

B A B VII
SARAN - SARAN

Dari hasil percobaan ini, diajukan beberapa saran se-
bagai berikut :

1. Perlu dilakukan percobaan lebih lanjut tentang kandung-
an dari kalus yang ditumbuhkan pada media dengan penam-
bahan air kelapa dan pada media dengan penambahan pi-
sang mentah.
2. Perlu dilakukan optimasi media pertumbuhan kalus deng-
an penambahan air kelapa dan dengan penambahan pisang
mentah, sehingga produktivitas steroidnya lebih tinggi.
3. Perlu dilakukan analisa kandungan air kelapa, dan buah
pisang mentah, yang memacu pertumbuhan kalus.

B A B VIII

RINGKASAN

Eksplan Solanum wrightii Benth telah berhasil ditumbuhkan pada media Murashige dan Skoog dengan menggunakan air kelapa dan pada media Murashige dan Skoog dengan menggunakan buah pisang mentah yang dilumatkan. Pada media tersebut ditambahkan hormon pertumbuhan kinetin 2 ppm dan 2,4 D 0,5 ppm.

Kalus yang didapat dari media dengan air kelapa mempunyai tekstur / bentuk yang lebih kompak daripada yang didapat dari media dengan pisang mentah. Dan warna kalus yang didapat dari media dengan air kelapa putih kehijauan sedangkan dari media dengan pisang mentah berwarna keoklatan.

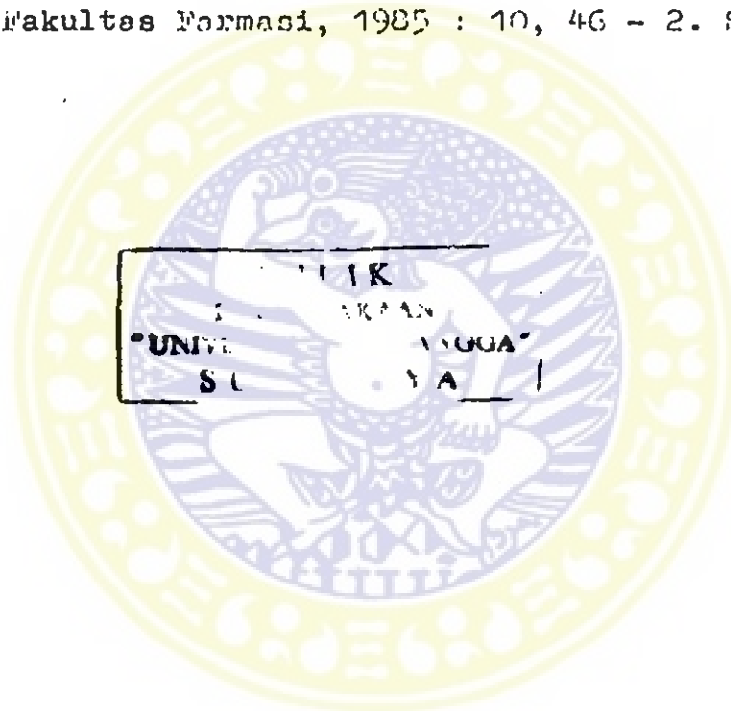
Hasil kromatografi lapisan tipis menunjukkan adanya kandungan sterol seperti sterol pembanding dan zat-zat lainnya, dari kalus yang ditanam pada media MS' dengan hormon pertumbuhan kinetin 2 ppm dan 2,4 D 0,5 ppm dengan penambahan air kelapa 30%, dan yang ditanam pada media MS' dengan hormon pertumbuhan kinetin 2ppm dan 2,4 D 0,5 ppm dengan penambahan pisang mentah 200 gram per liter media.

BAB IX
KEPUSTAKAAN

1. Staba EJ, Plant Tissue Culture as Source of Biochemicals Boca, Raton, Florida : CRC. Press, Inc 1980; 60, 72 - 2.
2. Isnaeni. Optimasi pembentukan kalus *Solanum mammosum* L dan identifikasi senyawa steroidnya. Surabaya : Universitas Airlangga Fakultas Pascasarjana, 1986 : 2 - 83, Tesis .
3. Stohs SJ, Rosenberg. Steroid and steroid metabolisme - in plant tissue cultures. *Lloydia* 1975 ; Vol. 38 No 3 : 181 - 11.
4. Kariyana K .Peranan beberapa zat pengatur tumbuh pada pertumbuhan potongan jaringan kentang *Solanum tuberosum* L . Bandung : ITB . 1982 : 1 - 36. Tesis .
5. Rokem JS, Tal B, Golden I. Method for increasing Diosgenin production by *Dioscorea* cell in suspension cultures. *J. Nat. Prod.* 48. 2. 1985. : 210 - 12 .
6. Dodds JS, Robert LW. Experiment in plant tissue culture London, New York : Cambridge University Press. 1982 : 1 - 47 ; 149 - 2.
7. Indrayanto G. Prospek kultur jaringan tanaman pada bidang Farmasi. *Bulletin ISFI Jatim.* Vol. 17. No 1. 1986.
8. Barz W. Potential of plant cell cultures for Pharmaceutical production.
In : Breimer DD, eds. *Topics in Pharmaceutical sciences Elsevier.* 1981 : 481 - 10 .

9. Tabata M. Recent advances in the production of Medicinal substances by plant cell cultures.
In : Earz W, et al, eds. Plant tissue culture and its Bio-technological application. Berlin, Heidelberg, New York : Springer - Verlag. 1977 : 3 - 10.
10. Puhan Z, Martin SM. The industrial potential of plant cell culture. Nat. Res. Counc. of Canada 115.95.
1971 : 14 - 22.
11. Bhojwani SS, Razdan MK. Plant tissue culture theory and practice. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo: Elsevier. 1983 : 1 - 22, 43 - 7.
12. Gantheret RJ. The nutrition of plant tissue cultures. Ann. Rev. Plant. Physiol.6.1955 : 433 - 8.
13. Suryowinoto SM, Suryowinoto M. Perbanyakakan vegetatif pada anggrek. Yayasan Kanisius. 1977 : hal. 70.
14. Rismunandar. Lertanam Pisang. Bandung : Sinar Baru.
1986 : 5 - 3.
15. Heddy S. Hormon tumbuhan. Jakarta : CV Rajawali.
1986 : 5 - 15.
16. Tarigan P. Beberapa aspek kimia sapogenin steroid pada tumbuhan di Indonesia. Bandung : Alumni. 1980 : 120 - 7.
17. Widodo Sri H. Morfologi beberapa jenis Solanum dan penyebarannya. Laporan penelitian No. 6604183. Bandung : ITB. 1983 : 10 - 1, 23 - 1.
18. Lawrence GMH. Taxonomy of vascular plants. The Macmillan Comp. 1951 : 472 - 1, 676.

19. Reinert J, Yeoman MM. Plant cell and tissue culture a Laboratory manual. Berlin, Heidelberg, New York : Springer - Verlag. 1982 : 6,74.
20. George EF, Sherrington PL. Plant propagation by tissue culture handbook and directory of commercial laboratories. Englanu : Exegetics Ltd. 1984 : 341 - 2, 350 - 5.
21. Wahyudi. Pengaruh diameter buah Solanum wrightii Benth terhadap kadar solasodina. Surabaya : Universitas Airlangga Fakultas Farmasi, 1985 : 10, 46 - 2. Skripsi.



DAFTAR GAMBAR.

