

Metode Elisitasi Menggunakan Ragi *Sacharomyces cerevisiae* H. untuk Meningkatkan Kandungan Bioaktif Kuinon Kalus *Morinda citrifolia* L. (Mengkudu)

Elicitation Method using *Sacharomyces cerevisiae* H. to Improve Quinone Bioactive content of *Morinda citrifolia* L. (Mengkudu) Callus

Widi Purwianingsih^{1*}, Yanti Hamdiyati¹

Prodi Biologi, Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA
Universitas Pendidikan Indonesia
Jl. Dr. Setiabudi no.229 Bandung 40154, Telp./Fax 022-2001937

Judul Pelari: Elisitasi Kalus *Morinda citrifolia* L.

Abstract

*An experiment about elicitation method used elicitors derived from *Sacharomyces cerevisiae* H. yeast to increased quinone of *Morinda citrifolia* L. callus, have been conducted. Objective of experiment was to increased concentration of bioactive compound quinone from *M.citrifolia* callus by elicitor derived from *S. cerevisiae* H.. Callus was induced from 1,5 month old seedling by culturing on solid Murashige & Skoog (MS) medium supplemented with 2,4-D 3.10^{-1} mg/L, aseptically. Callus was transfered into the same media and after 2 times subcultured, it was followed by elicitation with 0% (control), 2,5%, 5,0% and 7,5% (v/v) homogenate yeast. Before elicitation, growth and production curve have been made to certain the best time for elicitation. Product of elicitation was harvested on the second and fourth days after elicitation. Analysis of quinone content used GCMS (Gas Chromatography Mass Spectrum). The result showed that quinone content callus could be induced in MS medium supplemented with 2,4-D 3.10^{-1} mg/L. Addition elicitor from homogenate of *S. cerevisiae* H. on several concentration could be increased quinon concentration of callus. The optimum concentration of elicitor *S. cerevisiae* H. wich induced highest concentration of quinone, was 5,0% , on second days after elicitation. Increment of quinone concentration was influence by concentration of elicitor and harvest time.*

Key words: elicitation, elicitor, *Sacharomyces cerevisiae* H., *Morinda citrifolia* L. callus, quinone.

*Penulis untuk korespondensi, Tel/Fax, 022-2001937/08156005837
E-mail : wiedz_21962@yahoo.com

PENDAHULUAN

Salah satu sumber utama bahan obat adalah tumbuhan. Bahan-bahan bioaktif tumbuhan umumnya merupakan metabolit sekunder. Secara konvensional metabolit sekunder dapat diperoleh dengan cara mengekstraksi langsung dari organ tumbuhan. Namun cara tersebut memerlukan budi daya tanaman dalam skala besar, disamping itu proses ekstraksi, isolasi dan pemurniannya mahal.

Selain itu bila harus dibuat secara sintetis, harganya akan mahal karena struktur aktifnya sangat kompleks (Balandrin & Klocke,1988). Beberapa kelemahan metode konvensional tersebut, perlu diatasi dengan penemuan metode yang lebih baik.

Penggunaan kultur jaringan untuk produksi metabolit sekunder dapat digunakan sebagai alternatif karena dapat mengatasi berbagai permasalahan di atas. Metode kultur jaringan tidak memerlukan bahan yang banyak, lahan yang luas, dapat diproduksi secara terus menerus dan proses pemurniannya lebih mudah karena sel-sel hasil kultur jaringan tidak banyak mengandung pigmen sehingga biaya pemrosesannya lebih rendah. Pada kultur jaringan, kultur sel dan kultur kalus (kumpulan sel yang belum terorganisasi dan belum terdiferensiasi) berpotensi sebagai sarana produksi metabolit sekunder.

Menurut Mantell & Smith (1993), kandungan metabolit sekunder dalam beberapa kultur sel dan kultur kalus masih relatif rendah, oleh karena itu diperlukan metode dalam kultur jaringan yang dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder termasuk bahan bioaktif tumbuhan. Salah satu metode yang banyak dikembangkan adalah metode elisitasi. Elisitasi adalah metode untuk menginduksi secara simultan pembentukan fitoaleksin, metabolit sekunder konstitutif atau metabolit sekunder lain yang secara normal tidak terakumulasi (Barz, *et al.*,1990). Elisitasi dapat dilakukan dengan menambahkan elisitor abiotik maupun biotik. Elisitor biotik dapat berupa fungi atau ragi.

