

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanaman Pule Pandak (*Rauwolfia serpentina* Benth.)

2.1.1. Sistematika Tanaman Pule Pandak

Menurut Heyne (1987) tanaman pule pandak (*Rauwolfia serpentina* Benth.) mempunyai sistematika tumbuhan sebagai berikut :

- Divisio : Spermatophyta
- Subdivisio : Angiospermae
- Classis : Dicotyledoneae
- Ordo : Apocynales
- Famili : Apocynaceae
- Genus : *Rauwolfia*
- Spesies : *Rauwolfia serpentina* Benth.

2.1.2. Morfologi Tanaman Pule Pandak

Pule pandak (*Rauwolfia serpentina* Benth.) merupakan tanaman perdu yang mengandung getah, mempunyai tinggi antara 1-1,5 m. Tanaman pule pandak pada habitat aslinya memerlukan tanaman pelindung misalnya pohon Jati. Tanaman tersebut merupakan tanaman asli Indonesia, namun selain di Indonesia tanaman pule pandak juga terdapat di Srilangka, Myanmar, Cina Selatan, Hongkong, dan Taiwan. Di Indonesia tanaman pule pandak mempunyai nama lain yaitu akar tikus, sedangkan di luar negeri tanaman

ini lebih dikenal sebagai *Snake Root* (Hendrian, 1997). Pule pandak tumbuh di dataran rendah hingga daerah dengan ketinggian 1000 m di atas permukaan laut (Heyne, 1987).

Daun pule pandak merupakan daun tunggal, duduk berkarang, bentuk bulat telur memanjang, tepi daun rata, ujung daun runcing, pangkal daun runcing, susunan tulang daun menyirip, dan mempunyai tangkai daun yang pendek. Panjang daun berkisar antara 4-14 cm dan lebar antara 1-4 cm. Permukaan daun licin dengan permukaan atas berwarna hijau, sedangkan permukaan bawah berwarna hijau muda. Pada setiap buku muncul tiga lembar daun (Hamid, 1995).

Batang pule pandak merupakan batang berkayu, berbentuk bulat, beruas-ruas dan bercabang. Warna batang putih kehijauan dan kasar. Akar pule pandak merupakan jenis akar tunggang dan jarang mempunyai cabang serta tumbuh lurus ke bawah. Bunga tanaman pule pandak termasuk bunga majemuk berbentuk payung, setiap kuntum bunga terdiri dari 5 mahkota yang berwarna merah muda. Bunga pule pandak keluar dari ketiak daun atau ujung percabangan. Satu tanaman menghasilkan 1-7 malai bunga. Satu malai terdiri dari 36-39 biji. Berat biji rata-rata 0,03 g. Buah pule pandak berbiji satu berbentuk bulat lonjong dan bila sudah masak berwarna hitam (Zuhud dan Siswoyo, 1995).

Tanaman pule pandak mengandung beberapa macam alkaloid dan fenolik misalnya *reserpine*, *reserpinine*, *rescinamine*, *yohimbine*, *ajmaline*, *ajmalinine*, *ajamalicine*, *serpentine*, *serpentinine*, *sarpagine*, *samatine*, *tetraphillyne*, *tetraphillycine*, *deserpidine*, *raunesine*, *canescine*, *o-difenol*, dan *p-difenol*. (Hamid, 1995).

2.2. Kultur Jaringan (Kultur *In Vitro*)

Menurut Gunawan (1999), kultur jaringan didefinisikan sebagai usaha mengisolasi, menumbuhkan, memperbanyak, meregenerasikan protoplas (bagian hidup dari sel selain dinding sel), sel utuh atau agregat sel, atau bagian tanaman seperti meristem, tunas, daun muda, ujung batang, ujung akar, kepala sari, dan bakal buah dalam suatu lingkungan aseptik dan terkendali. Kultur jaringan merupakan aplikasi dari teori sel Schleiden dan Schwann, bahwa sel atau jaringan tumbuhan pada dasarnya mempunyai kemampuan totipotensi.

Sel atau jaringan tumbuhan yang ditanam dengan cara ini mempunyai kemampuan meregenerasi bagian-bagian yang diperlukan dalam upayanya untuk bisa tumbuh dengan normal, membentuk kembali menjadi tanaman yang utuh. Hal ini disebabkan di dalam masing-masing sel tanaman mengandung informasi genetik dan sarana fisiologis tertentu yang mampu membentuk tanaman lengkap bila ditempatkan pada lingkungan yang sesuai (Wetherell, 1982).

