

**PERBANYAKAN *IN VITRO* dan INDUKSI
AKUMULASI ALKALOID pada TANAMAN JERUJU (*Hydrolea spinosa* L.)
In Vitro Micropropagation and Induction of Alkaloid Accumulation in Jeruju
(*Hydrolea Spinosa* L.)**

Nofia Hardarani¹⁾, Agus Purwito²⁾, Dewi Sukma²⁾

¹Fakultas Pertanian, Universitas Lambung Mangkurat, Jl. Jend. A. Yani. Kotak Pos
1028 Banjarbaru, Kalimantan Selatan, Indonesia. Telp/Fax. 0511-4772254, Email:
enharanie@yahoo.co.id

²Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti Kampus IPB Dramaga Bogor,
Indonesia. Telp.Fax. 0251-8629353

ABSTRACT

Hydrolea spinosa is one of the potential plant for antimalarial medicine. Local people in South Kalimantan call the plant as jeruju. The alkaloid compound in this plant has antiplasmodial activity. The growth of these auxillary shoots of this plant will be inhibited when is grown on the soil medium due to the different environment of original habitat (swamp areal). Therefore, tissue culture is an alternative propagation of this plant. Tissue culture method can also be used as a technique for improve alkaloid compound. The objectives of this research were to study in vitro micropropagation and to study improvement of alkaloid content in H. spinosa. Shoot induction and proliferation was studied using shoot tip and node segments in MS medium with various concentration of BAP (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, and 5.0 mg L⁻¹), whereas callus induction from young leaf and stem explants used MS medium with various concentration of 2.4-D or NAA (0.1, 0.5 and 1.0 mg L⁻¹) with 5 mg L⁻¹ BAP. Shoot elongation was done using different strength of MS salts (full-, a half-, one-quarter strength) and with or without addition of 1.0 mg L⁻¹ gibberellin (GA₃). The addition of 138 mg L⁻¹ elicitor (salicylic acid), 100 mg L⁻¹ precursor amino acid (tryptophan) and high sucrose (6%) in MS medium used to improve alkaloid content in callus and shoot cultures. The result showed that cytokinin level produced a significant response on the numbers of shoot per explants and also showed effect on node number. Both of shoot tip and node segments had a similar potential as explants in shoot induction and proliferation. The presence of plant growth regulator was important to induce callus but the concentration was no significant effect on callus initiation. The young leaf explants was better than stem in callus induction. The half strength of MS salts produced root with vigorous planlets. The planlets produced from elongation phase were acclimatized and had survival rate up to 75%. All of the treatments of inducing alkaloid were not effect to alkaloid content qualitatively.

Keywords: *Hydrolea spinosa, in vitro micropropagation, alkaloid, precursor, elicitor*

PENDAHULUAN

Masyarakat Indonesia banyak yang menggunakan tanaman tertentu untuk tujuan pengobatan berdasarkan pengalaman empiris dimana senyawa metabolit sekunder di dalamnya mempunyai khasiat obat (Kusumawati *et al.* 2003). Di daerah seperti Kalimantan Selatan, masih banyak tanaman yang berpotensi sebagai obat dan

belum dieksplorasi. Salah satunya adalah tanaman *Hydrolea spinosa* L. Yang berdasarkan kajian etnobotani oleh Dharmono (2007) dikenal masyarakat dengan jeruju dan digunakan sebagai obat antimalaria. Melihat potensi tanaman jeruju tersebut terbuka peluang bahwa tanaman ini dapat menjadi salah satu tanaman yang dapat menjadi alternatif obat antimalaria. Oleh sebab itu, dilakukan kajian dasar fitokimia oleh tim dari Farmasi Fakultas MIPA Unlam pada tanaman ini dan memperoleh senyawa alkaloid yang diduga memiliki aktivitas sebagai antimalaria (Sutomo *et al.* 2009).

Tim dari Fakultas Kedokteran Unlam kemudian melakukan uji aktivitas antiplasmodial terhadap senyawa alkaloid tanaman ini dan memperoleh data yang menunjukkan adanya kemampuan menurunkan jumlah parasitemia plasmodium. Upaya

peningkatan kandungan alkaloid perlu dilakukan agar dapat mempertinggi khasiat tanaman sebagai obat (Istiana dan Hayatie 2009). Induksi produksi alkaloid dapat dilakukan secara *in vitro*, antara lain melalui kultur kalus dan kultur tunas. Hal ini telah dibuktikan pada penelitian Taha *et al.* (2009) dalam produksi alkaloid indol dari kalus tanaman *Catharanthus roseus* dan alkaloid tropan dalam kultur tunas pada *Datura stramonium* (Amdoun *et al.* 2009).

