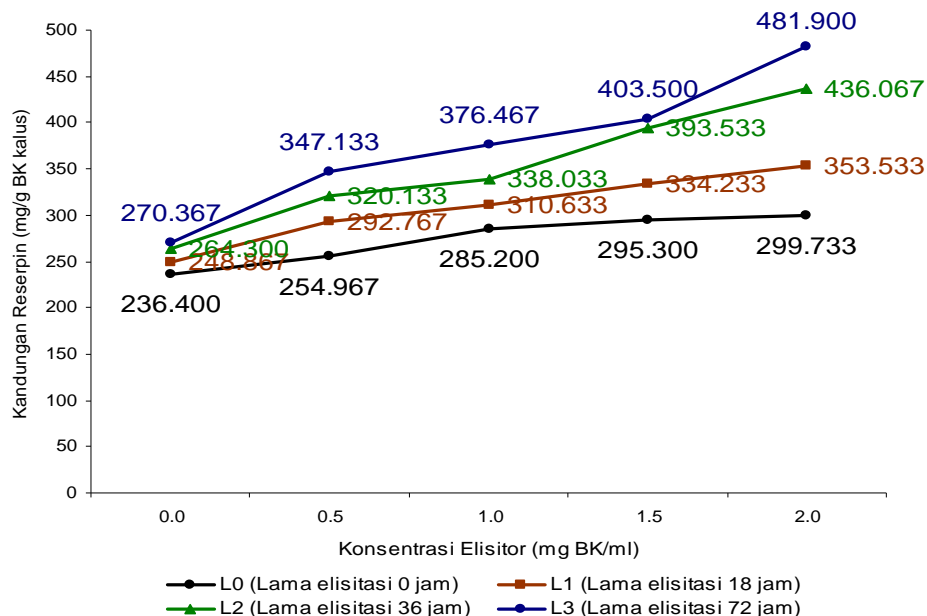
C. Analisis Kandungan Reserpin pada Kalus *R. verticillata*

Hasil analisis statistik dengan *General Linear Model Univariat/GLM Univariat* (Lampiran 8) 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.

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

Konsentrasi elisitor (mgBK/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

Angka dalam baris maupun kolom yang diikuti oleh huruf yang sama, maka tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf kepercayaan 95%.



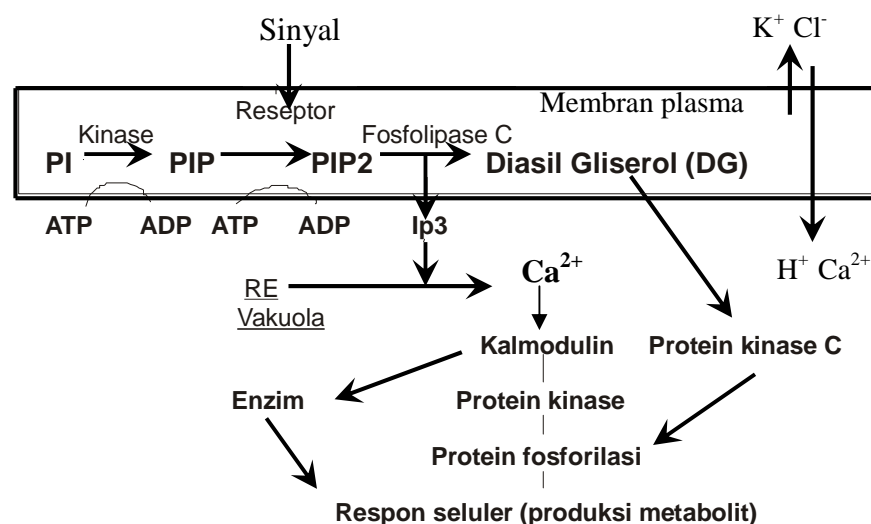
Gambar 12. Rata-rata kandungan reserpin kalus *R. verticillata* pada berbagai konsentrasi elisitor dan lama elisitasi.