	Halaman
GAMBAR 1 : Foto sel kalus media pisang mentah ...	22
GAMBAR 2 : Foto sel kalus media air kelapa	23
GAMBAR 3 : Kurva indeks pertumbuhan kalus	26
GAMBAR 4 : Hasil kromatografi lapisan tipis kalus dari media pisang mentah	29
GAMBAR 5 : Hasil kromatografi lapisan tipis kalus dari media air kelapa	30



B A B I
PENDAHULUAN

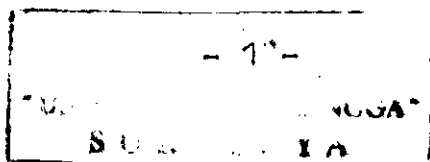
Kebutuhan sumber bahan alam nabati sebagai bahan baku obat, dewasa ini sangat besar. Bahan alam tersebut menghasilkan metabolit sekunder yang berkhasiat, yang diperlukan di dalam dunia kesehatan. Metabolit sekunder yang dihasilkan itu, misalnya : alkaloid, steroid, terpenoid, flavonoid, saponin, polifenol dan lain-lain. (1)

Steroid merupakan bahan baku obat vitamin, hormon, steroid kardenolida dan obat-obat kontrasepsi. Terutama golongan stigmasterol, sitosterol, kolesterol, diosgenin, solasodin dan turunannya yang merupakan bahan baku obat kontrasepsi. (2)

Bahan-bahan tersebut sangat dibutuhkan oleh penduduk Indonesia, yang sedang giat-giatnya melaksanakan program Keluarga Berencana.

Tanaman penghasil metabolit sekunder golongan steroid antara lain : Apocynum spp, Dioscorea spp, Trigonella spp, Solanum spp. (1)

Cara untuk mendapatkan metabolit sekunder, selain dari bagian tanamannya langsung, dapat juga dari kultur jaringan tanaman tersebut. Metode kultur jaringan ini mempunyai kelebihan dibandingkan dengan metode konvensional. Kelebihan tersebut ialah : kondisi lingkungan bagi pertumbuhan dapat diatur tanpa tergantung pada musim, kultur bebas mikroba, sel-sel tanaman dapat memperbanyak diri atau



berkembang, untuk menghasilkan metabolit tertentu, dan bahan dasar (prekursor) berlabel yang sengaja ditambahkan ke dalam media dapat dimonitor dengan mudah dan cepat.

(3)

Dalam hubungan metode kultur jaringan dengan tanaman yang menghasilkan steroid, telah banyak penelitian yang dilakukan. Misalnya pada tanaman : Apocynum spp, Dioscorea spp, dan Solanum spp.(1)

Solanum wrightii Benth termasuk salah satu jenis Solanum yang memiliki kandungan solasodin yang relatif tinggi pada buahnya. Hal ini diungkapkan oleh Wahjudi. (1985)

Kultur jaringan beberapa jenis Solanum, antara lain : Solanum laciniatum, Solanum wrightii, Solanum aviculare yang diteliti oleh Indrayanto (1983) dan Galanes (1984), terbukti menghasilkan steroid. (2,4)

Hasil penelitian Indrayanto (1983) dan beberapa peneliti lain (2), diketahui bahwa dalam beberapa kultur jaringan Solanum spp tidak ditemukan adanya diosgenin dan solasodin seperti tanaman induknya. Tetapi produksi diosgenin dalam kultur jaringan Dioscorea sp. dapat distimulasi dengan modifikasi macam dan konsentrasi komponen media pertumbuhan, sehingga menghasilkan diosgenin yang lebih banyak. Penelitian tersebut dilakukan oleh Rokem et al .(1985) (5)

Adanya perbedaan sumber eksplan dan kondisi kultur, termasuk komponen media di mana eksplan dan kultur terse

but ditumbuhkan, dapat mempengaruhi kadar dan jenis metabolitnya.

Karena kultur Solanum wrightii Benth dari strain Universitas Tubingen (Indrayanto, 1983) mengandung sterol, triterpen tetapi tidak mengandung solasodin dan diogenin; akan menarik untuk diteliti kemungkinan produktifitas steroid kultur Solanum wrightii yang berasal dari eksplan yang diambil dari tanaman yang tumbuh di Kebun Raya Purwodadi. Karena pada penelitian oleh Wahjudi, tanaman Solanum wrightii Benth di Purwodadi mengandung solasodin yang relatif tinggi.

Untuk itu sebagai langkah awal, maka penelitian ini bertujuan untuk menumbuhkan kalus dari eksplan Solanum wrightii Benth yang diambil dari tanaman yang tumbuh di Kebun Raya Purwodadi. Kemudian mendeteksi steroid yang terkandung di dalam kalus yang terbentuk.

B A B II

TINJAUAN PUSTAKA

II. Kultur jaringan

Metode kultur jaringan yang berkembang, bertolak dari teori sel yang dikemukakan oleh Schwann dan Schleiden (1838) yang menyatakan bahwa sel merupakan unit terkecil kehidupan yang mampu melakukan aktivitas metabolisme, reproduksi dan tumbuh berkembang. (6). Teori tersebut berkembang menjadi teori totipotensi sel yang dikemukakan oleh Haberlandt (1902), bahwa sel tumbuhan mampu tumbuh menjadi tumbuhan dewasa bila ditanam pada media buatan yang sesuai. Dan sel tersebut mampu memproduksi atau menghasilkan metabolit seperti tanaman induknya. Hal ini dikemukakan oleh Misawa et al pada tahun 1974. (2).

Definisi yang dikemukakan oleh Koblitz (1965), bahwa metode kultur jaringan ialah metode pengisolasian dan pemeliharaan sel, jaringan atau organ tumbuhan yang dipisahkan dari lingkungan alamiahnya dan ditanam pada media yang sesuai dalam kondisi steril, sehingga sel-selnya mampu melakukan pembelahan dan pertambahan plasma. (2,7).

II.1.1. Penerapan metode kultur jaringan tanaman

Metode kultur jaringan ini telah diterapkan dalam bidang pertanian, industri dan tanaman obat. Di samping itu, juga dipakai dalam penelitian dasar dalam bidang biokimia, genetika, fisiologi, biosintesa metabolisme dan

biotransformasi senyawa berkhasiat. (4,5).

Karena metode kultur jaringan mempunyai kelebihan yaitu: (2,7,8,9):

1. pertumbuhan cepat dan tidak terpengaruh oleh musim, letak geografis dan mikroba
2. sel-sel yang belum terdeferensiasi atau terorganisasi dapat mengatasi pengaruh variasi sel terhadap translokasi, permeabilitas dan segregasi pada penyimpanan metabolit
3. pertumbuhan sel dan proses metabolisme dapat dikontrol, terutama untuk pengembangan produktifitas
4. perubahan prekursor (bahan dasar) berlabel yang sengaja ditambahkan ke dalam media, dapat dimonitor atau diawasi dengan cepat.

Hal ini diungkapkan oleh Tabata (1977) dan Barz (1981).

