

TESIS
EFEK DIFERENSIASI SEL DAN JENIS ORGAN
TERHADAP KANDUNGAN ASAM AMINO
DAN FITOSTEROID TANAMAN *Solanum mammosum*,
Solanum laciniatum* dan *Solanum khasianum



JKK
71 SO 198
191
E

Oleh :
SITI FATIMAH
NIM. 099511901/M

PROGRAM STUDI ILMU FARMASI
PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
1998

TESIS
EFEK DIFERENSIASI SEL DAN JENIS ORGAN
TERHADAP KANDUNGAN ASAM AMINO
DAN FITOSTEROID TANAMAN *Solanum mammosum*,
Solanum laciniatum* dan *Solanum khasianum

UNTUK MEMENUHI PERSYARATAN PENDIDIKAN
PASCASARJANA PROGRAM MAGISTER
PROGRAM STUDI ILMU FARMASI PADA
PROGRAM PASCASARJANA UNIVERSITAS AIRLANGGA

Oleh :
SITI FATIMAH
NIM. 099511901/M

PROGRAM STUDI ILMU FARMASI
PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
1998

LEMBAR PENGESAHAN

Tesis ini telah diuji :

Pada tanggal : 16 Februari 1998

Oleh :

Pembimbing Ketua,



Dr. rer. nat. Gunawan Indrayanto, Apt.
NIP 130 541 814

Pembimbing,



Dr. rer. nat. Mulja Hadi Santosa, Apt.
NIP 130 809 084

Mengetahui,
Ketua Program Studi Ilmu Farmasi



Dr. Widi Soeratri, Apt. DEA
NIP 130 611 501

PANITIA PENILAI/PENGUJI TESIS

KETUA : PROF. DR. H. Noor Cholies Zaini, Apt.

ANGGOTA : PROF. DR. Sutarjadi, Apt.

DR. rer. nat. Gunawan Indrayanto, Apt.

DR. rer. nat. Mulja Hadi Santosa, Apt.

DR. H. Achmad Syahrani, Apt.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karuniaNya, sehingga kami dapat menyelesaikan penulisan tesis ini sebagai syarat Pendidikan Pascasarjana Program Magister - Program studi Ilmu Farmasi di Universitas Airlangga.

Pada kesempatan ini perkenankanlah kami mengucapkan rasa terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Dekan Fakultas Pertanian Universitas Bangkalan Madura yang telah memberikan ijin kepada kami untuk mengikuti program pendidikan Pascasarjana.
2. Tim Managemen Program Doktor (TMPD) Departemen Pendidikan dan Kebudayaan R.I. yang telah memberikan beasiswa selama pendidikan kami.
3. Dr. rer. nat. Gunawan Indrayanto dan Dr. rer. nat. Mulja Hadi Santosa sebagai pembimbing kami, yang telah banyak memberikan saran, nasehat dan bimbingan selama kami mengikuti pendidikan hingga terselesaikannya penulisan tesis ini.
4. Kepala Laboratorium Bioteknologi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga beserta staf yang telah memberikan bantuan dan fasilitas selama berlangsungnya penelitian ini.
5. Kepala Laboratorium Instrumen Fakultas Farmasi Universitas Airlangga beserta staf yang telah memberikan, bantuan dan fasilitas khususnya alat spektrofotometer UV-VIS HP 8452.
6. Kepala Laboratorium Dasar Bersama (LDB) Universitas beserta staf yang telah memberikan, bantuan dan fasilitas khususnya untuk analisa asam amino (Asam amino analyser) dan untuk analisa fitosteroid dengan GC detektor FID.
7. Ibu Dr. Ika Mariska (Puslitbangtri, Bogor) yang telah memberikan bahan penelitian yang berupa organ daun dan buah *Solanum khasianum*.

8. Bapak Marsono (Kebun Raya Purwodadi Pasuruan) yang telah memberikan bahan penelitian yang berupa organ daun dan buah *Solanum mammosum*
9. Bapak Dr. Ahmad Syahrani, Apt., Drs. Robby Sondakh, MS. dan Ibu Dra. Wahyu Utami, MS serta teman-teman S2 dan S1 yang bekerja di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan bantuan selama penelitian ini berlangsung.
10. Kedua orang tua dan saudara-saudaraku tercinta yang senantiasa memberikan dorongan baik moril maupun materiil selama ini.

Akhirnya rasa terima kasih juga kami sampaikan kepada semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu, sehingga tesis ini dapat terselesaikan.

Semoga Allah SWT memberikan balasan dengan limpahan rahmat dan hidayahNya. Amin.

Surabaya, Februari 1998

RINGKASAN

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui efek diferensiasi sel dan organ terhadap kandungan asam amino dan fitosteroid. Studi ini dilakukan pada tanaman *Solanum mammosum*, *Solanum laciniatum* dan *Solanum khasianum*.

Sel terdiferensiasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur amobil "CGS" dan kultur amobil dengan bahan pendukung alginat. Kultur sel terdiferensiasi hanya dilakukan pada tanaman *Solanum mammosum*, karena sel dari *Solanum laciniatum* tidak mampu membentuk struktur kompak "CGS", sedangkan pada kultur kalus dari *Solanum khasianum* belum tersedia di Laboratorium Bioteknologi Farmasi Universitas Airlangga.

Organ tanaman yang digunakan adalah pucuk dari *Solanum mammosum* (kode smp), *Solanum laciniatum* (kode SL-7) dan *Solanum khasianum* (kode SK-5) yang diperoleh dari kultur pucuk yang ada di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga; organ daun dan buah *Solanum mammosum* diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi Pasuruan Jawa Timur dan organ daun serta buah *Solanum khasianum* diperoleh dari Pusat Penelitian Tanaman Industri Bogor Jawa Barat.

Disamping itu digunakan pula kultur kalus dan kultur suspensi dari *Solanum mammosum* dan *Solanum laciniatum* sebagai bahan penelitian.

Dari hasil penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa diferensiasi sel dan jenis organ menyebabkan perubahan profil asam amino dari *Solanum mammosum*, *Solanum laciniatum* dan *Solanum khasianum*.

Organ buah mempunyai kadar asam amino relatif lebih rendah dari organ daun, sedangkan kultur sel yang terdiferensiasi (kultur amobil "CGS" dan amobil alginat) mempunyai kadar relatif lebih rendah dari kultur kalus dan kultur suspensi bebasnya.

Glutamat dan aspartat merupakan komponen asam amino utama. Histidin, tirosin dan metionin selalu menunjukkan komponen asam amino dengan kadar relatif rendah.

Setelah glutamat dan aspartat, lisin dan leusin banyak terdapat pada kultur kalus dan suspensi, alanin banyak terdapat pada kultur terdiferensiasi (amobil "CGS" dan amobil alginat), arginin banyak terdapat pada kultur pucuk, leusin dan prolin banyak terdapat pada organ daun dan glisin, prolin serta leusin banyak terdapat pada organ buah.

Organ buah mempunyai kadar protein lebih rendah dari organ daun, sedangkan kultur sel terdiferensiasi mempunyai kadar protein lebih tinggi dari kultur kalus dan kultur suspensi bebasnya.

Nilai rasio asam amino terhadap protein total pada organ buah lebih tinggi daripada organ daun, sedangkan pada kultur terdiferensiasi lebih rendah daripada kultur kalus dan kultur suspensi bebasnya.

Diferensiasi sel tidak menyebabkan perbedaan kandungan fitosterol, yaitu sitosterol merupakan komponen fitosterol utama dalam ekstrak fraksi kloroform dan hidrolisat dari semua kultur sel. Sedangkan pada jenis organ yang berbeda terdapat perbedaan fitosterol dalam ekstrak fraksi hidrolisatnya.

Pada kultur pucuk dan organ daun, kolesterol juga merupakan komponen fitosterol utam. Dan diantara organ yang mampu memproduksi solasodina terdapat perbedaan kandungan fitosterol dalam ekstrak fraksi hidrolisatnya.

Dari berbagai jenis kultur dan organ yang diamati, hanya kultur pucuk *Solanum laciniatum* (kode SL-7) dan organ buah *Solanum mammosum* dan *Solanum khasianum* yang mampu memproduksi solasodina.

Tidak terdapat hubungan antara diferensiasi sel , keberadaan arginin dan produksi solasodina, khususnya pada tanaman *Solanum mammosum* dan *Solanum khasianum*.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	i
UCAPAN TERIMAKASIH	ii
RINGKASAN.....	iv
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Tinjauan Tentang <i>Solanum mammosum</i> , <i>Solanum laciniatum</i> dan <i>Solanum khasianum</i>	6
2.2. Tinjauan tentang kultur jaringan tanaman	9
2.3. Tinjauan tentang produksi metabolit sekunder pada tanaman	11
2.4. Tinjauan tentang produksi metabolit sekunder dengan sistem kultur jaringan tanaman	14
2.5. Tinjauan tentang asam amino	16
2.6. Tinjauan tentang steroid	18
2.7. Tinjauan tentang solasodina	19
BAB III. METODE PENELITIAN	20
3.1. Tempat dan Waktu	20
3.2. Bahan Penelitian	20
3.2.1. Bahan Tumbuhan	21
3.2.2. Bahan Kimia	21
3.3. Alat-alat Percobaan	21

3.4. Metode Percobaan	22
3.4.1. Tahapan Percobaan	22
3.4.2. Pelaksanaan Percobaan	22
3.4.2.1. Pembuatan Media	22
3.4.2.2. Kultivasi Kultur	23
3.4.2.3. Pemanenan Kultur dan Organ	25
3.4.2.4. Penetapan Kandungan Asam Amino	25
3.4.2.5. Penetapan Kandungan Protein	30
3.4.2.6. Penetapan Kandungan Fitosterol dan Soladina	33
BAB IV. HASIL PENELITIAN	37
4.1. Karakter Pertumbuhan	37
4.2. Kandungan Asam Amino	40
4.3. Kandungan Protein	47
4.4. Rasio Kadar Asam Amino/Protein	49
4.5. Data Hasil Pengamatan Kadar Fitosteroid.....	54
4.6. Data Hasil Analisa Kualitatif Kandungan Solasodina	59
4.7. Hasil Analisa Kuantitatif kandungan Solasodina	60
BAB V. PEMBAHASAN	62
BAB VI. KESIMPULAN	72
BAB VII. SARAN	74
DAFTAR PUSTAKA	75
LAMPIRAN	79

DAFTAR GAMBAR

	halaman
Gambar 1 : Indeks pertumbuhan kultur suspensi, kultur amobil "CGS" dan kultur amobil alginat dari <i>Solanum mammosum</i> (kode SM)	39
Gambar 2 : Contoh kromatogram dari larutan standar asam amino.....	41
Gambar 3 : Contoh kromatogram dari hidrolisat organ buah <i>S. mammosum</i>	42
Gambar 4 : Histogram kadar asam amino (%BK) dari berbagai jenis kultur dan organ <i>S. mammosum</i> , <i>S. laciniatum</i> dan <i>S. khasianum</i>	44
Gambar 5 : Histogram kadar asam amino (%BK) kelompok aspartat dan glutamat dari organ daun dan buah <i>S. mammosum</i> dan <i>S. khasianum</i> serta <i>S. laciniatum</i>	45
Gambar 6 : Histogram kadar asam amino (%BK) kelompok aspartat dan glutamat dari kultur kalus, kultur suspensi, kultur amobil "CGS" dan kultur amobil alginat <i>Solanum mammosum</i> (kode SM).....	46
Gambar 7 : Histogram kadar protein (%BK) dari berbagai jenis kultur dan organ <i>S. mammosum</i> , <i>S. laciniatum</i> dan <i>S. khasianum</i>	48
Gambar 8 : Histogram rasio asam amino/protein total dari berbagai jenis kultur dan organ <i>S. mammosum</i> , <i>S. laciniatum</i> dan <i>S. khasianum</i>	51

Gambar 9 : Histogram rasio asam amino kelompok aspartat dan glutamat terhadap kadar protein total dari organ daun dan buah <i>S. mammosum</i> dan <i>S. khasianum</i> serta <i>S. laciniatum</i>	52
Gambar 10: Histogram rasio asam amino kelompok aspartat dan glutamat terhadap kadar protein total dari kultur kalus, kultur suspensi, kultur amobil "CGS" dan kultur amobil alginat <i>Solanum mammosum</i> (kode SM).....	53
Gambar 11: Contoh kromatogram GC detektor FID dari ekstrak fraksi kloroform kultur pucuk <i>S. laciniatum</i> (kode SL-7)	54
Gambar 12: Histogram kadar fitosterol ($\mu\text{g/g BK}$) dari berbagai jenis kultur dan organ <i>S. mammosum</i> , <i>S. laciniatum</i> dan <i>S. khasianum</i>	56
Gambar 13 : Histogram kadar fitosterol ($\mu\text{g/g BK}$) dari organ daun dan buah <i>S. mammosum</i> dan <i>S. khasianum</i> serta <i>S. laciniatum</i>	58
Gambar 14 : Contoh kromatogram GC detektor FID dari ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk <i>S. laciniatum</i> (kode SL-7)	60

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Komposisi media Murashige & Skoog yang dimodifikasi untuk pertumbuhan stok kultur di Laboratorium Bioteknologi Farmasi Universitas Airlangga
- Lampiran 2. Komponen tambahan bahan untuk pembuatan media kultur kalus dan kultur pucuk *S. mammosum*, *S. laciniatum* dan *S. khasianum*.
- Lampiran 3. Skema pembuatan media MS cair
- Lampiran 4. Skema ekstraksi fitosteroid
- Lampiran 5. Skema analisa asam amino dengan asam amino analyser
- Lampiran 6. Skema biosintesa steroid dalam tanaman
- Lampiran 7. Skema biosintesa asam amino
- Lampiran 9. Contoh data hasil analisa asam amino dari larutan standar
- Lampiran 10. Contoh data hasil analisa asam amino dari hidrolisat organ buah *Solanum mammosum*
- Lampiran 11. Contoh data hasil analisa kuantitatif kandungan fitosteroid dari fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* (kode SL-7)

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 1: Daftar komposisi larutan dapar untuk analisa asam amino	27
Tabel 2: Data hasil pengamatan indeks pertumbuhan (1) kultur suspensi, kultur amobil "CGS" dan kultur amobil alginat dari <i>Solanum mammosum</i> (kode SM)	37
Tabel 3: Data hasil pengamatan indeks pertumbuhan (2) kultur suspensi, kultur amobil "CGS" dan kultur amobil alginat dari <i>Solanum mammosum</i> (kode SM)	38
Tabel 4: Data hasil pengamatan kadar asam amino (%BK) dari berbagai jenis kultur dan organ <i>S. mammosum</i> , <i>S. laciniatum</i> dan <i>S. khasianum</i>	43
Tabel 5: Data hasil pengamatan kadar protein (%BK) dari berbagai jenis kultur dan organ <i>S. mammosum</i> , <i>S. laciniatum</i> dan <i>S. khasianum</i>	47
Tabel 6: Data rasio asam amino/protein total dari berbagai jenis kultur dan organ <i>S. mammosum</i> , <i>S. laciniatum</i> dan <i>S. khasianum</i>	50
Tabel 7: Data hasil pengamatan kadar fitosterol ($\mu\text{g/gBK}$) dari berbagai jenis kultur dan organ <i>S. mammosum</i> , <i>S. laciniatum</i> dan <i>S. khasianum</i> ...	55
Tabel 8: Data hasil pengamatan analisa kualitatif kandungan solasodina dengan KLT	59
Tabel 9: Data hasil pengamatan analisa kuantitatif kandungan solasodina dengan GC detektor FID..	61

DAFTAR SINGKATAN

BA	=	Benzil adenin
BB	=	Berat basah
BK	=	Berat kering
CGS	=	Compact Globular Structure
FID	=	Flame ionization Detector
GC	=	Gas Chromatography
HP	=	Hawlett Packard
KLT	=	Kromatografi Lapis Tipis
KJT	=	Kultur Jaringan Tanaman
KA	=	Kultur amobil
LAFC	=	Laminar Air Flow Cabinet
MS	=	Murashige dan Skoog
MA	=	Minimum area
MW	=	Minimum weight
rpm	=	Rotary per minute (putaran per menit)
R _f	=	Retardation factor (rasio jarak tempuh senyawa/jarak tempuh eluen)
SM	=	<i>Solanum mammosum</i>
SL	=	<i>Solanum laciniatum</i>
SK	=	<i>Solanum khasianum</i>
SUSP	=	Suspensi
UV - Vis	=	Ultra Violet Visibel



BAB I
PENDAHULUAN

Produksi solasodina dengan sistem Kultur Jaringan Tanaman (KJT) merupakan alternatif yang dapat dipilih untuk mendukung pencarian bahan baku obat. Telah banyak dilaporkan produksi metabolit sekunder dengan sistem KJT seperti pada tanaman aslinya.

Tetapi banyak pula penelitian yang melaporkan tentang ketidakmampuan sistem KJT untuk memproduksi metabolit sekunder solasodina.

Indrayanto dkk (1986) melaporkan bahwa dengan kultur kalus *Solanum mammosum* tidak mampu memproduksi metabolit sekunder, solasodina. Hanya mampu menghasilkan kolesterol kampesterol, stigmasterol dan sitosterol. Juga dengan strain baru *Solanum mammosum* yang ditanam pada media (kinetin 2 mg/lit dan NAA 0,5 g/lit) tetap tidak mampu memproduksi solasodina.

Ketidakmampuan kultur sel yang belum terdiferensiasi (kultur kalus) untuk memproduksi metabolit sekunder solasodina pada beberapa spesies *Solanum* juga telah banyak dilaporkan, misalnya kultur kalus *Solanum laciniatum*, *Solanum wrightii*, *Solanum khasianum*, *Solanum aviculare*, *Solanum aculestissimum*, *Solanum aculeastrum* (Carle, 1979; Indrayanto, 1983; Galanes et al, 1984; Nabeta, 1993; Drewes dan Steaden, 1995).

Sampai sekarang informasi tentang faktor-faktor yang berhubungan dengan produksi metabolit sekunder solasodina, khususnya pada *Solanaceae* relatif sedikit.

Emhke dan Eilert (1986) telah melaporkan adanya hubungan antara produksi solasodina dengan kandungan klorofil tanaman dan diferensiasi sel. Tetapi laporan ini ditentang oleh Indrayanto dan Doran. Indrayanto et al (1996) melaporkan bahwa kultur pada pucuk *Solanum mammosum* (SM) ternyata tidak mampu memproduksi solasodina. Sedangkan Doran (1994) melaporkan bahwa justru dengan kultur akar *Solanum aviculare* ternyata dapat memproduksi solasodina (29-32 mg/g BK). Hasil ini menunjukkan bahwa produksi solasodina tidak berkorelasi dengan kandungan klorofil.

Eltayeb et al (1997) melaporkan bahwa terdapat hubungan kandungan solasodina dengan perkembangan tanaman pada *Solanum nigrum* dan *Solanum incanum*. Dengan bertambahnya umur tanaman terjadi peningkatan kadar solasodina pada akar dan batang *Solanum nigrum*, batang dan daun *Solanum incanum*. Tetapi terjadi penurunan kadar pada daun dan buah *Solanum nigrum* dan akar *Solanum incanum*.

Informasi lain adalah pendapat Kaneko et al (1976) yang menduga bahwa sebagai sumber N pada biosintesa solasodina adalah L-arginin. Penelitian yang mengkonfirmasi pendapat ini adalah Erawati (1994), yaitu melaporkan bahwa pemberian L-arginin pada media dapat meningkatkan kandungan solasodina dari kultur pucuk *Solanum laciniatum*. Tetapi penelitian ini belum mampu mengungkap tentang hubungan antara kadar arginin dalam biomasanya dengan solasodina. Oleh karena itu penelitian yang mengarah pada tujuan di atas perlu dilakukan.

Profil asam amino merupakan salah satu alternatif yang dapat dipilih untuk diteliti. Menurut Erric et al (1994) bahwa asam amino aromatik, phenilalanin, tirosin

dan triptophan merupakan prekursor beberapa produk metabolit tanaman. Bray (1983) menambahkan bahwa terdapat beberapa alkaloid yang diturunkan secara langsung dari asam amino aromatik, yaitu tirosin dan phenilalanin sebagai prekursornya.

Schripsema et al (1991) juga melaporkan bahwa adanya perbedaan profil asam amino antara spesies tanaman yang satu dengan yang lain mempengaruhi terekspresikannya senyawa alkaloid pada kultur suspensi sel *Tabernaemontana divaricata*.

Produksi metabolit tanaman lain yang diduga ada hubungannya dengan biosintesa solasodina yang perlu diamati adalah profil fitosterolnya. Menurut Heftmann (1974) bahwa kolesterol mempunyai peranan penting dalam tanaman, sebagai prekursor, sebagai bahan dasar dalam biosintesa semua steroid tanaman.

Indrayanto (1983) menjelaskan bahwa kolesterol selain digunakan untuk biosintesa solasodina juga digunakan sebagai bahan dasar fitosterol lain, misalnya kampesterol dan sitosterol atau glikosidanya.

Indrayanto dkk (1996) juga telah melaporkan bahwa kultur kalus *Solanum mammosum* ternyata hanya mampu mengekspresikan kandungan fitosterol: kolesterol, kampesterol, stigmasterol dan sitosterol. Dimungkinkan dengan adanya diferensiasi sel dan pada berbagai jenis organ juga terdapat perbedaan kandungan serta profil fitosterolnya.

Menurut Yeoman (1986) salah satu alternatif diferensiasi sel yang dapat dilakukan adalah dengan amobilisasi, yaitu menjerap sel dengan suatu matriks

tertentu (misalnya alginat) dalam bentuk butiran yang mampu menciptakan keadaan lingkungan sel menyerupai *in vivo*-nya. Kondisi ini akan mengakibatkan pertumbuhan sel menjadi lambat sehingga diharapkan dapat digunakan untuk memanipulasi kemampuan sel untuk mengakumulasi metabolit sekunder dengan sistem KJT, karena prekursor yang ada akan lebih banyak digunakan untuk membentuk metabolit sekunder daripada untuk pembentukan metabolit primer.

Disamping cara di atas yang banyak membutuhkan matriks sebagai bahan pendukung, menurut Tsoulpha (1990), amobilisasi sel tanaman juga dapat diperoleh langsung dari kultur suspensi bebasnya (*Self Immobilisation*), yaitu bentuk butiran dari struktur kompak agregat sel. Struktur kompak dari agregat sel tersebut oleh Sierra (1991) diberi istilah *Compact Globular Structures (CGS)*.

Berdasarkan penelitian pendahuluan yang telah dilakukan diketahui bahwa kultur suspensi *Solanum mammosum* (Kode SM) mampu membentuk struktur kompak.

2. Masalah Yang Diteliti

Bagaimanakah efek diferensiasi sel dan jenis organ terhadap kandungan asam amino dan fitosteroid tanaman *Solanum mammosum*, *Solanum laciniatum* dan *Solanum khasianum*.

3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek diferensiasi sel dan jenis organ terhadap kandungan asam amino dan fitosteroid tanaman *Solanum mammosum*, *Solanum laciniatum* dan *Solanum khasianum*.

4. Manfaat Hasil Penelitian

Dengan di ketahui efek diferensiasi sel dan jenis organ terhadap kandungan asam amino dan fitosteroid tanaman *Solanum mammosum*, *Solanum laciniatum* dan *Solanum khasianum* akan menambah informasi tentang sistem biosintesis metabolit sekunder, khususnya solasodina.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. TINJAUAN TENTANG *Solanum mammosum*, *Solanum laciniatum* dan *Solanum khasianum*.

