



Pertumbuhan dan Produksi Reserpin Kalus Pule Pandak [*Rauvolfia serpentina* (L.) Bentham ex. Kurz.] pada Pemberian Metil Jasmonat secara *in Vitro*

The growth and reserpine production of pule pandak [Rauvolfia serpentina (L.) Bentham ex. Kurz.] callus on the methyl jasmonate addition

MURYANTI, SOLICHATUN*, ENDANG ANGGARWULAN

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta 57126.

Diterima: 1 Nopember 2005. Disetujui: 25 Nopember 2005.

ABSTRACT

The aim of this research was to know effect of methyl jasmonate addition in any concentration on the callus growth and alkaloid reserpine production from in vitro culture of pule pandak [*Rauvolfia serpentina* (L.) Bentham ex. Kurz.]. The research frame based on the advantage of pule pandak as medicine plants sources. The addition of methyl jasmonate on the callus medium would inhibit the callus growth. It also has effects for the synthesis strichthosidine synthase. This enzyme had essential role on the reserpine biosynthesis. The research was conducted of two steps. First, initiation step to induct the callus formation. Second, treatment step to induct reserpine production. The research was done by designing a factor random completed, that is methyl jasmonate concentration. Methyl jasmonate concentration which is 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M, and 100 μ M. The result data was qualitative form, that was callus morphology and quantitative form, fresh weight and dried weight, and reserpine content. The analysis of data used the ANOVA and DMRT 5%. The result of this research indicated that increasing of methyl jasmonate addition reduced the callus growth. The more methyl jasmonate concentration (10, 20, 40, 80 μ M) was added, the higher reserpine was produced. Methyl jasmonate concentration in 80 μ M produced the highest reserpine content that is 0.75 mg/g.

♥ Alamat korespondensi:

Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126
Tel. & Fax.: +62-271-663375.
e-mail: biology@mipa.uns.ac.id

Keywords: callus growth, reserpine content, *Rauvolfia serpentina*, methyl jasmonate.

PENDAHULUAN

Senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan telah lama diketahui mempunyai banyak manfaat bagi manusia, diantaranya sebagai senyawa obat, pewarna, pestisida dan pewangi. Kecenderungan untuk menggunakan bahan alam yang berasal dari tumbuhan sebagai bahan obat semakin meningkat dari waktu ke waktu. Diperkirakan sekitar 75 % dari penduduk dunia

masih tergantung pada obat-obat alami (Fitriani dkk., 1999; Gaines, 2004). Salah satu jenis tanaman obat yang banyak dibutuhkan adalah pule pandak. Tanaman ini mengandung senyawa alkaloid yang dapat berfungsi sebagai bahan obat. Dua jenis utamanya adalah reserpin dan yohimbin yang termasuk ke dalam golongan monoterpenoid indol alkaloid (AIM). Reserpin berpotensi sebagai antihipertensi dan mempunyai efek sedatif, sedangkan yohimbin

bermanfaat dalam mengobati arteriosklerosis dan impotensi (Singh *et al.*, 2004).

Pule pandak [*Rauvolfia serpentina* (L.) Bentham ex. Kurz] atau yang lebih dikenal dengan akar tikus, termasuk dalam kelompok tumbuhan obat langka yang mulai kritis keberadaannya (Amzu dan Haryanto, 1990). Keberadaan tanaman pule pandak yang masih bersifat liar sudah semakin sulit ditemukan. Hal ini disebabkan *R. serpentina* sukar untuk dibudidayakan, sementara itu kebutuhan akan bahan baku obat yang berasal dari tanaman ini untuk industri jamu dan farmasi, terus meningkat. Laju pemanenan di alam lebih cepat dari laju kemampuan alam dalam memulihkan populasinya. Nilai manfaat dan ekonomi yang tinggi menyebabkan tingkat kelangkaan yang semakin tinggi pula (Panjaitan dalam Alfiyono, 2003; Sandra dkk., 2002), oleh sebab itu diperlukan bioteknologi yang dapat memecahkan masalah ini, salah satunya adalah dengan kultur *in vitro*.