Dengan adanya kelebihan-kelebihan tersebut di atas maka perkembangan metoda kultur jaringan maju dengan pesat, dengan diadakannya penelitian-penelitian di berbagai negara. Misalnya, Amerika Serikat, Jepang, India dan lain-lain. Tujuan para peneliti tersebut dirumuskan oleh Alfermann sebagai berikut (7) :

1. produksi senyawa - senyawa tertentu yang berguna pada bidang farmasi atau medis
2. biotransformasi senyawa-senyawa tertentu menjadi senyawa yang dapat digunakan pada bidang farmasi atau medis
3. produksi senyawa-senyawa spesifik (misalnya, en-

zim, biosintesa intermediat, dan lain-lain)

4. seleksi galur tanaman unggul untuk dikembangkan dalam bidang pertanian dan hortikultura (termasuk fusi sel, manipulasi genetika)
5. multiplikasi tanaman secara cepat dan seragam

Penerapan metoda kultur jaringan ini diawali oleh White (1934) yang berhasil membuat kultur jaringan dari akar tomat (Solanum lycopersicum). Juga Gautheret membuktikan bahwa betapa pentingnya peranan zat pengatur tumbuh auksin (IAA) dan vitamin B dalam pertumbuhan kultur sel. (2). Dari penelitian-penelitian dengan metoda ini, dilakukan untuk penelitian dasar dan penelitian terapan.

Di samping kelebihan yang dimiliki oleh metoda ini, ada juga kekurangan-kekurangannya, yaitu :

1. sel yang tumbuh heterogen
2. pertumbuhan lambat daripada kultur suspensi
3. kondisi media dan lingkungan harus steril
4. bahan pembuat media mahal

Jadi dengan adanya kekurangan atau kerugian-kerugian tersebut, maka metoda ini perlu pertimbangan biaya, untuk produksi yang komersial dan besar-besaran.

II.1.2 Media kultur jaringan

Kultur jaringan tanaman dapat ditanam dan ditumbuhkan pada media padat atau statis, media cair atau pada fermentor atau bioreaktor. Dengan komposisi media normal, menurut kebutuhan nutrisi dari tanaman yang ditanam. Komposisi tersebut ialah sebagai berikut :(8)

- 7 -

- sumber karbon : sukrosa, glukosa, fruktosa, laktosa.
- makroelemen anorganik : NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , K, Ca, Mg, SO_4^{2-}
- mikroelemen anorganik : bermacam-macam logam berat misalnya : Co, Cu, Mo, dan lain-lain.
- vitamin-vitamin : tiamin, piridoksin, m-inositol, nikotinamid.
- fitohormon : kinetin, auksin (NAA, IAA, 2,4-D).
- bahan tambahan(10) : asam amino, yeast ekstrak, casein hidrolisat.

Media yang baik, yaitu media yang sesuai untuk pertumbuhan eksplan yang ditanam. pH dari media harus tertentu juga, yaitu antara 5,0 - 6,5. White menyatakan, bahwa pH optimal untuk pertumbuhan kultur kalus adalah 5,4. Sedangkan menurut Tullecke et al. dari hasil penelitiannya pada empat kultur suspensi dengan menggunakan empat macam media, ternyata pH optimal pertumbuhan antara 5,5 - 6,6. Pada beberapa media kultur ditambah dengan dapar fosfat, agar selama dan setelah proses sterilisasi dan dalam waktu pertumbuhan, pH tidak berubah. Tetapi penambahan mono atau di hidrogen fosfat sangat dibatasi, karena konsentrasi yang tinggi akan menghambat pertumbuhan kultur.(10).

Sumber karbon

Percobaan pembuatan kultur dari sel mesopil yang berwarna hijau secara sederhana dilakukan oleh Haberlandt (1902), ternyata sel-selnya yang berwarna hijau hilang selama kulturisasi, karena selnya tidak mengalami proses autotropi yang dapat menghasilkan karbon. Oleh karena itu proses proliferasi dan pertumbuhan sel memerlukan tambahan sumber karbon yang sesuai dalam kultur mediana. (11)

Sumber karbon yang biasa dipakai sebagai nutrisi pada kultur jaringan tanaman ialah sukrosa, dengan konsentrasi 2-5%. Glukosa dan fruktosa juga dipakai pada beberapa kultur. Gautheret (1959), mencoba beberapa sumber karbon lain pada kultur media, yaitu maltosa, galaktosa, manosa dan laktosa. (11,12)

Bahkan buah pisang juga digunakan sebagai bahan tambahan pada media Knudson atau media Vacin dan Went oleh petani anggrek, untuk menyebarkan biji dan menanam jaringan anggrek. Pisang yang digunakan ialah 'green banana' (Hawai) atau pisang ambon (Indonesia). (13)

Sagawa di Laboratorium Department of Horticulture, University of Hawai, menggunakan buah pisang ambon yang masih mentah yang kemudian dilumatkan, sehingga media berwarna agak kehitam-hitaman. (13)

Di dalam buah pisang mentah, mengandung zat tepung yang lebih banyak daripada kadar gulanya. (14). Yang dengan perebusan mengalami perubahan kimiawi menjadi gula. (14)

Hormon pertumbuhan

Peranan zat pengatur tumbuh selain mempengaruhi pembelahan, perpanjangan dan diferensiasi sel, ternyata juga mempengaruhi pembentukan metabolit dalam sel. Pengaruh tersebut tergantung pada konsentrasi, stabilitas zat tersebut, pengambilan (up take), translokasi dan metabolisme dalam jaringan selama kulturisasi, hal ini dikemukakan oleh Ammirato (1984). (2).

Zat pengatur tumbuh yang penting ialah hormon auksin dan sitokinin, yang menghasilkan respon berbeda-beda baik tunggal maupun kombinasinya. (11)

Yang termasuk auksin, adalah IAA (indole-3-acetic acid), NAA (naphthaleneacetic acid), 2,4-D (dichlorophenoxyacetic acid). Sedangkan hormon pertumbuhan yang termasuk sitokinin, adalah kinetin (furfurylamino purine), BAP (benzylamino purine). (11)

Selain hormon pertumbuhan sintesis, dari alam juga ada dan selalu ada pada setiap tumbuhan. Seperti misalnya pada buah kelapa, yaitu pada air buah kelapa. Air kelapa dari buah kelapa yang masih muda, tetapi sudah berdaging yang masih dapat dikerok (coconut milk), mengandung senyawa atau zat sifatnya seperti sitokinin. (6, 20)

Kelapa yang digunakan, ialah kelapa hijau yang diambil dari pasaran. Dengan kriteria sebagai berikut : sudah berdaging, daging buah masih dapat dikerok dengan sendok. Jadi air kelapa diambil segar dari buah kelapa yang masih muda, dan ditambahkan pada media dengan mengganti airnya.

II.1.3 Metode kultur jaringan untuk produksi metabolit sekunder

Salah satu penerapan metode kultur jaringan adalah untuk produksi metabolit sekunder. Hal ini dilakukan untuk mengatasi kesulitan-kesulitan yang sering timbul dalam memproduksi metabolit sekunder yang berguna bagi kehidupan manusia, dari tanaman secara langsung. (2)

Metabolit sekunder dari kultur sel tanaman yang diketahui, misalnya steroid, terpenoid, sapogenin, alkaloid, flavonoid, tannin dan sebagainya. (3)

Tiga pendekatan dasar untuk menyelidiki potensi biosintesa dan metabolisme steroid dalam kultur jaringan tanaman, dikemukakan oleh Stohs dan Rosenberg (1975), ialah : (3)

- (1). isolasi dan identifikasi steroid yang dihasilkan kultur kalus dan kultur suspensi
- (2). penggunaan prekursor berlabel untuk studi jalur biosintesa steroid dalam kultur jaringan
- (3). inkubasi kultur jaringan tanaman dengan senyawa steroidal untuk mengembangkan dan menyelidiki sistem enzim metabolisme steroid yang ada secara umum.