Pemanfaatan tanaman sebagai bahan obat yang berkualitas tinggi dalam jumlah yang besar akan memerlukan teknik budidaya yang intensif. Perbanyakkan secara *in vitro* menjadi \square climatiza dalam produksi bibit tanaman jeruju. Teknik ini juga dapat menghasilkan bibit yang tersedia sepanjang waktu dan seragam (Yunita dan Lestari 2008). Oleh sebab itu, optimasi dalam induksi tunas dan akar menjadi tahapan penting dalam protokol perbanyakkan tanaman secara *in vitro*.

Dalam upaya peningkatan akumulasi alkaloid melalui kultur kalus, produksi kalus merupakan tahapan penting yang perlu dilakukan pengkajian optimasinya (Pandiangan dan Nainggolan 2006). Jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh (ZPT) untuk pembentukan tunas, akar dan multiplikasinya serta induksi kalus dan proliferasinya menjadi penelitian awal yang perlu dilaksanakan. Beberapa metode untuk meningkatkan akumulasi alkaloid dapat dilakukan, seperti melalui elisitasi, penambahan \square climati dan peningkatan suplai karbohidrat (Rothe *et al.* 2001).

Sampai saat ini belum pernah dilakukan penelitian mengenai perbanyakkan dan induksi akumulasi senyawa alkaloid pada tanaman jeruju melalui kultur jaringan. Oleh sebab itu, penelitian ini bertujuan untuk: 1) Memperoleh metode perbanyakkan tanaman secara *in vitro*, yaitu konsentrasi ZPT yang terbaik untuk induksi, proliferasi dan elongasi tunas serta untuk induksi kalus; 2) Memperoleh metode induksi akumulasi alkaloid yang dapat meningkatkan alkaloid secara kualitatif.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2010 hingga Pebruari 2011 di Laboratorium Kultur Jaringan Departemen Agronomi dan Hortikultura Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor dan di Laboratorium Uji Fitokimia Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (BALITTRO). Bahan tanam (eksplan) yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman Jeruju (*Hydrolea spinosa* L.) yang berasal dari Desa Kayu Rabah Kecamatan Pandawan, Kabupaten Hulu Sungai Tengah, Kalimantan Selatan. Media dasar yang digunakan untuk semua perlakuan dalam penelitian ini adalah media Murashige & Skoog (MS).

Induksi dan Proliferasi Tunas

Percobaan ini menggunakan rancangan acak kelompok faktorial dua faktor. Faktor pertama berupa jenis eksplan yang terdiri atas dua taraf, yaitu pucuk dan buku, dan faktor kedua adalah konsentrasi BAP yang terdiri dari tujuh taraf, yaitu 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 dan 5.0 mg L⁻¹. Terdapat 14 (empat belas) perlakuan dengan tiga kelompok yang dibagi berdasarkan waktu tanam. Setiap kelompok terdiri dari lima botol tanam.

Elongasi Tunas *In Vitro*

Tahap elongasi tunas menggunakan rancangan acak lengkap satu faktor berupa jenis media enam taraf, yaitu MS, MS ½, MS ¼, MS + 1 mg L⁻¹ GA₃; MS ½ + 1 mg L⁻¹ GA₃, MS ¼ + 1 mg L⁻¹ GA₃. Terdapat enam perlakuan di mana setiap perlakuan diulang sebanyak lima kali.

Induksi Kalus

Induksi kalus menggunakan rancangan acak kelompok □cclimati dua faktor. Faktor pertama berupa jenis eksplan yang terdiri atas dua taraf, yaitu daun dan batang, dan faktor kedua adalah kombinasi ZPT dengan tujuh taraf, yaitu perlakuan tanpa ZPT sebagai □cclima dan perlakuan 5,0 mg L⁻¹ BAP yang ditambah dengan 2.4-D (0.1, 0.5, 1.0) mg L⁻¹ atau NAA (0.1, 0.5, 1.0) mg L⁻¹. Terdapat 14 (empat belas) perlakuan dengan tiga kelompok yang dibagi berdasarkan waktu tanam. Setiap kelompok terdiri dari lima botol tanam.