2.1.1. *Solanum mammosum*

Divisi	: Spermatophyta
Anak Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Solanales
Anak Bangsa	: Solanineae
Suku	: Solanaceae
Marga	: Solanum
Jenis	: <i>Solanum mammosum</i> (Lawrence, 1979)

Solanum mammosum L. diduga merupakan tanaman asli dari Amerika Tropik. Pusat penyebarannya di Amerika Tengah sampai Meksiko bagian Selatan dan sebagian besar Amerika bagian Selatan. Tanaman ini tumbuh baik di Pulau Jawa dengan ketinggian tempat sampai 1220 meter di atas permukaan laut (Miller, 1969; Backer and Van Den Brink, 1968).

Solanum mammosum L. termasuk tanaman herbaceous yang mempunyai tinggi antara 1,0-1,5 meter. Tanaman ini dibagi menjadi tiga varietas yang dapat dibedakan berdasarkan permukaan kulit buahnya, yaitu pertama buahnya memiliki bagian yang disebut "mamillaries", kedua buah yang tidak mempunyai bagian "mamillaries" dan ketiga buah yang berbentuk bola.

Kandungan alkaoid steroid penting dari tanaman ini adalah solasodina, yang merupakan salah satu bahan baku obat steroid (Mancek, 1989). Kandungan solasodina dalam buah *Solanum mammosum* berkisar antara 0,20-1,20 % BK, tetapi pada daunnya tidak ditemui adanya kandungan solasodina tersebut (Tarigan, 1980).

Indrayanto dkk (1986) melaporkan bahwa kultur kalus *Solanum mammosum* yang ditanam pada media MS (kinetin 2 mg/lit dan NAA 0,5 mg/lit) juga tidak mengandung solasodina dan diosgenin, tetapi hanya mengandung kolesterol, kampesterol, stigmasterol dan sitosterol.

Indrayanto dkk (1996) juga melaporkan bahwa didalam kultur pucuknya tidak ditemukan adanya kandungan solasodina.

2.1.2. *Solanum laciniatum*

Divisi	: Spermatophyta
Anak Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dycotyledonae
Bangsa	: Solanales
Anak Bangsa	: Solanineae
Suku	: Solanaceae
Marga	: Solanum
Jenis	: <i>Solanum laciniatum</i>

Solanum laciniatum adalah salah satu jenis dari marga Solanum yang banyak tumbuh di daerah tropis dan dapat menghasilkan solasodina.

Chadler dan Dodds, 1983; Conner, 1987, telah banyak melakukan studi tentang kandungan fitosteroid dalam kultur jaringan tanaman *Solanum laciniatum* Ait. Kultur kalus dan suspensinya mengandung solasodina berkisar antara 0,5 - 1,0 mg/g BK. Pada daun tanaman asal diperoleh sebesar $7,64 \pm 0,65$ mg/g BK, pada batang sebesar $0,93 \pm 0,12$ μ g/g BK dan pada akarnya mengandung $3,22 \pm 0,09$ μ g/g BK.

Conner juga menjelaskan bahwa dengan menginduksi terjadinya diferensiasi sel (kultur pucuk *Solanum laciniatum* Ait) produksi solasodina dapat ditingkatkan.

Indrayanto dkk (1995) juga melaporkan adanya kandungan solasodina dalam kultur pucuk *Solanum laciniatum*, tetapi pada kultur kalusnya tidak ditemui adanya kandungan solasodina.

2.1.3. *Solanum khasianum*

Divisi	: Spermatophyta
Anak Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Solanales
Anak Bangsa	: Solanineae
Suku	: Solanaceae
Marga	: Solanum
Jenis	: <i>Solanum khasianum</i>

Spesies ini juga merupakan salah satu jenis tanaman penghasil solasodina dari organ buah, daun dan batangnya (Tarigan, 1980).

Carle (1979) melaporkan bahwa dengan kultur kalusnya, *Solanum khasianum* tidak mampu memproduksi senyawa spesifik solasodina.

2.2. Tinjauan tentang Kultur Jaringan Tanaman

Kultur jaringan tanaman (KJT) dapat didefinisikan sebagai bagian atau jaringan tanaman yang telah dipisahkan dari tubuh tanaman asalnya dan ditumbuhkan dalam keadaan steril pada suatu media buatan dan sel-selnya mampu tumbuh serta mengadakan pembelahan (Doods, 1982; Mantel, 1983; Bhojwani dan Razdan, 1983). Apabila sel/jaringan/organ ditanam dalam media padat atau statis sebagai eksplant steril akan membelah dan tumbuh menjadi massa sel yang meristematis dan belum terdiferensiasi disebut *kultur kalus*. Bila kultur ini dipindahkan ke media cair dan diagitasi dengan kecepatan tertentu akan tumbuh sel-sel tunggal yang disebut *kultur suspensi*. Sedangkan bila kultur ini dijerap dalam suatu matriks tertentu sehingga pertumbuhannya akan menjadi lambat disebut *kultur sel amobil*.

KJT memerlukan media yang lebih kompleks dari tanaman utuhnya, yang unsur-unsurnya dapat dikelompokkan dalam 3 kelas, yaitu unsur makro, mikro dan organik. Komposisi dasar dari 3 unsur media yang biasa digunakan tertera pada lampiran 1. Modifikasi media disesuaikan dengan tujuan pembentukan kultur (Mattiasson, 1982).

KJT selain dimanfaatkan untuk bidang pertanian, sangat bermanfaat pula untuk bidang farmasi. Mantell (1985) menjelaskan bahwa secara umum tujuan dari pengembangan sistem KJT tersebut antara lain :

1. Produksi senyawa-senyawa tertentu yang berguna pada bidang farmasi atau medik.
2. Biotransformasi senyawa-senyawa tertentu menjadi senyawa baru yang dapat digunakan pada bidang farmasi atau medik.
3. Produksi senyawa-senyawa spesifik,
4. Seleksi galur tanaman unggul untuk dipakai pada bidang pertanian,
5. Multiplikasi tanaman secara cepat dan seragam.

Khususnya di bidang Farmasi dan biokimia, sistem KJT dapat dipakai untuk :

1. Perkembangan tanaman obat secara cepat dan seragam,
2. Studi jalur biosintesis senyawa kimia alami,
3. Mencari senyawa kimia baru dengan aktifitas tertentu,
4. Isolasi senyawa kimia tertentu yang sukar diperoleh dari tanaman yang ditanam secara konvensional (Heide, 1988).

2.3. Tinjauan tentang produksi metabolit sekunder pada tanaman

Metabolit sekunder didefinisikan sebagai senyawa kompleks yang diproduksi tanaman tidak untuk pertumbuhannya, tetapi digunakan untuk melindungi tubuh tanaman tersebut dari serangga, bakteri, cendawan dan patogen lainnya. Setiap spesies tanaman mempunyai senyawa spesifik tertentu (Manito, 1981 dan Frank, 1995). Misalnya solasodina banyak dijumpai pada beberapa spesies *Solanum*, tetapi tidak ditemui pada spesies tanaman yang lain.

Tempat pembentukan dari senyawa metabolit sekunder ini juga spesifik untuk tiap-tiap spesies tanaman tertentu. Demikian juga tentang tempat penimbunannya. Ada tanaman yang tempat pembuatan atau penimbunannya di akar, batang, daun, buah atau organ tanaman lainnya.

Terdapat beberapa kemungkinan tentang tempat pembuatan dan penimbunan senyawa metabolit sekunder dalam tubuh tanaman aslinya:

1. Tanaman yang tempat pembuatan dan penimbunan senyawa spesifik sama atau tidak adanya transport senyawa spesifik tersebut dalam tubuh tanaman.
2. Tanaman yang tempat pembuatan dan penimbunannya berbeda, berarti terdapat adanya transport senyawa spesifik dalam tubuh tanaman tersebut. Misalnya nikotin dari tanaman tembakau dibentuk pada akarnya, tetapi disimpan di dalam organ daun.

Indrayanto dkk (1996) melaporkan bahwa pada kultur pucuk, *Solanum laciniatum* mampu memproduksi senyawa solasodina, tetapi pada *Solanum mammosum* tidak mampu memproduksi senyawa solasodina.

Doran (1994) melaporkan bahwa dalam kultur akarnya, *Solanum aviculare* mampu memproduksi solasodina.

Contoh-contoh diatas menunjukkan bahwa terdapat adanya perbedaan mengenai tempat pembuatan dan penimbunan senyawa metabolit sekunder antara spesies tanaman yang satu dengan yang lainnya.

Informasi tentang biosintesa metabolit sekunder untuk masing-masing spesies tanaman sampai saat sekarang sangatlah terbatas.

Menurut Crocomo (1981) terdapat 3 hubungan antara pertumbuhan dan pembentukan metabolit sekunder, yaitu :

1. Pertumbuhan sel berlangsung bersama-sama dengan akumulasi metabolit,
2. Akumulasi terjadi setelah pertumbuhan sel menurun/berhenti,
3. Pertumbuhan sel terjadi sedikit mendahului pembentukan metabolit sekunder.

Menurut Manito (1981) tujuan dari pembentukan metabolit sekunder dalam tubuh tanaman tinggi juga tetap merupakan misteri. Sebagian besar penulis percaya bahwa produksi metabolit sekunder bertujuan untuk detoksifikasi dari timbunan metabolit yang beracun, yang tidak dapat dibuang oleh organisme tanaman tersebut dengan cara lain.

Dalam mikroorganismenya, terdapat beberapa tujuan dari pembentukan metabolit sekunder, yaitu :

1. Metabolit sekunder sebagai pembuangan metabolit primer,
2. Metabolit sekunder sebagai
3. Metabolit sekunder sebagai detoksifikasi
4. Metabolit sekunder sebagai hasil dari pertumbuhan yang tidak baik,
5. Metabolit sekunder sebagai pemegang peranan penting dalam proses biokimia tanaman.

Dijelaskan pula, bahwa terdapat 7 jalur biosintesa metabolit sekunder dalam mikroorganismenya, yaitu :

1. Substrat diturunkan dari metabolisme glukosa,
2. Substrat berasal dari metabolisme asam karboksilat,
3. Substrat berasal dari metabolisme asam amino,
4. Substrat berasal dari metabolisme glukosa dan asam karboksilat,
5. Substrat berasal dari metabolisme glukosa dan asam amino,
6. Substrat berasal dari metabolisme asam karboksilat dan asam amino
7. Substrat berasal dari hasil ketiga metabolisme di atas (Rohr et. al., 1990).

2.4. Produksi metabolit sekunder dengan sistem KJT

Telah banyak dilaporkan produksi metabolit sekunder tumbuhan seperti alkaloid, steroid, polifenol dan pigmen-pigmen tertentu yang telah diisolasi dan diidentifikasi dari sistem KJT.

Sierra (1991) telah berhasil mengisolasi alkaloid dari kultur suspensi *Tabernaemontana divaricata* dan *Catharanthus*.

Sistem KJT merupakan salah satu alternatif untuk produksi metabolit sekunder, karena sel dapat dikultur dalam jumlah yang relatif besar dengan kondisi yang terkontrol, dan permasalahan dalam hal pemanenan dapat dikurangi (Par, 1989 & Butelaar, 1992 dalam Zhang, 1994).

Namun ada beberapa pendapat yang mengatakan bahwa produksi metabolit sekunder dengan sistem KJT tidak selalu sebagai alternatif, karena ada beberapa spesies ternyata tidak mampu memproduksi metabolit sekunder bila dikultur.

Misalnya Indrayanto (1986) yang melaporkan bahwa kultur kalus *Solanum mammosum* ternyata tidak mampu memproduksi senyawa metabolit sekunder, solasodina seperti yang diperoleh pada tanaman aslinya. Pada tahun 1996, Indrayanto dkk juga melaporkan bahwa dengan kultur pucuk dari tanaman yang sama juga tetap tidak mampu memproduksi senyawa metabolit sekunder tersebut.

Ketidakmampuan kultur sel yang belum terdiferensiasi dalam memproduksi senyawa solasodina dari beberapa spesies *Solanum* juga telah

banyak dilaporkan. Misalnya *Solanum laciniatum*, *Solanum wrightii*, *Solanum khasianum*, *Solanum aviculare*, *Solanum aculestissimum*, *Solanum aculeastrum* (Carle, 1979; Indrayanto et al, 1983; Galanes et al, 1984; Nabeta, 1991; Drewes dan Steaden, 1995)

Menurut Zhang dan Harada (1994) terdapat beberapa hal yang dapat menyebabkan kultur sel tidak mampu memproduksi metabolit sekunder seperti tanaman asalnya :

1. Sel yang dikultur berasal dari jaringan atau organ yang tidak sama, sehingga ada beberapa enzim yang tidak aktif bila sel belum terdiferensiasi.
2. Produk yang dihasilkan terdegradasi lagi karena tidak adanya tempat penyimpanan pada sel yang belum terdiferensiasi.

Solasodina merupakan salah satu contoh metabolit sekunder yang tidak dapat dihasilkan dari beberapa spesies *Solanum* dengan sistem KJTnya. Sampai sekarang informasi tentang biosintesisnya masih sangat terbatas.

Emhke dan Eilert (1983) menjelaskan adanya hubungan antara biosintesa solasodina dengan kandungan klorophyl tanaman dan diferensiasi sel.

Eltayeb et al (1997) menerangkan adanya hubungan antara kandungan solasodina dengan perkembangan tanaman pada *Solanum nigrum* dan *Solanum incanum*. Dengan bertambahnya umur tanaman terjadi peningkatan kadar solasodina pada akar dan batang *Solanum nigrum* serta batang dan daun

Solanum incanum. Tetapi justru terjadi penurunan kadar pada daun dan buah *Solanum nigrum* serta akar *Solanum incanum*.

Informasi lain adalah pendapat Kaneko et al (1976) yang menduga bahwa bertindak sebagai sumber N pada biosintesa solasodina adalah L-arginin. Penelitian yang mendukung pendapat ini adalah Erawati (1994) yang melaporkan bahwa pemberian L-arginin pada media dapat meningkatkan kandungan solasodina dari kultur pucuk *Solanum laciniatum*.

2.5. Asam amino

Menurut Frank et al (1992) asam amino merupakan bagian terkecil dari protein, dimana suatu molekulnya terdiri dari suatu gugusan karboksil (COOH) dan gugusan amino (NH₂). Bentuk umum asam amino adalah :



R merupakan gugusan residu dari molekul yang berbeda bagi tiap asam amino. Gugus R menyebabkan asam amino berbeda sifat fisiknya, misalnya kelarutannya dalam air. Asam amino yang umum terdapat dalam protein kurang lebih 20 macam.

Bray (1983) menjelaskan bahwa kerangka karbon dari dua puluh macam asam amino yang umum digunakan untuk sintesa protein berasal dari hasil antara (intermediat) proses glikolisis, TCA, dan jalur pentosa phosphat. Dijelaskan bahwa berdasarkan sumber kerangka karbonnya, dapat dikelompokkan menjadi 6 kelompok asam amino, yaitu :

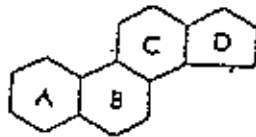
1. Serin, sistein dan glisin, kerangka karbonnya berasal dari 3 phosphoglisarat.
2. Phenilalanin, tirosin dan triptophan, kerangka karbonnya berasal dari erytrosa- 4-phosphat.
3. Alanin, valin dan leusin, kerangka karbonnya berasal dari piruvat.
4. Glutamat, prolin dan arginin, kerangka karbonnya dari oxaloglutarat.
5. Aspartat, lisin, metionin, treonin dan isoleusin, kerangka karbonnya berasal dari oxaloasetat.
6. Histidin, kerangka karbonnya berasal dari ribosa-5-P.

Errict et al (1994) menjelaskan bahwa asam amino aromatik, phenilalanin, tirosin dan triptophan merupakan prekursor beberapa produk metabolit sekunder tanaman. Bray menambahkan bahwa terdapat beberapa senyawa alkaloid yang langsung diturunkan dari asam amino aromatik, tirosin dan phenilalanin sebagai prekursornya.

Sckripsema et al (1991) melaporkan adanya perbedaan profil asam amino dari beberapa spesies tanaman yang diamati. Misalnya dalam kultur suspensi dari tanaman *Catharanthus roseus* (LS-58) banyak mengandung

2.6. Tinjauan tentang steroid

Steroid merupakan turunan dari "perhydrocyclopentanophenantrene", suatu kerangka inti yang terdiri dari 17 atom C, terdapat pada binatang dan tumbuh-tumbuhan. Inti steroid jenuhnya disebut "gonane" (Heftmann, 1973).



Substitusi pada R1, R2 dan R3 menghasilkan bermacam-macam golongan steroid. Secara garis besar dapat dibagi menjadi dua golongan, yaitu steroid sederhana yang terdiri dari maksimal 21 atom C dan steroid yang mempunyai atom C lebih dari 21 misalnya : sterol, asam empedu, vitamin, glikosida jantung, sapogenin dan alkaloid steroid. Berdasarkan efek farmakologi yang ditimbulkan steroid digolongkan menjadi hormon seks (androgen, estrogen, gestrogen), kortikosteroid, asam empedu, vitamin (Manitto, 1981).

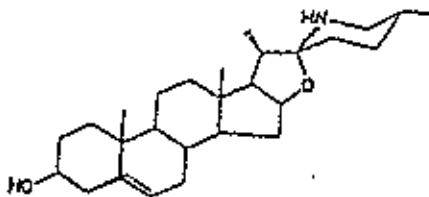
Steroid alam pada hewan berasal dari lanosterol, sedangkan dalam tumbuhan berasal dari sikloartenol (Manitto, 1981).

Penggunaan obat-obatan golongan steroid ini sangat luas, meliputi obat kontrasepsi, antiimplamasi (kortikosteroid), hormon antiandrogen, steroid jantung, vitamin dan lain-lain (Keislich, 1986 dan Manitto, 1981). Bahan yang banyak digunakan untuk membuat obat-obatan steroid sementara ini sebagian besar berasal dari steroid tanaman, yaitu yang disebut fitosteroid (solasodina, diosgenin, hekogenin dan stigmasterol).

2.7. Tinjauan tentang Solasodina

Solasodina merupakan salah satu alternatif bahan baku obat steroid setelah diosgenin (Mancek, 1984).

Solasodina termasuk golongan steroid alkloid, didalam tanaman terikat dalam bentuk glikosidanya (Wagner et al, 1984; Kiel, 1993). Solasodina mempunyai 27 atom C, merupakan N analog dari sapogenin yang banyak dihasilkan oleh tanaman *Solanum* sp. Strukturnya hampir sama dengan diosgenin, dimana satu atom C pada diosgenin diganti dengan atom N sebagai berikut :



Adapun rumus molekul dari solasodina adalah $C_{27}H_{43}O_2N$ dengan BM 413,62. Larutan bebas dalam benzena, piridin, kloroform, larut dalam alkohol dan aseton. Sedikit larut dalam air dan tidak larut dalam ester.
(jalur biosintesa steroid dalam tanaman dapat dilihat pada lampiran 6).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. TEMPAT DAN WAKTU

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Airlangga sejak bulan September 1996 - September 1997.

3.2. BAHAN ATAU MATERI PENELITIAN

3.2.1. Bahan Tumbuhan

Bahan penelitian yang digunakan berupa :

- kultur kalus dan suspensi *Solanum mammosum* (kode SM)
- kultur kalus dan suspensi *Solanum laciniatum* (kode SL-7)
- kultur pucuk *Solanum mammosum* (kode sm-p)
- kultur pucuk *Solanum laciniatum* (kode SL-7)
- kultur pucuk *Solanum khasianum* (kode sk-5)
diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi Farmasi UNAIR Surabaya,
- organ daun dan buah *Solanum mammosum* diperoleh dari Kebun Percobaan, Kebun Raya Purwodadi Pasuruan Jawa Timur,
- organ daun dan buah *Solanum khasianum* diperoleh dari Kebun Balai Penelitian Tanaman Obat Bogor Jawa Barat.

3.2.2. Bahan kimia

Kecuali dinyatakan lain semua bahan yang digunakan adalah produksi E. Merck dengan derajat pa. Sodium Alginat Produksi Sigma.

3.2.3. Media

Media dasar yang digunakan penelitian ini adalah media MS terdiri dari makroelemen, mikroelemen, vitamin, asam amino dan hormon pertumbuhan. Komposisi media MS tertera pada lampiran 1 dan tambahan komponen media masing-masing kultur tertera pada lampiran 2.

3.3. ALAT-ALAT YANG DIPAKAI

- Laminar air flow cabinet, Dalton model San Ei Seisakusho Ltd tipe WS2-84-64,
- Otoklaf tipe WS2-84-64,
- Shaker dengan putaran 50-100 rpm,
- pH meter Fiesher Accunmet model 230 A,
- Sentrifus Janetzki T-5,
- Oven "Despatch",
- Alat-alat gelas untuk kerja aseptis,
- Spektrofotometer UV-VIS HP 8452,
- Alat analisa asam amino Hitachi model 835-50,
- GC merek GL-Science

3.4. METODE PERCOBAAN

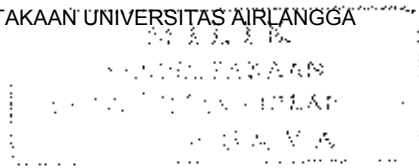
3.4.1. Tahapan Percobaan

- Pembuatan Media untuk berbagai jenis kultur
- Kultivasi kultur
- Panen kultur dan pengambilan organ tanaman
- Penetapan kadar air
- Penetapan kandungan asam amino
- Penetapan kandungan protein total
- Penetapan kandungan fitosteroid

3.4.2. Pelaksanaan Percobaan

3.4.2.1. Pembuatan Media

Diambil volume tertentu larutan stok media MS, ditambahkan sukrosa myoinositol, dan hormon pertumbuhan sesuai dengan jenis kultur yang dibuat. Tambahkan larutan NaOH 0,1 N atau larutan HCL 0,1 N untuk membuat pH media = 5,7; tambahkan air suling sampai volume menjadi 1 liter. Pembuatan media cair, langsung dituang pada tempat sesuai dengan kebutuhan dan pembuatan media padat terlebih dahulu ditambahkan agar kemudian baru dibagi pada tempat yang disediakan. Tempat media ditutup rapat dengan aluminium foil, kemudian disterilkan dalam otoklaf pada temperatur 121 C, selama 20 menit.



3.4.2.2. Kultivasi kultur

Kultivasi kultur dilakukan didalam LAFC yang telah dibersihkan dengan alkohol 70%. Lampu UV dinyalakan selama kurang lebih 20 menit. Botol media dimasukkan dalam LAFC, tutup botol dibuka kemudian mulut botol disterilkan dengan cara dibakar lampu spiritus. Dengan menggunakan skalpel atau gunting steril, kultur dipindahkan kedalam media baru. Mulut botol setelah disterilkan diturup rapat dengan aluminium foil.

Kultivasi kultur kalus

Untuk mendapatkan kultur kalus yang akan dianalisa, dipindahkan kurang lebih 1,000 gram kultur kalus kedalam media baru dengan skalpel steril. Subkultur dilakukan setiap 2 minggu sekali.

Kultivasi kultur suspensi

Untuk memperoleh kultur suspensi sel yang akan digunakan untuk analisa, diambil kurang lebih 5,000 gr sel dari media padat dipindahkan kedalam botol media cair. Kultur suspensi ditempatkan dalam ruang kultur dan diagitasi pada shaker 50-100 rpm. Subkultur dilakukan setiap 7 hari sekali.