Teknik kultur *in vitro* bukan hanya digunakan untuk perbanyak tanaman melainkan juga untuk tujuan yang lain yaitu melakukan perbaikan tanaman dan memproduksi senyawa metabolit sekunder. Kultur *in vitro* dapat mengakumulasi metabolit sekunder hanya dalam kondisi spesifik. Untuk memaksimalkan produksi dan akumulasi metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* dapat dilakukan dengan cara memanipulasi media, seleksi klon sel, penambahan prekursor, optimasi faktor lingkungan dan teknik elisitasi (Wetter dan Constabel, 1991; Mulabagal dan Tsay, 2004). Elisitasi adalah menambahkan substansi biotik maupun abiotik ke dalam sistem sel hidup dengan konsentrasi rendah sehingga dapat meningkatkan biosintesis metabolit sekunder sebagai respon tumbuhan dalam mempertahankan diri. Penggunaan elisitor dapat menstimulasi pembentukan metabolit sekunder pada kultur sel tumbuhan (Radman *et al.*, 2003; Braz *et al.* dalam Mulabagal dan Tsay, 2004).

Gaines (2004) melaporkan bahwa penggunaan elisitor metil jasmonat dengan konsentrasi 10 dan 100 μM berpengaruh positif terhadap peningkatan produksi indol alkaloid pada kultur suspensi sel *Catharanthus roseus*. Metil jasmonat (Me-Ja) dapat mempengaruhi biosintesis metabolit sekunder sebagai respon pertahanan diri dengan cara meningkatkan ekspresi gen yang mengkode striktosidin sintase (STR). Striktosidin sintase (STR) mengkatalisis reaksi kondensasi triptamin dan sekologanin yang akan menghasilkan striktosidin.

Striktosidin merupakan senyawa yang akan bertindak sebagai prekursor alkaloid indol monoterpenoid (Endt *et al.*, 2002; Shanks *et al.*, 1998; Stockigt dan Zenk dalam Kutchan, 1995).

Berdasarkan latar belakang masalah di atas, perlu dilakukan penelitian tentang tanaman pule pandak (*R. serpentina*) untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder alkaloid-reserpin dengan menggunakan elisitor metil jasmonat dalam media MS (Murashige dan Skoog) secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Juni sampai Desember 2005. Lokasi penelitian di Sub Laboratorium Biologi, Laboratorium Pusat MIPA, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Bahan

Sumber eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun muda (daun ke-3 dari pucuk atas) *R. serpentina* dari Gunung Tekil, Wonogiri.

Bahan kimia yang digunakan untuk sterilisasi eksplan adalah akuades, klorok/ *bayclin* (yang mengandung NaClO 5,25%) dan etanol absolut. Bahan untuk perlakuan adalah metil jasmonat 95% dan akuades. Bahan untuk analisis kandungan reserpin adalah etanol p.a., akubides, asam sulfamat 0,5%, sodium nitrit 0,3%, dan senyawa reserpin murni.

Media Inisiasi (Induksi) Kalus berupa Media MS, agar sebanyak 7.000 mg/l, KOH 1N, akuades, HCL 1N, NAA 2 mg, kinetin 2 mg. Media Perlakuan (Media Produksi) menggunakan bahan-bahan kimia seperti yang digunakan dalam pembuatan media inisiasi kalus, namun terdapat perbedaan yaitu: tanpa digunakan NH_4NO_3 , KH_2PO_4 dikurangi menjadi 100 mg/l, tidak digunakan NAA, sukrosa ditambah menjadi 80.000 mg/l dan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan adalah kinetin 5 mg/l (Aryati, 2005).

Rancangan percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan enam perlakuan, yaitu 6 konsentrasi metil jasmonat (0/ kontrol, 10, 20, 40, 80 dan 100 μM) yang diberikan pada media MS secara *in vitro*. Tiap-tiap perlakuan dengan 5 ulangan.

Cara kerja

Persiapan

Sterilisasi alat. Alat-alat gelas dicuci dengan detergen, dibilas dengan air kemudian disimpan di dalam rak dan dibiarkan kering dengan mulut tabung menghadap ke bawah. Gunting, skalpel, pinset dan pisau (*cutter*) dicuci dengan deterjen dan dikeringkan dengan kertas tisu. Botol kultur dan gelas ukur yang sudah kering ditutup dengan *alluminium foil*, sedangkan pinset, skalpel, spatula dan pipet yang telah kering dibungkus dengan kertas. Erlenmeyer diisi dengan akuades sebanyak $\frac{3}{4}$ volume dan ditutup dengan *alluminium foil*. Semua alat tersebut disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan uap air 1,5 atm selama 1 jam.