Banyak penelitian tentang elisitasi yang telah berhasil meningkatkan kandungan bioaktif tumbuhan dengan menggunakan elisitor fungi. Purwianingsih. (1997) telah berhasil meningkatkan kadar gossipol 2 kali lipat, dalam kalus *Gossypium hirsutum* yang ditambahkan elisitor berupa ekstrak fungi *Verticillium dahliae* dan *Rhizoctonia solani*. Kandungan gossipol juga dapat ditingkatkan oleh ekstrak fungi *Rhizopus arrhizus* (Hamdiyati, 1999). Beberapa penelitian elisitasi menggunakan ragi, terutama *Sacharomyces cerevisiae* H., juga telah berhasil meningkatkan kandungan bioaktif tumbuhan. Antosianin dalam kultur sel *Daucus carota* berhasil ditingkatkan

kadarnya sebesar 58% dengan menggunakan ekstrak sel *S. cerevisiae* H. (Survanalatha *et al.*,1994). Penelitian lain menunjukkan bahwa fraksi karbohidrat dari ekstrak ragi *S. cerevisiae* H. juga dapat menginduksi sintesis gliseolin sampai 200 µg/BK dalam kultur sel *Glycine max* dan meningkatkan bio sintesis barberin hingga 4 kali lipat pada kultur *Thalictrum rugosum* (Funk, *et al.*,1997).

Diantara banyak tumbuhan yang dikenal sebagai sumber bahan obat, *Morinda citrifolia* L. (mengkudu) , saat ini cukup populer pemanfaatannya karena telah diketahui banyak mengandung bioaktif yang bermanfaat sebagai bahan obat. Pada mengkudu telah teridentifikasi lebih dari 70 senyawa bioaktif. Senyawa-senyawa bioaktif tersebut tersebar dalam berbagai organ seperti akar, daun dan buah. Dari sekian banyak senyawa bioaktif yang berupa metabolit sekunder, ada beberapa yang dianggap penting diantaranya antrakuinon (golongan kuinon), skopoletin (golongan alkaloid), asam askorbat (vitamin), β-karotin ,l-arginin, dan proseronin yang merupakan prekursor dari seronin (golongan alkaloid) (Wang *et al.*,2002).

Salah satu kelompok antrakuinon yang ditemukan dalam *M. citrifolia* L. adalah *damnachantal*. Zat tersebut telah diketahui berpotensi sebagai bahan antikanker terutama pada *Lewis Lung Carcinoma* (Bangun & Sarwono, 2002).

Zenk *et al.* (1975 dalam Bajaj, 1988) telah berhasil memproduksi kultur suspensi sel *M. citrifolia* L. yang mengandung antrakuinon dengan menggunakan medium B5 dengan penambahan 2 mg/L NAA dan medium B5 dengan penambahan 10⁻⁵M NAA. Tewtrakul *et al.* (1997) telah berhasil menumbuhkan kalus yang mengandung antrakuinon dari daun *M. citrifolia* L. dalam medium Murashige & Skoog (MS) dengan penambahan zat pengatur tumbuh berupa 2,4-D dan kinetin. Purwianingsih. & Noviani, (2003), telah berhasil memperoleh kalus *M. citrifolia* L. yang mengandung beberapa metabolit sekunder dari sumber potongan jaringan daun. Kalus berhasil dibentuk pada medium MS dengan penambahan 2,4-D (2.10⁻¹-3.10⁻¹ mg/L) dan pada medium B5 dengan penambahan NAA (1.10⁻⁵dan 5.10⁻⁵ M). Metabolit sekunder yang berhasil diidentifikasi dari kalus dengan menggunakan GCMS adalah dari golongan alkaloid, flavonoid dan fenolik.

Berdasarkan uraian di atas, maka dilakukan penelitian yang bertujuan meningkatkan kandungan bioaktif golongan kuinon dalam kultur kalus *Morinda citrifolia L.* dengan metode elisitasi menggunakan ragi *S.cerevisiae* .

METODE PENELITIAN

1. Penyediaan dan Subkultur Kalus *M. citrifolia L.*

Eksplan untuk membentuk kalus berupa daun tanaman *Morinda citrifolia L.* berasal dari kecambah berumur 1,5 bulan yang ditumbuhkan dari biji (gambar 2.1A & 2.1.B). Medium yang digunakan adalah medium padat Murashige & Skoog (MS) dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D $3 \cdot 10^{-1}$ mg/L (Purwianingsih. & Noviani.,2003). Kalus yang terbentuk pada medium induksi, kemudian dipindahkan ke dalam medium yang sama setelah berumur kurang lebih 1.5 bulan atau sebagian besar eksplan tertutup kalus. Hasil terbaik subkultur didasarkan pada telah terjadinya pertumbuhan maksimal kalus, yaitu tidak tampak lagi sisa eksplan.