Sifat terpenting sel tumbuhan adalah kemampuannya untuk tumbuh dan membelah diri dan menghasilkan molekul-molekul seluler baru serta memperbanyak dirinya. Sel tumbuh dengan memasukkan unsur pembangun, berupa molekul-molekul sederhana dengan cara tertentu lalu mengubahnya menjadi molekul yang mengandung karbon. Dalam pertumbuhan dan perkembangan sel, sel memerlukan sumber energi yang dibutuhkan untuk menjamin agar reaksi – reaksi kimia selnya berjalan sesuai dengan biosintesis yang dikehendaki. Sel membutuhkan pemasukan energi untuk pemeliharaan dan pertumbuhan. Energi tersebut diperoleh melalui pemecahan molekul-molekul zat

makanan, sedangkan sel-sel yang bersifat autotrof akan melakukan fotosintesis dengan memanfaatkan energi langsung dari matahari. (Salisbury dan Ross, 1995).

Gunawan (1991) dan Nugroho dan Sugito (1996) menyebutkan bahwa faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan tanaman dalam kultur jaringan adalah :

1. Genotip dari sumber bahan eksplan yang digunakan

Genotip berpengaruh dalam induksi kultur, kemampuan eksplan untuk tumbuh dan berkembang secara nyata. Tiap-tiap tanaman berbeda mempunyai genotip yang berbeda.

2. Penggunaan media yang cocok

Media harus mengandung semua zat yang dibutuhkan oleh eksplan untuk tumbuh dan berkembang. Media terdiri campuran makro dan mikro, vitamin, gula dan hormon tumbuh. Berdasarkan komposisinya media dibedakan menjadi beberapa macam antara lain yaitu media *Vacin and Went* dan media *Murashige and Skoogs*. Media dapat berbentuk padat, semi padat, atau cair. Media padat merupakan media tumbuh dengan penambahan agar sebagai bahan pematat, sedangkan media semi padat yaitu media dengan penambahan agar, tetapi media tidak cukup padat. Media cair yaitu media tanpa penambahan agar, sehingga media tetap cair.

3. Keadaan lingkungan yang aseptik serta terkontrol.

Pierik (1987) menyatakan bahwa komposisi media terdiri dari :

1. Air

Air yang digunakan dalam kultur *in vitro* adalah aquades murni atau air yang mengalami penyulingan. Air ledeng tidak bisa digunakan sebagai komponen dalam media kultur, karena air ledeng banyak mengandung bermacam-macam senyawa pengotor.

2. Sumber energi

Sumber energi merupakan komponen media yang sangat penting karena menentukan pertumbuhan dan perkembangan dari eksplan. Hal ini disebabkan mekanisme fotosintesis pada eksplan belum berjalan. Bahan organik yang biasa yang digunakan sebagai sumber energi adalah senyawa karbohidrat misalnya sukrosa, glukosa, maltosa dan rafinosa. Sukrosa merupakan senyawa gula yang paling baik (Gunawan, 1995). Konsentrasi sukrosa yang biasa digunakan adalah berkisar antara 1-5%.

3. Nutrisi mineral

Nutrisi mineral dapat dibagi dalam tiga kelompok yaitu makronutrien, mikronutrien, dan sumber besi. Makronutrien diperlukan dalam jumlah banyak, sedangkan mikronutrien dan sumber besi diperlukan dalam jumlah kecil dan biasanya dalam jumlah mg/l. Untuk mengatasi hal tersebut maka untuk membuat media maka dibuat larutan persediaan (stok) campuran mikronutrien dibuat dengan kadar 1000 kali lebih pekat dari kadar yang dibutuhkan.

4. Bahan pematat

Bahan pematat yang biasa digunakan dalam pembuatan media adalah agar. Penggunaan agar selain sebagai pematat juga berfungsi untuk memungkinkan terjadinya kontak antara eksplan dengan media, tetapi eksplan tidak sampai tenggelam, sehingga masih memungkinkan terjadinya aerasi.

5. pH media

pH media antara 5,0- 6,5 merupakan kondisi yang optimum untuk pertumbuhan dan perkembangan sel atau jaringan. Pada pH media antara kurang dari 4,5 dan lebih dari 7 umumnya pertumbuhan dan perkembangan eksplan terhenti. Adanya larutan buffer dalam media berfungsi untuk menjaga agar pH sebelum dan sesudah diautoklaf pH media relatif tidak berubah. Contoh larutan buffer yang biasa digunakan yaitu Na_2HPO_4 dan KH_2PO_4 , sedangkan untuk mengatur pH maka digunakan larutan NaOH dan HCl.

6. Zat pengatur tumbuh

Zat pengatur tumbuh merupakan senyawa yang mempengaruhi proses fisiologis sel, meskipun diberikan dalam kadar rendah. Pada kultur *in vitro*, zat pengatur tumbuh yang biasa digunakan adalah zat pengatur tumbuh yang tergolong dalam hormon auksin dan sitokinin. Kelompok hormon auksin antara lain yaitu asam indol asetat (IAA), asam indol bensoat (IBA), naftalen asam asetat (NAA) dan asam diklorofenoksi asetat (2, 4 D). Zat pengatur tumbuh yang tergolong dalam hormon sitokinin yaitu kinetin dan bensil amino purin (BAP). Peran auksin dalam kultur *in vitro* yaitu merangsang pemanjangan, pembelahan sel serta memacu pembentukan kalus, sedangkan sitokinin berfungsi merangsang

pembelahan sel dan memacu diferensiasi, terlebih jika sitokinin ditambahkan bersama-sama dengan auksin.