Kultivasi kultur amobil dengan bahan pendukung alginat

Pertama kali kultur suspensi (dipilih pada pasasi 3-9) disaring dengan kertas saring steril, inokulum berupa massa sel hasil penyaringan sebanyak 10,000 gram dimasukkan ke dalam 25 ml larutan alginat 4% steril dan ditambah

media baru, kemudian diaduk dengan menggunakan pengaduk steril. Dengan menggunakan sendok steril, campuran tersebut diambil dan ditetaskan satu per satu kedalam 50 ml larutan CaCl_2 50 mM sehingga terbentuk butiran dengan diameter 3-4 mm. Agar butiran tidak mudah pecah, butiran dalam larutan CaCl_2 diletakkan di atas shaker 50 rpm selama 3 jam. Untuk membersihkan butiran dari CaCl_2 , butiran dicuci dengan 25 ml media baru selama 3 kali, masing-masing 15 menit, 15 menit, dan terakhir 30 menit diletakkan di atas shaker. Terakhir kali setiap 50 butiran dimasukkan dalam 25 ml media baru, diletakkan pada shaker dengan kecepatan 50-60 rpm. Subkultur dilakukan setiap 7 hari sekali.

Kultivasi kultur amobil "CGS"

Pembuatan struktur kompak diperoleh dari kultur suspensi yang telah dilakukan subkultur kurang lebih 10 kali dengan waktu subkultur 7 hari sekali. Setelah terbentuk struktur kompak CGS, kemudian disaring dan dipindahkan kedalam 25 ml media baru dan diagitasi pada shaker dengan kecepatan 50-60 rpm. Subkultur dilakukan setiap 7 hari sekali.

Kultivasi kultur pucuk

Untuk memperoleh kultur pucuk, dipindahkan antara 3-4 potongan kultur pucuk stok dan ditanam pada media baru. Subkultur dilakukan setiap 4 minggu sekali.

3.4.2.3. Pemanenan kultur dan pengambilan organ tanaman

Bahan yang digunakan dalam penelitiannya adalah :

- Kultur kalus dan kultur pucuk dipanen pada umur 4 minggu,
- Kultur suspensi, amobil "CGS" dan amobil alginat dipanen umur 8 hari,
- Organ daun dan buah dipanen dari tanaman berumur 4 bulan, organ daun dipilih yang berkedudukan di tengah dan buah dipilih berwarna kuning muda.

3.4.2.4. Penetapan kadar air sampel

Penentuan kadar air serbuk sampel mengikuti metode Farmakope Indonesia edisi III (1979). Serbuk sampel bisa diekstrasi bila kadar air tidak lebih dari 10%. Ditimbang 0,100 mg serbuk kering udara, kemudian dioven pada suhu 105°C selama 30 menit. Kemudian didinginkan dalam eksikator ± 20 menit dan baru diukur lagi beratnya setelah pengeringan. Kadar air dihitung dengan rumus :

$$KA = \frac{\text{berat awal} - \text{berat akhir}}{\text{berat awal}} \times 100\%$$

3.4.2.5. Penetapan kandungan asam amino

Analisis kandungan asam amino dilakukan dengan kromatografi pertukaran ion menurut Hitachi Scientific Instrument Technical Data Sheet (1986). Semua sampel diamati duplo dengan syarat variasi data tidak lebih dari 10%. Adapun tahapan analisisnya adalah sebagai berikut :

- hidrolisis sampel
- pembuatan larutan pereaksi ninhidrin

- pembuatan larutan eluen
- pembuatan larutan standar asam amino
- preparasi sampel hasil hidrolisis
- perhitungan

Hidrolisis Sampel

Kurang lebih 1,000-2,000 mg sampel kering ditambah 1 ml HCl 6 N, dikocok sampai homogen kemudian dioven pada suhu 110°C selama 22 jam. Cairan hasil pemanasan kemudian diuapkan dengan cara mengalirkan uap N sampai kering. Hasil digunakan untuk analisis.

Pembuatan larutan ninhidrin

Ditimbang natrium asetat anhidrat sebanyak 82,000 gram, larutkan didalam 150 ml air suling steril, tambahkan 25 ml asam asetat anhidrat. Setelah larut, encerkan larutan tersebut dengan air suling sampai volumenya 250 ml. Kocok larutan menjadi homogen dan pH diatur 5,5 dengan indikator universal. Tambahkan kedalam larutan tersebut 750 ml selulov, aduk hingga homogen sambil dialiri gas nitrogen selama 20 menit (larutan I).

Timbang 20,000 gram ninhidrin dalam botol kedap udara, kemudian masukkan kedalam larutan (I) sambil diaduk supaya larut sempurna, sambil alirkan gas nitrogen selama 15 menit (larutan II). Pada larutan II tambahkan 1,7 ml larutan titanous klorida dan aduk sambil dialiri gas nitrogen selama 10 menit. Tambahkan larutan buffer sampai volume menjadi 1 liter. Larutan ninhidrin yang sudah jadi sebaiknya disimpan dalam almari es.

Pembuatan larutan eluen

Larutan eluen ini merupakan larutan dapar dengan berbagai macam pH yang tersusun bahan-bahan dengan komposisi seperti tercantum pada tabel 1.

Tabel 1 :
Daftar larutan dapar dengan berbagai harga pH

	Eluen 1	Eluen 2	Eluen 3	Eluen 4	Column regeneration
Air suling	0,7 l	0,7 l	0,7 l	0,7 l	0,7 l
Natrium sitrat	7,74g	7,74g	14,71g	26,67 g	-
Natrium hidroksida	-	-	-	-	8,0
Natrium klorida	7,07g	7,07g	2,92g	54,35 g	-
Asam sitrat	20,00g	20,00g	10,50g	6,10 g	-
Etil alkohol	130 ml	20 ml	-	-	-
Bensil alkohol	-	-	-	5,0 ml	-
Tiodiglikol	5 ml	5 ml	5 ml	-	-
Larutan Bryj-35	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml
Asam kaproat	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Jumlah Vol	1 lt	1 lt	1 lt	1 lt	1 lt
pH	3,3	3,2	4,3	4,9	-

Pembuatan larutan standar asam amino

Larutan standar mengandung 18 macam asam -asam amino baku. Dipipet 0,2 ml larutan standar dengan pipet ukur 1,00 ml dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml. Larutan standar ini diencerkan dengan larutan dapar sitrat 0,2 N, pH diatur 2,2 dan larutan disiapkan untuk pengukuran pada alat penganalisis asam-asam amino.

Penyiapan sampei hasil hidrolisis

Hasil hidrolisis yang berupa sampel kering berwarna hitam merupakan hasil sisa-sisa senyawa karbon dalam tabung hidrolisis tersebut ditambahkan 0,5 ml NaOH 0,01 N dan diaduk sampai homogen dengan alat ultrasonik selama 15 menit. Kedalam campuran tersebut ditambahkan 1,5 ml HCl 0,02 N dengan diaduk sampai homogen, kemudian suspensinya diambil dengan injektor 2 ml. Campuran yang terambil ini disaring dengan filter Millex - HA 0,45 um dan hasil saringan dimasukkan kedalam tabung sampel 500 ul untuk siap dianalisa.

Kondisi alat

Waktu analisis	:	144 menit
Volume optimum sampel	:	10 nmol
Ukuran kolom	:	4 x 150 mm (2619F)
Kecepatan alir dari larutan bufer	:	0,475 ml/menit
Tekanan kolom	:	130 kg/cm ²
Temperatur kolom	:	53° C
Temperatur tempat pencampuran	:	
Antara sampel dan ninhidrin	:	95-96 ° C

Perhitungan

Berdasarkan perhitungan luas area sampel yang dibandingkan dengan luas area standar asam amino, dapat dihitung kadar masing-masing asam amino penyusun sampel dengan cara sebagai berikut :

$$C_x = \frac{A_x}{A_{st}} \times C_{st} \times BM_{st}$$

Keterangan

A_x = Luas area asam amino sampel

A_{st} = Luas area asam amino standar

C_x = Berat (mg) asam amino

C_{st} = Konsentrasi asam amino dalam sampel standar/volume standar yang diinjeksikan (n mol)

BM_{st} = Berat molekul asam amino standar

Kemudian persen kadar dari masing-masing asam amino dapat diperoleh

dengan rumus :

$$\% AA = \frac{C_x}{BS} \times \frac{V_s}{V_i} \times 100\%$$

Keterangan

BS = Berat sampel (mg)

V_s = Volume sampel setelah dihidrolisis (ul)

V_i = Volume sampel yang diinjeksikan (ul)

3.4.2.6. Penetapan Kandungan Protein total

Analisa kandungan protein total yang digunakan adalah secara tidak langsung, yaitu pertama kali mengamati kandungan N total dengan metode Mikro Kjeldahl menurut AOAC Edisi 15 (1990) yang dimodifikasi dengan pewarnaan pereaksi Nessler (Regenstein,1984). Kemudian kandungan N total yang diperoleh dikalikan dengan faktor perkalian 6,25. Semua bahan dianalisa duplo dengan syarat variasi data tidak lebih dari 10%. Apabila terjadi variasi lebih dari 10% baru dilakukan pengamatan ke-3. Adapun tahapannya adalah sebagai berikut :

- destruksi
- pembuatan pereaksi Nessler
- preparasi sampel hasil destruksi
- perhitungan kandungan N total
- perhitungan kandungan protein total

Destruksi

Destruksi dilakukan dengan menggunakan 15 ml H_2SO_4 pekat. Sampel yang digunakan sebanyak 0,200-1,200 gr. Untuk mempercepat proses destruksi, ditambahkan katalisator HgO sebanyak 0,100 gr dan K_2SO_4 sebanyak 2,500 gr. Destruksi diberhentikan bila larutan sudah jernih berwarna kuning muda sampai jernih tanpa warna.

Pembuatan Pereaksi Nessler

Untuk membuat 500 ml pereaksi Nessler diperlukan :

- a. 17,5 gr KI dilarutkan dalam 50 ml air suling,
- b. 8 gr HgCl dalam 200 ml air suling panas,
- c. 60 gr NaOH dalam 125 ml air suling

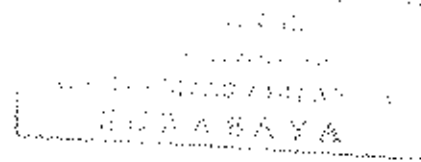
Adapun cara pembuatannya adalah sebagai berikut :

Campurkan larutan a dan b secara baik, yaitu dengan cara menuangkan larutan b sedikit demi sedikit kedalam larutan a sambil diaduk, kemudian masukkan larutan c yang panas kedalam campuran di atas. Selanjutnya aduk larutan tersebut dan ad-kan sampai volume 500 ml, selanjutnya diamkan di dalam almari es satu malam. Ambil larutan yang jernih dan pindahkan kedalam botol gelap, dengan cara menyaring larutan dengan glasswol, simpan larutan dalam almari es.

Preparasi sampel hasil destruksi

Filtrat hasil destruksi pertama kali diencerkan dengan air suling sampai volume 100 ml. Untuk membuat larutan sampel yang memiliki kandungan N masuk dalam range kandungan N pada larutan baku, maka dilakukan pengeceran lagi sebesar 25 kali. Untuk analisa dengan alat spektrofotometer UV-Vis, dilakukan dengan cara mengambil filtrat hasil destruksi setelah diencerkan sebesar 4 ml kemudian ditambahkan 1 ml pereaksi Nessler, selanjutnya di-adkan dengan air suling sampai volume 50 ml dan dikocok kurang lebih 1 menit. Setelah homogen siap untuk diamati dengan spektrofotometer UV-Vis.

Perhitungan kadar N total



Kandungan N total sampel dari spektrofotometer diketahui dengan cara menginterpolasi nilai absorbansi dari sampel kedalam persamaan kurva baku yang dibuat pada waktu pengamatan yang sama. Kandungan N total dalam persentase berat kering (% BK) dapat dihitung dengan rumus :

$$\%N = \frac{\mu\text{g N hasil spektrofotometer}}{\mu\text{g biomassa per ml sampel}} \times 100\%$$

Perhitungan kandungan protein total

Kandungan protein total diperoleh dengan cara mengalikan kandungan N total yang diperoleh dengan faktor perkalian 6,25 (rata-rata kandungan N dari protein alamiah sebesar 16%).

3.4.2.7. Analisis Kandungan Fitosterol dan Solasodina

Analisis kandungan fitosterol dan solasodina dilakukan dengan menggunakan metode Carle (1979) dan Indrayanto et. al. (1993) yang dimodifikasi. Semua sampel diamati duplo dengan syarat variasi data tidak lebih dari 10%. Fitosterol yang dianalisis adalah kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan sitosterol baik dalam ekstrak fraksi kloroform maupun fraksi hidrolisat. Adapun tahapan analisis yang dilakukan antara lain :

- ekstraksi fraksi kloroform
- hidrolisis
- ekstraksi fraksi hidrolisat
- preparasi sampel
- analisis kualitatif dan kuantitatif dengan GC
- perhitungan kadar dalam $\mu\text{g/g}$

Ekstraksi fraksi kloroform

Kurang lebih 0,500 - 100 gr serbuk kering yang telah ditentukan kadar airnya diekstraksi dengan 10 ml kloroform selama 10 menit dengan alat vortek. Filtrat disaring dan ditampung dalam botol ukuran 50 ml. Ekstraksi dilakukan sebanyak 4 kali dan filtrat yang dihasilkan dikeringkan pada suhu kamar sampai kering.

Hidrolisis

Residu ekstraksi fraksi kloroform dihidrolisis dengan 15 ml HCl 2 N dalam metanol dan dioven pada 75°C selama 2 jam. Setelah dingin diatur pH-nya menjadi 10 dengan menambahkan NaOH 10 N. Kemudian kedalam filtrat ditambah 10 ml air suling untuk selanjutnya diekstraksi.

Ekstraksi fraksi hidrolisat

Ekstraksi pada fraksi hidrolisat dilakukan sama dengan ekstraksi pada fraksi kloroform. Tetapi untuk mengambil filtratnya, dilakukan sentrifuse pada kecepatan 2500 rpm selama 10 menit kemudian supernatannya ditarik dengan pipet dan ditampung pada botol ukuran 50 ml. Filtrat yang didapat dikeringkan pada suhu kamar untuk dianalisis.

Preparasi sampel

Filtrat dari fraksi kloroform maupun dari fraksi hidrolisat masing-masing diencerkan dengan 2 ml. Kloroform, kemudian larutan tersebut dibagi menjadi 4 bagian (@ 0,5 ml) yang siap dianalisa.

Analisis sampel dengan GC

Diambil dua bagian larutan sampel ditambah dengan 1 bagian standar internal progesteron dikocok secara homogen. Kemudian diambil 3 μ l diinjeksikan pada alat GC dan selanjutnya dicatat luas area puncak dari masing-masing senyawa yang dicari dan luas area puncak standar internal progesteron. Kadar sampel dari alat GC dihitung dengan cara menginterpolasikan luas area puncak kolesterol/solasodina dari sampel ke dalam persamaan regresi kurva baku yang dibuat pada pengamatan yang sama.

Kondisi alat

Kolom	:	OV-1 Chrompack 2 meter 1/8 inchi
Gas pembawa N	:	1,7 kg/cm ²
Suhu injektor	:	280° C
Program suhu	:	
Alat suntik	:	Hamilton micro syringe 10µl, volume injek 3 µl
Detektor	:	FID suhu 280°C
Recorder	:	GL-Science Chromatocorder model 12 dengan Chart speed 2 min/cm; attenuation 2; MA 100; MW 0,3 dan end time 25.

Perhitungan kadar bahan dalam µg/g

Kadar senyawa fitosterol dan solasodina dari sampel dalam (µg/g) dapat dihitung dengan rumus :

$$KS = \frac{f. \text{ peng} \times f. \text{ sst krg} \times \frac{\text{vol. peng}}{\text{vol. injek}} \times \text{kadar hasil dari GC per } 3 \mu\text{l}}{\text{berat penimbangan (gr)}}$$

dimana :

KS	= Kadar sampel (µg/g)
f. peng	= faktor pengenceran
f. sst krg	= faktor susut kering
Vol peng	= volume pengenceran (2000 µl)
Vol injek	= volume yang diinjekkan (3 µl)

BAB IV HASIL PENELITIAN

4.1. Karakter Pertumbuhan

Karakter pertumbuhan yang diamati adalah indeks pertumbuhan dari kultur suspensi, kultur amobil "CGS" dan kultur amobil alginat *Solanum mammosum* pada umur 2,4,6,8,10,12 dan 14 hari setelah tanam. Data hasil pengamatan dapat dilihat dalam tabel 2 dan 3, sedangkan grafik indeks pertumbuhannya dapat dilihat pada gambar 1.

Tabel 2. Data hasil pengamatan indeks pertumbuhan (*) dari kultur suspensi, kultur amobil "CGS" dan kultur amobil alginat *Solanum mammosum* (kode SM) pada berbagai umur pengamatan

umur (hari)	Kultur suspensi	Kultur amobil "CGS"	Kultur amobil alginat
2	2,60 ± 0,13	1,07 ± 0,04	1,07 ± 0,01
4	2,94 ± 0,18	1,14 ± 0,01	1,07 ± 0,02
6	4,82 ± 0,31	1,24 ± 0,01	1,27 ± 0,08
8	5,81 ± 0,30	1,34 ± 0,02	1,45 ± 0,05
10	6,29 ± 0,15	1,41 ± 0,07	1,56 ± 0,09
12	7,34 ± 0,37	1,46 ± 0,02	1,69 ± 0,11
14	7,45 ± 0,53	2,34 ± 0,22	2,73 ± 0,03

Keterangan :

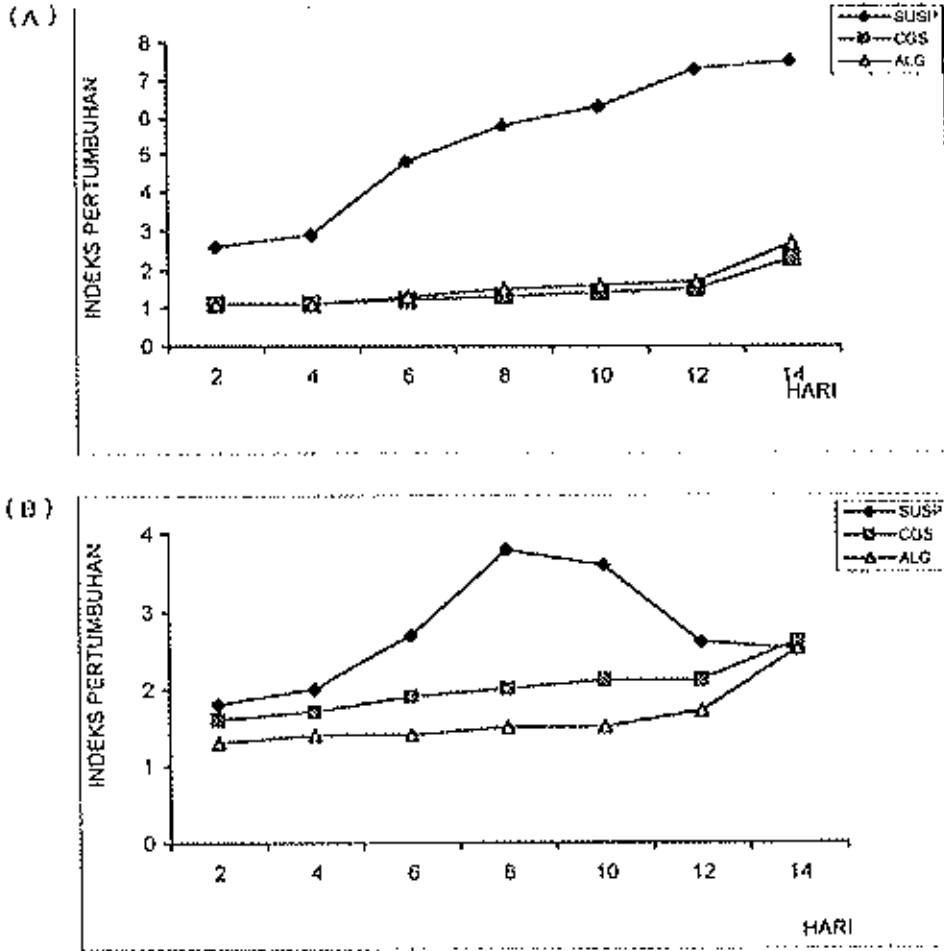
- data di atas merupakan nilai rata-rata n = 5
- (*) = indeks pertumbuhan berat basah (rasio berat BB awal /BBakhir)

Tabel 3. Data hasil pengamatan indeks pertumbuhan (***) dari kultur suspensi, kultur amobil "CGS" dan kultur amobil alginat *Solanum mammosum* (kode SM) pada berbagai umur pengamatan

umur (hari)	Kultur suspensi	Kultur amobil "CGS"	Kultur amobil alginat
2	1,75 ± 0,06	1,63 ± 0,12	1,27 ± 0,01
4	2,00 ± 0,08	1,68 ± 0,04	1,39 ± 0,05
6	2,72 ± 0,09	1,87 ± 0,03	1,41 ± 0,09
8	3,83 ± 1,59	1,96 ± 0,01	1,45 ± 0,04
10	3,59 ± 0,51	2,09 ± 0,05	1,47 ± 0,03
12	2,60 ± 0,10	2,12 ± 0,03	1,66 ± 0,11
14	2,52 ± 0,09	2,55 ± 0,06	2,59 ± 0,23

Keterangan :