2.Pengukuran Kurva Tumbuh dan Kurva Produksi Kalus *M. citrifolia L.*

Kalus subkultur pertama dipindahkan ke medium baru, kemudian dilakukan pengukuran pertambahan berat dengan interval 4 hari selama 32 hari. Dari data tersebut dibuat kurva pertumbuhan kalus. Selain pengukuran kurva pertumbuhan juga dilakukan pengukuran kurva produksi, dengan terlebih dahulu diekstrak dengan methanol. Pengukuran bioaktif secara kualitatif dan kuantitatif menggunakan GCMS (Gas Chromatography Mass Spectrum). Kandungan bioaktif ditentukan berdasarkan % kandungan senyawa terhadap seluruh kandungan senyawa yang ada pada sampel. Dari kurva tumbuh dan kurva produksi, ditentukan waktu elisitasi terbaik.

3. Pengukuran Kurva Tumbuh *Saccharomyces cerevisiae H.*

Biakan murni *S. cerevisiae H.* berumur dua hari, diinokulasikan sebanyak dua oose ke dalam 4 ml NaCl ($2,56 \times 10^7$ sel/ml). Inokulum yang telah ditentukan jumlah selnya kemudian diambil sebanyak 3 ml dan diinokulasikan ke dalam 50 ml GYEA dan diinkubasi pada suhu 30 °C tanpa pengocokan. Untuk mendapatkan kurva tumbuh *S. cerevisiae H.* yang lengkap, sel dipanen

dengan interval 2 jam selama 24 jam. Jumlah sel dihitung dengan menggunakan metode cawan tuang (*dilution plate count*) dilakukan secara duplo (Irdawati, 1999). Penghitungan sel dilakukan mulai dari pengenceran 10^{-4} - 10^{-6} . Jumlah sel yang telah mencapai awal fase stasioner digunakan sebagai bahan elisitor (Eilert *et al.*, 1986).

4. Penyiapan Elisitor

Kultur *S. cerevisiae* H. pada awal fase stationer digunakan sebagai sumber elisitor , selanjutnya diautoklaf dan disentrifugasi. Pelet yang dihasilkan ,dibilas ,ditambah akuades sesuai volume pelet dan diautoklaf kembali. Homogenat yang dihasilkan dilarutkan dengan aquadest steril sesuai dengan konsentrasi yang akan digunakan, yaitu 0; 2,5; 5; 7,5 % (v/v) (Survanalatha *et al.*, 1994).

5. Elisitasi Kalus

Elisitasi dilakukan dengan menambahkan elisitor sebanyak 0,5 ml dengan konsentrasi yang telah ditentukan.Pada kalus kontrol ditambahkan aquadest steril. Pemanenan hasil elisitasi dilakukan hari ke- 0, 2, dan 4.Selanjutnya dilakukan analisis kandungan fenolik dan alkaloid dengan GCMS.

6. Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh waktu pemanenan dan konsentrasi elisitor terhadap ada tidaknya peningkatan senyawa kuinon dalam kultur kalus *M. citrifolia* L. dilakukan dengan analisis Two Way Anava dalam rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga kali ulangan pada tingkat kepercayaan 95 %. Jika hasil uji Anava menunjukkan adanya perbedaan yang nyata, maka analisis dilanjutkan dengan “ Duncan’s Multiple Range Test (DMRT)” pada tingkat kepercayaan 95 %. Uji statistic dilakukan dengan menggunakan Program Statistika for Windows Release 4.3 Statsoft. Inc.1993.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan dan Perkembangan Kalus *M. citrifolia* L. Eksplan yang berasal dari potongan daun hasil pengecambahan biji *M. citrifolia* L. berumur \pm 1,5 bulan dapat tumbuh menjadi kalus pada medium MS dengan penambahan 3×10^{-1} mg/l 2,4 D. Pertumbuhan kalus mulai terjadi ketika eksplan berumur tujuh hari setelah diinduksi dalam medium tersebut (Gambar 3.1). Kalus yang terbentuk bertekstur meremah dan agak lunak berwarna kecoklatan dan semakin coklat seiring bertambahnya umur kalus. Kalus akan terus berkembang pada eksplan dan mencapai perkembangan kalus maksimum pada hari ke-33, seperti yang ditunjukkan gambar 3.2.