Konsentrasi elisitor dan lama elisitasi berperan dalam meningkatkan rata-rata kandungan reserpin kalus *R. verticillata* (Gambar 12). Rata-rata kandungan reserpin kalus meningkat seiring dengan penambahan konsentrasi elisitor cendawan *Pythium* sp. Peningkatan kandungan reserpin juga 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).

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

Menurut Sitinjak dkk. (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 13). 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 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 (seperti penjelasan di atas) untuk meningkatkan aktivitas enzim yang berperan dalam produksi reserpin.



Gambar 13. Mekanisme penghantaran sinyal ekstraseluler pada membran plasma (Srivastava dan Gupta, 1996).

Menurut Endt *et al.* (2002), pengaturan jalur biosintesis metabolit sekunder dilakukan oleh faktor transkripsi spesifik. Faktor transkripsi ini berupa sekuen *DNA-binding protein* yang mengatur inisiasi mRNA dan yang berhubungan dengan daerah promotor gen target. Protein tersebut mengatur transkripsi gen berdasarkan tipe jaringan dan/atau dalam hal respon terhadap sinyal internal (hormon tanaman), dan sinyal eksternal (elisitor biotik atau sinar UV). Promotor yang terlibat dalam ekspresi gen yang responsif terhadap elisitor telah diidentifikasi pada gen yang menyandikan *strictosidine synthase* dalam biosintesis Alkaloid Indol Terpenoid. Promotor pada gen *strictosidine synthase* memiliki daerah yang disebut dengan *JERE* (*Jasmonate and Elicitor-Responsive Element*). 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 *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 dkk. (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 dkk. (1999) penambahan elisitor meningkatkan transkripsi mRNA untuk 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 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 dan uraian pembahasan di atas 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.

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Kandungan reserpin pada kultur kalus pule pandak (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon) meningkat setelah dielisitasi dengan cendawan *Pythium* sp.
2. Konsentrasi elisitor dan waktu panen yang optimum untuk menghasilkan kandungan reserpin tertinggi pada kultur kalus pule pandak (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon) 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).

B. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh elisitor cendawan *Pythium* sp. dengan variasi konsentrasi elisitor dan lama elisitasi yang berbeda, sehingga diperoleh konsentrasi elisitor dan waktu panen optimum untuk mendapatkan kandungan reserpin tertinggi pada kultur kalus pule pandak (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon).
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh konsentrasi elisitor cendawan *Pythium* sp. terhadap kandungan reserpin pule pandak (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon) melalui teknik kultur *in vitro* lainnya, misalnya dengan kultur rambut akar atau kultur suspensi sel.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai peningkatan kandungan reserpin tanaman pule pandak (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon) secara *in*