Kalus yang ditumbuhkan pada media yang sesuai dan dengan penambahan macam dan konsentrasi hormon pertumbuhan tertentu, yaitu sitokinin dan auksin, dalam jumlah yang tepat, agar pertumbuhan dan produksi metabolit sekunder terpacu. (4,15)

Penelitian yang dilakukan oleh Rokem et al, pada

kultur jaringan Dioscorea sp., ternyata produksi diosgenin nya dapat distimulasi dengan modifikasi komponen dan konsentrasi media pertumbuhan. (4)

II.2 Tinjauan tentang steroid

Penelitian steroid bermula pada penelitian Windaus terhadap sterol yang kemudian dilanjutkan oleh Wieland terhadap asam empedu.(16). Pada waktu itu, masih sedikit orang yang mengerti kegunaan hasil penelitian mereka. Tetapi dewasa ini steroid mendapat tempat tersendiri dalam cabang kimia sintesis.(16)

Pada tahun 1935 Russel E. Marker mencari bahan yang murah untuk mensintesa hormon steroid. Kemudian pada tahun lima puluhan, hampir semua kebutuhan obat-obat steroid berasal dari diosgenin. Kini steroid yang lain sudah dikenal, antara lain solasodin dan stigmasterol.(16).

Steroid yang terdapat dalam kultur jaringan dikenal sebagai fitosterol. Dalam tanaman, sterol ditransformasi menjadi saponinsteroida.(1). Saponin dapat berupa glikosida triterpenoid atau glikosida steroid dengan cabang cincin spiroketal dan cincin spiroaminoketal dengan inti perhidrosiklopentanofenantrena.(16). Didalam Tarigan (1980), sapogenin steroid dibagi menjadi :

II.3 Tinjauan tentang Solanum wrightii Benth

Solanum adalah suatu marga tanaman yang terdapat di negara tropik dan subtropik, serta terdiri dari banyak spesies. Di Indonesia saja jumlah solanum mencapai 71 jenis. (17)

Kedudukan klasifikasi tanaman ini menurut Lawrence (18) :

Divisi . . . : Spermatophyta
 Anak-divisi: Angiospermae
 Kelas . . . : Dicotyledoneae
 Bangsa . . . : Solanales
 Anak-bangsa: Solaninae
 Suku . . . : Solanaceae
 Marga . . . : Solanum
 Jenis . . . : Solanum wrightii Benth

Solanum wrightii Benth merupakan pohon hias, daunnya jorong sampai bulat telur, berlekuk menyirip sampai bercangap menyirip dengan bulu-bulu seperti sikat pada permukaan daun dan berambut bintang pada permukaan bawah daun. Mempunyai bunga majemuk yang letaknya lateral dan berbulu halus, terdiri 7-10 bunga dengan bunga yang berwarna ungu muda. Buah bacca, bentuk bulat dengan penampang 5-7 cm. (18)

B A B III
METODOLOGI PENELITIAN

III.1 Bahan

III.1.1 Untuk sterilisasi

- alkohol 90 %
- alkohol 70 %
- 'Clorox' yang mengandung Na hipoklorida 5,25 %
- aquadest steril

III.1.2 Untuk penanaman

III.1.2.1 Eksplan (potongan jaringan)

Potongan tangkai daun yang masih muda Solanum wrightii Benth., yang diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi Pasuruan, Jawa Timur.

III.1.2.2 Media

Media yang digunakan adalah media buatan yang sesuai dengan metoda Murashige dan Skoog (1974). (6). Semua bahan kimia yang digunakan adalah produksi E. Merck Darmstadt, dengan derajat "pro analisa", kecuali apabila disebutkan lain. Agar yang digunakan adalah Bacto Agar, Difco Centrified, Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA. Hormon 2,4 D yang digunakan adalah produksi Sigma. Komposisi kimiawi media Murashige dan Skoog. tanpa hormon. (6).

TABEL 1 : KOMPOSISI KIMIAMI MEDIA MURASHIGE DAN SKOOG
TANPA HORMON (6)

Komponen	Jumlah (mg / l)
$(\text{NH}_4) \text{NO}_3$	1650
KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	27,8
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	37,3
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	8,6
H_3BO_3	6,2
KI	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025
Mio-inositol	100
Asam nikotinat	0,5
Piridoksin HCl	0,5
Tiamin HCl	0,1
Glisin	2
Sukrosa	30000
Agar	10000

TABEL 2 : KODE MEDIA DAN KOMPOSISI

Kode media	Media dasar	Hormon pertumbuhan(ppm)				Lain lain
		K	IAA	NAA	2,4 D	
A	MS'	2	-	-	0,5	-
B	MS'	2	0,5	-	-	-
C	MS'	2	-	0,5	-	-
D	MS'	2	-	-	0,5	pisang mentah 20 %
E	MS'	2	-	-	0,5	air kelapa 30 %
F	MS'	2	-	-	0,5	antioksidan vitamin C 100 mg
E	MS'	2	-	-	0,5	antioksidan asam sitrat 150 mg

MS' adalah media Murashige dan Skoog tanpa hormon pertumbuhan.

III.1.2.3. Kriteria

- Air kelapa yang digunakan adalah sebagai berikut :
 - kelapa hijau dari pasar
 - daging buah berwarna putih santan
 - daging buah lunak masih mudah disendok
 - air kelapa yang ditambahkan, dari buah yang di-baru dipecah (20)
- Pisang ambon mentah yang digunakan adalah sebagai berikut :
 - kulit buah seluruh permukaannya berwarna hijau dan bergetah
 - daging buah keras
 - irisan melintang daging buah bulat penuh (siku siku tidak ada)

Buah pisang sebelum dicampur dengan larutan media, dilumatkan dulu dengan blender dan digunakan sebanyak 200 gram / 1 liter media. (11)

III.2 Alat

Laminar air flow cabinet, digunakan untuk pengerjaan aseptis.

Autoklaf 25 l (American Portable Autoclave WAF Co Inc.).

pH-meter Fisher, untuk mengatur pH larutan media.

Lempeng jadi Kieselgel 60 F 254, E. Merck, untuk mendeteksi steroid yang kemungkinan ada pada kalus yang terjadi.

III.3 Metode

III.3.1 Pembuatan media

Media yang dipakai adalah media padat, dan pembuatannya sesuai dengan metode Murashige dan Skoog (6). Masing-masing komponen media dibuat larutan stok. Untuk memperoleh media dengan volume satu liter, dibuat sebagai berikut:

- bahan makronutrien dari larutan stok masing-masing 10 ml
- bahan mikronutrien dari larutan stok masing-masing 10 ml
- hormon tergantung konsentrasi dan macam yang akan dibuat untuk percobaan
- ditambahkan mio-inositol pada campuran larutan media

- 19 -

- ditambahkan aquadest sampai volume kurang-lebih 800 ml
- larutan media dibuat dengan pH 5,7 - 5,8 dengan menambah NaOH 0,1 N atau HCl 0,1 N
- setelah ditambah dengan agar 1 %, larutan dipanaskan sambil terus diaduk sampai jernih
- larutan dituang ke dalam botol kultur masing-masing 50 ml.
- tutup dengan aluminium foil rapat-rapat
- kemudian disterilkan di dalam autoklaf 121°C selama 20 menit
- simpan di dalam ruang dengan suhu 20 - 25°C bila tidak dipakai

III.3.2 Penanaman eksplan

Penanaman dilakukan sesuai dengan metoda yang dikemukakan oleh Reinert dan Yeoman (19), sebagai berikut: tangkai daun Solanum wrightii Benth. yang akan dipakai sebagai eksplan dicuci bersih dengan aquadest, kemudian direndam dalam alkohol 90 % selama 2 menit, untuk menghilangkan lemak atau lilin dari tangkai daun tersebut. Setelah itu disterilkan dalam larutan pensteril 'Clorox' 40 % (yang mengandung Na hipoklorida 5,25 %) selama 5 menit, dan dibilas dengan aquadest steril bebas mineral sebanyak tiga kali. Kemudian eksplan dipotong-potong sepanjang \pm 1 cm, lalu ditanam pada media yang telah dibuat, kemudian ditutup lagi dengan aluminium dengan rapat. Disimpan di dalam ruang yang sejuk (20 - 25°C). Semua pekerjaan

dilakukan di 'laminar air flow cabinet'.