Media inisiasi (induksi kalus). Membuat larutan stok dari makronutrien, mikronutrien, vitamin, dan asam amino yang digunakan. Sukrosa sebanyak 30 gr dimasukkan ke dalam gelas beker yang telah diisi akuades $\frac{1}{3}$ bagian erlenmeyer volume 1 liter yang diletakkan di atas *hot plate* dan telah diberi *magnetic stirrer*. Makronutrien, mikronutrien, vitamin dan asam amino dimasukkan ke dalam gelas piala. Akuades ditambahkan secukupnya sampai $\frac{3}{4}$ bagian dari kapasitas gelas piala. pH diukur dengan pH meter dan ditetapkan pada pH 5,75 dengan menambahkan KOH 1N untuk menaikkan pH dan dengan menambahkan HCL 1N untuk menurunkan pH. Akuades ditambahkan sampai volume 1 liter. NAA sebanyak 2 mg dan kinetin 2 mg dimasukkan ke dalam gelas piala. Agar ditambahkan sebanyak 7000 mg. Larutan dipanaskan diatas *hot plate*, diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai larut sempurna kemudian dituang ke dalam botol-botol kultur steril sebanyak $\frac{1}{5}$ bagian dari volume botol. Botol-botol kultur yang telah berisi media ditutup rapat dengan kertas *alluminium foil*, botol-botol kultur disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm.

Media perlakuan. Seperti membuat media inisiasi tetapi ditambahkan kinetin sebanyak 5 mg/l dan erlenmeyer yang berisi media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121° C tekanan 1 atm selama 15 menit. Metil jasmonat ditambahkan pada media sesuai konsentrasi yang diinginkan saat suhu media kira-kira 40° C. Media dituang dalam botol-botol kultur yang telah steril. Proses ini dilakukan di dekat api bunsen di dalam *laminar air flow cabinet*.

Induksi pembentukan kalus

Sterilisasi eksplan. Eksplan yang akan ditanam disterilisasi terlebih dahulu untuk mencegah terjadinya kontaminasi selama penelitian berlangsung. Daun pule pandak dicuci dan dibuang bagian jaringan daun yang kotor dan mati di bawah aliran air selama 1 menit, dipotong dan diukur 3x3 cm kemudian direndam dalam larutan detergen selama 15 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir, direndam dalam klorok 45% selama 15 menit, dibilas akuades steril sebanyak 3 kali selama 5 menit, direndam etanol 70% selama 0,5 menit, dan terakhir dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali selama 5 menit.

Penanaman eksplan

Eksplan yang telah disterilisasi kemudian ditanam dan diinkubasi selama 30 hari pada media inisiasi kalus yaitu media dasar MS yang ditambah NAA 2 mg/l dan kinetin 2 mg/l.

Penanaman kalus pada media perlakuan. Kalus yang diperoleh dari media inisiasi dipindah (ditanam) ke dalam media perlakuan selama 15 hari dengan menggunakan pinset steril di dalam *laminar air flow cabinet*. Botol-botol kultur yang telah berisi kalus dari media inisiasi diinkubasi pada suhu kamar (25°-27 °C) dan diberi cahaya berupa lampu neon 10 watt di dalam ruang kultur. Untuk mencegah kontaminasi maka dilakukan penyemprotan pada botol-botol kultur dengan alkohol 70%. Penyemprotan dilakukan minimal tiga hari sekali menggunakan *hand sprayer*.

Pengamatan dan pengujian hasil

Pengamatan pertumbuhan. Pengamatan terhadap pertumbuhan dan morfologi kalus meliputi: warna kalus, tekstur kalus, dan mengukur berat basah serta berat kering kalus. Berat basah kalus akhir diperoleh dengan menimbang kalus secara langsung pada akhir pengamatan (hari ke-15 pada media perlakuan) dari dalam botol kultur. Pengukuran berat kering kalus dilakukan dengan menimbang kalus yang telah dikeringkan. Pemisahan kalus dari media dilakukan dengan memisahkan media yang menempel pada kalus menggunakan pinset. Kalus yang telah bersih dari media dikeringkan dalam inkubator pada suhu 30 °C sampai beratnya konstan.