Data pertumbuhan dan perkembangan kalus dan data hasil analisis kuinon dengan GCMS dapat dilihat pada Gambar 3.3. Pada Gambar 3.4 dapat dilihat bahwa produksi kuinon sudah dimulai sejak kultur berumur 0 hari. Pertumbuhan kalus sangat lambat, terlihat dari kurva yang relatif datar. Batas antara fase lag dan eksponensial (log) tidak jelas, tetapi pada hari ke-12 mulai nampak pertumbuhan yang lebih cepat dibanding sebelumnya. Hal ini menunjukkan sel sudah mulai teradaptasi dengan lingkungannya dan nutrien digunakan untuk metabolisme primer. Pertumbuhan mencapai maksimal pada hari ke-28. Peningkatan kandungan kuinon sejajar dengan pertumbuhan dari hari ke-0 sampai kultur berumur 20 hari, setelah itu terjadi pola yang berlawanan. Hal ini sesuai dengan pendapat Lindsey dan Yeoman (1983) bahwa terjadi persaingan prazat antara jalur metabolisme primer dengan jalur metabolisme sekunder, sehingga bila jalur metabolisme primer aktif, maka jalur metabolisme sekunder akan terhambat. Pola hubungan pertumbuhan kalus dengan kandungan quinone termasuk pola III, yaitu akumulasi metabolit sekunder sejajar terhadap kurva pertumbuhan (Endress, 1994). Berdasarkan hubungan antara pertumbuhan kalus dengan kandungan kuinon, maka ditentukan waktu elisitasi pada umur kalus 12 hari. Pada umur tersebut kalus sudah teradaptasi dengan lingkungan dan kandungan metabolit sekunder kuinon belum mencapai maksimal, sehingga diharapkan dengan pemberian elisitor akan merangsang peningkatan pembentukan bioaktif kuinon.

Pengukuran Kurva Tumbuh & Penyediaan Elisitor *S. cerevisiae* H. Kurva tumbuh *S. cerevisiae* H. yang dipanen setiap 2 jam sekali selama 24 jam dapat dilihat pada gambar 3.4. Berdasarkan hasil kurva tumbuh ragi *S. cerevisiae* tersebut, diketahui bahwa pertumbuhan maksimum dicapai pada jam ke 16 yaitu ketika sel sudah mencapai awal fase stationer. Waktu tersebut dipakai sebagai waktu paling tepat dilakukan pemanenan ragi sebagai elisitor. Hal ini dikarenakan pada saat pertumbuhan maksimum, komponen dinding sel jamur yang berguna sebagai bahan elisitor sudah terbentuk lebih sempurna dibandingkan yang belum maksimum pertumbuhannya. Vazquez-Flota, *et al.* (1994) menyatakan bahwa jika menggunakan homogenate jamur yang sudah diotoklaf sebagai bahan elisitor, respons sel tumbuhan terhadap elisitor berhubungan langsung dengan komposisi dari dinding sel jamur.

Pengaruh Elisitasi Terhadap Kandungan Kuinon. Kalus *M.citrifolia* yang dielisitasi dengan *S.cerevisiae*, menunjukkan respons seperti pada gambar 3.5. Dari gambar tersebut terlihat bahwa kalus hasil elisitasi berwarna lebih coklat dibanding kalus yang tidak dielisitasi. Terjadinya pencoklatan kemungkinan merupakan suatu respons hipersensitif yang ditunjukkan oleh jaringan tumbuhan karena adanya cekaman dalam hal ini elisitor. Hal ini sesuai dengan pendapat Isaac (1992) yang mengemukakan bahwa jaringan yang mengalami cekaman akan mengalami pencoklatan dan hambatan pertumbuhan. Isaac juga menyatakan bahwa pada sel-sel yang mengalami cekaman terjadi peningkatan akumulasi metabolit sekunder tertentu. Berdasarkan Tabel 3.1.dan Gambar 3.6. dapat dilihat beberapa hal sebagai berikut:

Elisitasi pada hari ke 0, belum tampak terjadinya pengaruh elisitor terhadap peningkatan kandungan kuinon. Belum terjadinya pengaruh elisitor pada hari ke 0, kemungkinan disebabkan belum terjadi kontak antara sel-sel kalus dengan komponen elisitor. Dengan demikian sel-sel kalus belum merespons elisitor untuk terjadinya induksi elisitasi yang mengakibatkan peningkatan kandungan kuinon. Hasil penelitian Yoshikawa (1993), mendukung hipotesis bahwa elisitor menginisiasi aktivitas fisiologi pada sel tumbuhan melalui interaksi reseptor pada membran plasma

sel tumbuhan, dan hal ini kemungkinan belum terjadi pada hari ke 0, karena belum terjadi interaksi reseptor pada membrane plasma.