Induksi Akumulasi Alkaloid Total

Percobaan ini menggunakan rancangan acak lengkap satu faktor yang berupa perlakuan tanpa senyawa induksi selama 0, 2, 4, 7 hari, 138 mg L⁻¹ asam salisilat (SA) selama dua hari, sukrosa 6% selama empat hari dan 100 mg L⁻¹ triptofan selama tujuh hari. Terdapat tujuh perlakuan dan setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Setiap ulangan terdiri atas lima botol tanam. Analisis kandungan alkaloid secara kualitatif dilakukan dengan menggunakan pereaksi Bouchardat dan Mayer yang sesuai dengan *Materia Medika Indonesia* (1995) di Laboratorium Analisis Fitokimia BALITTRO Cimanggu Bogor yang ditentukan berdasarkan kepekatan warna endapan yang terbentuk. Visualisasi kepekatan larutan diberi □cclima yang disesuaikan dengan standar di Laboratorium Analisis Fitokimia BALITTRO.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi dan Proliferasi Tunas

Konsentrasi sitokinin *6-benzylaminopurine* (BAP) dan sumber eksplan pada media memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap jumlah tunas per eksplan. Begitu juga dengan interaksi antara BAP dengan sumber eksplan seperti yang terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Interaksi konsentrasi BAP dengan jenis eksplan pada media MS terhadap jumlah tunas per eksplan pada pengamatan 4 MST

Perlakuan BAP (mg L ⁻¹)	Jenis eksplan	
	Pucuk	Buku
0.0	1.00 i	1.67 hi
0.5	1.73 hi	2.07 gh
1.0	2.00 gh	3.93 de
2.0	3.00 f	2.73 fg
3.0	3.07 f	3.40 ef
4.0	4.40 cd	5.60 ab
5.0	5.07 bc	6.07 a

Keterangan :MST = minggu setelah tanam. Angka yang diikuti huruf yang sama pada baris dan kolom tidak berbeda nyata pada DMRT dengan $\alpha=5\%$

Pada penelitian ini terlihat bahwa BAP dengan konsentrasi tertinggi (5.0 mg L⁻¹) dapat menghasilkan jumlah tunas per eksplan yang paling tinggi pula dimana eksplan buku lebih baik daripada eksplan pucuk. Hal ini sejalan dengan yang dikemukakan Ntui *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa induksi tunas tertinggi pada tanaman *Colocynthis citrullus* L. diperoleh pada media MS yang ditambah dengan 5 mg L⁻¹ BAP, yaitu sebanyak 3.5 tunas. Interaksi antara konsentrasi BAP dengan sumber eksplan mempengaruhi kemampuan eksplan dalam proliferasi tunas terkait dengan adanya dominansi \square cclim pada eksplan pucuk. Adanya dominansi \square cclim menyebabkan penghambatan pada pertumbuhan tunas lateral (Arteca 1995). Pada eksplan buku terjadi penghilangan ujung tunas sehingga dapat mengurangi dominansi \square cclim dan meningkatkan respon morfogenesis eksplan tunas (Mohamed-Yasseen 1994).

BAP meningkatkan kemampuan regenerasi dengan menstimulasi kemampuan pembelahan sel dalam jaringan. Pengaruh aplikasi BAP bekerja melalui siklus pembelahan sel dengan mengendalikan aktivitas enzim *cyclin-dependent kinase* (CDKs) pada akhir fase S, M dan G₁ (Taiz dan Zeiger 2002). Respon terhadap sinyal hormonal tersebut menunjukkan sel-sel dalam eksplan menjadi sel yang kompeten (Sugiyama 1999). Semakin tinggi konsentrasi BAP menyebabkan semakin banyak sel yang kompeten dalam satu jaringan sehingga potensi regenerasi menjadi lebih tinggi (Veltcheva dan Svetleva 2005).

Pada peubah jumlah buku per eksplan, konsentrasi BAP, sumber eksplan dan interaksinya juga berpengaruh nyata (Tabel 2). Semakin tinggi konsentrasi BAP tunggal (hingga 4.0 mg L⁻¹) memberikan kecenderungan jumlah buku yang semakin banyak pula namun menurun pada konsentrasi 5.0 mg L⁻¹ BAP. Pada eksplan pucuk perlakuan 4.0 mg L⁻¹ BAP, rataan jumlah buku per tanamannya sebanyak 25.60 dan dari eksplan buku sebanyak 28.20.