Penghitungan kadar reserpin. Serbuk kalus kering sebanyak 50 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan etanol p.a sebanyak 1 ml, divortek dan kemudian ditambah

akuabides sampai volume 10 ml. Larutan disaring dan ditambahkan sodium nitrit 0,3 % sebanyak 1 ml. Larutan dimasukkan *waterbatch* yang bersuhu 55^o C selama 30 menit. Larutan didinginkan dan ditambahkan asam sulfamat 0,5 % sebanyak 0,5 ml. Dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer *UV-Vis Shimadzu* pada panjang gelombang 399 nm dengan larutan pembanding reserpin (Singh *et al.*, 2004).

HASIL DAN PEMBAHASAN

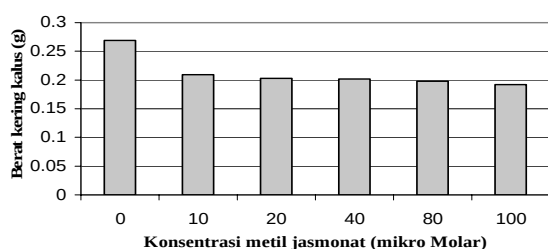
Berat kering kalus

Berat kering merupakan parameter pertumbuhan yang dapat digunakan sebagai ukuran global pertumbuhan tanaman dengan segala peristiwa yang dialaminya. Untuk mendapatkan berat kering dilakukan pengeringan untuk menghilangkan kadar air dan menghentikan aktivitas metabolisme dalam bahan hingga diperoleh berat yang konstan. Menurut Sitompul dan Guritno (1995), bahan kering tanaman dipandang sebagai manifestasi dari semua proses dan peristiwa yang terjadi dalam pertumbuhan tanaman. Produksi tanaman biasanya lebih akurat dinyatakan dengan ukuran berat kering dari pada dengan berat basah, karena berat basah sangat dipengaruhi oleh kondisi kelembaban. Hasil pengamatan mengenai berat kering kalus *R. serpentina* tersaji dalam Tabel 1.

Tabel 3. Rata-rata berat kering (g) kalus *R. serpentina* pada media perlakuan

Perlakuan	M ₀	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
Berat kering (g)	0,269 ^a	0,209 ^b	0,203 ^b	0,202 ^b	0,198 ^b	0,192 ^b

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada satu baris berarti tidak berbeda nyata dengan DMRT taraf 5%. M: konsentrasi metil jasmonat; M₀: 0 µM, M₁: 10 µM, M₂: 20 µM, M₃: 40 µM, M₄: 80 µM, M₅: 100 µM.



Gambar 1. Berat kering (g) kalus *R. serpentina* pada berbagai perlakuan konsentrasi metil jasmonat.

Dari Gambar 1 dapat dilihat adanya penurunan berat kering yang seiring dengan bertambahnya konsentrasi metil jasmonat yang diberikan. Penurunan berat kering kalus yang seiring dengan bertambahnya konsentrasi metil jasmonat yang diberikan ini diduga disebabkan adanya aktifitas metil jasmonat yang mampu menghambat pembelahan sel dan mengalihkan metabolisme sel untuk mensintesis metabolit sekunder sebagai upaya pertahanan diri terhadap stres. Mekanisme penghambatan metil jasmonat terhadap pembelahan sel terjadi dengan mencegah terbentuknya gelendong pembelahan (mikrotubula) dan menghambat aktifitas histon H1 kinase saat terjadinya sintesis DNA. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan pada kultur kalus tembakau BY-2 bahwa terjadi penghambatan aktifitas histon H1 kinase pada kalus setelah diberi perlakuan metil jasmonat dengan konsentrasi 100 µM (Witek *et al.*, 2002).