Waktu pemanenan hari ke 2 dan hari ke 4 tampak bahwa elisitor yang diberikan dapat direnspons dengan peningkatan kandungan kuinon. Hal ini dapat dilihat dari peningkatan kandungan kuinon pada perlakuan (terutama pemberian elisitor 2,5% dan 5%) dibanding kontrol (elisitor 0%). Namun demikian pada konsentrasi elisitor 7,5% baik untuk waktu pemanenan hari ke 2 maupun hari ke 4 kandungan kuinon mulai mengalami penurunan dibandingkan kontrol. Pada waktu pemanenan hari ke 2 kandungan kuinon yang dielisitasi dengan 7,5% sebesar 3,24% sedangkan kontrol menunjukkan angka sebesar 3,59%. Sedangkan pada pemanenan hari ke 4 kandungan kuinon yang dielisitasi dengan 7,5% sebesar 2,54% sedangkan kontrol menunjukkan angka sebesar 3,53%. Terjadinya penurunan kandungan kuinon pada pemberian elisitor dengan konsentrasi 7,5%, kemungkinan dapat disebabkan pada konsentrasi tersebut seluruh reseptor yang mengenali komponen elisitor telah terisi jenuh dengan elisitor sehingga penambahan molekul elisitor yang diberikan tidak dapat mempengaruhi lagi peningkatan kandungan kuinon. Sedangkan kandungan kuinon akibat pemberian elisitor 7,5% dari hari ke 2 ke hari ke 4 yang juga mengalami penurunan (dari 3,24% menjadi 2,54%) kemungkinan disebabkan sintesis metabolit sekunder ini terjadi dalam waktu yang sangat singkat, dimana pada hari kedua masih cukup tinggi tetapi pada hari ke 4 telah mengalami penurunan. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Barz, *et al.* (1990), terhadap terpenoid pada kapas yang menunjukkan bahwa terpenoid pada jaringan tumbuhan hanya disintesis dalam waktu yang sangat singkat karena dimetabolisme oleh jaringan tumbuhan menjadi senyawa yang kurang toksik. Hal ini merupakan faktor yang berperan dalam pengaturan akumulasi metabolit sekunder.

Kandungan kuinon hari ke 2 lebih tinggi dibanding hari ke 4 terutama pada konsentrasi elisitor 2,5% dan 5,0%. Dari data ini tampak bahwa waktu pemanenan berpengaruh terhadap kandungan kuinon. Sesuai dengan hasil penelitian Purwianingsih (1997) pada kalus *Gossypium*

hirsutum, menunjukkan bahwa waktu pemanenan berpengaruh terhadap kandungan metabolit sekunder gosipol. Hasil tersebut kemungkinan disebabkan adanya efek ‘post binding’ (Ridge,1991). Efek ‘post binding’ terjadi karena adanya perbedaan kecepatan kemampuan sel dalam merespons suatu sinyal. Hasil elisitasi menunjukkan bahwa peningkatan kandungan tertinggi kuinon dicapai pada konsentrasi elisitor 5,0% pada waktu pemanenan hari ke 2. Peningkatan kandungan kuinon setelah diberi elisitor kemungkinan disebabkan oleh peningkatan sintesis enzim yang terlibat dalam sintesis kuinon. Isaac (1992) menyatakan bahwa elisitor dapat menginduksi akumulasi metabolit sekunder dalam jaringan tumbuhan dengan menstimulasi sintesis mRNA melalui peningkatan laju transkripsi gen-gen terlibat. Seperti halnya hasil penelitian Joost *et al.* (1995) pada tanaman kapas yang dielisitasi oleh jamur *Verticillium dahliae* yang viable dan yang sudah diotoklaf, menunjukkan terjadinya peningkatan jumlah mRNA untuk sintesis 3-hidroksi-3-metil-gutaril KoA reduktase (HMGR). HMGR merupakan enzim yang penting dalam sintesis gosipol. Peningkatan aktivitas HMGR dapat meningkatkan “pool” asam mevalonat yang diperlukan untuk sintesis gosipol.