III.3.3 Penetapan kecepatan pertumbuhan

Dalam percobaan ini, penetapan kecepatan pertumbuhan kalus yang terjadi, digunakan parameter indeks pertumbuhan.

Indeks pertumbuhan didefinisikan sebagai :

$$\frac{\text{berat basah kalus akhir}}{\text{berat awal kalus}} \times 100$$

Berat basah kalus akhir ditentukan tiap minggu, dengan cara kalus dikeluarkan dari botol kultur, kemudian ditimbang. Sedangkan berat awal kalus diperoleh dengan cara sebagai berikut :

$$\text{berat}(\text{media} + \text{kalus}) - \text{berat}(\text{media})$$

III.3.4 Deteksi steroid

Kalus yang terjadi, dipisahkan dari media agar yang menempel. Setelah dikeringkan dalam lemari pengering atau lampu pengering pada suhu 40 - 60°C, diserbuk dan dihomogenkan. Ditimbang sebanyak 5 gram serbuk, direfluk lima kali selama 2 jam dengan 100 ml petroleum eter 40 - 60 pada 60 - 65°C. Setelah disaring, filtrat (fraksi) petroleum eter diuapkan sampai kental.

Ekstrak kental yang didapat, ditotolkan pada lempeng kromatografi lapisan tipis jadi Kieselgel 60 F 254, dengan eluen : n- heksan : etilasetat = 8 : 2 , kloroform : etilasetat = 9 : 1 , dengan penampak noda menggunakan anisaldeg

hida sulfat. Lempeng hasil kromatografi dikeringkan dalam lemari pengering pada suhu $100.- 105^{\circ}\text{C}$ selama 5 - 10 menit. Warna noda dan tinggi noda dibandingkan dengan steroid standard.

Kemudian dilakukan reaksi warna, yaitu :Liebermann-Burchard dan Salkowski.



B A B IV

HASIL PERCOBAAN

IV.1. Pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis kalusIV.1.1 Pemeriksaan makroskopis kalus pada minggu IV

TABEL 3 :

Pemeriksaan makroskopis kalus pada minggu IV

Media	Warna	Bentuk	Diferensiasi
D	coklat muda	agak rapuh	tidak terjadi
E	putih kehi- jauan	kompak	tidak terjadi

IV.1.2 Pemeriksaan mikroskopis kalus pada minggu IV

Gambar 1 : Sel kalus Solanum wrightii Benth pada media dengan penambahan pisang mentah dengan pembesaran 400 kali.



Gambar 2 : Sel kalus Solanum wrightii Benth pada media E (media Murashige dan Skoog dengan penambahan air kelapa) dengan pembesaran 400 kali.

IV.2. Kecepatan pertumbuhan

IV.2.1 Pertumbuhan kalus dari eksplan

TABEL 4 :

Kecepatan pertumbuhan kalus dari eksplan

Media	Tumbuh (hari)
A	$28 \pm 0,71$
B	$56 \pm 0,82$
C	47 ± 1
D	13 ± 1
E	$8 \pm 0,82$
F	-
G	-

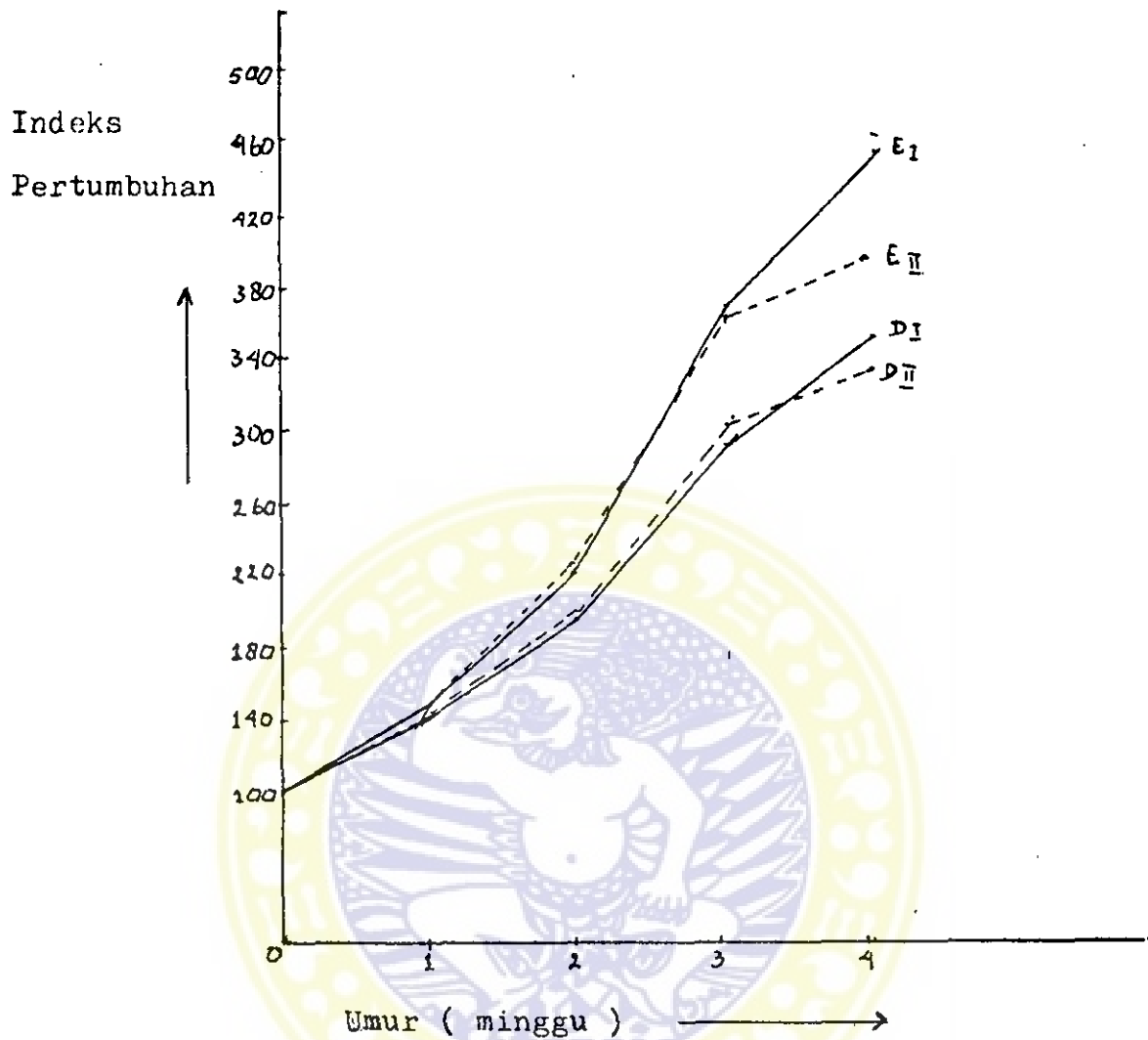
IV.2.2 Indeks pertumbuhan kalus

TABEL 5 : Indeks pertumbuhan kalus

Media	Umur	I P I					IPR _I	I P II					IPR _{II}
		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5	
D	1	143	138	144	138	145	141,6	145	138	145	140	145	143
	2	173	217	214	173	221	199,6	172	218	203	202	210	201
	3	354	354	231	278	277	298,8	336	354	291	328	247	309,8
	4	345	327	356	374	384	355,2	353	374	381	334	236	335,6
E	1	165	133	140	147	148	146,6	132	145	150	147	156	146
	2	271	269	204	171	197	222,4	268	235	213	171	242	225,8
	3	284	388	319	420	461	374,4	378	391	291	417	360	367,4
	4	458	460	340	470	503	456,2	457	376	-	467	330	407,5