Penurunan berat kering yang terjadi juga diduga karena rendahnya laju fotosintesis dan meningkatnya respirasi untuk menyediakan prekursor dan energi dalam pembentukan metabolit sekunder. Menurut Gardner, dkk. (1991) hasil berat kering tanaman merupakan keseimbangan antara fotosintesis dan respirasi. Fotosintesis mengakibatkan peningkatan berat kering tanaman karena pengambilan karbondioksida dan respirasi mengakibatkan penurunan berat kering karena pengeluaran karbondioksida.

Analisis kandungan alkaloid reserpin pada kalus

Hasil analisis alkaloid-reserpin yang terkandung pada kalus *R. serpentina* menunjukkan hasil yang positif. Hal ini disebabkan metil jasmonat mampu menginduksi ekspresi gen yang mengkode striktosidin sintase, yaitu enzim yang mengkatalis reaksi kondensasi antara sekologanin dan triptamin untuk membentuk striktosidin yang merupakan prekursor utama dalam pembentukan *monoterpenoid indol alkaloid*.

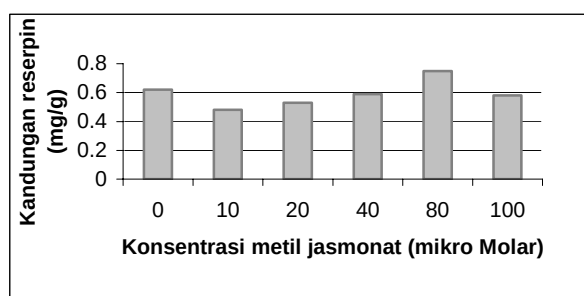
Metil jasmonat berperan dalam pengaturan respon pertahanan diri pada tanaman dengan cara menginduksi gen dan meningkatkan jalur pembentukan metabolit sekunder. Menurut Endt *et al.* (2002) dan Santos *et al.* (2001), fungsi metil jasmonat adalah sebagai signal transduksi pada sistem pertahanan diri tanaman terhadap stres dengan memacu sintesis metabolit sekunder. Metil jasmonat dapat menstimulasi biosintesis terpenoid indol alkaloid dengan cara

menginduksi gen yang mengaturnya. Promoter pada gen *Str* memiliki daerah yang disebut sebagai *JERE* (*Jasmonate and Elicitor-Responsive Element*). Metil jasmonat akan mengaktifkan protein yang berperan sebagai faktor transkripsi dengan mengikatnya langsung pada *JERE* yang kemudian akan meningkatkan ekspresi gen *Str*.

Tabel 2. Rata-rata kandungan reserpin (mg/g) kalus *R. serpentina* pada media perlakuan.

Perlakuan	M ₀	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
Rata-rata kandungan reserpin (mg/g)	0,62 ^{ab}	0,48 ^a	0,53 ^a	0,59 ^{ab}	0,75 ^b	0,58 ^{ab}

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada satu baris berarti tidak berbeda nyata dengan DMRT taraf 5%. M; konsentrasi metil jasmonat; M₀: 0 μ M, M₁: 10 μ M, M₂: 20 μ M, M₃: 40 μ M, M₄: 80 μ M, M₅: 100 μ M.



Gambar 2. Kandungan reserpin (mg/g) kalus *R. serpentina* pada berbagai perlakuan konsentrasi metil jasmonat.

Gambar 2 menunjukkan bahwa kandungan reserpin tertinggi terdapat pada konsentrasi metil jasmonat 80 μ M dan diketahui bahwa konsentrasi metil jasmonat 80 μ M merupakan konsentrasi yang optimum untuk meningkatkan kandungan reserpin kalus *R. serpentina* dalam penelitian ini. Peningkatan kandungan reserpin seiring dengan naiknya konsentrasi metil jasmonat yang diberikan tetapi mengalami penurunan pada perlakuan yang menggunakan metil jasmonat sebanyak 100 μ M. Menurut Larcher dalam Salisbury dan Ross (1995b), tumbuhan yang mulai mendapatkan faktor cekaman mengalami reaksi tanda bahaya yang ditandai dengan mulai terganggunya fungsi fisiologis dari biasanya. Kemudian berlangsung tahap resistensi yaitu organisme beradaptasi pada faktor cekaman. Tahap selanjutnya akan terjadi kematian jika faktor cekaman meningkat atau terus berlangsung. Pada penelitian ini kandungan reserpin semakin meningkat pada