Hasil-hasil penelitian di atas menunjukkan bahwa konsentrasi elisitor dan waktu pemanenan mempengaruhi kandungan kuinon dalam kultur kalus *M.citrifolia*. Hal ini sesuai dengan pernyataan Buitelaar & Tramper (1991) bahwa elisitasi antara lain dipengaruhi oleh konsentrasi elisitor dan waktu pemanenan atau waktu kontak antara elisitor dengan sel tumbuhan.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa elisitor *Sacharomyces cerevisiae* H. efektif dalam meningkatkan kandungan bioaktif kuinon pada kultur kalus *Morinda citrifolia* L.. Kandungan kuinon tertinggi dihasilkan oleh kultur kalus *M citrifolia* yang dielisitasi pada konsentrasi 5,0% dan waktu pemanenan 2 hari. Konsentrasi elisitor *S. cerevisiae* H. dan waktu pemanenan merupakan faktor yang berpengaruh terhadap peningkatan kandungan kuinon pada kultur kalus *M citrifolia*.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat dilihat bahwa potensi elisitor *S.cerevisiae* dalam meningkatkan kandungan kuinon cukup baik, oleh karenanya perlu dilakukan penelitian serupa terhadap kandungan metabolit sekunder (bioaktif lainnya) lainnya baik pada tumbuhan yang sama atau pada tumbuhan lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, yang telah membiayai penelitian ini sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian Nomor: 032/SP2H/PP/DP2M/III/2007, tanggal 31 Desember 2006.

DAFTAR PUSTAKA

- Bajaj Y.P.S. 1988. Biotechnology in Agriculture and Forestry 4, Medicinal and aromatic Plants I. Springer Verlag. Berlin Heidelberg, New York, London, Tokyo, Paris.
- Balandrin, M.F. & J.A. Klocke. 1988. Medicinal, Aromatic and Industrial Materials from Plants. In : Biotechnology in Agriculture and Forestry. 4 ed. Bajaj, Y P S. Springer Verlag, Berlin.
- Bangun A.P. & B. Sarwono. 2002. Khasiat & Manfaat Mengkudu. Agro Media. Tangerang.
- Barz, W., Bless, W., Borger-Papendorf, G., Gunia, W., Makenborck, U., Meier, D., Otto, C.H., and Super, E. 1990. Phytoalexin as the part of induced defense reaction in plant : Their elicitation, function, and metabolism. In: Bioactive compound of Plants (Ciba Foundation Symposium 154). Wiley. hichester.p.141-156.
- Buitelaar, R.M., and Tramper, J.1991. Strategies to improve the production of secondary metabolite with plants cell culture a literature review. In : Production and exretion of secondary metabolites by plant cell cultures of *Tagetes*. p. 6-45
- Endress, R. 1994. Plant cell biotechnology. Springer Verlag. Berlin. P.121-255.
- Funk, C., Gugler, K., and Bordelius, P.1997. Increased secondary product formation in plant suspension cultures after treatment with yeast carbohydrate preparation (elicitor). Phytochemistry. 26:401-405.
- Hamdiyati, Y. 1999. Perbandingan kandungan gossipol pada kultur kalus *Gossypium hirsutum* L. ev. Tamcot SP-37 yang dielisitasi dengan homogenat jamur *Rhizoctonia solani* Kuhn dan *Rhizopus arrhizus*. Thesis Magister sains (Biologi). ITB. Bandung.