Tabel 2. Interaksi konsentrasi BAP dengan jenis eksplan pada media MS terhadap jumlah buku per tanaman pada pengamatan 4 MST

Perlakuan BAP (mg L ⁻¹)	Jenis eksplan	
	Pucuk	Buku
0.0	16.93 b	9.93 c
0.5	17.07 b	10.07 c
1.0	18.93 b	13.73 bc
2.0	14.73 bc	14.00 bc
3.0	19.40 b	10.00 c
4.0	25.60 a	28.20 a
5.0	19.73 b	19.73 b

Keterangan : MST = minggu setelah tanam. Angka yang diikuti huruf yang sama pada baris dan kolom tidak berbeda nyata pada DMRT dengan $\alpha=5\%$

Aplikasi 5.0 mg L⁻¹ BAP dapat memecah dominansi α cclim dan meningkatkan pembentukan tunas (Arigita *et al.* 2005). Hal ini yang menyebabkan morfogenesis tanaman diarahkan pada pembentukan tunas baru, bukan pembentukan buku di bagian bawah α cclim. Kemampuan eksplan pucuk dan buku sama besarnya dalam menghasilkan buku karena kedua eksplan memiliki jaringan meristematik dimana sel-selnya aktif membelah (Wattimena *et al.* 1992).

Elongasi Tunas *In Vitro*

Selama tahap proliferasi tunas, diperoleh pertumbuhan tunas yang banyak dan berakar namun tunas yang tumbuh memiliki buku yang rapat sehingga memberikan penampilan tunas yang kerdil. Oleh sebab itu, dilakukan tahap elongasi tunas agar diperoleh tunas yang lebih tinggi dengan menggunakan media MS dalam konsentrasi hara yang berbeda dan dengan atau tanpa penambahan giberelin (GA₃).

Aplikasi GA₃ pada media elongasi berpengaruh sangat nyata terhadap tinggi dan bobot tunas seperti yang terlihat pada Tabel 3. Perlakuan GA₃ dapat meningkatkan tinggi tunas pada setiap konsentrasi hara media MS. Sebaliknya untuk bobot basah tunas, penambahan GA₃ memberikan peningkatan bobot basah tunas yang kecil. Tunas yang tertinggi diperoleh dari media MS ¼ + 1 mg L⁻¹ GA₃ yang berbeda nyata dengan media lain, yaitu sebesar 3.80 cm sedangkan media yang memberikan bobot basah tunas tertinggi adalah media MS ½ dan MS ¼ masing-masing sebesar 0.28 dan 0.25 g.

Tabel 3. Rataan tinggi tunas, bobot basah tunas, panjang akar dan jumlah akar umur 4 MST pada media elongasi (ukuran eksplan awal 0.5 cm)

Media	Tinggi tunas (cm)	Bobot basah tunas (g)	Panjang akar (cm)	Jumlah akar
MS	1.00 c*	0.13 b	1.12 c	5.00 bc
MS ½	1.50 c	0.28 a	3.00 a	7.20 a
MS ¼	1.30 c	0.25 a	2.44 b	6.40 ab
MS + GA ₃ 1 mg L ⁻¹	1.40 c	0.04 c	0.54 d	3.60 cd
MS ½ + GA ₃ 1 mg L ⁻¹	2.50 b	0.07 bc	0.42 d	2.60 de
MS ¼ + GA ₃ 1 mg L ⁻¹	3.80 a	0.09 bc	0.42 d	2.00 e

Keterangan: MST = minggu setelah tanam. Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama pada masing-masing peubah tidak berbeda nyata pada uji DMRT dengan $\alpha=5\%$

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ GA}_3$ pada media elongasi meningkatkan tinggi tunas secara signifikan dibandingkan dengan tinggi tunas tanpa GA_3 . Aplikasi GA_3 memberikan pengaruh yang positif terhadap tinggi tunas namun berpengaruh sebaliknya terhadap bobot basah tunas. Tunas yang tumbuh pada media dengan GA_3 menjadi tinggi dan memiliki ruas batang yang panjang namun terlihat kurus dan tidak vigor. Hal ini menyebabkan bobot basah tunas menjadi rendah karena GA_3 yang ditambahkan dalam media hanya meningkatkan pertumbuhan batang dengan menstimulasi pembelahan dan pemanjangan sel pada daerah sub-apikal dan menghasilkan pemanjangan ruas batang pada tunas (Arigita *et al.* 2005).