Keterangan :

- umur dalam minggu
- bobot basah dalam gram
- IP = indeks pertumbuhan
- IPR = indeks pertumbuhan rata-rata



Gambar 3 : Kurva indeks pertumbuhan kalus *Solanum wrightii* Benth terhadap waktu.

D_I = kalus dari media D pada pasasi I

D_{II} = kalus dari media D pada pasasi II

E_I = kalus dari media E pada pasasi I

E_{II} = kalus dari media E pada pasasi II

IV.3. Deteksi steroid dari kalus yang terjadiIV.3.1. Kromatografi lapisan tipis :

- Ekstrak petroleum eter dengan fase gerak n-Heksana
: Etil asetat (8 : 2)
- Penampak noda anis aldehida asam sulfat

TABEL 6 :

Hasil Kromatografi lapisan tipis ekstrak petroleum eter dengan fase gerak n-Heksana : Etil asetat (8 : 2)

Z A T	JUMLAH NODA	HARGA R _f	WARNA
- steroid pembanding	1 buah	0,12	ungu
- ekstrak petroleum eter dari media pi sang mentah	6 buah	0,10 0,15 0,21 0,28 0,58 0,69	ungu
- ekstrak petroleum eter dari media a- ir kelapa	4 buah	0,15 0,28 0,58 0,68	ungu

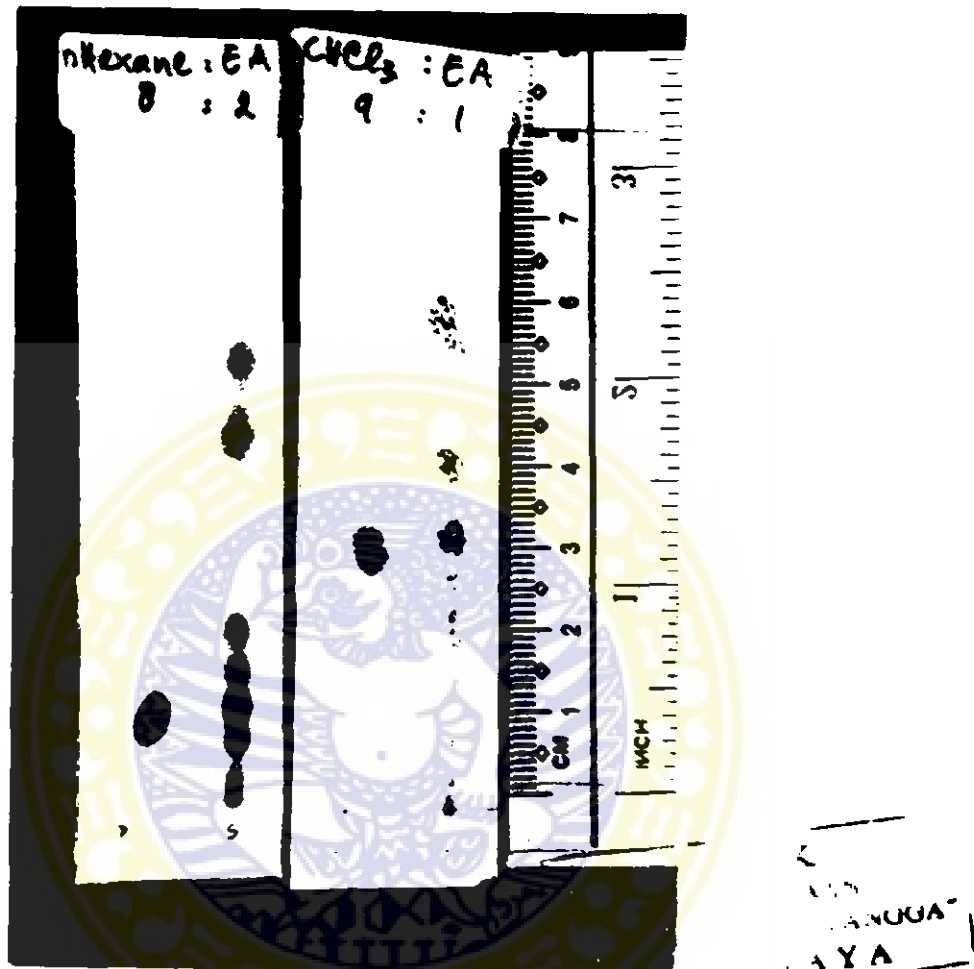
IV.3.2. Kromatografi lapisan tipis :

- Ekstrak petroleum eter dengan fase gerak Kloroform : Etil asetat (9 : 1)
- Penampak noda anis aldehida asam sulfat

TABEL 7 :

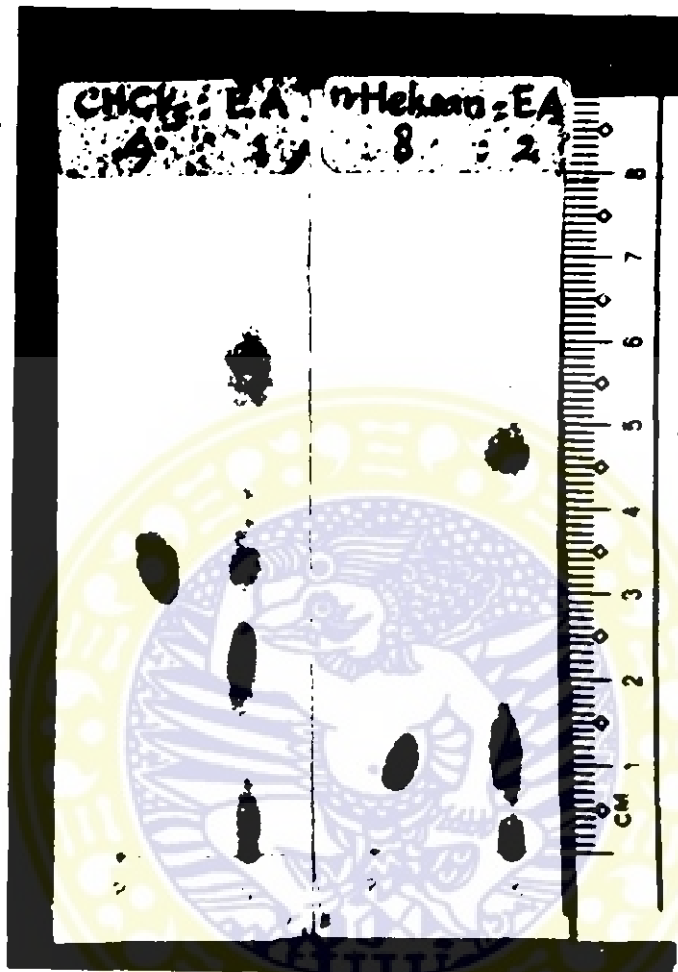
Hasil kromatografi lapisan tipis ekstrak petroleum eter dengan fase gerak Kloroform : Etil asetat (9 : 1)