vitro melalui teknik elisitasi dengan elisitor biotik lainnya, misalnya *Saccharomyces* sp., *Phytophthora* sp., dan *Fusarium* sp.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, M.A., Marziah, M., and Arif, A.B. 1998. "Establishment of Cell Suspension Cultures of *M. elliptica* for The Production of Anthraquinones". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 54: 173-182.
- Achmad, S.A., Hakim, E.H., Juliawaty, L.D., Kusuma, S., Makmur, L., dan Syah, Y.M. 1995. "Eksplorasi Kimia Tumbuhan Hutan Tropis Indonesia: Beberapa Data Mikromolekuler Tumbuhan Lauraceae sebagai Komplemen Etnobotani" dalam *Prosiding dan Lokakarya Nasional Etnobotani II Buku I Tumbuhan Obat*. Jakarta: Ikatan Pustakawan Indonesia (IPI). Hal: 8-12.
- Agrawal, S.C. and Prasad, K.V.V. 1997. *Diseases of Lentil*. New Hampshire: Science Publisher, Inc.
- Alaoui-Sosse, B., Genet, P., Vinit-Dunad., Marie-Laure, T., Epron, D., and Piere-Marie, B. 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, Esyanti, R.R., dan Siregar, A.H. 2003. "Pengaruh Pemberian Elisitor Jamur *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. terhadap Kandungan Ajmalisin pada Kultur Kalus Berakar *Catharanthus roseus* (L.) G. Don" dalam *Berita Biologi* 6 (4): 543-547.
- Aryati, H., Anggarwulan, E., dan 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.
- Backer, C.A and van Den Brink, R.C.B. 1965. *Flora of Java (Spermatophytes only)*. Netherland: Groningen-NVP Noordhoff.
- Bagian Farmakologi FK UI. 1995. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 4. Jakarta: Gaya Baru
- Balfas, R., Supriadi, Karyani, N., dan Sugandi, E. 2000. "Serangan *Mimegralla coeruleifrons* Macquart pada Tanaman Jahe dan Peranannya dalam Membawa Patogen Penyakit Layu". *Jurnal Littri*. 5 (4): 123-127.
- Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, KP., and Backhouse, D. 1994. *Laboratory Manual for Fusarium Research* (3rd Edition). Sydney.
- Carlie, M.J and Watkinson, S.C. 1994. *The Fungi*. London: Academic Press.
- Cook, A.A. 1981. *Diseases of Tropical and Subtropical Field, Fiber and Oil Plants*. New York: MacMillan Publishing Co. Inc.

- Croteau, R., Kutchan, T.M., and Lewis, W.G. 2000. *Natural Production (Secondary Metabolites)* in Buchanan, B., Gruissem, W., and Jones, R. (Eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. New York: American Society of Plant Physiologists. pp: 1250-1318.
- Dalimoenthe, S.L. 1987. "Kultur Jaringan sebagai Sarana untuk Menghasilkan Metabolit Sekunder" dalam Pramono, S., Gunawan, D., dan Soegihardjo, C.J (Ed.). *Buku Risalah Seminar Nasional Metabolit Sekunder*. Yogyakarta: Pusat Antar Universitas Bioteknologi UGM. Hal: 156-162.
- de Padua, L.S., Bunyapraphtsara, N., and Lemmens, R.H.M.J (Editors). 1999. "Medicinal and Poisonous Plants 1" in *Plant Resources of South-East Asia* 12 (1): 431.
- Depkes RI Dirjen POM. 1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Jakarta: Depkes RI.
- Depkes RI Dirjen POM. 2000. *Informatorium Obat Nasional Indonesia 2000*. Jakarta: Depkes RI.
- Dodds, J.H. and Roberts, L.W. 1995. *Experiments in Plants Tissue Culture* 3rd edition. Cambridge: Cambridge University Press.
- Domsch, K.H., Gams, W., and Anderson, T. 1980. *Compendium of Soil Fungi*. London: Academic Press.
- Endt, D.V., Kijnei, J.W., and Memelink, J. 2002. "Transcription Factor Controlling Plant Secondary Metabolism: What Regulates the Regulator?". *Phytochemistry*. 61: 107-114.
- Ernawati, A. 1992. "Produksi Senyawa-Senyawa Metabolit Sekunder dengan Kultur Jaringan Tanaman" dalam G. A. Wattimena (Ed.) *Bioteknologi Tanaman*. Bogor: Tim Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, PAU Bioteknologi IPB.
- Erwin, D.C. and Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora Diseases World Wide*. Minnesota: APS Press.
- Fitriani, A., Siregar, A.H., dan Esyanti, R.R. 1999. "Pengaruh Pemberian Homogenat *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. terhadap Kandungan Ajmalisin dalam Kultur Kalus Tapak Dara" dalam *Hayati* 6 (3): 65-69.
- Forney, B. 1999. "Reserpine for Veterinary Use". <http://www.wedgewoodpharmacy.com/monographs/reserpine.asp> [8 April 2006].
- Fudholi, A. 2001. "Teknologi dan Formulasi Sediaan Obat Bahan Alam dan Permasalahannya" dalam *Pharmacon*, 2 (1): 25-29.
- Gardner, F.P., Pearce, R.B., dan Mitchell, R.I. 1991. *Fisiologi Tanaman Budidaya* (diterjemahkan oleh Herawati Susilo). Jakarta: UI Press.
- Hadioetomo, R.S. 1990. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*. Jakarta: Gramedia.