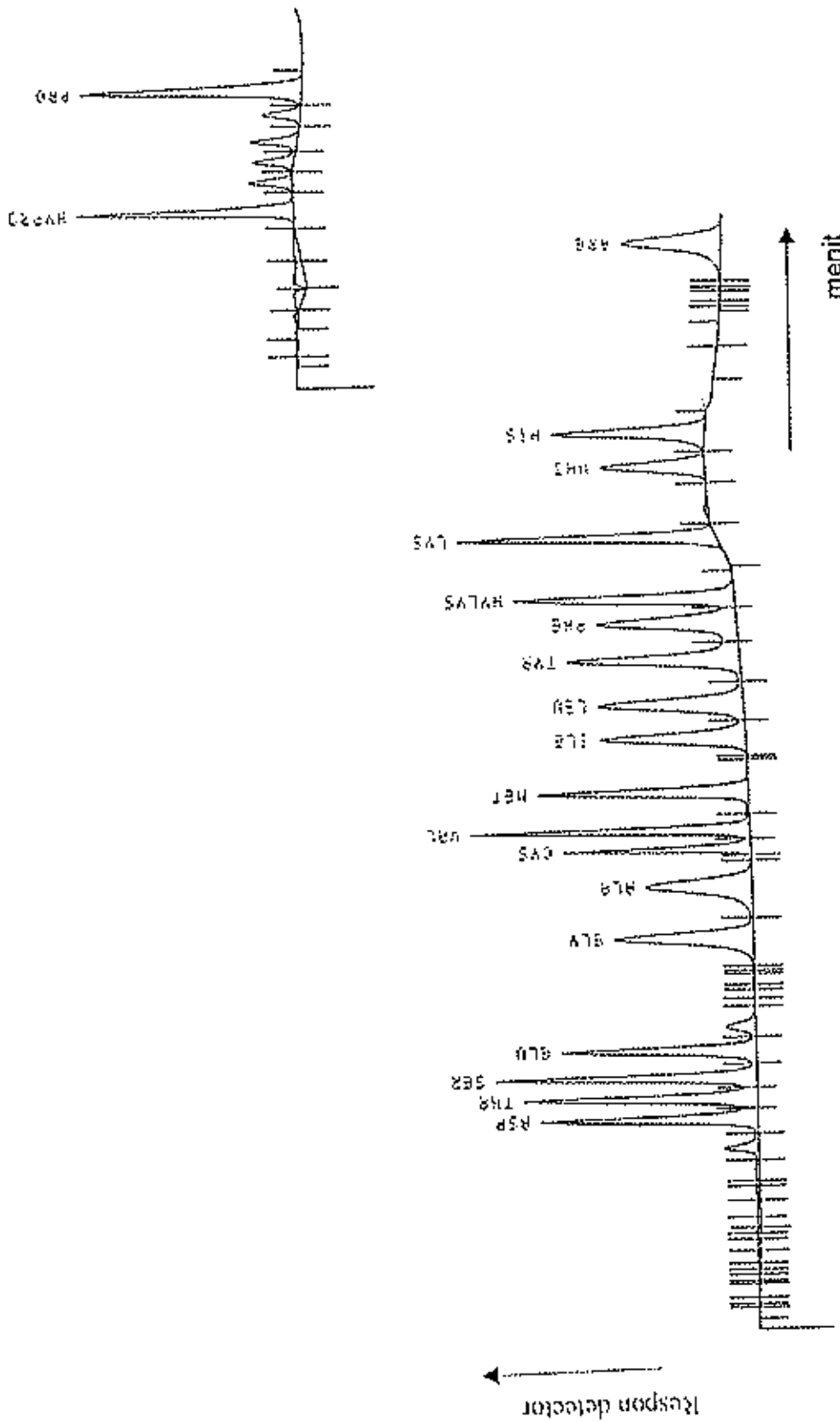
- data di atas merupakan nilai rata-rata n = 5
- (***)=indeks pertumbuhan berat kering (rasio berat BK awal /BK akhir)



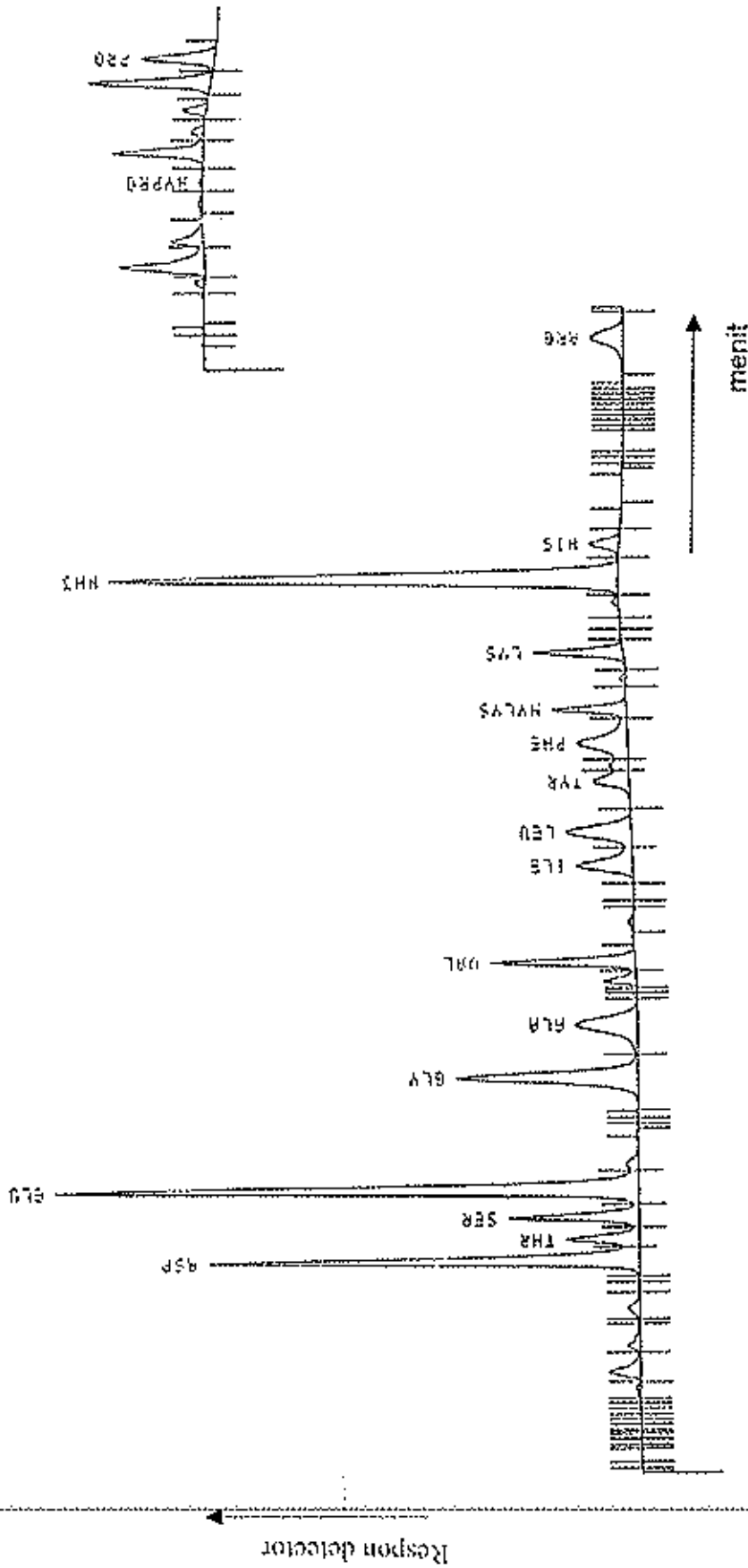
Gambar 1. Grafik indeks pertumbuhan.
 (A) data Tabel 2 dan (B) data Tabel 3.

4.2. Kandungan asam amino

Asam amino yang diamati terdiri dari 17 macam, yang dibagi menjadi 5 kelompok. Kelompok 1, terdiri dari histidin (HIS), phenilalanin (PHE), tirosin (TYR); kelompok 2 terdiri dari serin (SER), glisin (GLY), sistein (CYS); kelompok 3 terdiri dari alanin (ALA), valin (VAL), leusin (LEU); kelompok 4 terdiri dari glutamin (GLU), prolin (PRO), arginin (ARG); kelompok 5 terdiri dari aspartat (ASP), lisin (LYS), treonin (THR), metionin (MET) dan isoleusin (ILE). Data hasil pengamatan kadar masing-masing asam amino disajikan dalam tabel 4. Contoh kromatogram analisa asam amino dapat dilihat pada gambar 2 dan 3. Sedangkan histogram dari data hasil pengamatan pada gambar 4.



Gambar 2. Contoh kromatogram dari larutan standar asam amino (Kondisi alat lihat 3.4.2.5)

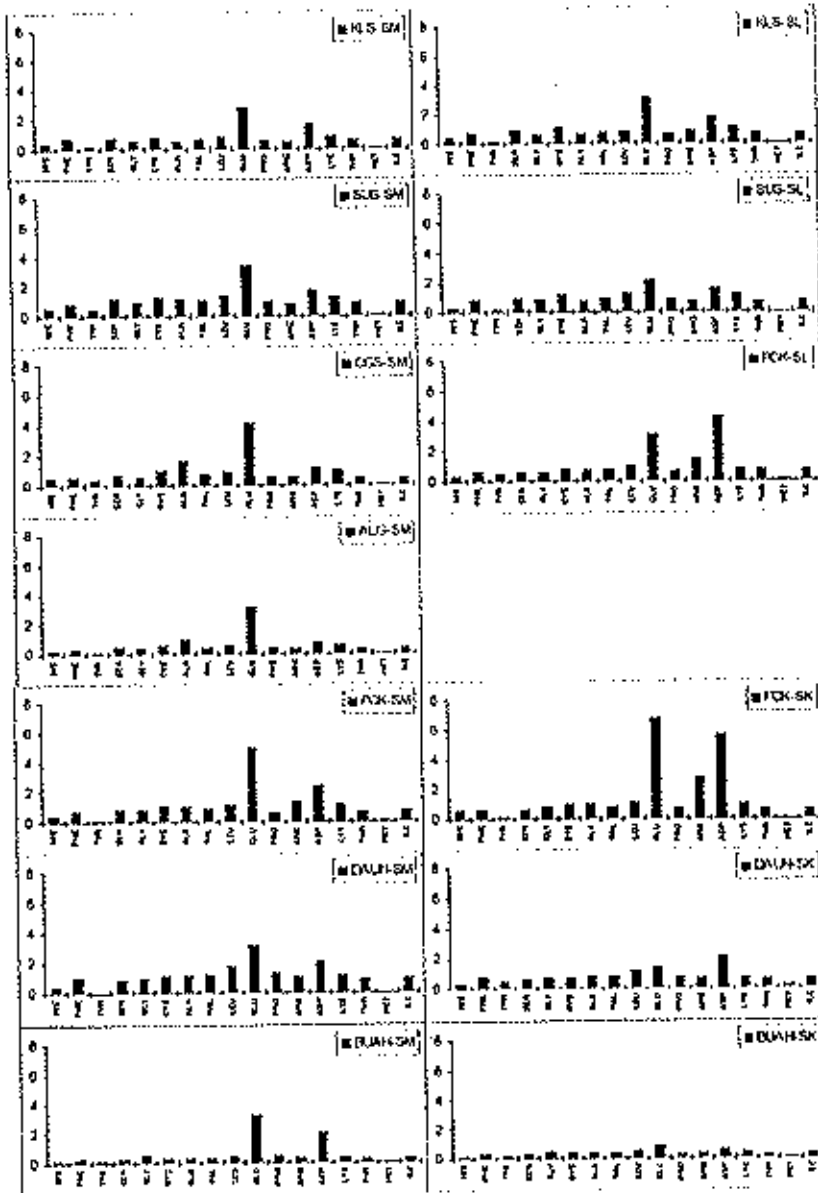


Gambar 3. Contoh kromatogram ekstrak fraksi hidrolisat organ buah *Solanum mammosum*
(Kondisi alat lihat 3.4.2.5)

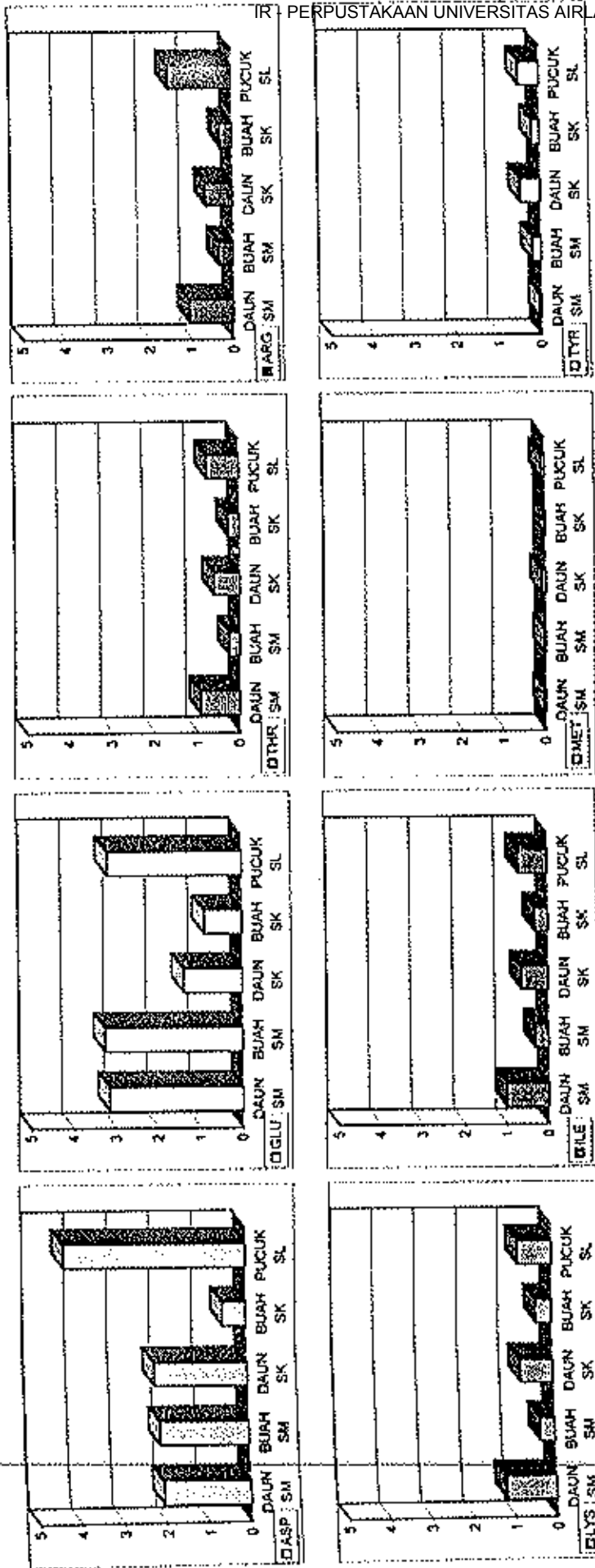
Tabel 4. Hasil pengamatan kadar asam amino (%BK) dari berbagai jenis kultur dan organ *Solanum mammosum*, *Solanum laciniatum* dan *Solanum khasianum*

NO	JENIS ASAM AMINO	KULTUR KALUS SM	KULTUR SUSP. SM	K.A. "CGS" SM	K.A. ALGINAT SM	KULTUR PUCUK SM	ORGAN DAUN SM	ORGAN BUAH SM	KULTUR KALUS SL	KULTUR SUSP. SL	KULTUR PUCUK SL	KULTUR PUCUK SK	ORGAN DAUN SK	ORGAN BUAH SK
1	HIS	0,45	0,57	0,48	0,26	0,40	0,41	0,19	0,42	0,36	0,33	0,57	0,30	0,11
2	PHE	0,74	0,87	0,58	0,37	0,79	1,11	0,26	0,75	0,81	0,69	0,70	0,80	0,30
3	TYR	0,23	0,48	0,40	0,11	0,19	0,03	0,20	0,21	0,19	0,48	0,16	0,48	0,18
4	SER	0,72	1,13	0,75	0,48	0,83	0,89	0,29	0,90	0,93	0,70	0,66	0,64	0,34
5	GLY	0,55	0,90	0,56	0,38	0,81	1,04	0,53	0,62	0,82	0,68	0,80	0,77	0,47
6	CYS	0,16	0,13	0,14	0,16	0,19	0,15	0,14	0,18	0,16	0,13	0,13	0,23	0,15
7	ALA	0,62	1,14	1,65	0,98	0,99	1,18	0,36	0,64	0,78	0,71	1,02	0,82	0,38
8	VAL	0,67	1,12	0,76	0,44	0,89	1,28	0,34	0,76	0,95	0,83	0,84	0,82	0,33
9	LEU	0,83	1,43	0,89	0,56	1,17	1,75	0,44	0,84	1,22	1,02	1,09	1,14	0,49
10	GLU	2,80	3,38	4,14	3,19	5,04	3,15	3,25	3,11	2,18	3,18	6,78	1,39	0,90
11	PRO	0,56	0,96	0,63	0,41	0,66	1,32	0,48	0,67	0,83	0,64	0,71	0,76	0,27
12	ARG	0,47	0,82	0,56	0,33	1,36	1,07	0,36	0,82	0,75	1,52	2,79	0,65	0,30
13	ASP	1,69	1,79	1,14	0,76	2,43	2,05	2,10	1,79	1,61	4,30	5,63	2,19	0,56
14	LYS	0,83	1,35	0,99	0,59	1,13	1,20	0,35	1,07	1,16	0,82	0,99	0,78	0,39
15	THR	0,56	0,91	0,57	0,36	0,68	0,93	0,26	0,69	0,70	0,77	0,64	0,61	0,28
16	MET	0,09	0,12	0,10	0,02	0,17	0,04	0,03	0,03	0,03	0,09	0,05	0,17	TRACE
17	ILE	0,67	0,89	0,53	0,34	0,71	1,01	0,32	0,69	0,74	0,71	0,68	0,65	0,32

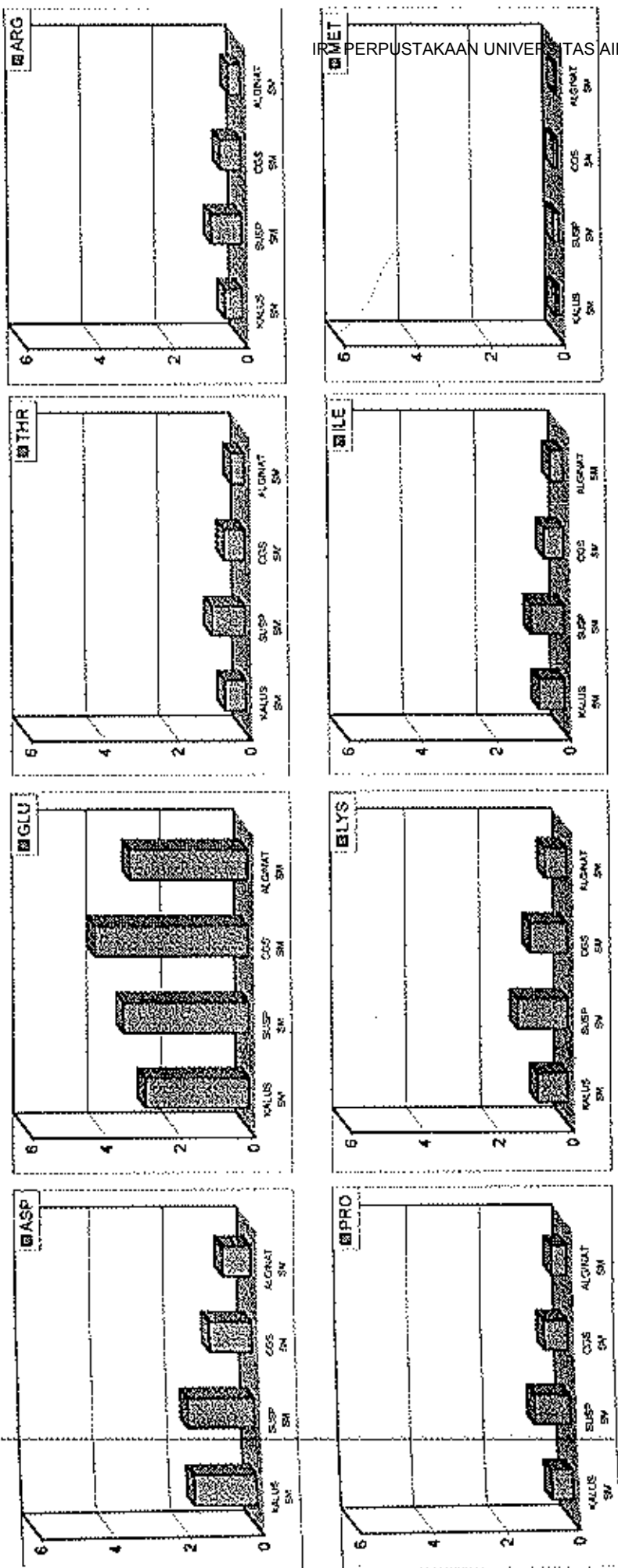
Keterangan: Nomor 1-3 : asam amino kelompok I
 Nomor 4-6 : asam amino kelompok II
 Nomor 7-9 : asam amino kelompok III
 Nomor 10-12 : asam amino kelompok IV
 Nomor 13-17 : asam amino kelompok V



Gambar 4. Histogram kadar asam amino (%BK) dari berbagai jenis kultur dan organ tanaman *S. mammosum*, *S. laciniatum* dan *S. khasianum*.



Gambar 5. Histogram kadar asam amino kelompok aspartat dan glutamat dari organ daun dan buah *Solanum mammosum* dan *Solanum khasianum*, serta kultur pucuk *Solanum laciniatum* (kode SL-7)



Gambar 6. Histogram kadar asam amino kelompok aspartat dan glutamat dari kultur kalus, kultur suspensi, kultur amobil "CGS" dan kultur amobil alginat dari *Solanum mammosum*

4.3. Kandungan protein

Tabel 5. Data hasil analisa kadar protein (% BK) dari berbagai jenis kultur dan organ tanaman *S. mammosum*, *S. laciniatum* dan *S. khasianum*.

Jenis sampel	<i>Solanum mammosum</i>	<i>Solanum laciniatum</i>	<i>Solanum khasianum</i>
Kultur kalus	16,26	23,75	TD
Kultur suspensi	21,61	25,00	TD
Kultur amobil "CGS"	31,82	TD	TD
Kultur amobil alginat	20,01	TD	TD
Kultur pucuk	24,56	20,51	33,35
Organ daun	23,36	TD	21,04
Organ buah	11,34	TD	7,62

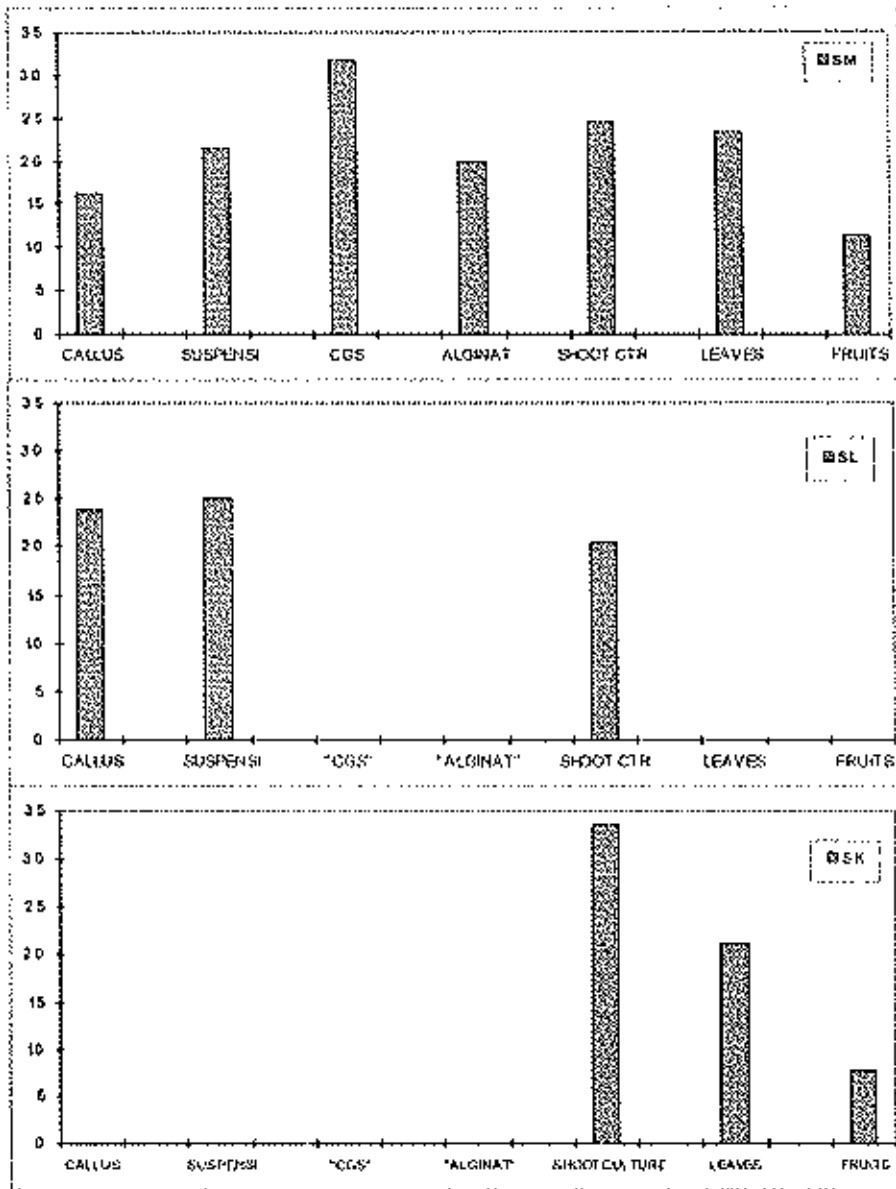
Keterangan :

Solanum mammosum : Kultur kalus, suspensi, amobil "SGS" dan kultur amobil alginat dari *S. mammosum* (kode SM), kultur pucuk dari *S. mammosum* (kode smp) dan organ daun serta buah dari *S. mammosum*.