pemberian konsentrasi metil jasmonat 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M dan 80 μ M. Peningkatan kandungan reserpin ini disebabkan oleh sel mengalami tahap resistensi atau masa adaptasi terhadap faktor cekaman metil jasmonat yang diberikan. Pada tahap adaptasi ini, sel berusaha mempertahankan diri dengan cara mensintesis metabolit sekunder (reserpin). Pemberian konsentrasi metil jasmonat sebanyak 100 μ M menyebabkan kandungan reserpin pada kalus menurun. Terjadinya penurunan kandungan reserpin ini diduga disebabkan sel telah memasuki tahap kematian karena konsentrasi metil jasmonat yang diberikan sebagai faktor cekaman terlalu tinggi.

Penurunan kandungan reserpin pada pemberian metil jasmonat 100 μ M juga berkaitan dengan warna kalus yang muncul yaitu munculnya warna coklat tua yang disebabkan terbentuknya senyawa fenol atau disebut terjadinya *browning*. Menurut Whitmer *et al.* (1998), pencoklatan umumnya berasosiasi dengan kenaikan masukan prekursor dari percabangan jalur shikimat yang akan meningkatkan sintesis asam fenolik dan fenilpropanoid, yang akan berkompetisi dengan percabangan indol. Konsekuensi dari terjadinya pencoklatan ini akan mengakibatkan terhalangnya sintesis triptamin sebagai prekursor alkaloid indol terpenoid.

Pada penelitian ini terjadi peningkatan kandungan reserpin yang sejalan dengan peningkatan pemberian metil jasmonat pada konsentrasi 10, 20, 40 dan 80 μ M kemudian cenderung menurun pada pemberian metil jasmonat di atas 80 μ M. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Shanks dan Sushil (1998) yaitu terjadi peningkatan kandungan alkaloid seiring dengan banyaknya konsentrasi asam jasmonat yang digunakan. Menurut Creelman dan Mullet dalam Shanks dan Sushil (1998), dosis asam jasmonat yang digunakan merupakan parameter yang penting. Pemberian metil jasmonat dengan konsentrasi rendah tidak menunjukkan efek yang nyata pada sel sedangkan pemberian metil jasmonat dengan konsentrasi yang tinggi menyebabkan kematian dan menghambat pertumbuhan sel.

Sintesis reserpin pada kalus *R. serpentina* juga diduga berkaitan dengan fotosintesis dan respirasi yang terjadi pada kalus. Pada penelitian ini kalus diduga mengandung klorofil yang ditandai dengan adanya warna hijau pada kalus sehingga memungkinkan sel untuk melakukan

fotosintesis. Laju fotosintesis yang terjadi diduga lebih rendah bila dibandingkan dengan laju respirasi. Laju fotosintesis yang rendah pada kalus diduga karena sudah tersedianya sukrosa dalam jumlah yang cukup dalam media kultur, sedangkan meningkatnya respirasi untuk menyediakan bahan asam amino sebagai prekursor pembentukan reserpin. Menurut Salisbury dan Ross (1995a), sukrosa merupakan produk fotosintesis yang menjadi sumber energi dalam respirasi. Respirasi menghasilkan produk esensial yang dihasilkan saat pemecahan kerangka karbon yaitu asam amino untuk protein, nukleotida untuk asam nukleat, dan prazat karbon untuk porfirin, lemak, karotenoid serta senyawa lain. Asam amino triptofan menjadi prekursor dalam pembentukan alkaloid indol monoterpenoid (Kutchan, 1995).

Kandungan reserpin yang lebih tinggi pada kontrol bila dibandingkan dengan kandungan reserpin pada perlakuan 10, 20, dan 40 μM diduga disebabkan karena tingginya konsentrasi kinetin tunggal yang diberikan pada media yaitu 5mg/l. Menurut Ramawat dan Merillon (1999) sitokinin dapat mempertahankan sifat fisik dari *lipid bilayer* pada membran. Aktivitas geraniol 10-hidrolase sangat tergantung pada komposisi lipid membran. Geraniol 10-hidrolase merupakan enzim penting dalam sintesis alkaloid yang mengkatalis reaksi pembentukan 10-hidroksigeraniol yang selanjutnya akan membentuk sekologanin (Turner *et al.*, 2002).