Z A T	JUMLAH NODA	HARGA Rf	WARNA
- steroid pembanding	1 buah	0,4	ungu
- ekstrak petroleum eter dari media pi	5 buah	0,26	
sang mentah		0,34	
		0,41	ungu
		0,52	
		0,75	
- ekstrak petroleum eter dari media a-	4 buah	0,06	
ir kelapa		0,31	
		0,42	ungu
		0,74	



Gambar 4 : Hasil kromatografi lapisan tipis steroid dari hasil ekstraksi dengan fase gerak n-Heksana : Etilasetat = 8 : 2
Kloroform : Etilasetat = 9 : 1

Keterangan : P adalah steroid pembanding
S adalah steroid hasil ekstraksi petroleum eter dari kalus pada media dengan pisang mentah



Gambar .5 : Hasil kromatografi lapisan tipis steroid

dari hasil ekstraksi dengan fase gerak

n-Heksane : Etilasetat = 8 ; 2

Kloroform : Etilasetat = 9 :1

Keterangan: P adalah steroid pembanding

S adalah steroid hasil ekstraksi petroleum

eter dari kalus pada media dengan air kelapa

B A B V
PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, pertumbuhan kalus dari eksplan Solanum wrightii Benth terjadi pada media A, B, C, D dan E dengan waktu yang bervariasi, yaitu antara 8 - 56 hari. Hal ini disebabkan oleh perbedaan kombinasi hormon pertumbuhan yang ditambahkan dalam media - media tersebut. Kalus dari eksplan dapat tumbuh dengan cepat, jika media pertumbuhan yang dipakai sesuai. Dan tiap - tiap kalus dari eksplan tanaman yang berbeda, mempunyai media pertumbuhan yang berbeda pula.

Pertumbuhan kalus yang tercepat dalam penelitian ini ialah pertumbuhan kalus pada media E, yaitu media MS' dengan hormon pertumbuhan kinetin 2 ppm dan 2,4 D 0,5 ppm dengan penambahan air kelapa 30 %. Hal ini mungkin disebabkan oleh adanya zat yang sifatnya seperti sitokinin di dalam air kelapa, yang memacu pembentukan kalus dari eksplan. (6, 20)

Sedangkan pada media dengan penambahan antioksidan, eksplan Solanum wrightii Benth tidak tumbuh, meskipun eksplan tersebut tidak mengalami pencoklatan (browning). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh pengaruh dari antioksidan yang terkandung di dalam media tersebut.

Pada media yang tidak ditambah antioksidan, eksplan yang ditanam pada mulanya mengalami pencoklatan. Tetapi setelah tumbuh menjadi kalus dan dipindahkan ke media yang

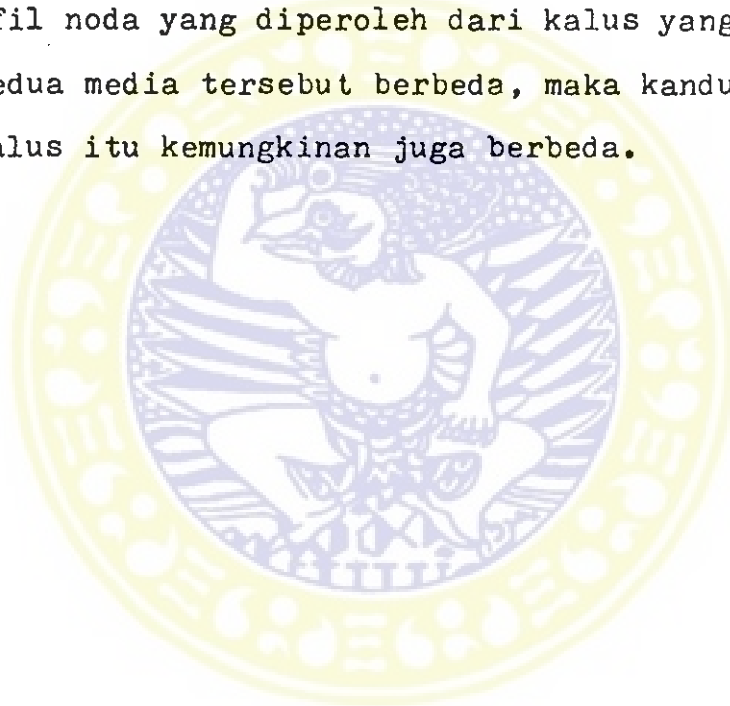
sama, pencoklatan tersebut hilang. Jadi pencoklatan ini terjadi hanya pada permukaan eksplan yang mengalami pemo-tongan, dan tidak terjadi pada kalus yang sudah tumbuh a-tau terjadi.

Dari kurva indeks pertumbuhan terhadap waktu, meng-hasilkan kurva yang berbentuk sigmoid. Hal ini sesuai de-ngan percobaan-percobaan yang telah dilakukan, bahwa per-tumbuhan kalus selalu menghasilkan kurva yang berbentuk sigmoid. Kecepatan mencapai maksimum setelah fase linier dan menjadi konstan pada fase stasioner, karena sel mulai mengalami maturasi dan pertumbuhan akhirnya menurun. Hal ini karena masa kalus banyak dan persediaan makanan menu-run. (11)

Tetapi pada penelitian ini belum mencapai fase stasioner karena sebelum fase stasioner, kalus yang terjadi dipin-dah ke media baru yang sama, untuk menjaga kelangsungan hidup kalus tersebut.

Dari kurva indeks pertumbuhan tersebut dapat dilihat bahwa kalus yang ditanam pada media MS' dengan hormon per-tumbuhan kinetin 2 ppm dan 2,4 D 0,5 ppm dengan penambah-an air kelapa 30 %, lebih cepat dari pada kalus yang di-tanam pada media MS' dengan hormon pertumbuhan kinetin 2 ppm dan 2,4 D 0,5 ppm dengan penambahan pisang mentah 200 gram per liter media. Hal ini mungkin disebabkan oleh zat yang sifatnya seperti sitokinin yang terkandung di-dalam air kelapa, sehingga lebih memacu pertumbuhan kalus, dari pada zat yang terkandung di dalam pisang mentah.

Dari hasil kromatografi lapisan tipis , setelah eluasi dan penyemprotan dengan penampak noda anisaldehyda asam sulfat, tampak berbagai noda. Salah satu dari noda - noda tersebut mempunyai harga R_f dan warna yang sama dengan sterol pembanding. Hal ini berarti pada kalus yang didapat dari media pertumbuhan dengan penambahan air kelapa dan dengan penambahan pisang mentah mengandung sterol seperti sterol pembanding dan zat-zat kandungan lain. Karena profil noda yang diperoleh dari kalus yang ditanam pada kedua media tersebut berbeda, maka kandungan dari kedua kalus itu kemungkinan juga berbeda.