Solanum laciniatum : Kultur kalus, suspensi dan kultur pucuk dari *S. laciniatum* (kode SL-7).

Solanum khasianum : Kultur pucuk dari *S. khasianum* (kode SK-5) dan organ daun serta buah dari *S. khasianum*.

TD : Tidak diamati



Gambar 7. Histogram kadar protein (%BK) dari berbagai jenis kultur dan organ tanaman *S. mammosum*, *S. facinlatum* dan *S. khasianum*.

4.4. Rasio asam amino/protein

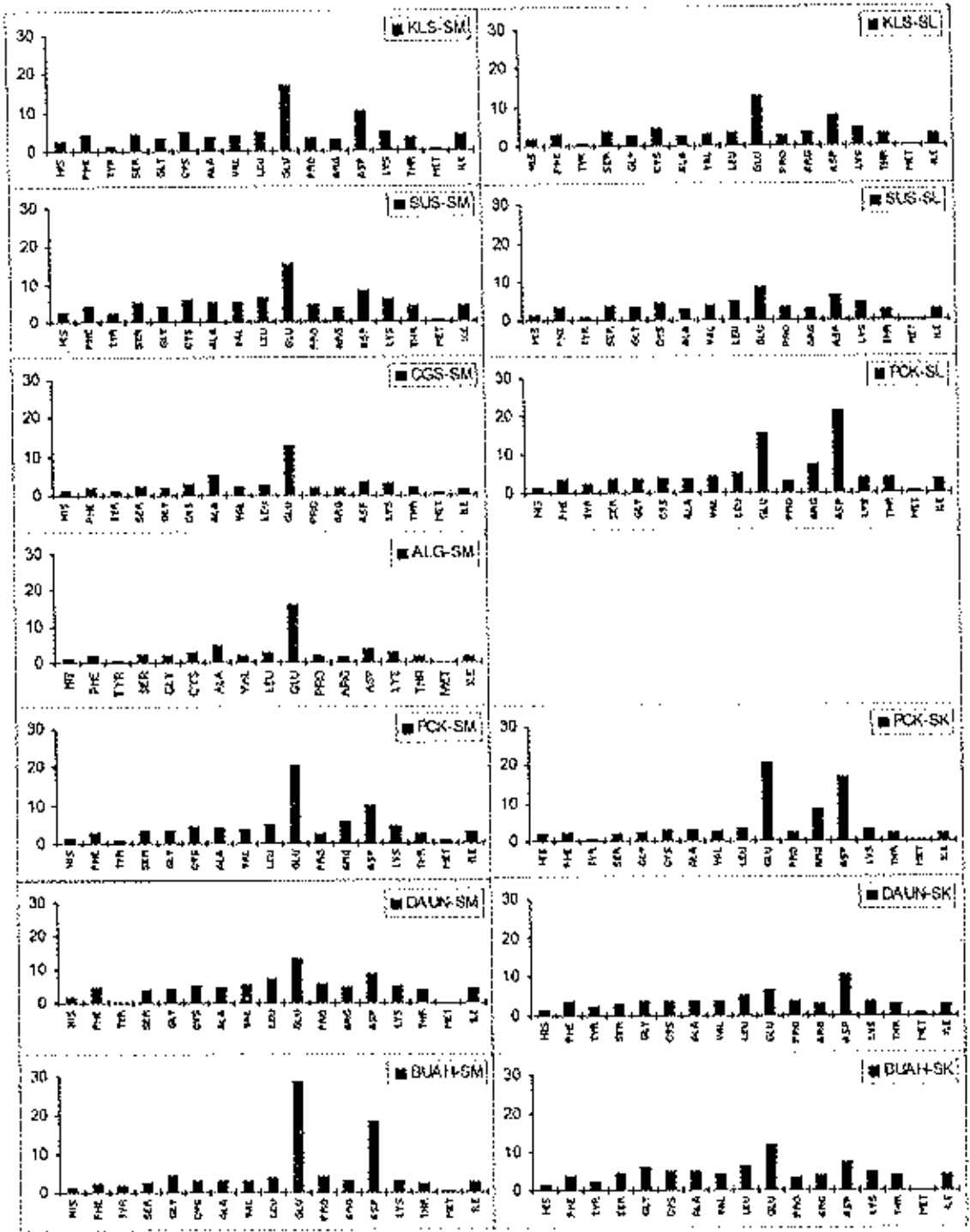
Rasio masing-masing asam amino/protein total dihitung dengan membagi kadar masing-masing asam amino dengan kadar protein yang didapatkan. Nilai rasio ini dihitung dengan tujuan untuk mengetahui seberapa besar peranan masing-masing asam amino sebagai penyusun protein.

Nilai rasio dari masing-masing asam amino disajikan dalam tabel 6, dan histogramnya dapat dilihat pada gambar 8.

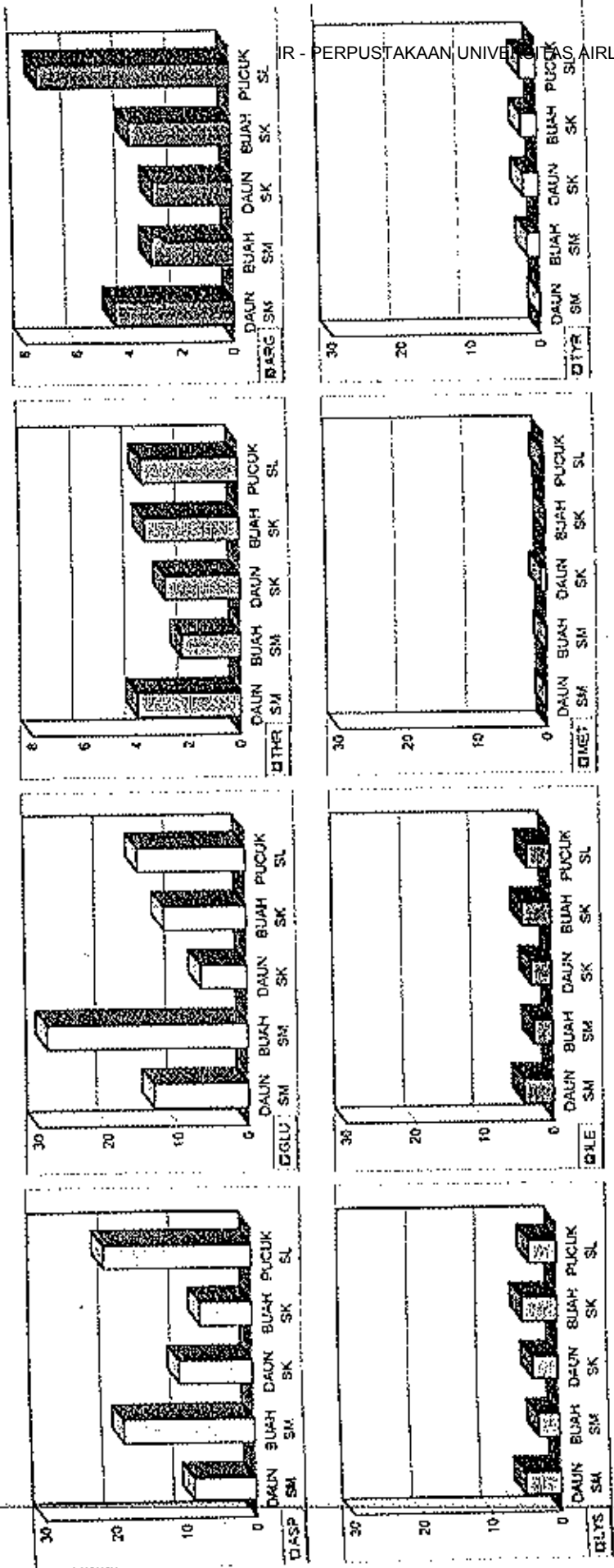
Tabel 6. Nilai rasio masing-masing asam amino/protein total dari berbagai jenis kultur dan organ *Solanum mammosum*, *Solanum laciniatum* dan *Solanum khasianum*

NO	JENIS ASAM AMINO	KULTUR KALUS SM	KULTUR SUSPENSI SM	K. AKOBIL "CGS" SM	K. AKOBIL ALGINAT SM	KULTUR PUCUK SM	ORGAN DAUN SM	ORGAN BUAH SM	KULTUR KALUS SL	KULTUR SUSPENSI SL	KULTUR PUCUK SL	ORGAN DAUN SK	ORGAN BUAH SK
1	HIS	2.77	2.64	1.51	1.30	1.63	1.76	1.68	1.77	1.44	1.61	1.43	1.44
2	PHE.	4.55	4.03	1.82	1.85	3.22	4.75	2.29	3.16	3.24	3.36	3.80	3.94
3	TYR	1.41	2.22	1.26	0.55	0.77	0.13	1.76	0.88	0.76	2.34	2.28	2.36
4	SER	4.43	5.23	2.36	2.40	3.38	3.80	2.56	3.79	3.72	3.41	3.04	4.46
5	GLY	3.38	4.16	1.76	1.90	3.30	4.45	4.67	2.61	3.28	3.32	3.66	6.17
6	CYS	0.98	0.60	0.44	0.80	0.77	0.64	1.23	0.76	0.64	0.63	1.09	1.71
7	ALA	3.80	5.28	5.19	4.90	4.03	4.88	3.17	2.69	3.12	3.46	3.90	4.99
8	VAL	4.10	5.18	2.39	2.20	3.62	5.48	3.00	3.20	3.80	4.05	3.90	4.33
9	LEU	5.10	6.62	2.80	2.80	4.76	7.49	3.88	3.54	4.88	4.97	5.40	6.43
10	GLU	17.22	15.64	13.01	15.94	20.52	13.48	28.66	13.09	8.72	15.50	6.61	11.81
11	PRO	3.44	4.44	1.98	2.05	2.69	5.69	4.23	2.82	3.32	3.12	3.61	3.54
12	ARG	2.89	3.79	1.76	1.65	5.54	4.58	3.17	3.45	3.00	7.41	3.08	3.94
13	ASP	10.39	8.28	3.58	3.80	9.89	8.78	18.52	7.54	6.44	20.97	10.41	7.35
14	LYS	5.10	6.25	3.11	2.80	4.60	5.14	3.09	4.51	4.64	4.00	3.71	5.12
15	THR	3.44	4.21	1.79	1.80	2.77	3.98	2.29	2.91	2.80	3.75	2.90	3.67
16	MET	0.55	0.56	0.31	0.10	0.69	0.17	0.26	0.13	0.12	0.44	0.81	trace
17	ILE	4.12	4.12	1.67	1.70	2.89	4.32	2.82	2.91	2.96	3.46	3.09	4.20

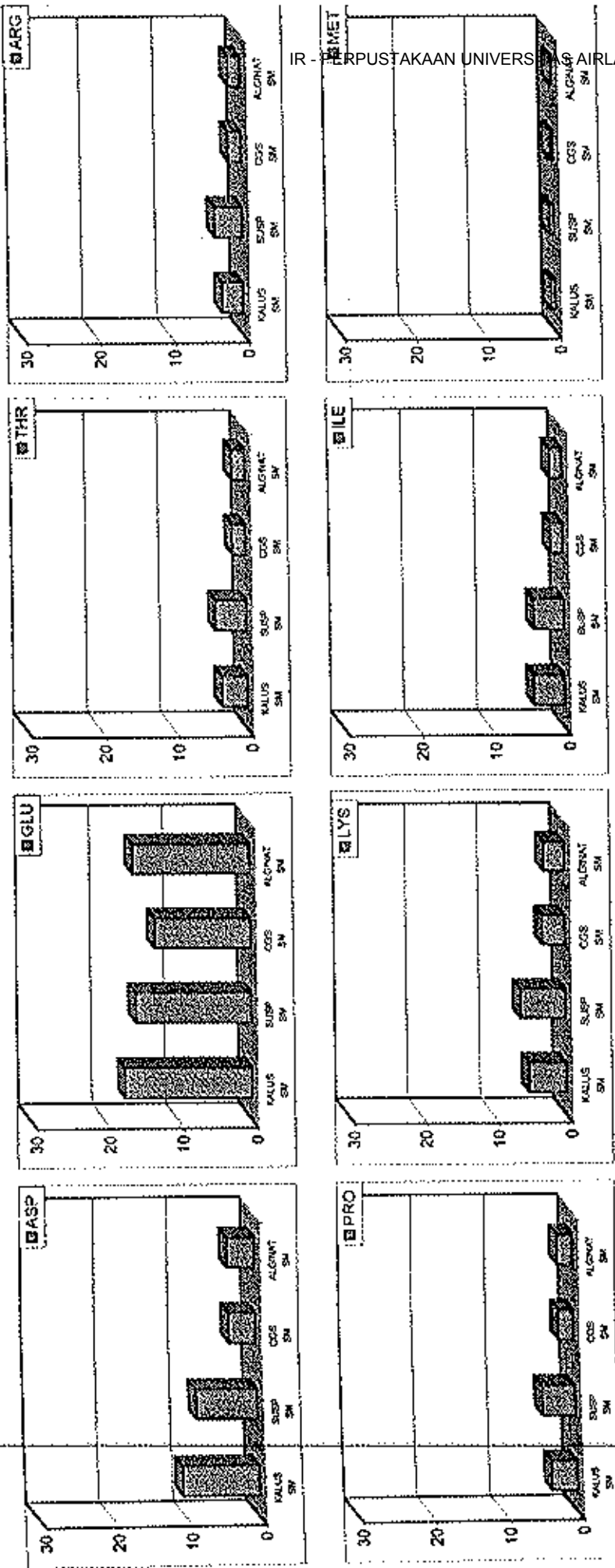
Keterangan : Nomor 1-3 : asam amino kelompok I
 Nomor 4-6 : asam amino kelompok II
 Nomor 7-9 : asam amino kelompok III
 Nomor 10-12 : asam amino kelompok IV
 Nomor 13-17 : asam amino kelompok V



Gambar 8. Histogram rasio kadar masing-masing asam amino/protein total dari berbagai jenis kultur dan organ tanaman *S. mammosum*, *S. laciniatum* dan *S. khasianum*



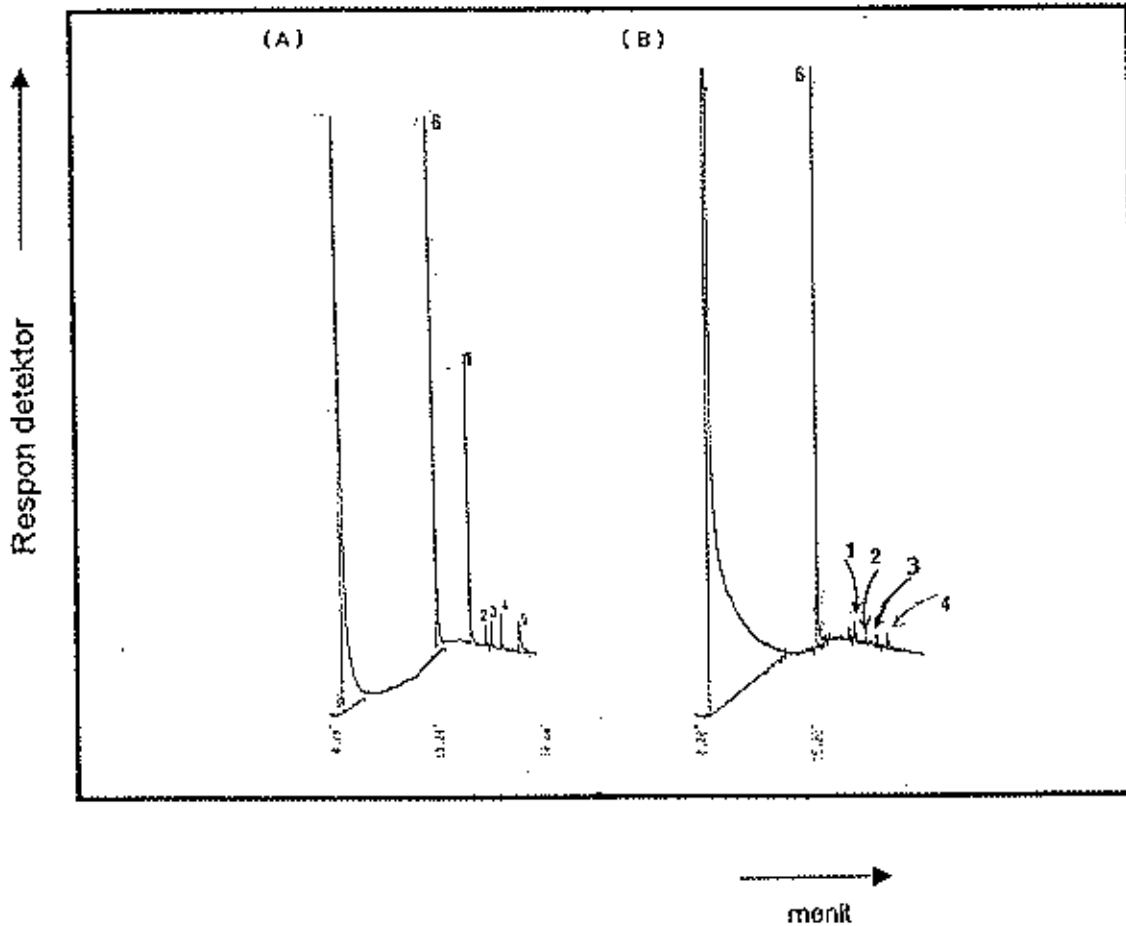
Gambar 9. Histogram nilai rasio asam amino kelompok aspartat dan glutamat terhadap kadar protein total dari organ daun dan buah *Solanum mammosum* dan *Solanum khasianum*, serta kulit pucuk *Solanum laciniatum* (kode SL-7)



Gambar 10. Histogram nilai rasio asam amino kelompok aspartat dan glutamat terhadap kadar protein total dari kultur kalus, kultur suspensi, kultur amobil "CGS" dan kultur amobil alginat dari *Solanum mammosum*

4.5. Data hasil pengamatan kadar fitosteroid

Kadar fitosteroid diamati dengan GC detektor FID, baik dalam ekstrak fraksi kloroform dan hidrolisatnya. Contoh kromatogram dari larutan standar dan sampel dapat dilihat pada gambar 11, data hasil pengamatan disajikan dalam tabel 7.



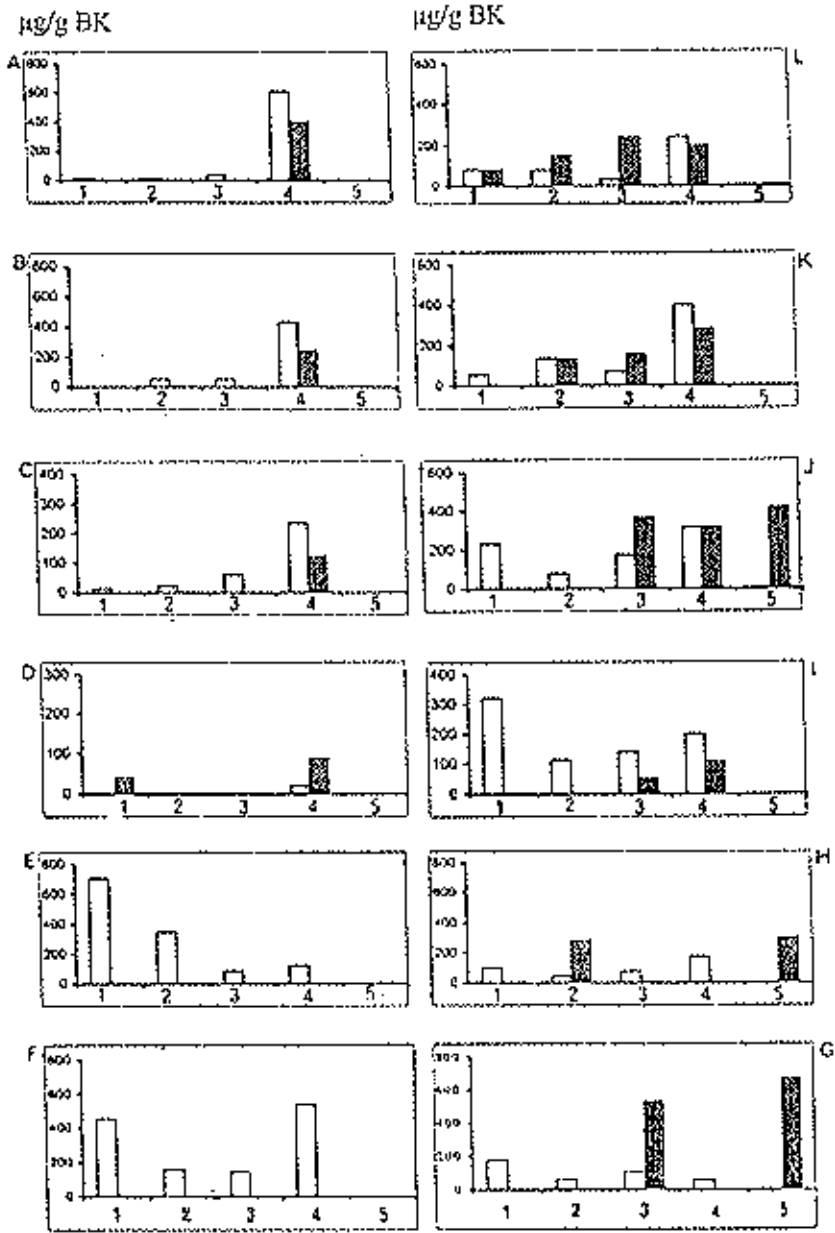
Keterangan : 1. Kolesterol
2. Kampesterol
3. stigmasterol
4. sitosterol
5. solasodina
6. progesteron

A : Larutan standar
B : Larutan sampel

Gambar 11. Contoh kromatogram dari ekstrak fraksi kloroform kultur pucuk *Solanum laciniatum* (kode SL-7) (Kodisi alat lihat 3.4.2.7)

Tabel 7 . Data hasil pengamatan kadar fitosterol (ug/g BK) dari berbagai jenis kultur dan organ *Solanum mammosum*, *Solanum laciniatum* dan *Solanum khasianum*