Kemampuan metil jasmonat dalam meningkatkan produksi metabolit sekunder pada kultur sel tanaman telah banyak dibuktikan pada berbagai penelitian. Gundlach *et al.* (1992) dan Ogata *et al.* (2004) menyatakan bahwa pemberian elisitor metil jasmonat dengan konsentrasi 100 μM dapat meningkatkan kandungan alkaloid pada kultur *Eschscholtzia californica* dan asam rosmarinat pada kultur suspensi sel *Lithospermum erythrorhizon*, sedangkan pada *Glycine max* akumulasi antosianin dapat ditingkatkan melalui pemberian metil jasmonat dengan konsentrasi 250 μM . Menurut Kirakosyan *et al.* (2004), produksi hiperforin pada kultur tanaman *Hypericum perforatum* juga dapat ditingkatkan melalui pemberian metil jasmonat dengan konsentrasi 50 μM .

Berdasarkan uraian di atas maka dapat disimpulkan bahwa pemberian metil jasmonat dengan konsentrasi 0 μM , 10 μM , 20 μM , 40 μM , 80 μM , dan 100 μM berpengaruh nyata terhadap berat kering kalus dan kandungan reserpin kalus

R. serpentina. Berat kering kalus cenderung menurun seiring dengan peningkatan konsentrasi metil jasmonat yang diberikan. Konsentrasi metil jasmonat yang mampu untuk meningkatkan kandungan reserpin tertinggi adalah 80 μM .

KESIMPULAN

Pemberian metil jasmonat pada media MS secara *in vitro* menghambat pertumbuhan kalus *R. serpentina*. Penghambatan pertumbuhan semakin besar sejalan dengan peningkatan pemberian metil jasmonat. Produksi alkaloid reserpin kalus *R. serpentina* cenderung mengalami peningkatan sejalan dengan peningkatan pemberian metil jasmonat pada konsentrasi 10, 20, 40 dan 80 μM . Konsentrasi metil jasmonat 80 μM mampu meningkatkan kandungan reserpin tertinggi kalus *R. serpentina* yaitu sebesar 0,75 mg/g.

DAFTAR PUSTAKA

- Alfiyono, 2003. *Perbedaan Pengaruh antara Indol Asam Asetat (IAA) dengan Naftalen Asam Asetat terhadap Pertumbuhan dan Struktur Anatomi Akar Pule Pandak (Rauvolfia serpentina (L.) Bentham)*. [Skripsi]. Surakarta: Jurusan Biologi FMIPA UNS.
- Amzu, E. dan Haryanto. 1990. *Pelestarian Pemanfaatan Tumbuhan Obat di Indonesia. Dalam Seminar Nasional Pelestarian Pemanfaatan Tumbuhan Obat*. Bogor: Jurusan Konservasi Sumberdaya Hutan Fakultas Kehutanan IPB.
- Aryati, H. 2005. *Pengaruh Penambahan DL-Triptofan terhadap Pertumbuhan Kalus dan Produksi Alkaloid-Reserpin Pule Pandak [Rauvolfia serpentina (L.) Bentham ex. Kurz]*. [Skripsi]. Surakarta: Jurusan Biologi FMIPA UNS.
- Endt, D.V., J.W. Kinje, and J. Memelink. 2002. Transcription factor controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulator?. *Phytochemistry* 61:107-114.
- Fitriani, A., A.H. Siregar, and R.R. Esyanti, 1999. Pengaruh pemberian homogenat *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. terhadap kandungan ajmalisin dalam kultur kalus tapak dara. *Hayati*. 6 (3): 65-69.
- Gaines, J.L. 2004. Increasing alkaloid production from *Catharanthus roseus* suspension through methyl jasmonate elicitation. *Pharmaceutical Engineering* 24 (4): 1-5.
- Gardner, F.P., R.B. Pearce, dan R.L. Mitchel. 1991. *Fisiologi Tanaman Budidaya*. Penerjemah: H. Susilo. Jakarta: UI Press.
- Gundlach, H., J.M. Muller, T. M. Kutchan, and H.M. Zenk. 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor induced plant cell culture. *Plant Biology* 89: 2389-2393.
- Kirakosyan, A., M.T. Sirvent, M.D. Gibson, and P.B. Kaufman. 2004. The production of hyperforin by in vitro culture of St. John Wort (*Hypericum perforatum*). *Biotechnology & Applied Biochemistry* 39: 71-81.