Tabel 3 juga menunjukkan rata-rata kondisi perakaran pada media elongasi. Konsentrasi hara media MS dan keberadaan GA_3 berpengaruh sangat nyata terhadap panjang dan jumlah akar. Panjang akar tertinggi diperoleh dari media MS $\frac{1}{2}$ yang berbeda nyata dengan perlakuan yang lain, yaitu sebanyak 3.00 cm. Pola yang \square cclim sama juga ditunjukkan oleh jumlah akar dimana media MS $\frac{1}{2}$ yang menghasilkan jumlah akar terbanyak, yaitu 7.20 dan berbeda nyata dengan perlakuan lain kecuali dengan media MS $\frac{1}{4}$ yang sebanyak 6.40 akar.

Keberadaan GA_3 menyebabkan perakaran menjadi terhambat dimana akar yang tumbuh sedikit dan pendek serta memerlukan waktu yang lebih lama dalam inisiasinya. Hal ini disebabkan aplikasi giberelin eksogen dengan konsentrasi yang tinggi dapat menghambat pembentukan akar (Arteca 1996).

Dalam penelitian ini, tunas dan perakaran dapat tumbuh dengan lebih baik dalam media MS $\frac{1}{2}$ dimana tunas yang tumbuh memiliki batang yang lebih kokoh dengan perakaran yang banyak dan panjang. Dengan demikian perbanyakan tanaman jeruju secara *in vitro* dapat dilakukan dalam dua tahap, yaitu induksi dan proliferasi tunas dengan penambahan BAP konsentrasi tinggi (5.0 mg L^{-1}) dan dilanjutkan dengan media elongasi tunas pada media MS $\frac{1}{2}$ konsentrasi hara. Prosedur dua langkah tersebut sesuai dan tidak mahal untuk propagasi komersial skala besar (\square cclima Sen 1995).

Persentase keberhasilan tanaman untuk tumbuh setelah diaklimatisasi adalah sebesar 75%. Daya tumbuh tanaman saat diaklimatisasi juga menunjukkan bibit tanaman jeruju yang berasal dari perbanyakan *in vitro* mampu beradaptasi dan tumbuh pada media tanah. Hal ini memberikan peluang yang lebih besar untuk dilakukannya budidaya konvensional menggunakan bibit hasil kultur jaringan karena tidak lagi menuntut media pertanaman yang sesuai dengan habitat asli tanaman ini, yaitu lahan rawa.

Induksi Kalus

Penggunaan kalus sebagai sumber produksi senyawa metabolit sekunder telah banyak dilakukan (Syahid dan Hernani 2001). Tabel 4 menunjukkan adanya interaksi yang sangat nyata dari konsentrasi ZPT dan sumber eksplan terhadap persentase jumlah eksplan yang membentuk kalus.

Tabel 4. Interaksi jenis dan konsentrasi ZPT dengan eksplan daun dan batang terhadap persentase jumlah eksplan yang membentuk kalus pada 4 MST

Perlakuan Auksin (mg l ⁻¹)	Jumlah eksplan berkalus (%)	
	Jenis eksplan	
	Daun	Batang
Kontrol	0.00 e	0.00 e
0.1 2.4-D	100.00 a	94.43 ab
0.5 2.4-D	83.33 abc	100.00 a
1.0 2.4-D	91.67 ab	91.67 ab
0.1 NAA	50.00 d	95.83 ab
0.5 NAA	94.43 ab	75.00 bc
1.0 NAA	66.67 cd	94.43 ab

Keterangan: MST = minggu setelah tanam; Kontrol = media MS tanpa ZPT. Angka yang diikuti huruf yang sama pada baris dan kolom tidak berbeda nyata pada DMRT dengan $\alpha=5\%$. Seluruh perlakuan menggunakan media MS yang ditambah dengan 5 mg L⁻¹ BAP