JENIS SAMPEL	Fraksi kloroform				Fraksi hidrolisat			
	Kolesterol	Kampesterol	Stigmasterol	Sitosterol	Kolesterol	Kampesterol	Stigmasterol	Sitosterol
	SM-K.KALUS	TRACE	TRACE	40,1	601,2	TRACE	TRACE	TRACE
SM-K.SUSPENSI	TRACE	TRACE	53,1	430,8	TRACE	TRACE	TRACE	245,5
SM-K.AMOBIL"CGS"	TRACE	TRACE	63,2	232,1	TRACE	TRACE	TRACE	122,7
SM-K.A.ALGINAT	TRACE	TRACE	TRACE	19,6	TRACE	TRACE	TRACE	131,2
SM-K.PUCUK	706,8	348	86,8	123,1	TRACE	TRACE	TRACE	TRACE
SM-ORGAN DAUN	453,8	158,1	146,6	540,0	TRACE	TRACE	TRACE	TRACE
SM-ORGAN BUAH	171,3	62,7	110,3	57,1	TRACE	(-)	533,9	TRACE
SL-K.KALUS	81,8	77,8	32,6	243,0	81,7	150,2	238,7	199,9
SL-K.SUSPENSI	53,6	135,1	71,3	400,0	(-)	133,8	159,1	281,6
SL-K.PUCUK	232,3	79,3	172,0	313,8	(-)	(-)	364,3	317,4
SK-K.PUCUK	TD	TD	TD	TD	TD	TD	TD	TD
SK-ORGAN DAUN	313,8	110,0	140,2	198,1	(-)	(-)	50,5	19,4
SK-ORGAN BUAH	98,8	43,3	77,3	175,7	(-)	285,9	(-)	(-)



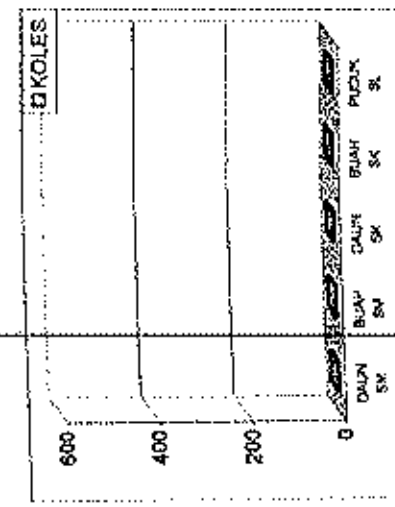
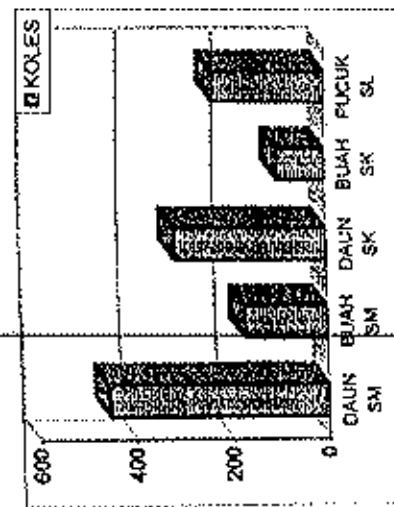
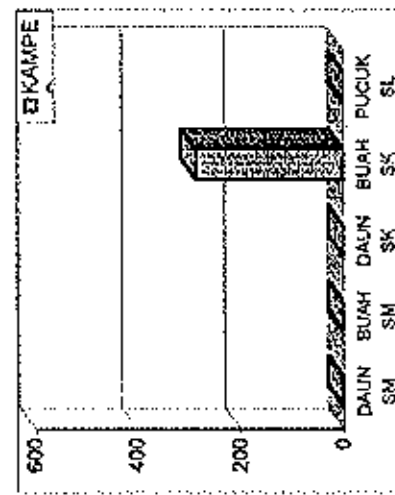
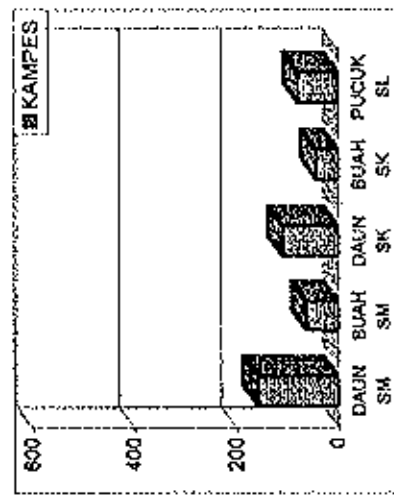
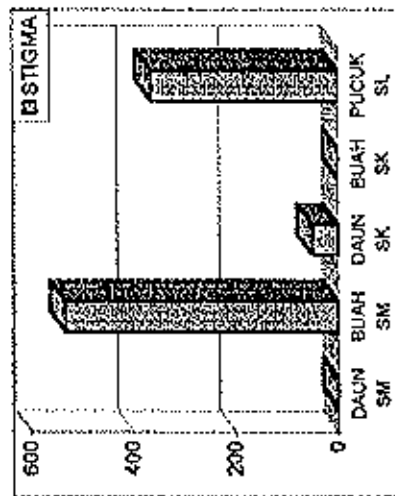
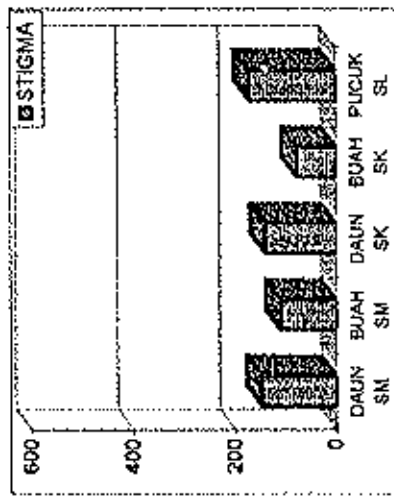
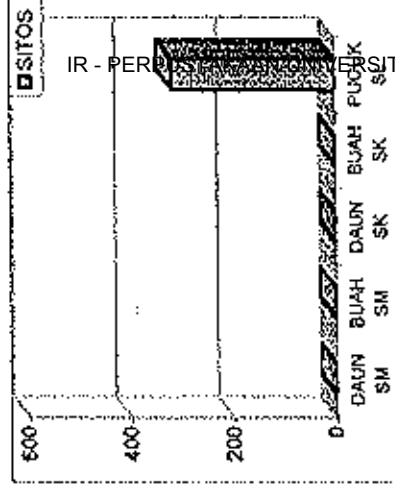
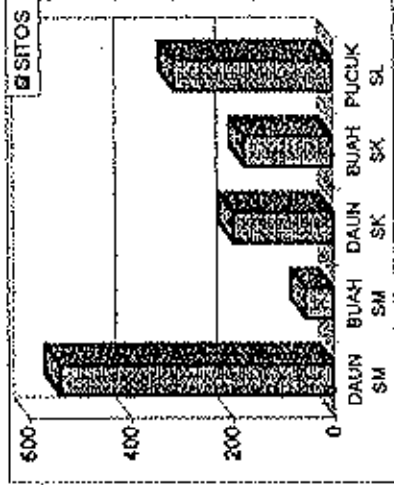
Gambar 12. Histogram kadar fitosterol dari berbagai jenis kultur dan organ *S. mammosum*, *S. laciniatum* dan *S. khasianum* (□) fraksi kloroform dan (▨) fraksi hidrolisat.

Keterangan :

- A. Kultur kalus *Solanum mammosum* (kode SM)
- B. Kultur suspensi *Solanum mammosum* (kode SM)
- C. Kultur amobil "CGS" *Solanum mammosum* (kode SM)
- D. Kultur amobil alginat *Solanum mammosum* (kode SM)
- E. Kultur pucuk *Solanum mammosum* (kode smp)
- F. Organ daun *Solanum mammosum*
- G. Organ buah *Solanum mammosum*
- H. Kultur kalus *Solanum laciniatum* (kode SL-7)
- I. Kultur suspensi *Solanum laciniatum* (kode SL-7)
- J. Kultur pucuk *Solanum laciniatum* (kode SL-7)
- K. Organ daun *Solanum khasianum*
- L. Organ buah *Solanum khasianum*

Keterangan

1. Kolesterol
2. Kampesterol
3. Stigmasterol
4. Silosterol
5. Solasodina



Gambar 13. Histogram kadar fitosterol organ daun dan buah *Solanum mammosum* dan *Solanum khasianum* serta kultur pucuk *Solanum faciniatum* (kode SL-7)

4.6. Data hasil analisa kualitatif kandungan solasodina

Analisa kualitatif kandungan solasodina dilakukan dengan KLT (Kieselgel 60 F254), kemudian dikembangkan dengan campuran eluen kloroform : metanol : dietyl amin (20 : 2 : 0,5). Dengan penampak noda Dragendorff, noda senyawa pembanding solasodina tampak berwarna orange pada $R_f = 0,6$. Data hasil pengamatan disajikan dalam tabel 8.

Tabel 8. Data hasil pengamatan analisa kualitatif kandungan solasodina dengan KLT

Jenis sampel	<i>Solanum mammosum</i>	<i>Solanum laciniatum</i>	<i>Solanum khasianum</i>
Kultur kalus	Negatif	Negatif	TD
Kultur suspensi	Negatif	Negatif	TD
Kultur amobil "CGS"	Negatif	TD	TD
Kultur amobil alginat	Negatif	TD	TD
Kultur pucuk	Negatif	Positif	Negatif
Organ daun	Negatif	TD	Negatif
Organ buah	Positif	TD	Positif

Keterangan :

Solanum mammosum : Kultur kalus, suspensi, amobil "CGS", amobil alginat dari *S. mammosum* (kode SM), kultur pucuk *S. mammosum* (kode smp), organ daun dan buah *S. mammosum*

Solanum laciniatum : Kultur kalus, suspensi dan kultur pucuk dari *S. laciniatum* (kode SL-7)

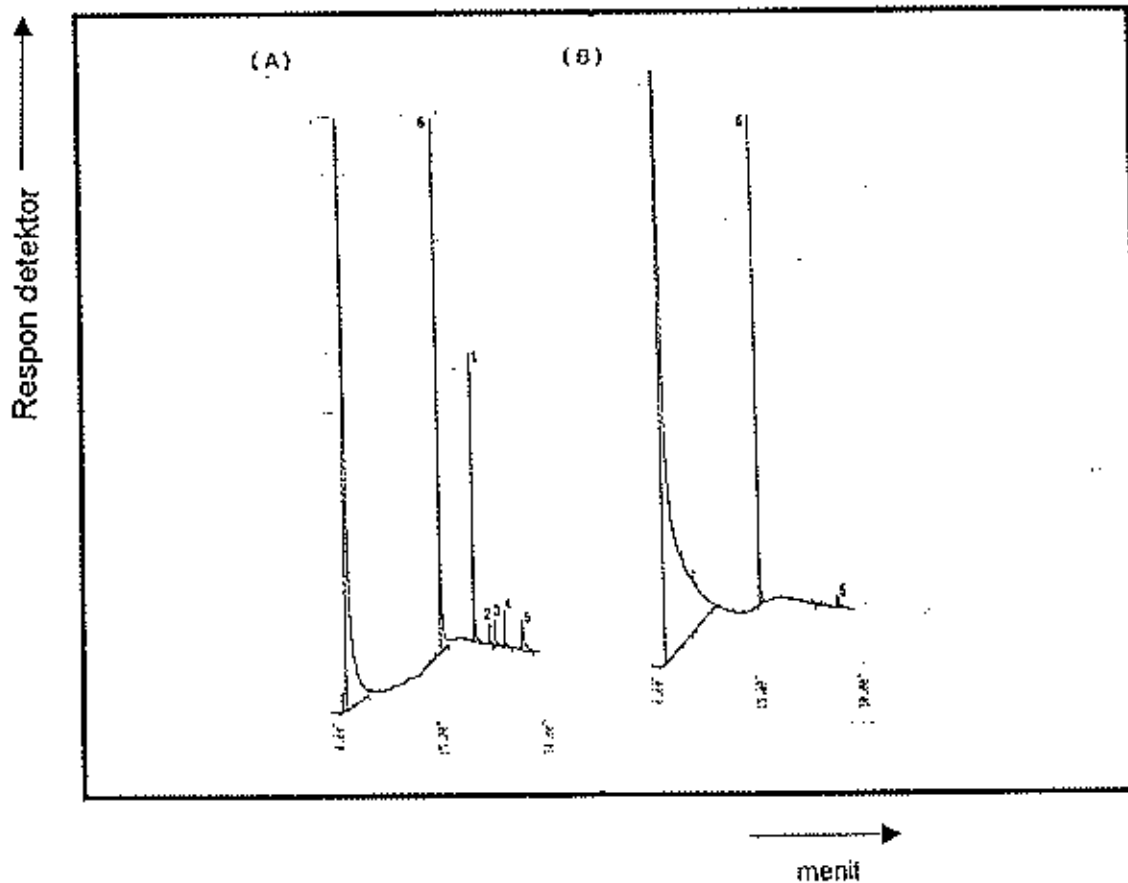
Solanum khasianum : Kultur pucuk dari *S. khasianum* (kode SK-5), organ daun dan buah dari *S. khasianum*

TD : Tidak diamati

Negatif : Tidak adanya noda yang sama dengan noda senyawa pembanding solasodina

4.7. Hasil analisa kuantitatif kandungan solasodina

Kadar solasodina diamati dengan GC detektor FID dari ekstrak fraksi hidrolisatnya. Contoh kromatogram dari larutan standar dan sampel dapat dilihat pada gambar 14, data hasil pengamatan disajikan dalam tabel 9.



Keterangan : 1. Kolesterol
2. Kampesterol
3. stigmasterol
4. sitosterol
5. solasodina
6. progesteron

A : Larutan standar
B : Larutan sampel

Gambar 14. Contoh kromatogram dari larutan standar dan ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* (kode SL-7) (Kodisi alat lihat 3.4.2.7)

Tabel 9. Data hasil pengamatan analisa kuantitatif kandungan solasodina dengan GC (ug/g)

Jenis sampel	<i>Solanum mammosum</i>	<i>Solanum laciniatum</i>	<i>Solanum khasianum</i>
Kultur kalus	Negatif	Negatif	TD
Kultur suspensi	Negatif	Negatif	TD
Kultur amobil "CGS"	Negatif	TD	TD
Kultur amobil alginat	Negatif	TD	TD
Kultur pucuk	Negatif	4.159,2	TD
Organ daun	Negatif	TD	Negatif
Organ buah	6.709,2	TD	3.017,2

Keterangan :

Solanum mammosum : Kultur kalus, suspensi, amobil "CGS", amobil alginat dari *S. mammosum* (kode SM), kultur pucuk *S. mammosum* (kode smp), organ daun dan buah *S. mammosum*

Solanum laciniatum : Kultur kalus, suspensi dan kultur pucuk dari *S. laciniatum* (kode SL-7)

Solanum khasianum : Organ daun dan buah dari *S. khasianum*

TD : Tidak diamati

Negatif : Tidak tampak adanya puncak area yang sama dengan senyawa pembanding solasodina

BAB V PEMBAHASAN

Profil asam amino

Solanum mammosum. Dari gambar 4 dapat dilihat bahwa profil asam amino pada berbagai jenis kultur dan organ yang diamati adalah mirip. Glutamat dan aspartat merupakan komponen asam amino utama (glutamat 2,80-5,04 % BK dan aspartat 0,76-2,43% BK). Kadar glutamat selalu lebih tinggi dari pada kadar aspartat. Asam amino lain yang juga menunjukkan kadar relatif tinggi adalah leusin atau lisin (0,83-1,43 % BK) banyak terakumulasi pada kultur kalus dan suspensi; alanin (0,98-1,65 % BK) banyak terakumulasi pada kultur amobil "CGS" dan kultur amobil alginat; arginin (1,36 % BK) banyak terakumulasi pada kultur pucuk; leusin (1,75% BK) banyak terakumulasi pada organ daun dan glisin serta prolin banyak terakumulasi pada organ buah (Tabel 4). Pada organ buah menunjukkan bahwa hampir semua komponen asam amino kelompok aspartat dan glutamat mempunyai kadar relatif lebih rendah dari berbagai jenis kultur dan organ lainnya: yaitu prolin (0,48%BK), lisin (0,35% BK), treonin (0,26 %BK), arginin (0,36% BK) dan isoleusin (0,32%BK). Sedangkan pada kultur pucuk dan organ daun komponen asam amino ini menunjukkan kadar relatif lebih tinggi: yaitu prolin (0,66-1,33%BK), lisin (1,13-1,20%BK), treonin (0,68-0,93%BK), arginin (1,07-1,36%BK) dan isoleusin (0,71-1,01%BK).

Solanum laciniatum. Dari gambar 4. dapat dilihat bahwa glutamat dan aspartat juga merupakan asam amino utama, tetapi kadar glutamat tidak selalu lebih tinggi dari aspartat. Pada kultur kalus dan suspensi, kadar glutamat lebih tinggi dari

aspartat (glutamat 2,18-3,11% BK dan aspartat 1,61-4,30% BK), sedangkan pada kultur pucuk, kadar aspartat lebih tinggi dari glutamat (aspartat 4,3% BK dan glutamat 3,18% BK). Asam amino lain yang juga menunjukkan kadar relatif tinggi adalah leusin (0,84-1,22 % BK) dan lisin (1,07-1,16% BK) pada kultur kalus dan suspensi dan arginin (1,52%BK) pada kultur pucuknya. Komponen asam amino kelompok aspartat dan glutamat pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* (kode SL-7) juga menunjukkan kadar relatif lebih tinggi daripada kultur kalus dan suspensinya.

Solanum khasianum. Pada spesies tanaman ini, glutamat dan aspartat juga merupakan asam amino utama (glutamat 0,99-6,78 % BK dan aspartat 0,56-5,63 % BK), tetapi kadar glutamat tidak selalu lebih tinggi dari aspartat. Pada kultur pucuk dan organ buah, kadar glutamat lebih tinggi dari aspartat, tetapi pada organ daun terjadi hal yang sebaliknya, aspartat lebih tinggi dari glutamat. Asam amino lain yang juga menunjukkan kadar relatif tinggi adalah arginin banyak terakumulasi pada kultur pucuk, leusin banyak terakumulasi pada organ daun, dan leusin serta glisin banyak terakumulasi pada organ buah. Sebagian besar komponen asam amino pada kultur pucuk menunjukkan kadar relatif tinggi: yaitu glutamat (6,78%BK), aspartat (5,63%BK), lisin (0,99%BK), treonin (0,64%BK), arginin (2,79%BK) dan isoleusin (0,68%BK).

Dari data diatas menunjukkan bahwa glutamat (0,98-6,78 % BK) dan aspartat (0,56-5,63% BK) merupakan asam amino utama pada hampir semua jenis kultur dan organ dari tiga spesies *Solanum* yang diamati.

Schrepsema dan Verpotee (1991) melaporkan bahwa arginin (3,5%BK) dan glutamin (0,7%BK) merupakan asam amino utama pada dua strain kultur suspensi

sel *Tabernaemontana divaricata*, sedangkan glutamin (0,7% BK; arginin 0,2% BK dan phenilalanin 0,3% BK) merupakan asam amino utama pada kultur suspensi *Catharanthus roseus*. Glutamin (2% BK), alanin (3% BK) dan serin (1% BK) merupakan asam amino utama pada kultur kalus embrionik dari tanaman jagung (Claparols dkk, 1992). Bewley dkk (1986) juga melaporkan bahwa alanin (1% BK), asam glutamat (2,6% BK) dan leusin (1,9% BK) merupakan asam amino utama pada biji tanaman jagung.

Data-data di atas menunjukkan bahwa spesies tanaman yang berbeda menunjukkan perbedaan pula profil asam aminonya. Sehingga hal ini menarik untuk diteliti apakah asam amino dapat menjadi suatu ciri famili tanaman.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, ditemui pula perbedaan profil asam amino antara berbagai jenis kultur dan organ yang diamati. Asam amino lain yang juga menunjukkan kadar relatif tinggi disamping glutamat dan aspartat adalah leusin dan lisin (0,83-1,35%BK) banyak terakumulasi pada kultur kalus dan suspensi, alanin banyak terakumulasi pada kultur amobil (0,98-1,65% BK), arginin banyak terakumulasi pada kultur pucuk (1,36-2,79 % BK), leusin banyak terakumulasi pada organ daun (1,14-1,75 % BK), sedangkan glisin (0,47-0,53 % BK), prolin (0,27-0,48 % BK) dan leusin (0,44-0,49% BK) banyak terakumulasi organ buah.

Hal ini menunjukkan bahwa pada berbagai jenis kultur dan organ yang berbeda, terdapat perbedaan pula profil asam aminonya. Sehingga hal ini juga menarik untuk diteliti lebih lanjut.

Kandungan protein

Solanum mammosum. Berdasarkan analisa protein yang dilakukan menunjukkan bahwa organ buah mempunyai kadar protein relatif rendah (11,34% BK) dibandingkan yang lainnya. Sedangkan diantara kultur sel yang diamati, kultur amobil "CGS" menunjukkan kadar protein relatif tinggi (31,82% BK), kemudian diikuti kultur suspensi (21,61% BK), kultur amobil alginat (20,01% BK) dan terendah pada kultur kalusnya (16,26% BK).

Solanum laciniatum. Kadar protein pada kultur pucuk relatif rendah (20,51% BK) dibandingkan kultur kalusnya (23,75 % BK) dan kultur suspensinya (25% BK).

Solanum khasianum. Organ buah juga mempunyai kadar protein relatif rendah (7,6% BK) dibandingkan organ daun (21,04% BK) dan kultur pucuk (33,35% BK).

Dari data di atas, dapat disimpulkan bahwa kandungan protein pada organ buah relatif lebih rendah dibandingkan organ daun dan berbagai jenis kultur yang diamati. Hal ini sesuai dengan pendapat Frank et al (1982), yang menjelaskan bahwa sebagian besar sel-sel pada organ buah sudah dewasa (terdiferensiasi menjadi tempat penyimpanan), sel-selnya tidak aktif membelah, dan tingkat respirasinya rendah. Sehingga distribusi protein, yang merupakan salah satu sumber energi biosintesa senyawa organik tanaman pada organ buah menjadi rendah. Keadaan ini berbeda dengan organ daun, yang sebagian besar sel-selnya, relatif masih muda, aktif melakukan pembelahan dan mempunyai tingkat respirasi lebih tinggi, maka akumulasi protein pada organ ini menjadi lebih tinggi.

Diantara kultur sel yang diamati, kultur amobil mempunyai kadar protein relatif lebih rendah dari pada kultur suspensi bebasnya. Hal ini sesuai dengan pendapat Abdul mazid (1993), yang menjelaskan bahwa amobilisasi sel tanaman dapat mengakibatkan tingkat pertumbuhan sel menjadi rendah. Sel yang tingkat pertumbuhannya rendah, mempunyai tingkat respirasi yang rendah pula. Sehingga pada kultur ini hanya sedikit membutuhkan protein sebagai energi untuk pertumbuhannya dan sebagai akibatnya, protein yang terbentuk menjadi banyak banyak yang terakumulasi. Berdasarkan penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa tingkat pertumbuhan pada kultur amobil (amobil "CGS" dan amobil alginat) lebih rendah dari tingkat pertumbuhan kultur suspensi bebasnya (gambar 1).

Rasio asam amino/protein

Solanum mammosum. Profil nilai rasio asam amino/protein total pada berbagai jenis kultur dan organ yang diamati tidak jauh berbeda dengan profil kadar asam amino absolutnya. Yaitu glutamat (6,61-28,66) dan aspartat (3,58-20,97) juga menunjukkan nilai rasio asam amino terhadap protein total relatif tinggi. Asam amino lain yang juga mempunyai nilai rasio terhadap kadar protein relatif tinggi adalah leusin (5,10-6,62) dan lisin (5,10-6,25) pada kultur kalus dan suspensi, alanin (4,90-5,19) pada kultur amobil, arginin (5,54) pada kultur pucuk, leusin (7,49) dan prolin (5,69) pada organ daun dan glisin (4,67) serta prolin (4,23) pada organ buahnya.