- Kutchan, T.M. 1995. Alkaloid biosynthesis the basic for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell*. 7 (7): 059-1070.
- Mulabagal, V. and H. Tsay. 2004. Plant Cell Culture-An Alternative and Efficient Source for The Production of Biologically Important Secondary Metabolite. *International Journal of Applied Science and Engineering* 2 (1): 29-48.
- Ogata, A., A. Tsuraga, M. Matsuro, and H. Mizukazi. 2004. Elicitor induced rosmarinic acid biosynthesis in **Lithospermum erythrorhizon** cell suspension culture: activities of rosmarinic acid synthase and the final two cytochrome P 450 catalyzed hydroxylations. *Plant Biotechnology* 21(5): 393-396.
- Radman, R., T. Saez, C. Bucke and T. Keshavarz. 2003. Review elicitation of plants and microbial cell system. *Biotechnology & Applied Biochemistry* 37: 91-102.
- Ramawat, K.G dan J.M. Merillon. 1999. Mechanism and control. In: Ramawat, K.G and J. M Merillon (eds.) *Biotechnology Secondary Metabolites*. New Hampshire: Science Publisher, Inc.
- Salisbury, F.B. dan C.W. Ross. 1995a. *Fisiologi Tumbuhan*. Jilid 2. Penerjemah: Lukman, D.R. dan Sumaryono. Bandung: Penerbit ITB.
- Salisbury, F.B. dan C.W. Ross. 1995b. *Fisiologi Tumbuhan*. Jilid 3. Penerjemah: Lukman, D.R. dan Sumaryono. Bandung: Penerbit ITB.
- Sandra, E., Zuhud, Y. Fitriani, Yahya dan T. Anwar. 2002. *Kultur In Vitro Tumbuhan Obat Langka Pule pandak (Rauvolfia serpentina Bentham)*. www.geocities.com.
- Santos, A.A., C.C. Giuliano, F. Simonelli, R.M. Alferado, F.A. Marques, and P.H.G. Zarbin. 2001. A new approach to synthesis of ($\pm$) methyl jasmonate and baclofen via conjugated addition of oxazoline cyanocuprate to michael acceptor. *Journal of Brazilian Chemical Society* 2 (5): 673-679.
- Shanks, J.V. and K.R. Sushil. 1998. Effect of elicitor dosage and exposure time on biosynthesis of indol alkaloid by **Catharanthus roseus** hairy root culture. *Biotechnology Program* 14: 442-449.
- Shanks, J.V., R. Bhadra, J. Morgan, S. Rijhwani, and S. Vani. 1998. Quantification of metabolites in the indole alkaloid pathway of **Catharanthus roseus**: implication for metabolic engineering. *Biotechnology & Bioengineering*. 58: 333-338.
- Singh, K.D., A. Sahu, and B. Srivastava, 2004. Spectrophotometric determination of **Rauvolfia** alkaloid: estimation of reserpin in pharmaceuticals. *Analytical Science* 20: 571-573.
- Sitompul, S.M. dan B. Guritno, 1995. *Analisis Pertumbuhan Tanaman*. Yogyakarta: UGM Press.
- Turner, J.G., C. Elis, and A. Deroto. 2002. The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell*. S: 153-164.
- Wetter, L.R. and F. Constabel. 1991. *Metode Kultur Jaringan Tanaman*. Penerjemah: Mathilda, B.W. Bandung: Penerbit ITB.
- Whitmer, S., C. Canel, D. Hallard, C. Goncalves, and R. Verpoorte, 1998. Influence of precursor availability on alkaloid accumulation by transgenic cell line of **Catharanthus roseus**. *Plant Physiology* 116(2): 853-857.
- Witek, A., M. Lenjou, V.D. Bockstaele, D. Inze, V.H. Onckelen. 2002. Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiology* 128: 201-211.