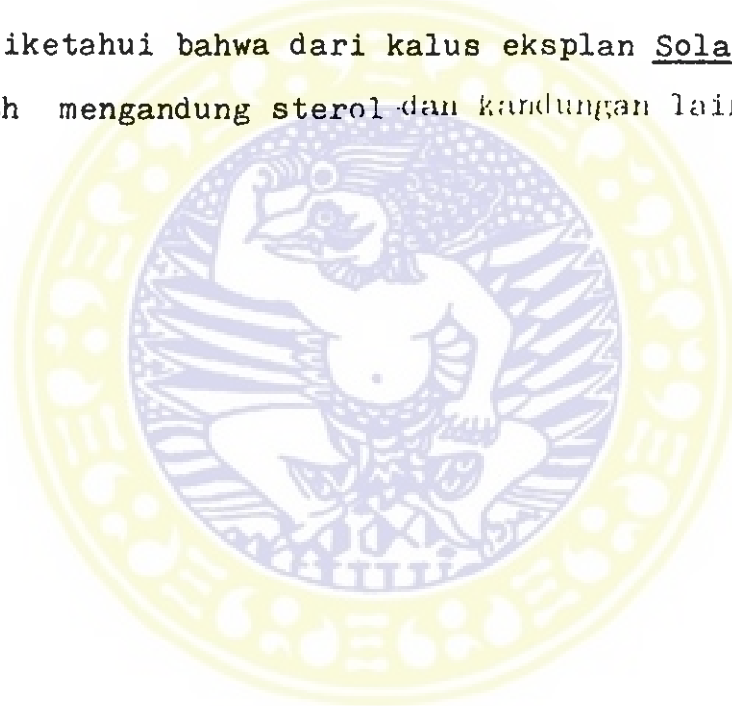


B A B VI

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Kalus Solanum wrightii Benth dapat dengan cepat tumbuh pada media Murashige dan Skoog dengan penambahan hormon pertumbuhan kinetin 2 ppm dan 2,4 D 0,5 ppm serta air kelapa 30 %.
2. Dari hasil kromatografi lapisan tipis yang telah dilakukan, diketahui bahwa dari kalus eksplan Solanum wrightii Benth mengandung sterol dan kandungan lainnya. .



B A B VII
SARAN - SARAN

Dari hasil percobaan ini, diajukan beberapa saran sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan percobaan lebih lanjut tentang kandungan dari kalus yang ditumbuhkan pada media dengan penambahan air kelapa dan pada media dengan penambahan pisang mentah.
2. Perlu dilakukan optimasi media pertumbuhan kalus dengan penambahan air kelapa dan dengan penambahan pisang mentah, sehingga produktivitas steroidnya lebih tinggi.
3. Perlu dilakukan analisa kandungan air kelapa, dan buah pisang mentah, yang memacu pertumbuhan kalus.

B A B VIII

RINGKASAN

Eksplan Solanum wrightii Benth telah berhasil ditumbuhkan pada media Murashige dan Skoog dengan menggunakan air kelapa dan pada media Murashige dan Skoog dengan menggunakan buah pisang mentah yang dilumatkan. Pada media tersebut ditambahkan hormon pertumbuhan kinetin 2 ppm dan 2,4 D 0,5 ppm.

Kalus yang didapat dari media dengan air kelapa mempunyai tekstur / bentuk yang lebih kompak daripada yang didapat dari media dengan pisang mentah. Dan warna kalus yang didapat dari media dengan air kelapa putih kehijauan sedangkan dari media dengan pisang mentah berwarna keoklatan.

Hasil kromatografi lapisan tipis menunjukkan adanya kandungan sterol seperti sterol pembanding dan zat-zat lainnya, dari kalus yang ditanam pada media MS' dengan hormon pertumbuhan kinetin 2 ppm dan 2,4 D 0,5 ppm dengan penambahan air kelapa 30%, dan yang ditanam pada media MS' dengan hormon pertumbuhan kinetin 2ppm dan 2,4 D 0,5 ppm dengan penambahan pisang mentah 200 gram per liter media.

BAB IX
KEPUSTAKAAN

1. Staba EJ, Plant Tissue Culture as Source of Biochemicals Boca, Raton, Florida : CRC. Press, Inc 1980; 60, 72 - 2.
2. Isnaeni. Optimasi pembentukan kalus *Solanum mammosum* L dan identifikasi senyawa steroidnya. Surabaya : Universitas Airlangga Fakultas Pascasarjana, 1986 : 2 - 83, Tesis .
3. Stohs SJ, Rosenberg. Steroid and steroid metabolisme - in plant tissue cultures. *Lloydia* 1975 ; Vol. 38 No 3 : 181 - 11.
4. Kariyana K .Peranan beberapa zat pengatur tumbuh pada pertumbuhan potongan jaringan kentang *Solanum tuberosum* L . Bandung : ITB . 1982 : 1 - 36. Tesis .
5. Rokem JS, Tal B, Golden I. Method for increasing Diosgenin production by *Dioscorea* cell in suspension cultures. *J. Nat. Prod.* 48. 2. 1985. : 210 - 12 .
6. Dodds JS, Robert LW. Experiment in plant tissue culture London, New York : Cambridge University Press. 1982 : 1 - 47 ; 149 - 2.
7. Indrayanto G. Prospek kultur jaringan tanaman pada bidang Farmasi. *Bulletin ISFI Jatim.* Vol. 17. No 1. 1986.
8. Barz W. Potential of plant cell cultures for Pharmaceutical production.
In : Breimer DD, eds. *Topics in Pharmaceutical sciences* Elsevier. 1981 : 481 - 10 .

9. Tabata M. Recent advances in the production of Medicinal substances by plant cell cultures.
In : Earz W, et al, eds. Plant tissue culture and its Bio-technological application. Berlin, Heidelberg, New York : Springer - Verlag. 1977 : 3 - 10.
10. Puhan Z, Martin SM. The industrial potential of plant cell culture. Nat. Res. Counc. of Canada 115.95.
1971 : 14 - 22.
11. Bhojwani SS, Razdan MK. Plant tissue culture theory and practice. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo: Elsevier. 1983 : 1 - 22, 43 - 7.
12. Gantheret RJ. The nutrition of plant tissue cultures. Ann. Rev. Plant. Physiol.6.1955 : 433 - 8.
13. Suryowinoto SM, Suryowinoto M. Perbanyakakan vegetatif pada anggrek. Yayasan Kanisius. 1977 : hal. 70.
14. Rismunandar. Lertanam Pisang. Bandung : Sinar Baru.
1986 : 5 - 3.
15. Heddy S. Hormon tumbuhan. Jakarta : CV Rajawali.
1986 : 5 - 15.
16. Tarigan P. Beberapa aspek kimia sapogenin steroid pada tumbuhan di Indonesia. Bandung : Alumni. 1980 : 120 - 7.
17. Widodo Sri H. Morfologi beberapa jenis Solanum dan penyebarannya. Laporan penelitian No. 6604183. Bandung : ITB. 1983 : 10 - 1, 23 - 1.
18. Lawrence GMH. Taxonomy of vascular plants. The Macmillan Comp. 1951 : 472 - 1, 676.

19. Reinert J, Yeoman MM. Plant cell and tissue culture a Laboratory manual. Berlin, Heidelberg, New York : Springer - Verlag. 1982 : 6,74.
20. George EF, Sherrington PL. Plant propagation by tissue culture handbook and directory of commercial laboratories. Englanu : Exegetics Ltd. 1984 : 341 - 2, 350 - 5.
21. Wahyudi. Pengaruh diameter buah Solanum wrightii Benth terhadap kadar solasodina. Surabaya : Universitas Airlangga Fakultas Farmasi, 1985 : 10, 46 - 2. Skripsi.