- Hendaryono, D.P.S. dan Wijayani, A. 1994. *Teknik Kultur Jaringan Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakan Tanaman secara Vegetatif-Modern*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Hill, A.F. 1996. *Economic Botany*. New Delhi: Tata Mc. Graw-Hill.
- Husni, A. 1997. "Perbanyakan dan Penyimpanan Tanaman Inggu Melalui Kultur Jaringan". *Plasma Nutfah* II (1): 9-13.
- Ignacimuthu, S. 1997. *Plant Biotechnology*. New Hampshire: Science Publisher.
- Indo World. 1997. "Reserpine". <http://www.indo-world.com/reserpine/reserpine.htm> [31 Maret 2006].
- Joko, P.W., Sugiarto, S., Widiyastuti, Y., dan Djumidi. 1995. "Beberapa Tumbuhan Obat Penyusun Jamu Setelah Melahirkan di Desa Pengasih Kulonprogo" dalam *Prosiding dan Lokakarya Nasional Etnobotani II Buku I Tumbuhan Obat*. Jakarta: Ikatan Pustakawan Indonesia (IPI). Hal: 196-200.
- Kurz, W.G.W dan Constabel, F. 1991. "Produksi dan Isolasi Metabolit Sekunder". dalam Wetter, L. R. dan Constabel, F. *Metode Kultur Jaringan Tanaman*. Edisi kedua (diterjemahkan oleh Mathilda). Bandung: Penerbit ITB.
- Kutchan, T.M. 1995. "Alkaloid Biosynthesis-The Basic for Metabolic Engineering of Medicinal Plants". *Plant Cell*. 7 (7): 1059-1070.
- Leon, J., Rojo, E., and Sanchez-Serrano, J.J. 2001. "Wound Signalling in Plants". *Journal of Experimental Botany*. 52 (354): 1-9.
- Lestari, E.G dan Mariska, I. 1997. "Kultur *in vitro* sebagai Metode Pelestarian Tumbuhan Obat Langka" dalam *Buletin Plasma Nutfah* II (1): 1-8.
- LIPI. 1999. *Koleksi Tumbuhan Obat Kebun Raya Bogor* 5 (3) (Penyunting: Julisasi Trihadiah). Bogor: LIPI.
- Mantell, S.H. and Smith, H. 1983. "Cultural Factor that Influence Secondary Metabolites Accumulation in Plant Cell and Tissue Cultures" in *Plant Biotechnology*. London: Cambridge University. Pp: 75-102
- Mirfat. 2004. "Pengaruh Pemberian Elisitor dari *Verticillium dahliae* dan *Rhizoctonia solani* terhadap Produksi Gosipol pada Agregat Sel *Gossypium hirsutum*". <http://www.digilib.bi.itb.ac.id/go.php?id=jbptitbbi-gdl-s2-2004mir fat-335> [14 Desember 2005].
- Mukarlina, Esyanti, R.R. dan Siregar, A.H. 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.
- Mulabagal, V. and Tsay, H. 2004. "Plant Cell Culture-An Altenative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolite" *Int. J. Appl. Sci. Eng.* 2 (1): 29-48.