Eksplan yang ditanam pada media \square cclima (media MS tanpa ZPT) tidak satupun yang membentuk kalus. Media yang mampu menginduksi pertumbuhan kalus seluruhnya (100%) adalah media MS dengan penambahan 5.0 mg l⁻¹ BAP + 0.1 mg L⁻¹ 2.4-D untuk eksplan daun dan 5.0 mg L⁻¹ BAP + 0.5 mg L⁻¹ 2.4-D untuk eksplan batang. Pada konsentrasi yang lebih tinggi, terjadi penurunan dalam pembentukan kalus. Hal ini menunjukkan bahwa dalam pembentukan kalus, aplikasi auksin konsentrasi rendah bersinergi dengan auksin endogen pada masing-masing eksplan, yaitu IAA dimana senyawa ini di dalam daun diduga lebih tinggi daripada batang. Oleh sebab itu, konsentrasi 2.4-D eksogen yang diperlukan pada eksplan daun lebih rendah daripada eksplan batang. Al-Juboory *et al.* (1998) menyatakan bahwa penggunaan auksin konsentrasi rendah akan lebih baik dalam menginduksi kalus dibandingkan dengan konsentrasi tinggi. Di lain pihak, penambahan 0.1 mg L⁻¹ 2.4-D pada eksplan batang menyebabkan pembentukan kalus tidak maksimal diduga pada konsentrasi ini belum tercapai keseimbangan antara auksin dengan sitokinin untuk menginduksi kalus.

Pada semua perlakuan, kalus yang dihasilkan memiliki tekstur kompak dengan warna putih hingga kekuningan. Warna dan tekstur kalus yang dihasilkan dari media yang mengandung jenis auksin yang sama pada eksplan daun memiliki kesamaan dengan yang tumbuh dari eksplan batang. Kalus tumbuh pada sitokinin tinggi dan auksin rendah karena diduga auksin endogen yang cukup tinggi sehingga hanya memerlukan penambahan auksin konsentrasi rendah untuk mencapai kondisi seimbang dengan sitokinin eksogen yang diberikan dan mampu membentuk kalus. Sinergi auksin 2.4-D dengan sitokinin BAP terlihat lebih baik pengaruhnya daripada NAA karena pada penambahan 2.4-D cenderung memberikan hasil yang lebih tinggi daripada NAA pada semua konsentrasi. Auksin 2.4-D sangat efektif untuk induksi kalus dan BAP sangat berperan dalam pembelahan sel sehingga penggunaan kedua ZPT tersebut sangat mendukung pertumbuhan kalus (Syahid dan Hernani 2001).

Induksi Akumulasi Alkaloid Total

Induksi senyawa alkaloid yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan tiga jenis metode, yaitu penambahan triptofan yang merupakan asam amino sebagai prekursor senyawa alkaloid, asam salisilat sebagai elisitor dan sukrosa konsentrasi tinggi sebagai sumber karbohidrat. Semua perlakuan diaplikasikan pada kalus dan tunas. Dalam percobaan ini, lama induksi untuk setiap jenis penginduksi tidak sama, di mana perlakuan 138 mg L⁻¹ asam salisilat diberikan selama dua hari sedangkan sukrosa 6% diberikan selama empat hari dan 100 mg L⁻¹ triptofan diberikan selama tujuh hari.

Analisis kandungan alkaloid total secara kualitatif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna, yaitu putih terhadap reagen Bouchardat dan coklat pada reagen Mayer. Hasil analisis yang telah dilakukan seperti yang terlihat pada Tabel 5. Kandungan alkaloid total baik dalam kalus maupun tunas pada semua perlakuan dan kontrol (media MS tanpa senyawa induksi) adalah sama, yaitu positif kuat terdeteksi adanya alkaloid. Dengan demikian, pertumbuhan sampai dengan minggu pertama inkubasi (tujuh hari) tidak memberikan pengaruh yang berbeda terhadap kandungan alkaloid total. Hal ini terlihat dari kandungan alkaloid secara kualitatif yang sama pada kalus dan tunas kontrol hari ke-2, 4 dan 7.