- Isaac, S. 1992. Fungal Plant interactions. Chapman & Hall. London.p.186-206.
- Irdawati. 1999. Produksi asam asetat dari hidrolisat ubi kayu oleh kultur campuran *Sacharomyces cerevisiae H.* dan *Acetobacter aceti* secara fermentasi bawah permukaan. Thesis Magister Sains (Biologi). ITB. Bandung
- Joost, O., Bianchini, G., Bell.A.A., Benedict, C.R., and Magill, C.W. 1995. Diferential induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in two cotton species following inoculation with *Verticillium*. The American Phytopathological Society. 8 (6):880-885.
- Lindsey, K. and Yeoman, M.M. 1983. Novel Experimental system for studying the production of secondary metabolite by plant tissue cultures. In: Plant Biotechnology. Mantell, S.H. and Smith, H (Eds) Cambridge University Press. London.
- Mantell & smith. 1983. Cultural factor that influence secondary Metabolites Accumulation in Plant Cell & Tissue Cultures. In : Plant Biotechnology. Mantell S.H. & Smith (eds.).Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- Purwianingsih. W. (1997). Efek pemberian homogenat *Verticillium dahliae* & *Rhizoctonia solani* sebagai elisitor terhadap kandungan gopipol dalam kultur kalus *Gossypium hirsutum*. Thesis Magister Sains (Biologi). ITB. Bandung.
- Purwianingsih, W. & Noviani, R. 2003. Pembentukan Kalus *Morinda citrifolia L.* (Mengkudu) yang mengandung beberapa Metabolit Sekunder pada Medium Buatan. Laporan Dana Rutin UPI Bandung. Tidak diterbitkan
- Suvarnalatha, G., Rajendran, L., Ravishankar, G.A., and Venkataraman, L.V.1994. Alicitation of anthocyanin production in cell cultures of carrot (*Daucus carota L.*) by using elicitors and abiotic stress. Biotechnology letters. 16(12):1275-1280.
- Tewtrakul *et al.* 1997. Callus Induction of *Morinda citrifolia L.*, by Plant Tissue Culture, Journal of Pharmaceutical Sciences. Tersedia <http://www.clib.psu.ac.th/academic/tsupi> 1.htm.
- Vazquez-Flota, F., Moreno-Valenzuela, O., Miranda-Ham, M.L., and Coello-Coello, J. Loyola-Vargas, V.M.1994.Catharanthine and ajmalicine synthesis in *Catharanthus roseus* hairy root cultures. Plant Cell, Tissue, and Organ Culture. 38. 273-279.
- Wang,M.Y. *et.al.* (2002). Tersedia dalam : http://www.getnoni.com/noni_research.pdf. (Diakses 15 Desember 2005).
- Yoshikawa, M., Yamaoka, N., and Takauchi, Y. (1993). Elicitors : Their significance and primary modes of action in the of plant defence reactions. Plant Cell Physiology. 34 (8): 1163-1173.

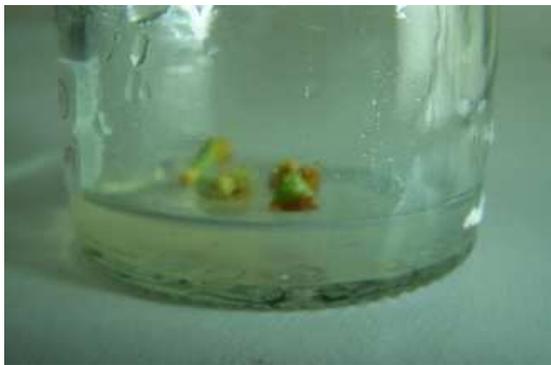
TABEL & GAMBAR



A

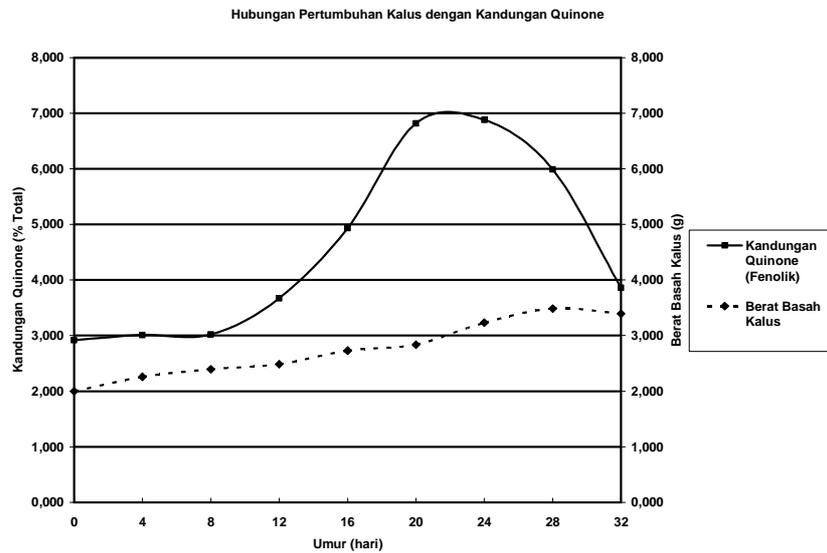
B

Gambar 2.1.A (biji *M.citrifolia*), B (kecambah *M.citrifolia* berumur 1,5 bulan yang dijadikan sumber eksplan).