- Purnamaningsih, R., Mariska, I., Gati, E., dan Rahayu, S. 1998. "Proliferasi Tunas dan Penekanan Masalah Penguningan Daun sebagai Usaha Pelestarian Tumbuhan Pule" dalam *Plasma Nutfah* III (1): 1-7.
- Radman, R., Saez, T., Bucke, C., and Keshavarz, T. 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". <http://www.digilib.bi.itb.ac.id/go.php?id=jbptitbbi-gdl-s2-2004sucirahayu-328> [14 Desember 2005].
- Ramawat, K.G. and Merillon, J.M. 1999a. "Introduction: Research Need" in *Biotechnology Secondary Metabolites* (Eds. Ramawat, K.G and Merillon, J.M). U.S.A: Sciences Publisher, Inc. pp: 1-10.
- Ramawat, K.G. and Sonie, K.C. 1999b. "Production Under Stress" in *Biotechnology Secondary Metabolites* (Eds. Ramawat, K.G and Merillon, J.M). U.S.A: Sciences Publisher, Inc. pp: 177-187.
- Ramawat, K.G. 1999c. "Secondary Plant Products in Nature" in *Biotechnology Secondary Metabolites* (Eds. Ramawat, K.G and Merillon, J.M) . U.S.A: Sciences Publisher, Inc. pp: 11-37.
- Ramawat, K.G. 1999d. "Production in Culture Optimization" in *Biotechnology Secondary Metabolites* (Eds. Ramawat, K.G and Merillon, J.M) . U.S.A: Sciences Publisher, Inc. pp: 193-218.
- Ratnasari, J. 2001. "Pengaruh Pemberian Elisitor Ekstrak Khamir *Saccharomyces cerevisiae* Hansen terhadap Kandungan Ajlimasin dalam Kultur Agregat Sel *Catharanthus roseus* (L) G. Don." *Berita Biologi* 5 (4).
- Reichling, J. 1999. "Plant-Microbe Interaction and Secondary Metabolites with Antiviral Antibacterial and Antifungal Properties" in *Functions of Plant Secondary Metabolites and Their Exploitation in Biotechnology Annual Plant Reviews* (Ed. Wink, M) 3: 187-257.
- Rijhwani, S.K. and Shanks, J.V. 1998. "Effect of Elicitor Dosage and Exposure Time on Biosynthesis of Indol Alkaloid by *Catharanthus roseus* Hairy Root Cultures". *Biotechnol Prog.* 14: 442-449.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi* (diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata). Bandung: Penerbit ITB.
- Salisbury, F.B. dan Ross, C.W. 1995a. *Fisiologi Tumbuhan*. Jilid 1 (diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata). Bandung: Penerbit ITB.
- Salisbury, F.B. dan Ross, C.W. 1995b. *Fisiologi Tumbuhan*. Jilid 2 (diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata). Bandung: Penerbit ITB.
- Salisbury, F.B. dan Ross, C.W. 1995c. *Fisiologi Tumbuhan*. Jilid 3 (diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata). Bandung: Penerbit ITB.