Nilai rasio aspartat / protein total (18,52) dan glutamat / protein total (28,66) pada organ buah lebih tinggi dari organ daun dan kultur selnya. Sedangkan nilai rasio arginin / protein total (4,58), treonin / protein total (3,98), isoleusin / protein total (4,32), lisin / protein total (5,14) dan prolin / protein total (5,69) pada organ daun lebih tinggi dari pada organ buah dan kultur selnya. Nilai rasio alanin/protein total pada kultur amobil "CGS" dan alginat juga relatif tinggi (4,90-5,19) dibandingkan dari kultur kalus dan suspensinya.

Solanum laciniatum. Glutamat (8,72-15,5) dan aspartat (6,44-20,97) juga menunjukkan nilai rasio terhadap protein total relatif tinggi dari pada asam amino lainnya. Arginin (7,41) juga menunjukkan nilai rasio relatif tinggi pada kultur pucuknya. Leusin (3,54-4,88) dan lisin (4,51-4,64) menunjukkan nilai relatif tinggi pada kultur kalus dan suspensinya. Hampir semua nilai rasio asam amino yang diamati pada kultur pucuk relatif lebih tinggi dari pada kultur selnya, kecuali nilai rasio lisin / protein total (4,00).

Solanum khasianum. Sama dengan dua spesies yang lainnya, glutamat (6,61-20,33) dan aspartat (7,35-16,88) juga menunjukkan nilai rasio terhadap protein total relatif tinggi pada kultur pucuk, organ daun dan buahnya. Arginin juga merupakan asam amino penyusun protein pada kultur pucuk, leusin sebagai asam amino penyusun protein pada organ daun dan glisin serta leusin sebagai penyusun asam amino penyusun protein pada organ buah. Hampir semua nilai rasio asam amino terhadap kadar protein yang diamati pada organ buah relatif lebih tinggi dari organ daun dan kultur pucuknya. Hanya aspartat (10,41) dan prolin (3,61) yang menunjukkan nilai rasio terhadap protein lebih tinggi pada organ daunnya.

sedangkan pada kultur pucuknya hanya glutamat (20,33), aspartat (16,88) dan arginin (8,37) yang menunjukkan nilai rasio terhadap protein lebih tinggi.

Dari data diatas dapat disimpulkan bahwa glutamat dan aspartat merupakan komponen asam amino utama penyusun protein pada berbagai jenis kultur dan organ yang diamati. Leusin dan lisin juga merupakan asam amino utama penyusun protein pada kultur kalus dan suspensi, alanin merupakan asam amino utama penyusun protein kultur amobil, arginin juga merupakan asam amino utama penyusun protein pada kultur pucuk, leusin dan prolin juga merupakan asam amino penyusun protein pada organ daun, leusin, prolin serta glisin juga merupakan asam amino utama penyusun protein organ buah.

Profil fitosterol

Solanum mammosum. Dari gambar 12. dapat dilihat bahwa sitosterol merupakan fitosterol utama pada berbagai jenis kultur sel (kalus, suspensi, amobil "CGS" dan amobil alginat), baik dalam ekstrak fraksi kloroform dan hidrolisatnya. Dalam ekstrak fraksi kloroform dari kultur pucuk dan organ daun, kolesterol juga merupakan komponen fitosterol utama. Tetapi dalam ekstrak fraksi hidrolisatnya tidak ditemui adanya komponen fitosterol utama, karena semua fitosterol hanya dapat terakumulasi dalam jumlah yang tidak terukur atau trace. Sedangkan dalam fraksi hidrolisat dari organ buah, hanya stigmasterol yang dapat terakumulasi. Kampesterol dalam organ ini tidak dapat terakumulasi.

Solanum laciniatum. Sama dengan *Solanum mammosum*, sitosterol juga merupakan fitosterol utama dalam fraksi kloroform dari kultur selnya dan kolesterol juga merupakan fitosterol utama pada kultur pucuk. Dalam ekstrak fraksi hidrolisatnya, stigmasterol dan sitosterol merupakan fitosterol utama, baik pada kultur sel dan kultur pucuknya. Tetapi dalam fraksi hidrolisat kultur pucuknya, kolesterol dan kampesterol tidak terakumulasi

Solanum khasianum. Sitosterol dan kolesterol juga merupakan fitosterol utama dalam fraksi kloroform organ daun. Dalam ekstrak fraksi hidrolisatnya, hanya stigmasterol dan sitosterol yang terakumulasi, sedangkan kolesterol dan kampesterol tidak terakumulasi. Dalam ekstrak fraksi hidrolisat dari organ buah, hanya kampesterol yang terakumulasi.

Dari ketiga spesies tanaman yang diamati dapat diambil kesimpulan bahwa dalam ekstrak fraksi kloroformnya, sitosterol merupakan fitosterol utama dari semua jenis kultur dan organ yang diamati dan kolesterol juga merupakan fitosterol utama pada kultur pucuk serta organ daun. Terdapat perbedaan fitosterol utama dalam ekstrak fraksi hidrolisat dari berbagai jenis kultur dan organ tiga spesies tanaman yang diamati.

Solasodina

Berdasarkan analisis kualitatif dan kuantitatif yang telah dilakukan, hanya pada organ buah dari *Solanum mammosum* dan *Solanum khasianum* serta kultur pucuk *Solanum laciniatum* yang dapat diperoleh solasodina.

Ketidakmampuan kultur sel dari *Solanum mammosum* dan *Solanum lacinistum* (kode SL-7) dalam memproduksi solasodin diduga disebabkan oleh tidak terakumulasinya kolesterol bebas sebagai bahan dasar solasodina dan rendahnya kadar arginin (0,33-0,82%BK) sebagai sumber N dalam biosintesa solasodina. Hal ini sesuai dengan pendapat Indrayanto (1983) yang menjelaskan bahwa jalur biosintesa solasodina berasal dari kolesterol (lampiran 7). Ketidakberadaan kolesterol pada kultur sel diduga disebabkan bahan yang ada tidak digunakan membentuk kolesterol, tetapi banyak digunakan untuk membentuk fitosterol yang lain, misalnya sitosterol. Berdasarkan penelitian yang dilakukan diperoleh hasil bahwa, kolesterol ditemukan dalam jumlah yang tidak dapat terukur dalam ekstrak fraksi kloroformnya dari semua kultur sel. Sedangkan sitosterol merupakan fitosterol yang dapat terakumulasi dalam jumlah besar pada semua kultur sel dari *Solanum mammosum* (243,0-601,2 $\mu\text{g/g}$ BK) (gambar 12).

Namun pada kultur pucuk *Solanum mammosum*, dimana kolesterol bebas dan arginin dapat terakumulasi dalam jumlah relatif tinggi (kolesterol 706,8 $\mu\text{g/g}$ BK dan arginin 1,36%BK), ternyata tetap tidak mampu memproduksi solasodina. Hal ini diduga disebabkan kolesterol yang terakumulasi tidak digunakan membentuk

solasodina, karena dalam sel kultur pucuk tidak tersedia organ sel sebagai tempat penyusunan solasodina. Hal ini berbeda dengan kultur pucuk *Solanum laciniatum*, diduga didalam selnya sudah tersedia organ sebagai tempat penyusunan solasodina. Sehingga kolesterol dan arginin yang ada dapat digunakan untuk membentuk solasodina. Data di atas menunjukkan adanya perbedaan biosintesa solasodina antara *Solanum mammosum* dan *Solanum laciniatum*.

Tidak ditemukannya solasodina dalam organ daun *Solanum mammosum* dan *Solanum khasianum* diduga juga disebabkan tidak tersedianya organ sel sebagai tempat penyusunan solasodina. Kolesterol dan arginin yang diduga sebagai prekursor solasodina, sebenarnya dapat terakumulasi dalam jumlah relatif besar (kolesterol 313,8-453,8 $\mu\text{g/g}$ BK dan arginin 0,65-1,07%BK). Tetapi tidak digunakan untuk membentuk solasodina dan diduga ditransport ke dalam organ buah sebagai tempat pembentukan solasodina. Hal ini sesuai dengan pendapat Willuhn (1970) yang menjelaskan bahwa pada *Solanum dulcamara* tidak terjadi tranport alkaloid steroid dari pucuk ke organ buah. Diduga hanya terjadi transport prekursor-prekursornya dari pucuk ke buah sebagai tempat penyusunan alkaloid steroid dari *Solanum dulcamara*.

Data di atas juga menunjukkan adanya kemiripan biosintesa solasodina antara *Solanum mammosum* dan *Solanum khasianum*, tidak terbukti adanya hubungan antara keberadaan kolesterol, arginin dan keberadaan solasodina, khususnya pada dua spesies tanaman ini.

BAB VI

KESIMPULAN

- I. 1. Dari penelitian yang dilakukan diperoleh hasil bahwa diferensiasi sel dan jenis organ menyebabkan perubahan profil asam amino dari *Solanum mammosum*, *Solanum laciniatum* dan *Solanum khasianum*.
2. Organ buah mempunyai kadar asam amino relatif lebih rendah dari organ daun, sedangkan kultur sel yang terdiferensiasi mempunyai kadar relatif lebih rendah dari kultur kalus dan kultur suspensinya.
3. Glutamat dan aspartat merupakan asam amino utama pada berbagai jenis kultur dan organ yang diamati, tetapi terdapat perbedaan asam amino yang lain antara berbagai jenis kultur dan organ yang diamati. Lisin dan leusin banyak terdapat pada kultur kalus dan suspensi, alanin banyak terdapat pada kultur amobil ("CGS" dan alginat), arginin banyak terdapat pada kultur pucuk, leusin dan prolin banyak terdapat pada organ daun dan glisin prolin serta leusin banyak terdapat pada organ buah.
- II. Organ buah mempunyai kadar protein lebih rendah dari organ daun, sedangkan kultur sel terdiferensiasi mempunyai kadar protein lebih tinggi dari kultur kalus dan suspensinya.
- III. Nilai rasio asam amino glutamat dan aspartat terhadap protein total pada organ buah lebih tinggi daripada organ daun, sedangkan pada kultur sel terdiferensiasi lebih rendah daripada kultur kalus dan kultur suspensi bebasnya.

- IV. 1. Semua jenis kultur sel yang diamati tidak mengandung kolesterol dalam ekstrak fraksi kloroformnya, dan hanya mengandung sitosterol. Pada kultur pucuk dan organ daun, kolesterol juga merupakan fitosterol utama. Diantara organ yang mampu mengakumulasi solasodina terdapat perbedaan kandungan fitosterol dalam ekstrak fraksi hidrolisatnya.
- V. 1. Dari berbagai jenis kultur dan organ yang diamati, hanya kultur pucuk *Solanum laciniatum*, organ buah *Solanum mammosum* dan *Solanum khasianum* yang mengandung solasodina.
2. Diduga terdapat kemiripan biosintesa solasodina antara *Solanum mammosum* dan *Solanum khasianum*, yaitu terjadi transport prekursor solasodina dari daun ke dalam buah. Tetapi terdapat perbedaan dengan *Solanum laciniatum*.
3. Tidak terdapat hubungan antara keberadaan kolesterol, arginin dan keberadaan solasodina, khususnya pada *Solanum mammosum* dan *Solanum khasianum*.

BAB VII

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang :

1. Efek diferensiasi dan jenis organ terhadap kandungan metabolit tanaman yang lain.
2. Efek diferensiasi dan jenis organ terhadap kandungan asam amino dan fitosteroid dari berbagai jenis kultur dan jenis organ serta dari tanaman yang lain.
3. Pemberian label pada asam amino arginin agar diketahui secara pasti sumber N dalam biosintesa solasodina

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. (1990), Edisi 15, Association of Official Analytical Chemistry, Arlington, Virginia 22201. USA.
- Backer, C.A. & Bakman Van den Brink, R.C. (1968) Flora of Java Vol II, Wolters-Noordhoff . Groningen, pp 470-472.
- Bewley, J.D. and Michael Black (1984) Seeds, Plenum, New York and London, p 17-25
- Bhojwani, S.S. dan M.K. Razdan (1983) Plant Tissue Culture Theory and Practice, Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo.
- Bray, C.M. (1983) Nitrogen metabolism in plant, Longman, London and New York.
- Buitelaar, R.M. and J. Tramper (1992) Journal Biotechnology 23 : p 111 in Zhang, J.Z. and J.J. Harada, (1994) Gen expression in plant cells in Advances in Plant Biotechnology. Elsevier. Amsterdam – New York- London – Tokyo.
- Carle, R., (1979) Untersuchungen zur Steroid Alkaloid und Sapogenin Fuhung in Pflanzen und Zellkulturen der Gatung *Solanum* L. Dissertation.
- Chadler, S.F. and Doods, J.H., (1983) The effect of Phosphate, Nitrogen and Sucrosa on the production of Phenolics and solasodin in callus culture of *Solanum laciniatum*.
- Cocromo, O.J. Aquarone, E. Gottlieb, O.R. (1981) Biosynthesis of Secondary Product in vitro. In Thorpe, T.A. (ed) Plant Tissue Culture, Methode and Application in Agriculture, Academic Press Inc. 359-371.
- Claparols, M.A. , Santos & J.M. Torne (1993) Influence of some exogenous amino acids on the production of Maize embrionic callus and on endogenous amino acids content, Plant cell, Tissue and organ culture, 34 :1-11.
- Conner, A.J. , (1987) Differential solasodine accumulation in photoautotropic and heterotropic tissue culture of *Solanum laciniatum*, Phytochemistry, Great Britain 26: 2749-2750.

- Doods, J.S., L.W. Robert, (1982) Experiment in Plant Tissue Culture. Cambrigde Press. London-New York.
- Drewes, F.E. & Steaden, J.V. (1995) Aspect of Extraction and Purification of Solasodine from *S. aculeastrum* tissues, *Phytochemical Analysis* 6:203-206.
- Erawati Munandar, T. (1994) Pengaruh L-arginin, Kasein hidrolisat, Tepung pisang dan Sakarosa terhadap kandungan solasodina Kultur Pucuk *S. laciniatum*, Tesis, Universitas Airlangga.
- Eltayeb, E.A., S.Al Ansari and James G. Roddick (1997) Changes in the Steroidal Alkaloid Solasodine During Development of *S. nigrum* dan *S. incanum*, *Phytochemistry*, 46, 3 : 489-494.
- Eric, et al (1994) Regulation of Shikimate Pathway in Suspension Culture Cells of Parsley (*Petroselinum crispum* L.) in *Anvances in Plant Biotechnology*. Elsevier. Amsterdam-Ney York- London- Tokyo. Pp 95-102.
- Emhke, A. And Eilert, V. (1986) Steroid Alkaoid in Tissue Cultures and Regenerated Plant of *Solanum dulcamara*, *Plant Cell Report*, 5 : 31-34.
- Farmakope Indonesia, (1979), Edisi III, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 807.
- Galanes, I.T., Webb, D.T., Rosario, O. (1984) Steroid Production by Callus and Cell Suspension Cultures of *S. aviculare*, *Journal of Natural Product* 47:373 – 376.
- Heide, L. (1988) *Bioengineering* 4, 93-95.
- Hitachi Technical data sheet. (1986), No. 6&10, Hitachi High Speed Amino Acid Analyzer, Hitachi, Ltd. Tokyo Japan.
- Indrayanto, G. (1983) Steroid und Zellkulturen Von *Solanum laciniatum* Ait., *S. wrightii* Benth und *Costus Spesious* (koen) SM, Dissertation. Universitas Tubingen.
- Indrayanto, G., Isnaeni dan Sutaryadi (1986) Sterol in callus cultures of *Solanum mammosum*, *Planta medica* 52 : pp 413.

- Indrayanto, G., Rahayu, L., Rahman, A., Noerani, PE. (1993), Effect of Calcium, Strontium, and Magnesium on the Formation of Phytosteroids in Callus Cultures of *Agave amaniensis*, *Planta Medica*, 59 :97-98.
- Indrayanto, G., Roby Sondakh, Acmad Syahrani and Wahyu Utami (1996). *Solanum mammosum* L. In vitro cultures and the production of Secondary metabolites.
- Joly, R. CH. Tamm, (1967). Biosynthesis of Steroidal Sapogenin. *Tetrahedron Lett.* 36, pp 3535.
- Kiel, D.F. (1993). *Solanum dulcamara* L. Der Bittersobe Nachschaffen, *Zeitchrift far Phytotheraphic* 14 : 337-342
- Kaneko, K., et al. (1976) Origin of Nitrogen in the biosynthesis of Solasodine by *Veratrum grandiflorum*, *Phytochemistry*. Vol 15: pp 1391-1393.
- Laurence, G.M. H. (1979) *Taxonomy of vascular plant*, The Mac Millan Company.
- Macek, T.E., (1989). *S. aviculare* Forst., *S. laciniatum* Ait (Poroporo) : In vitro Culture ang the production of Solasodin, *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol 7. Medical and Aromatic Plant II (ed by Y.P.S. Bajaj) Springer-verlag, Berlin, Heideleberg :pp 443-467
- Manitto, P. (1981) *Biosynthesis of Natural Product*, Ellis Horwood Ltd., Chigchester, 314-345.
- Mantell, S.H., et. Al. (1985), *Principle of Plant Biotechnology , An Introduction to Genetic Engineering in Plant*. Blackwell Scientific Publication. Oxford.
- Mattiasson, B. (1982) *Immobilized Cells and Organelles Vol I*, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Miller, R.H. (1969), A morphological study of *Solanum mammosum* and its mammiform fruit. *Bot. Gaz.* 130:230-237.
- Nabeta, K. (1993) *Solanum aculeatissimum* Jack : In vitro Culture and the Production of Secondary metabolites, *Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol 24. Medicinal and Aromatic Plants* (ed. By YPS. Bajaj) Springer Verlag. Berlin Heidelberg : 329-341.

- Parr, A.J. (1989) J. Biotechnology 10 (pp 1) in Zhang,J.Z. and J.J. Harada, (1994) Gen expression in plant cells in Advances in Plant Biotechnology. Elsevier. Amsterdam – New York- London – Tokyo.
- Rohr, J. and A.Zeeck (1990), Biogenetic chemical classification of secondary metabolites produced by fermentation. In Biotechnology Focus 2. Oxford University Press. New York. 251-281.
- Rattenbury, B.Sc.,Ph.D., (1981) Amino acid analysis, Ellis Harwood, Chichester, 153-175.
- Regenstein, C.E., (1984), Food Protein Chemistry, Academic Press, Inc. 83-109.
- Schripsema, J. And Robert Verpoorte (1991) Search for Factors Related to the Indole Alkaloid Production in Cell Suspension Cultures of *Tabernaemontana divaricata*, *Planta Medica* 58, 3: pp 229-300.
- Schripsema, J. And Robert Verpoorte (1991) Investigation of Extracts of Plant Cell Cultures by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *Phytochemical Analysis Vol. 2* : 155-162.
- Sierra, M.I. (1991) Aspect of Indole Alkaloid Accumulation in *Tabernaemontana* Tissue Culture, Pasmans offset drukkerij BV. S-Grarenhage.
- Tsoulpha (1990) and Doran, P.M. (1991), Solasodine Production from Self-immobilised *S. aviculare*, *Journal of Biotechnology* 19 : 99-110.
- Yeoman, M.M., (1986) Plant Cell Culture Technology. Blackwell Scientific Publications. Oxford-London-Edinburgh. Boston. P.A.I. OALTO. Melbourne.
- Wagner, H., Blads, S., Zgainski, E.M., (1984) Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Translated by TH. A.Scott., Spinger-Verlag Berlin Hedelberg, New York, pp 299-300.
- Willuhn, G., (1970), Untersuchungen Chemischen Differenzierung bei *Solanum dulcamara* L., *Ber. Dtsch. Bot. Ges. Bd. S2., H.10/11. S.657-663.*
- Tarigan, P. (1980) Sapogenin Steroid. Penerbit Alumni, Bandung. Indonesia. Pp 96-103.