Respon fisiologis eksplan terhadap pemberian hormon tergantung dari spesies, bagian tumbuhan (eksplan), fase perkembangan, konsentrasi hormon, dan faktor lingkungan (Salisbury dan Ross, 1995). Pemberian 2,4 D pada konsentrasi 0,5 mg/l dan BAP pada konsentrasi 2 mg/l memberikan efek terbaik dalam memacu pertumbuhan kalus (Edhi, 2002).

7. Vitamin

Beberapa vitamin yang sering digunakan dalam kultur *in vitro* yaitu mio-inositol, vitamin B, asam pantotenat, asam folat, riboflavin, asam askorbat, asam nikotinat, piridoksin, biotin dan tokoferol.

8. Kelating agen

Kelating agen berfungsi mengikat senyawa-senyawa yang bersifat labil karena perubahan pH. Contoh kelating agen yaitu EDTA yang mengikat Fe membentuk Fe-EDTA, sehingga memungkinkan senyawa besi tersebut dapat digunakan pada kisaran pH yang lebih luas.

Menurut Wetherell (1982) faktor lingkungan yang berpengaruh pada keberhasilan kultur *in vitro* yaitu :

1. Penyinaran

Penyinaran dalam kultur *in vitro* biasa digunakan lampu fluoresensi yang mempunyai kekuatan penyinaran 1000 – 4000 lux. Intensitas yang rendah dapat meningkatkan embriogenesis dan organogenesis.

2. Suhu

Sebagian besar laporan penelitian menyebutkan bahwa pemakaian suhu yang baik yaitu antara 20- 28⁰ C dan yang paling optimal pada suhu antara 25-27⁰ C.

3. Kualitas udara

Udara dalam ruang kultur perlu dijaga supaya tetap bersih dan bebas dari debu. Tanaman yang dikulturkan secara *in vitro* cenderung peka terhadap polusi, gas-gas dan lain-lain.

4. Kelembaban relatif

Kelembaban pada umumnya tinggi yaitu sekitar 80-90%. Kelembaban yang tinggi ini meningkatkan derajat kontaminasi.

2.3. Pertumbuhan Kalus

Pertumbuhan adalah pertambahan ukuran bersifat tidak dapat balik (irreversibel) (Sitompul dan Guritno, 1995). Pada organisme multiseluler pertambahan meliputi volume, berat, jumlah sel, banyaknya sitoplasma dan tingkat kerumitan. Pertumbuhan biasanya diketahui dengan mengukur massa segar dan massa kering. Massa segar adalah berat bahan tanaman setelah dipanen dan belum mengalami pengurangan air yang cukup besar. Sedangkan massa kering tanaman diperoleh dengan mengeringkan bahan tanaman selama 24-48 jam dan pada suhu 70-80⁰ C (Salisbury dan Ross, 1995)

Menurut Gunawan (1995) kalus merupakan kumpulan sel-sel yang belum terdiferensiasi yang merupakan hasil dari pembelahan sel yang terjadi secara terus-menerus. Dalam kultur *in vitro*, menginduksi terbentuknya kalus

merupakan salah satu tahap paling penting. Setelah itu diusahakan rangsangan agar terjadi diferensiasi. Kalus pada daun biasanya muncul pada daerah sepanjang tulang daun atau di antara tulang daun. Setiap jaringan memiliki kemampuan untuk menghasilkan kalus yang berbeda-beda. (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Untuk dapat menumbuhkan kalus, persyaratan minimal adalah penyediaan media yang sesuai baik komposisi maupun dosisnya bagi setiap jenis tanaman yang dikulturkan (Dodds and Roberts, 1984). Media Murashige dan Skoogs (MS) merupakan media yang paling baik untuk produksi kalus (Gamborg *et al.*, 1968). Media MS mengandung unsur esensial baik unsur makro maupun unsur mikro dalam kadar yang cukup tinggi dibandingkan dengan media yang lain (Wetherell, 1982).

Analisa dari pertumbuhan kalus, biasanya berdasarkan pada berat basah kalus, berat kering kalus atau jumlah sel. Pengukuran berat basah kalus merupakan cara yang paling cepat, sederhana, mudah dan tidak merusak kalus. Sedangkan berat kering kalus digunakan untuk mengestimasi adanya kemungkinan aktivitas biosintetis dari kultur jaringan (Street, 1977). Salisbury dan Ross (1992) menyatakan bahwa berat kering kalus lebih tepat dalam menunjukkan pertumbuhan dibandingkan berat basah. Curtis and Clark (1950) dalam Nugroho (2002) menyatakan berat kering tumbuhan terdiri dari 90% bahan organik dan 10% bahan anorganik.