- Santoso, U dan Nursandi, F. 2004. *Kultur Jaringan Tanaman*. Malang: UMM Press.
- Sastrahidayat, I.R. 1990. *Ilmu Penyakit Tumbuhan*. Surabaya: Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya.
- Sastrohamidjojo, H. 1996. *Sintesis Bahan Alam*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Scragg, A.H. 1997. "The Production of Aromas by Plant Cell Culture". *Adv. In. Biochem. Eng. Biotech.* 55: 259-263.
- Setiawati, T. 2001. "Pengaruh Pemberian Elisitor yang Berasal dari *Verticillium dahliae* terhadap Produksi Gosipol Kultur Kapas (*Gossypium hirsutum*)" dalam Tim ITB (Editor) *Bachelor and Magister Thesis Abstract and Staff Contribution Biology ITB*. Bandung: ITB Press. Hal: 34.
- Sevon, N. and Caldentey, K.M. 2002. "Agrobacterium rhizogenes Mediated Transformation Root Culture As a Source of Alkaloid". *Planta Medica*. 68: 859-950.
- Shanks, J.V., Bhadra, R., Morgan, J., Rijhwani, S., and Vani, S. 1998. "Quantification of Metabolites in the Indol Alkaloid Pathways of *Catharanthus roseus*: Implications for Metabolic Engineering". *Biotechnology and Bioengineering*. 58: 333-338.
- Singh, D.K., Srivastava, B., and Sahu, A. 2004. "Spectrophotometric Determination of *Rauwolfia* Alkaloids: Estimation of Reserpine in Pharmaceuticals". *Analytical Sciences*. 20: 571-573.
- Sitinjak, R. R., Siregar, A. H., dan Rizkita, R. E. 2000. "Pengaruh Pemberian Ekstrak *Saccharomyces cerevisiae* Hansen terhadap Kandungan Gosipol pada Kultur Kalus *Gossypium hirsutum* L." dalam *Berita Biologi* 5 (2): 131-135.
- Sitompul, S.M. dan Guritno, B. 1995. *Analisis Pertumbuhan Tanaman*. Yogyakarta: UGM Press.
- Spollansky, T.C., Pitta-Alvarez, S.I., and Giulietti, A.M. 2000. "Effect of Jasmonic Acid and Aluminium on Production of Tropane Alkaloids in Hairy Root Cultures of *Brugmansia candida*". *Journal of Biotechnology* 3 (1): 72-77.
- Srivastava, P.C. and Gupta, U.C. 1996. *Trace Elements in Crop Production*. New Delhi: Science Publisher Inc.
- St-Pierre, B., Vazquez-Flota, F.A., and De Luca, V. 1999. "Multicellular Compartementation of *Catharanthus roseus* Alkaloid Biosynthesis Predicts Intracellular Translocation of Pathway Intermediate". *Plant Cell*. 11: 887-900.
- Street, H.E. 1973. *Plant Tissue and Cell Culture*. Los Angeles: University of California Press.

- Suryowinoto, M. 2000. *Pemuliaan Tanaman secara in vitro*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. *Plant Physiology*. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc, Publisher.
- Thien An, T. and Ziegler, S. 2001. "Utilization of Medicinal Plants in Bach Ma National Park, Vietnam" in *Medicinal Plant Conversation* 7.
- Thomas, R.C. 1933. "Compositon of Fungus Hyphae III: The Pythiaceae". *Amer. Jour. Bot.* <http://www.amerj.com/pyt/thm> [12 September 2006]
- Thomson. 1998. "Rauvolfia Alkaloids". <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/uspdi/202503.html> [8 April 2006].
- Triharso. 1994. *Dasar-dasar Perlindungan Tanaman*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Walton, N.J., Alfermann, A.W., and Rhodes, M.S.C. 1999. "Production of Secondary Metabolites in Cell and Differentiated Organ Cultures" in Wink, M (Ed.) *Functions of Plant Secondary Metabolites and Their Exploitation in Biotechnology Annual Plant Reviews* 3: 311-335.
- Wardani, D.P. 2003. "Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kultur Kalus *Talinum paniculatum* Gaertn. Pada Variasi Penambahan Asam 2,4-diklorofenoksi Asetat dan Kinetin". *Skripsi*. Surakarta: Jurusan Biologi FMIPA UNS.
- Wattimena, G.A. 1992. *Bioteknologi Tanaman*. Bandung: Penerbit ITB.
- Whitmer, S., Canel, C., Hallard, D., Concalves, C., and Verpoorte, R. 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.
- Zumaidar. 2000. "Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* (L.) Bentham ex. Kurz.)". *Lembaran Prosea (Plant Resources of South-East Asia)*. 2 (14): 85-90.

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillahirrobbil'alamin puji dan syukur ke hadirat Allah SWT atas limpahan kesehatan, rahmat, hidayah, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah skripsi "Kandungan Reserpin Kultur Kalus Pule Pandak (*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon) setelah Dielisitasi dengan Jamur *Pythium* sp". Shalawat dan salam senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW pemberi syafa'at akhir zaman Amin.....