LAMPIRAN

Lampiran I. Komposisi media MS yang dimodifikasi untuk pertumbuhan stok kultur pada Laboratorium Bioteknologi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

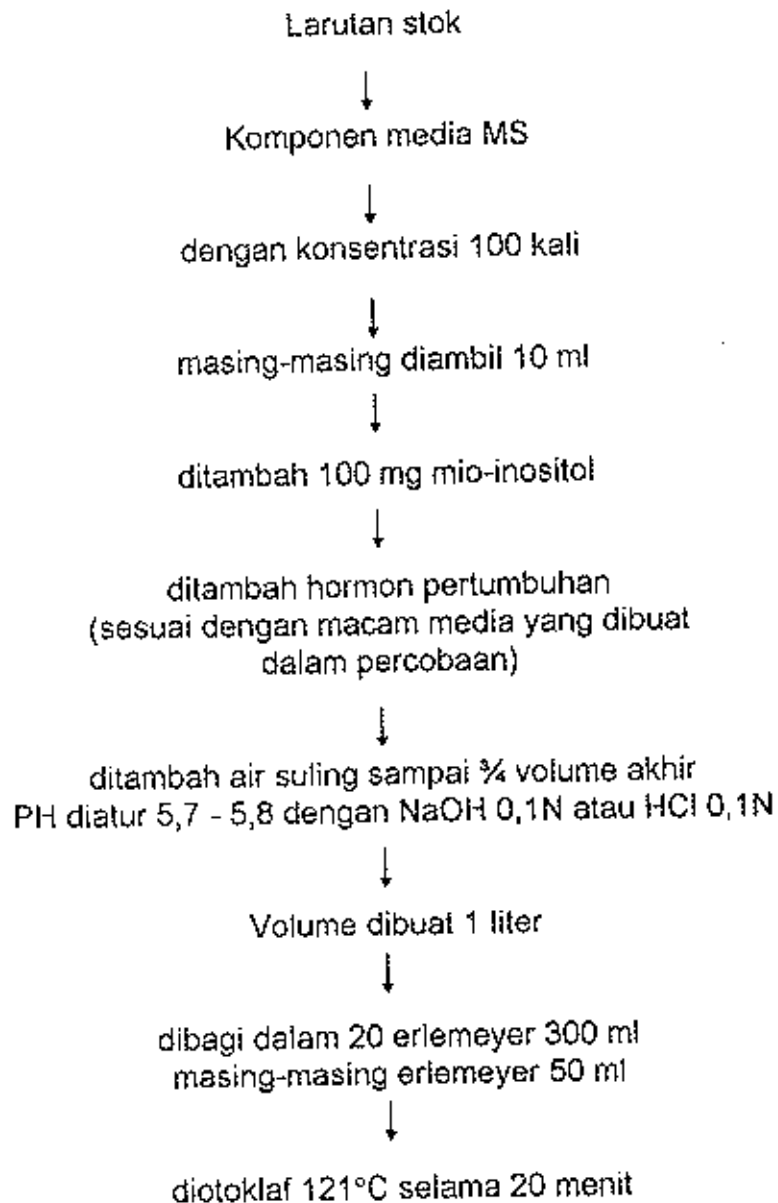
Komponen	Jumlah (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1600
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	400
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .7H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ .EDTA.2H ₂ O	0,25
Mio-inositol	100
Asam nikotinat	0,5
Piridoksin HCl	0,5
Tiamin HCl	0,1
Glisin	2
Sukrosa	30

Lampiran 2. Komponen tambahan untuk pembuatan media kultur kalus dan kultur pucuk dari *Solanum mammosum*, *Solanum laciniatum* dan *Solanum khasianum*

Komponen tambahan (MS +)	Jumlah (mg/l)	
	Kultur sel	Kultur pucuk
Casein	1000	100
mio-inositol	100	100
Sukrosa	30.000	30.000
Kinetin	2	-
BA	-	4
NAA	0,5	-

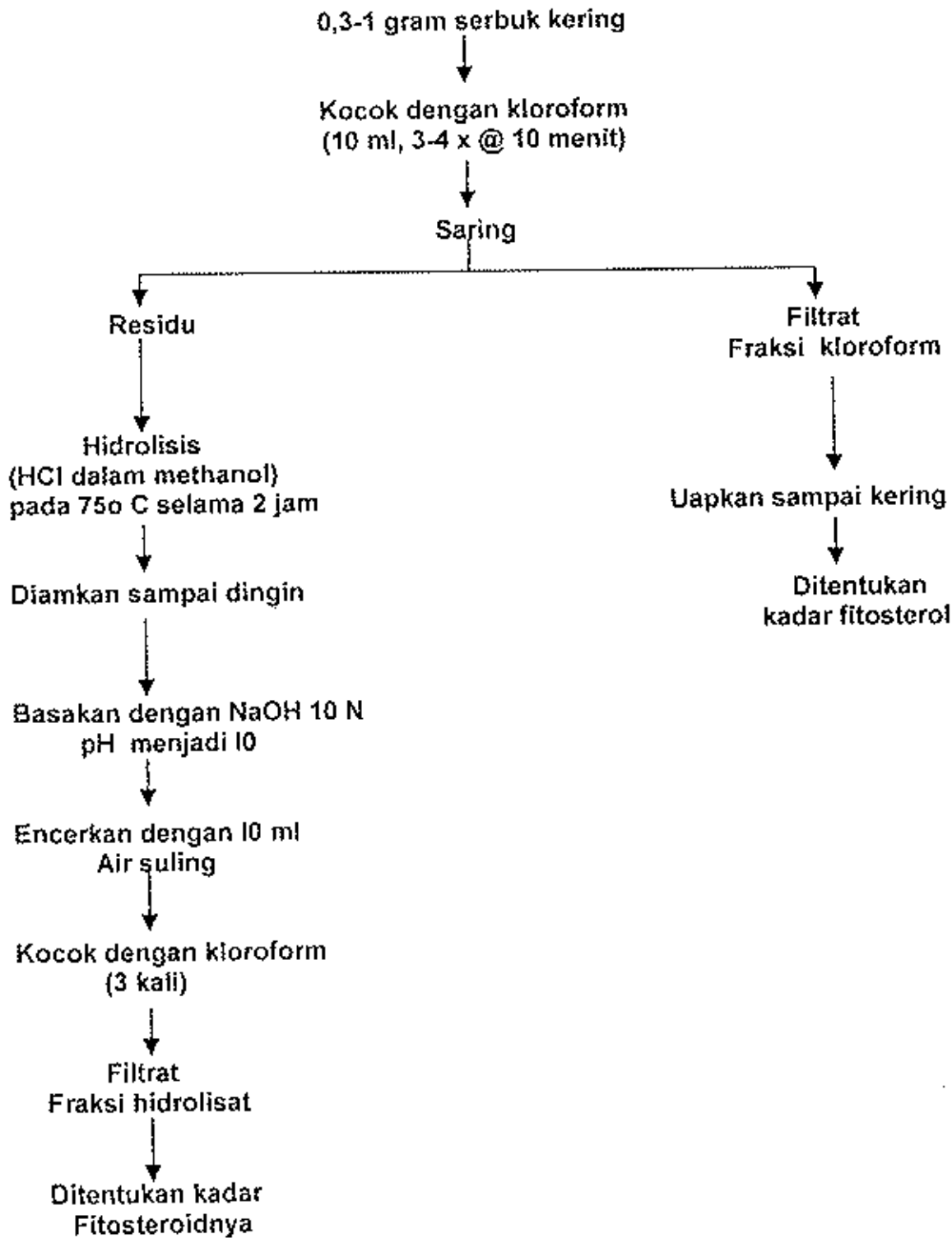
Keterangan :

Kultur sel meliputi kultur kalus, suspensi, amobil alginat dan amobil "CGS"

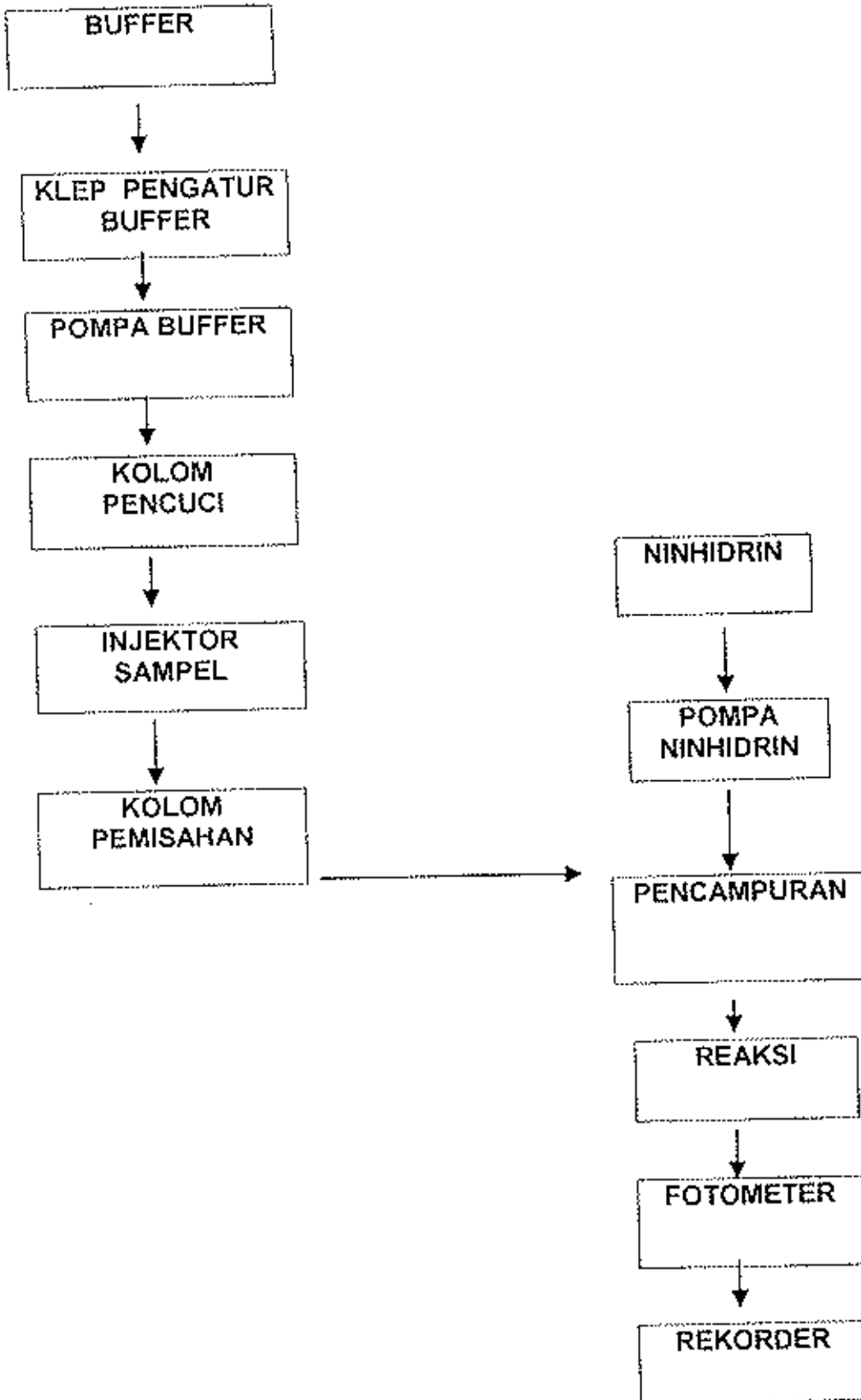
Lampiran 3. Skema Pembuatan Media MS Cair

Lampiran 4 . Skema ekstraksi fitosteroid

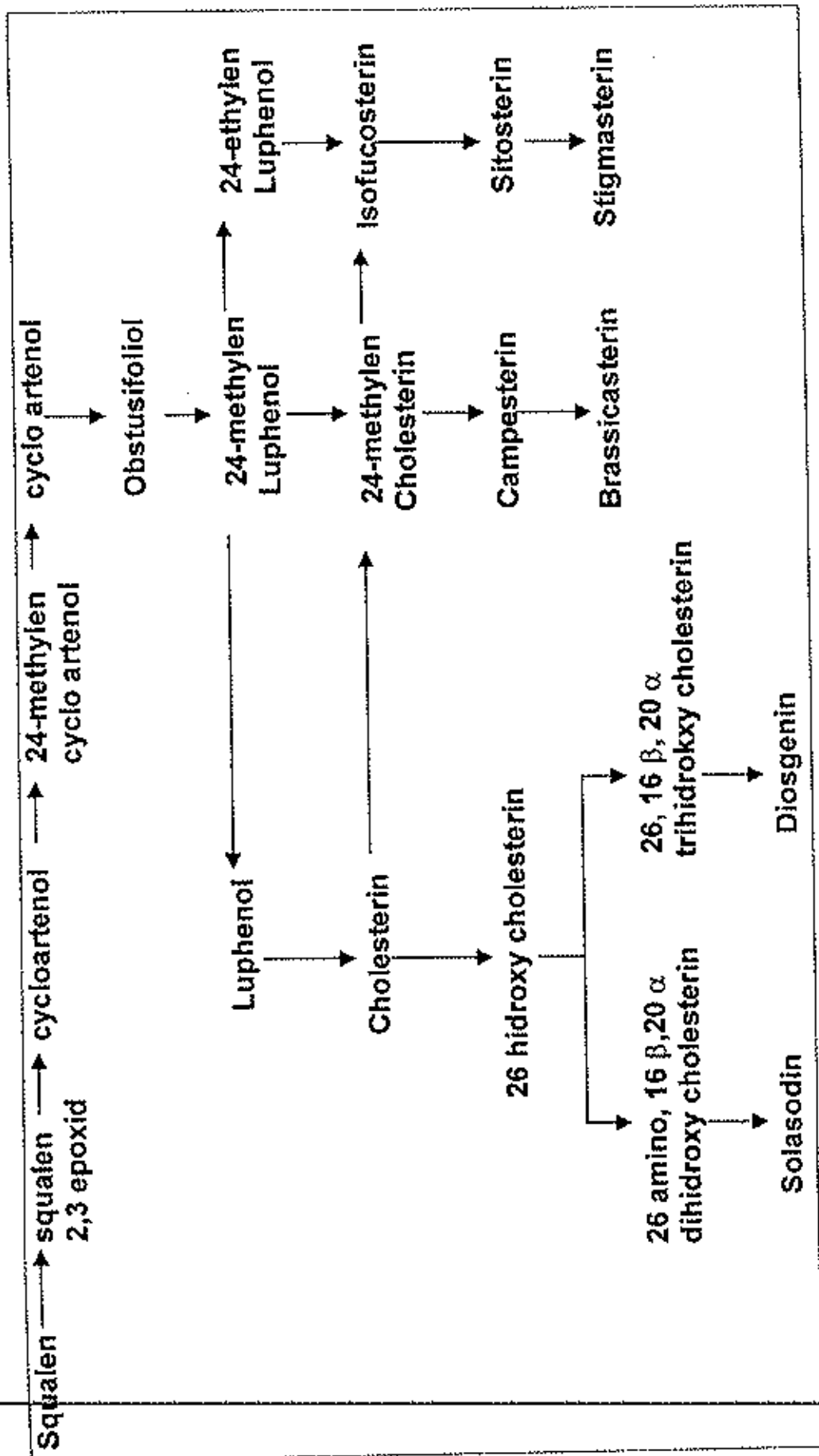
SKEMA EKSTRAKSI



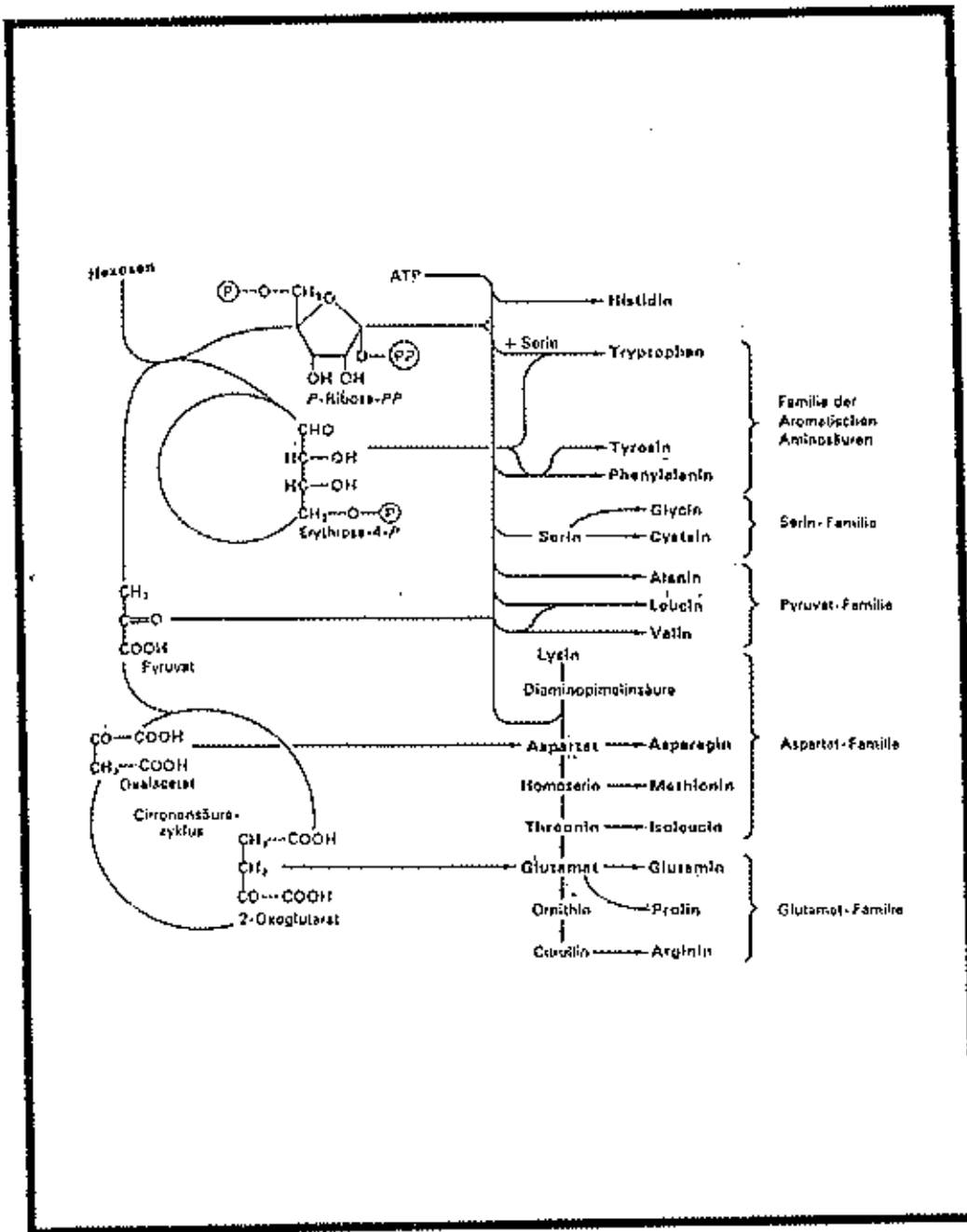
IP. PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS IPILANCCA
Lampiran 5. Skema analisa asam amino



Lampiran 0 .Pagan jaur biosintesa squalen mammosum
 (Indrayanto, 1983)



Lampiran 7. Bagan jalur biosintesa asam amino



Sintesa asam amino
Cristine Falter, 1986

Lampiran 7. Contoh data hasil analisa asam amino dari larutan standar

HITACHI 833A DATA PROCESSOR 0.0.0 3: 2								SM-1
CH NO	FILE	CAL	TABLE	MIN.P	SAMPLE	TAG		
1	3	3	1	10000	0	1		
NO.	NAME	RT	HEIGHT	AREA	H MOL	N GRAM	FACTOR	SM
19	ASP	18.68	36553	1523700	0.000	0.0	3.000	UU
20	THR	20.48	39256	1630990	0.000	0.0	3.000	UU
21	SER	22.30	43835	1692985	0.000	0.0	3.000	UU
22	ALU	24.69	52849	1497121	0.000	0.0	3.000	UU
30	GLY	34.85	23676	1662104	0.000	0.0	3.000	UU
31	ALA	39.42	18358	1552564	0.000	0.0	3.000	UB
33	CVS	42.61	31657	882424	0.000	0.0	1.500	BU
34	VAL	44.33	46969	1653574	0.000	0.0	3.000	UU
35	MET	47.88	35514	1714578	0.000	0.0	3.000	UB
37	ILE	52.70	24656	1581205	0.000	0.0	3.000	BU
38	LEU	55.66	24471	1667234	0.000	0.0	3.000	UU
39	TYR	59.46	28992	1822632	0.000	0.0	3.000	UU
40	PHE	62.73	23541	1757236	0.000	0.0	3.000	UU
41	HVLVS	64.97	36961	1799970	0.000	0.0	3.000	UB
42	LYS	70.28	43430	1808896	0.000	0.0	3.000	BB
44	HR3	76.65	17661	1855156	0.000	0.0	3.000	BB
45	HIS	79.70	25701	1437766	0.000	0.0	3.000	BB
53	ARG	96.98	16886	1526770	0.000	0.0	3.000	UB

HITACHI 833A DATA PROCESSOR 0.0.0 3: 2								
CH NO	FILE	CAL	TABLE	MIN.P	SAMPLE	TAG		
2	4	3	2	30000	0	1		
NO.	NAME	RT	HEIGHT	AREA	H MOL	N GRAM	FACTOR	SM
7	HYPRO	16.10	36962	1370314	0.000	0.0	15.000	BB
12	PRO	26.90	37797	1900034	0.000	0.0	15.000	BB

Lampiran 8 . Contoh data hasil analisa asam amino dari ekstrak hidrolisat organ buah *Solanum mammosum*

HITACHI 933A DATA PROCESSOR 0.0.0 5:26									
CH NO	FILE	CAL	TABLE	MIN.P	SAMPLE	TAG			
1	3	3	10	10000	0	2			
NO.	NAME	RT	HEIGHT	AREA	N MOL	N GRAM	FACTOR	SM	
15		7.34	703	39625	0.039	0.0	1.000	UB	
16		8.74	5049	289663	0.289	0.0	1.000	BU	
17		10.94	2022	129791	0.129	0.0	1.000	UU	
19		14.20	1846	144352	0.144	0.0	1.000	UU	
21		16.64	362	10340	0.010	0.0	1.000	UU	
22	ASP	18.29	69076	2887547	5.602	756.2	1.968	UU	
23	THR	20.12	11904	533266	0.980	116.7	1.839	UU	
24	SER	21.96	21209	842090	1.492	156.8	1.772	UU	
25	GLU	24.76	93699	4222016	8.456	1243.0	2.003	UU	
26		26.52	2082	128804	0.128	0.0	1.000	UU	
30	GLY	33.78	29390	1836403	3.312	248.7	1.804	BU	
31	ALA	38.21	18064	929163	1.749	155.8	1.683	UU	
34	CYS	41.81	5406	185001	0.315	75.6	1.699	UU	
35	VAL	43.42	23477	911477	1.653	193.7	1.814	UB	
37	MET	46.02	778	40497	0.070	10.4	1.749	BU	
40	ILE	51.61	9132	648236	1.229	161.2	1.897	BU	
41	LEU	54.48	10639	818151	1.471	192.9	1.799	UU	
42	TYR	58.82	5794	394330	0.648	117.4	1.645	UU	
43		60.12	3119	154904	0.154	0.0	1.000	UU	
44	PHE	62.12	8249	782212	1.335	220.5	1.787	UU	
45	HYLVLS	64.96	12159	474918	0.791	128.3	1.666	UB	
46		67.62	1125	37970	0.037	0.0	1.000	BB	
47	LVS	69.93	14647	594945	0.986	144.1	1.658	BB	
50		74.52	895	36097	0.036	0.0	1.000	BB	
51	NR3	76.30	91572	4678694	13.878	235.7	2.843	BB	
52	HTS	79.32	4786	249973	0.521	80.8	2.086	BB	
54		83.66	165	10714	0.010	0.0	1.000	BB	
68	ARG	96.81	5270	462427	0.968	156.1	1.964	UB	
TOTAL			454619	22674914	46.444	4396.7			

HITACHI 933A DATA PROCESSOR 0.0.0 5:26									
CH NO	FILE	CAL	TABLE	MIN.P	SAMPLE	TAG			
2	4	3	20	30000	0	2			
NO.	NAME	RT	HEIGHT	AREA	N MOL	N GRAM	FACTOR	SM	
4		7.40	1829	66213	0.066	0.0	1.000	BB	
5		8.73	13769	758366	0.758	0.0	1.000	BU	
6		10.99	5256	246911	0.246	0.0	1.000	UB	
7		13.94	706	36288	0.036	0.0	1.000	BB	
9		18.28	14723	628505	0.628	0.0	1.000	BU	
10		20.08	2270	166751	0.166	0.0	1.000	UB	
11		21.97	3890	151487	0.151	0.0	1.000	BB	
12		24.26	19761	842200	0.842	0.0	1.000	BU	
13	PRO	26.37	11744	567702	4.401	515.7	7.894	UB	
14		33.77	1127	35907	0.035	0.0	1.000	BB	
TOTAL			75075	3432330	7.341	515.7			

Lampiran 9 : Contoh data hasil analisa kuantitatif kandungan fitosterol dan solasodina dari ekstrak hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* (kode SL-7)

standar						
CAL.	METHOD	GC	FA	PB		
		SP				
		.100000e+03	.100000e+01	.100000e+01		
NO.	NAME	RT	A OR H	NK	CONC	
		2.265	290071	M	98.0353	
		15.797	36579	M	0.3902	
		20.564	13105	M	0.3220	
		22.880	11253	M	0.0387	
		23.498	830	M	0.0449	
		25.021	2579	M	0.0648	
		27.591	4366	M	0.1072	
	TOTAL		406389		100.0000	

sample						
CAL.	METHOD	GC	FA	PB		
		SP				
		.100000e+03	.100000e+01	.100000e+01		
NO.	NAME	RT	A OR H	NK	CONC	
1		3.245	2342083	M	98.2173	
2		5.465	3360	M	0.1412	
3		5.861	5784	M	0.2425	
4		6.089	19129	M	0.8021	
5		8.263	1292	M	0.0504	
6		8.645	1777	M	0.0745	
7		9.365	1871	M	0.0784	
8		14.519	155	M	0.0069	
9		15.701	7496		0.3105	
10		22.055	127		0.0053	
11		23.418	136	M	0.0057	
12		23.631	391	M	0.0105	
13		24.121	166		0.0044	
14		24.811	644		0.0162	
15		27.355	1644		0.0438	
	TOTAL		2204089		100.0000	