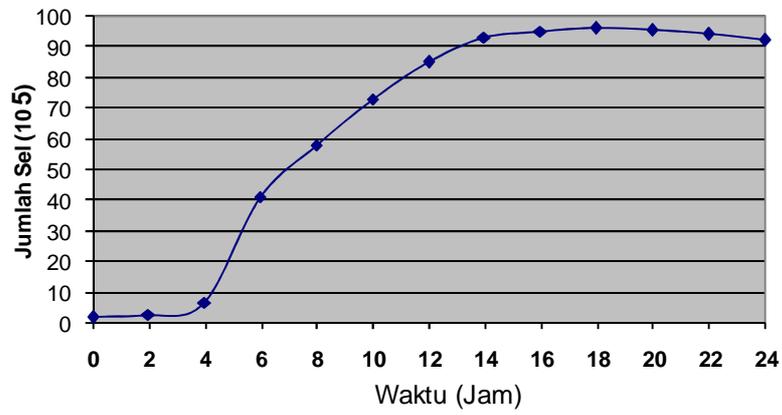


Gambar 3.1. Kalus yang terbentuk setelah tujuh hari penanaman

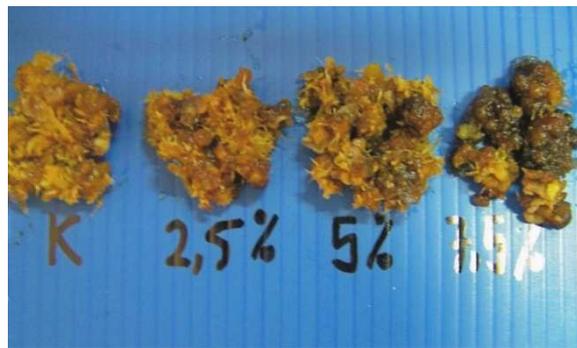
Gambar 3.2 Kalus yang telah mencapai pertumbuhan maksimal selama 33 hari memiliki struktur yang kompak dengan tekstur lunak



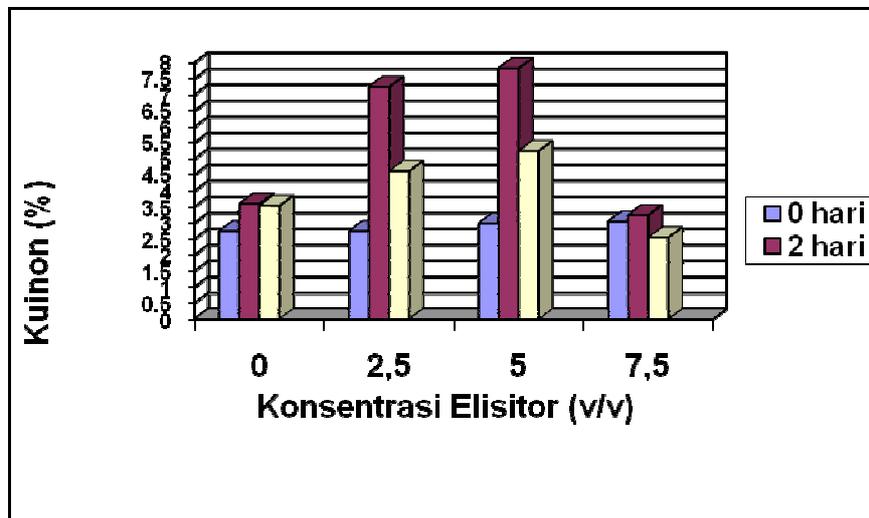
Gambar 3.3. Hubungan Pertumbuhan Kalus dengan Kandungan Quinon



Gambar 3.4 Kurva Pertumbuhan *Sacharomyces cerevisiae* H.



Gambar 3.5 Kalus kontrol (K) & kalus hasil elisitasi.



Gambar 3.6. Pengaruh Penambahan Elisitor *S.cerevisiae*H. dalam berbagai Konsentrasi dan Waktu Pemanenan terhadap kandungan Kuinin pada Kultur Kalus *M.citrifolia* L..

Konst. (% v/v)	0	2,5	5,0	7,5
Hari ke				
0	2,74 ± 0,43	2,74 ± 0,12	2,98 ± 0,08	3,04 ± 0,08
2	3,59 ± 0,15	7,24 ± 0,58	7,82 ± 1,21	3,24 ± 0,24
4	3,53 ± 0,33	4,61 ± 0,32	5,24 ± 0,28	2,54 ± 0,19

Tabel 3.1. Pengaruh Penambahan Elisitor *S.cerevisiae* dalam berbagai Konsentrasi dan Waktu Pemanenan terhadap kandungan Kuinon (%) pada Kultur Kalus *M.citrifolia*.