Naskah skripsi ini tidak dapat terselesaikan tanpa bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan rasa terimakasih sedalam-dalamnya kepada:

1. Ayah dan ibu tercinta atas do'a dan dukungan baik moril maupun materiil.
2. Kakak-kakakku tersayang atas do'a dan motivasi yang tiada henti.
3. (Alm.) Prof. Dr. H. Koesnadi Hardjosoemantri, S.H, M.L dan ibu beserta keluarga atas bantuan dan dukungan baik moril maupun materiil. Terima kasih Pak Ageng, semoga Pak Ageng dimudahkan menggapai syurga-Nya Amin.....
4. Drs. H. Marsusi, M.S selaku Dekan FMIPA UNS atas pemberian ijin sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan naskah skripsi ini.
5. Drs. Wiryanto, M.Si selaku Ketua Jurusan Biologi atas wejangan dan pemberian ijin sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi ini.
6. Solichatun, M.Si selaku Pembimbing I atas waktu, perhatian dan bimbingan selama penyusunan proposal, penelitian dan penyusunan naskah skripsi.
7. Ari Susilowati, M.Si selaku Pembimbing Akademik dan Pembimbing II atas bimbingan selama kuliah, juga selama penelitian dan penyusunan skripsi.

8. Dra. Endang Anggarwulan, M.Si dan Shanti Listyawati, M.Si selaku dosen penelaah atas masukan dan nasehat demi kesempurnaan naskah skripsi ini.
9. Arif Wibowo, M.Agr.Sc atas kesediaan menyediakan isolat murni *Pythium* sp juga nasehat-nasehat dan pelajaran yang sangat berharga.
10. Bapak Sutarmin dan staff Balai Penelitian Tanaman Obat (BPTO) atas kesediaan menyediakan tanaman *R. verticillata* dan kerja sama yang baik.
11. Drs. Mudjijono, Ph.D selaku Ketua Lab. Pusat MIPA UNS atas pemberian ijin penggunaan laboratorium beserta fasilitas yang ada.
12. Dr. Prabang Setyono, M.Si dan Dr. Okid Parama Astirin, M.Si selaku Ketua Sub Lab. Biologi Lab. Pusat MIPA UNS atas segala kemudahan dan pemberian ijin penggunaan laboratorium beserta fasilitas yang ada.
13. Kuncoro Adi, S.Si atas motivasi dan bantuannya selama kuliah dan penelitian.
14. Seluruh staf Laboratorium Pusat FMIPA atas kerjasamanya selama penelitian.
15. Sdr. Adenan Suryani dan Sdr. Misbakul Munir selaku laboran Biologi atas pelayanan dan kemudahan dalam pemakaian fasilitas laboratorium.
16. Bapak Agus Purnomo dan Bapak Sri Widodo selaku staf administrasi jurusan Biologi atas pelayanan surat-menyurat yang sangat penting bagi penulis
17. Seluruh dosen di jurusan Biologi atas sumbangan ilmu yang sangat berharga.
18. Muryanti, S. Si, Aminah Sarju Pinilih, S. Si, dan Nunung Nurcahyani, S. Si atas saran dan bantuannya.
19. Herawati Kurnia Angga, Sevi Sawestri, S.Si, dan Sri Hapsari Tyas Rejeki Suryaningrum atas persahabatan yang takkan pernah usai.
20. Irmawati dan Supatmi atas kebersamaannya *in the steril room?*

21. Sahabat-sahabatku angkatan 2002 “TjahBIO02”, terima kasih atas persaudaraan yang menakjubkan, bagiku kelas kita bagaikan sebuah keluarga besar yang sangat membahagiakan.
22. Adik-adik angkatan 2003-2006 lakukan yang terbaik dan jangan pernah menyerah!
23. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, terima kasih atas bantuannya, sekecil atom pun sangat berharga bagi penulis.