2.4. Asam Askorbat dan Pencoklatan

Asam askorbat atau vitamin C mempunyai rumus molekul $C_6H_8O_6$. Berat molekul asam askorbat yaitu 172,12 mg. Dalam keadaan murni berbentuk kristal plat atau jarum. Senyawa asam askorbat larut dalam air dan alkohol, tetapi tidak larut dalam senyawa lemak. Bersifat tidak stabil, jika terkena panas, oksidasi, cahaya dan larutan basa (Kutsky, 1992).

Asam askorbat merupakan metabolit utama pada tanaman yang berperan sebagai anti-oksidan yang disebabkan oleh pengaruh lingkungan (Halliwell, 1984). Asam askorbat terdapat dalam semua jaringan tanaman dengan konsentrasi yang beragam. Kandungan asam askorbat dalam jaringan sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan, status nutrisi dan fase perkembangan tanaman (Leung dan Loewus, 1985). Asam askorbat sangat mudah teroksidasi secara reversibel menjadi asam L-dehidroaskorbat. Asam L-dehidroaskorbat secara kimia bersifat sangat labil dan dapat mengalami perubahan lebih lanjut menjadi asam L-diketogulonat yang tidak mempunyai aktivitas seperti asam askorbat. Pada tingkat sel, asam askorbat berperan penting dalam metabolisme sel. Asam askorbat juga berhubungan dengan respirasi sel dan aktivitas kerja enzim (Winarno, 1997).

George dan Sherrington (1984) menyatakan bahwa pencoklatan merupakan kondisi dimana eksplan berwarna coklat kehitaman setelah eksplan diisolasi dan diinkubasi pada media. Adanya pencoklatan disebabkan oleh aktivitas enzim oksidase misalnya enzim fenol oksidase maupun tirosinase. Enzim polifenol-oksidase yang bereaksi dengan substrat yaitu senyawa fenol akan

menghasilkan senyawa kuinon yang bersifat toksik bagi jaringan. Asam askorbat di dalam media kultur *in vitro* berperan sebagai zat anti-oksidan.

2.5 Eksplan dan Sterilisasinya

Eksplan yaitu bagian tanaman yang digunakan dalam kultur *in vitro*, sehingga menjadi dasar dari pembentukan kalus. Eksplan sebaiknya dipilih dari tanaman dewasa dengan asal-usul yang jelas dan tidak terinfeksi dari penyakit (Nugroho dan Sugito, 1996). Pada tanaman dikotil jaringan pada daun merupakan sumber eksplan yang banyak digunakan (Lea dan Leegood, 1999). Ada 3 hal yang mempengaruhi terhadap respon *in vitro* yaitu kemampuan regenerasi, tingkat fisiologi, dan kesehatan dari tanaman induk (Wetherell, 1984).

Meristem adalah kumpulan sel-sel yang mempunyai sifat selalu membelah. Ciri-ciri dari sel meristem yaitu sel berukuran kecil, inti sel relatif besar, sitoplasma padat, vakuola kecil dan banyak, dinding sel tipis yang biasanya masing-masing terdiri dari dinding primitif dan tersusun atas zat pektin atau propektin (Suryowinoto, 2000).

Sterilisasi paling mudah terhadap eksplan dapat dilakukan dengan cara meletakkan bagian tanaman ke dalam larutan desinfektan selama selang waktu tertentu, kemudian sisa desinfektan dibilas dengan aquades steril. Beberapa larutan desinfektan yang sering digunakan antara lain yaitu NaClO_3 0,5-5% selama 5-10 menit, alkohol 75% selama 0,5-1 menit, larutan fungisida selama 10-20 menit, dan H_2O_2 0,1% selama 20-30 menit. Sebelum dilakukan sterilisasi, potongan tanaman biasanya dibilas dengan larutan detergen dan air keran selama kurang lebih 10 menit (Herawan dan Hendrati, 1996).

2.6. Hipotesis

Penambahan asam askorbat dalam media kultur *in vitro* berperan sebagai antioksidan, sehingga mencegah pembentukan senyawa kuinon, sehingga mencegah terjadinya pencoklatan pada eksplan (George dan Sherrington, 1984). Asam askorbat mempengaruhi metabolisme dalam sel (Winarno, 1997). Berdasarkan hal tersebut maka hipotesis dari penelitian ini adalah penambahan asam askorbat dalam media sampai batas tertentu mengurangi terjadinya pencoklatan eksplan serta meningkatkan pertumbuhan kalus daun pule pandak.