Tabel 5. Analisis kandungan senyawa alkaloid secara kualitatif dengan metode Bouchardat dan Mayer

Perlakuan induksi	Metode Bouchardat		Metode Mayer	
	Kalus	Tunas	Kalus	Tunas
Asam salisilat 0 mg L ⁻¹ (2 hari)	+++	+++	+++	+++
Asam salisilat 138 mg L ⁻¹ (2 hari)	+++	+++	+++	+++
Sukrosa 3% (4 hari)	+++	+++	+++	+++
Sukrosa 6% (4 hari)	+++	+++	+++	+++
Triptofan 0 mg L ⁻¹ (7 hari)	+++	+++	+++	+++
Triptofan 100 mg L ⁻¹ (7 hari)	+++	+++	+++	+++

Keterangan : (-) = tidak terdeteksi; (+) = positif lemah; (++) = positif; (+++) = positif kuat; (++++) = positif sangat kuat

Senyawa penginduksi tidak memberikan hasil yang berbeda terhadap analisis senyawa alkaloid total secara kualitatif. Hal ini disebabkan analisis alkaloid yang dilakukan masih bersifat kualitatif terhadap alkaloid total. Perubahan senyawa alkaloid akibat perlakuan induksi dapat hanya terjadi pada senyawa alkaloid yang lebih spesifik seperti klistegin pada tanaman *Atropa belladonna* namun secara keseluruhan, alkaloid tropan total yang terbentuk tetap (Rothe *et al.* 2001). Dalam penelitian Peebles (2008) diperoleh bahwa sintesis alkaloid indol ajmalisin dan vinblastin pada tanaman *Catharanthus roseus* berkorelasi negatif dimana apabila biosintesis ajmalisin meningkat maka produksi vinblastin menurun. Hal ini yang juga menyebabkan perubahan kandungan alkaloid secara total tidak berubah.

Sampai saat ini belum diketahui senyawa alkaloid spesifik yang memiliki peran sebagai senyawa antimalaria pada tanaman jeruju ini. Fraksinasi senyawa alkaloid perlu dilakukan oleh tim penelitian yang terintegrasi dari bidang farmasi dan biokimia. Apabila senyawa spesifik yang berkhasiat obat diketahui maka upaya peningkatan

kandungan senyawa bioaktif dapat diukur secara kuantitatif. Perubahan kadar senyawa yang diukur secara kuantitatif dapat lebih terlihat jika dibandingkan dengan hasil analisis senyawa alkaloid total secara kualitatif.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diperoleh beberapa kesimpulan sebagai berikut.

1. Induksi dan proliferasi tunas *in vitro* jeruju yang terbaik adalah menggunakan media MS dengan 5.0 mg L^{-1} BAP berdasarkan peubah jumlah tunas per eksplan. Pucuk dan buku dapat digunakan sebagai sumber eksplan perbanyakkan *in vitro*.
2. Penambahan 1 mg L^{-1} GA₃ dalam media elongasi meningkatkan panjang ruas batang namun menghasilkan tunas yang tidak vigor dan perakarannya terhambat sehingga media elongasi tunas *in vitro* jeruju yang terbaik adalah media MS $\frac{1}{2}$.
3. Induksi kalus jeruju dapat diperoleh pada perlakuan media MS dengan 5.0 mg L^{-1} BAP + 0.1 mg L^{-1} 2,4-D berdasarkan peubah persentase eksplan berkalus. Eksplan daun lebih baik daripada eksplan batang dalam menginduksi kalus berdasarkan peubah waktu muncul kalus dan bobot basah kalus.
4. Seluruh metode induksi yang digunakan untuk akumulasi alkaloid total belum dapat meningkatkan alkaloid total secara kualitatif.

Saran

1. Metode perbanyakkan *in vitro* tanaman jeruju dapat menggunakan dua tahapan, yaitu induksi dan proliferasi tunas dengan media MS + 5.0 mg L^{-1} BAP. Dilanjutkan dengan tahap elongasi dan proliferasi tunas menggunakan media MS $\frac{1}{2}$ kali konsentrasi hara. Aklimatisasi dilakukan menggunakan media tanah, kompos dan arang sekam dengan perbandingan 1:1:1.
2. Diperlukan analisis senyawa alkaloid yang spesifik agar hasil induksi akumulasi alkaloid dapat diukur secara kuantitatif.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Juboory, K.H., R.M. Skirvin, D.J. Williams. 1998. Callus induction and adventitious shoot regeneration of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) leaf explants. *Scientia Horticulturae* 72:171-178.
- Amdoun, R., L. Khelifi, M. Khelifi-Slaoui, S. Amroune, E.H. Benyoussef, D.V. Thi, C. Assaf-Ducrocq, E. Gontier. 2009. Influence of minerals and elicitation on *Datura stramonium* L. tropane alkaloid production: Modelization of the *in vitro* biochemical response. *Plant Science* 177:81-87.
- Arigita L, B. Fernández, A. González, R.S. Tamés. 2005. Effect of the application of benzyladenine pulse on organogenesis, acclimatization and endogenous phytohormone content in kiwi explants cultured under autotrophic conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 43:161-167
- Arteca, R.N. 1996. *Plant Growth Substances Principles and Applications*. Chapman & Hall. New York. 332 hal.