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di kabupaten Gunungkidul bertepatan dengan Hari Lingkungan Hidup, tahun 1984. Penulis merupakan bungsu dari empat saudara pasangan Ibu Suminah dan Bapak Adi Sunaryo, seorang ibu rumah tangga dan wiraswastawan.

Riwayat Pendidikan. Penulis mulai menempuh pendidikan formal di TK ABA Siyono Tengah selama 1 tahun, kemudian menempuh pendidikan Sekolah Dasar selama 6 tahun di SD Negeri Siyono I lulus pada tahun 1996. Tahun 1996-1999 penulis menempuh pendidikan di SLTP Negeri I Playen dan pada tahun 2002 menyelesaikan pendidikan di SMU Negeri I Wonosari, Gunungkidul. Pada tahun 2002 penulis diterima di Jurusan Biologi FMIPA UNS melalui jalur Penelusuran Minat dan Kemampuan (PMDK).

Pengalaman Organisasi. Selama menempuh pendidikan tinggi, penulis aktif dalam kepengurusan Himpunan Mahasiswa Biologi (HIMABIO) sebagai Sekretaris Bidang Minat dan Bakat (2002/2003) dan pada kepengurusan selanjutnya menjabat sebagai Ketua Bidang Minat dan Bakat. Penulis juga aktif dalam keanggotaan Kelompok Studi Biodiversitas (2003-2006) serta Kelompok Studi Mutan (Jamur dan Tanaman Obat), tahun 2002-2003. Penulis aktif dalam kepanitiaan dan juga dalam kegiatan seminar nasional baik intern kampus maupun di luar kampus. Selama menempuh pendidikan di Jurusan Biologi, penulis menjadi asisten praktikum beberapa mata kuliah, yaitu Ikhtiologi (2004); Taksonomi Hewan, Struktur dan Perkembangan Hewan II dan III, Fisiologi Tumbuhan (2005); Dasar-dasar Kultur Jaringan Tumbuhan dan Limnologi (2006).

Pengalaman Akademik. Penulis melakukan kegiatan Praktek Kerja Lapangan (PKL/magang) di Laboratorium Pengujian Air Perusahaan Daerah Air Minum (PDAM) Surakarta selama 1 bulan, yaitu pada bulan Juli 2006. Penulis bersama Laksito Nugroho dan Setyawan Yuniar Wijaya menjadi peserta “Indonesian Bird Race” di Malang pada tanggal 15-17 Agustus 2004 yang diselenggarakan oleh *Profauna Wildlife Education Center (P-WEC)*.

Prestasi Akademik. Penulis dan Kuncoro Adi menjadi peserta dalam Lomba Karya Tulis Ilmiah (LKTI) Mahasiswa tahun 2006 yang diselenggarakan oleh Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) F.MIPA UNS dengan judul “Pemanfaatan Kulit Umbi Singkong (*Manihot utilissima* Pohl.) sebagai Bio Gas Sumber Bahan Bakar Alternatif Keperluan Rumah Tangga”. Penulis juga menjadi peserta dalam Program Kreativitas Mahasiswa Penelitian (PKMP) Dana Hibah Universitas tahun 2006 dengan judul “Pemanfaatan Biji Kelor (*Moringa oleifera* (Lamk.)) dalam Menurunkan Kadar Pencemar Limbah Cair Industri Ciu di Sukoharjo” bersama Kuncoro Adi dan Usman Setiawan. Pada tahun 2006/2007 penulis bersama Supatmi (Biologi) serta Niken Puspitasari dan Yannis Syahidiyyah (Fisika) menjadi peserta dalam Program Kreativitas Mahasiswa Penelitian (PKMP) DIKTI dengan judul “Pengaruh Gelombang Sonik dan Ultrasonik terhadap Perilaku Nyamuk *Aedes aegypti* sebagai Upaya Preventif terhadap Penyakit Demam Berdarah”.