- Dharmono. 2007. Kajian etnobotani tumbuhan jaruju (*Hydrolea spinosa*) suku Dayak Bukit Loksado. Paradigma Jurnal Pendidikan MIPA 1(2):51-65.
- Istiana dan L. Hayatie. 2009. Aktivitas plasmodial *in vivo* ekstrak etanol daun jeruju [Laporan kegiatan eksplorasi tanaman obat khas lahan basah Kalimantan yang berkhasiat sebagai obat antimalaria dan filariasis]. Universitas Lambung Mangkurat. Banjarmasin
- Kusumawati, I.W., Djatmiko, A. Rahman, H. Studiawan, W. Ekasari. 2003. Eksplorasi keanekaragaman dan kandungan kimia tumbuhan obat di hutan tropis Gunung Arjuno. Jurnal Bahan Alam Indonesia 2(3):100-104.
- Mohamed-Yasseen. 1994. In vitro shoot proliferation and production of sets from garlic and shallot. Plant Cell Tissue Organ Culture 23:243-247.
- Ntui, V.O., G. Thirukkumaran, S. Iioka, M. Mii. 2009. Efficient plant regeneration via organogenesis in "Egusi" melon (*Colocynthis citrullus* L.). Scientia Horticulturae 119:397-402.
- Pandiangan, D. dan N. Nainggolan. 2006. Peningkatan kandungan katarantin pada kultur kalus *Catharanthus roseus* dengan pemberian NAA. Hayati:1-7.
- Peebles, C.A.M. 2008. Metabolic engineering of the terpenoid indole alkaloid pathway of *Catharanthus roseus* hairy root [Thesis]. Houston: Iowa State University.
- Rothe, G., U. Garske, B. Drager. 2001. Calystegines in root cultures of *Atropa belladonna* respond to sucrose, not to elicitation. Plant Science 160:1043-1053.
- Sen J. dan S. Sen. 1995. Two-step bud culture technique for a high frequency regeneration of Gladiolus corms. Scientia Horticulturae 64:133-138.
- Sugiyama, M. 1999. Organogenesis In Vitro. Current Opinion in Plant Biology 2:61-64.
- Sutomo, Arnida, R. Yunus, N. Wathan. 2009. Karakterisasi golongan senyawa bioaktif daun jeruju yang berpotensi sebagai antimalaria melalui pendekatan *bioassay guide* [Laporan Kegiatan Ekstraksi Tanaman Obat Khas Lahan Basah Kalimantan yang Berkhasiat sebagai Obat Antimalaria dan Filariasis]. Universitas Lambung Mangkurat. Banjarmasin
- Syahid, S.F. dan Hernani. 2001. Pengaruh ZPT terhadap pembentukan dan pertumbuhan serta kandungan sinensetin dalam kalus pada tanaman kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*). Jurnal Litri 7(4):99-103.
- Taha, H.S., M.K. El-Bahr, M.M.S. El-Nasr. 2009. *In vitro* studies on Egyptian *Catharanthus roseus* (L.). II. Effect of Biotic and Abiotic Stress on Indole Alkaloids Production. Journal of Applied Sciences Research 5(10):1826-1831.
- Taiz, L. dan E. Zeiger. 2002. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc. Publisher. Sunderland. 690 hal.
- Veltcheva, M.R. dan D.L. Svetleva. 2005. In vitro regeneration of *Phaseolus vulgaris* L. via organogenesis from petiole explants. Journal of Central European Agriculture 6(1):53-58.
- Wattimena, G.A., L.W. Gunawan, N.A. Mattjik, E. Syamsudin, N.M.A. Wiendi, A. Ernawati. 1992. Bioteknologi Tanaman Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB. Bogor.hal.
- Yunita, R. dan E.G. Lestari. 2008. Induksi kalus dan regenerasi tunas pulai pandak (*Rauwolfia serpentine* L.). Berita Biologi 9(1):91-97.