

KESEHATAN

LAPORAN

HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN SESUAI PRIORITAS NASIONAL BATCH I
(CLUSTER GIZI DAN KESEHATAN)
TAHUN ANGGARAN 2009



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

PRODUKSI SENYAWA ANTIMALARIA DARI KALUS *Sonchus arvensis* L. : UPAYA PENANGANAN PENYAKIT INFEKSI

TIM PENELITI

Dr. Edy Setiti Wida Utami, M.S.
Dra. Wiwied Ekasari, M.Si. Apt.
Dwi Kusuma Wahyuni, S.Si., M.Si.
Tutik Sri Wahyuni, SSI. MSI. Apt.

DIBIYAI OLEH DIRJEND PENDIDIKAN TINGGI DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
Sesuai Dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Kegiatan Penelitian Stratnas
Kluster Gizi dan Kesehatan Tahun Anggaran 2008
Nomor: 616/H3.13/PPd/2009 Tanggal: 9 Juli 2009

UNIVERSITAS AIRLANGGA
DESEMBER 2009

KESEHATAN

LAPORAN

HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN SESUAI PRIORITAS NASIONAL BATCH I
(CLUSTER GIZI DAN KESEHATAN)
TAHUN ANGGARAN 2009



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
K R I Y A

KKB
kk=2
Lp. 106/10
Ufa
P

PRODUKSI SENYAWA ANTIMALARIA DARI KALUS *Sonchus arvensis* L. : UPAYA PENANGANAN PENYAKIT INFEKSI

TIM PENELITI

Dr. Edy Setiti Wida Utami, M.S.
Dra. Wiwied Ekasari, M.Si. Apt.
Dwi Kusuma Wahyuni, S.Si., M.Si.
Tutik Sri Wahyuni, SSi. MSi. Apt.

DIBIYAI OLEH DIRJEND PENDIDIKAN TINGGI DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
Sesuai Dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Kegiatan Penelitian Stratnas
Kluster Gizi dan Kesehatan Tahun Anggaran 2008
Nomor: 616/H3.13/PPd/2009 Tanggal: 9 Juli 2009

UNIVERSITAS AIRLANGGA
DESEMBER 2009

KESMATA 74

LAPORAN

HIRAH KOMPETITIF PENELITIAN SESUAL PRIORITAS NASIONAL BATCH I
(CLUSTER GIZI DAN KESEHATAN)
TAHUN ANGGARAN 2009



UPAYA PENANGANAN PENYAKIT INTERSI
DARI KALUS *Souchea stenosia* L.
: PRODUKSI SENYAWA ANTIMALARIA

TIM PENELITIAN

Dr. Eddy Setiti Wida Utami, M.S.
Dr. Wiliad Ekasari, M.Si. Apt.
Dwi Kusuma Wahyuni, S.Si., M.Si.
Tutik Sri Wahyuni, S.Si. M.Si. Apt.

DISINYAL OLEH ORGANO PENELITIAN TILOGI DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
sesuai dengan Surat Penelitian Pelaksanaan Kegiatan Penelitian Sains
Kluster Gizi dan Kesehatan Tahun Anggaran 2009
Nomor 610/H/2009/PB/2009 Tanggal 9 Juli 2009

UNIVERSITAS AIRLANGGA
DESEMBER 2009

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul : Produksi Senyawa Antimalaria dari kalus *Sonchus Arvensis* : Upaya Penanganan Penyakit Inveksi.
2. Ketua Pelaksana
- a. Nama : Dr. Edy Setiti Wida Utami, MS
- b. Jenis kelamin : Perempuan
- c. NIP : 131406062
- d. Bidang Keahlian : Kultur Jaringan Tanaman
- e. Pangkat/gol / Jabatan : Pembina Tingkat I/ IV-b/ Lektor Kepala
- f. Fakultas : Sains dan Teknologi
- g. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti


No.	Nama	Bidang Keahlian	Fakultas	Perguruan Tinggi
1.	Dra. Wiwied Ekasari, MSi. Apt..	Farmasi Bahan Alam	Farmasi	Unair
2.	Dwi Kusuma W, SSi., MSi.	Kultur Jaringan Tumb	Saintek	Unair
3.	Tutik Sri Wahyuni, SSi. MSi. Apt.	Farmasi Bahan Alam	Farmasi	Unair

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian
- a. Jangka Waktu Kegiatan : 1 tahun
- b. Biaya yang diusulkan : Rp. 100.000,00
- c. Biaya yang disetujui : Rp. 90.000,00

Surabaya, Desember 2009

Mengetahui,
Dekan FST Universitas Airlangga

Ketua Pelaksana



Drs. Salamun, M.Kes.
NIP. 131696506



Dr. Edy Setiti Wida Utami, MS.
NIP. 131406062

Mengetahui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat


Prof. Dr. Bambang Sektiari Lukiswanto, DEA., drh.
NIP. 131837004

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul : Produk Senyawa Antimalaria dan Kain Spons
 Anvisa : Ujra Pengangan Penyakit Invertebrata

2. Ketua Pelaksana : Dr. Edy Setiti Wida Utami, MS

a. Nama : Perikanan

b. Jenis Kelamin : Perempuan

c. NIP : 13140602

d. Bidang Keahlian : Kultur Jaringan Tanaman

e. Pangkat/Gol. Jabatan : Pembina Tingkat IV-IV Faktor Keasid

f. Fakultas : Sains dan Teknologi

g. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti

Nama	Bidang Keahlian	Fakultas	Perguruan Tinggi
Tulik Sh Wahyuni, Ssi, Msi, Apt	Farmasi Bahan Alam	Farmasi	Unair
Dwi Kusuma W, Ssi, Msi	Kultur Jaringan Tumbuhan	Saintek	Unair
Dr. Widad Ekaadi, Msi, Apt	Farmasi Bahan Alam	Farmasi	Unair

3. Pembanaan dan jangka waktu penelitian

a. Jangka Waktu Kegiatan : 1 tahun

b. Biaya yang dibutuhkan : Rp. 100.000,00

c. Biaya yang diterima : Rp. 30.000,00

Surabaya, Desember 2009

Mendagri
 Dekan FST Universitas Airlangga
 Ketua Pelaksana

Dr. Edy Setiti Wida Utami, MS
 NIP. 13140602

Dr. Salamun, M. Kes.
 NIP. 13168508

Mendagri
 Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat

Prof. Dr. Bambang Sektiati Lukman, DEA, PhD
 NIP. 13183704

RINGKASAN

Penelitian Produksi Senyawa Antimalaria dari kalus *Sonchus Arvensis* L. : Upaya Penanganan Penyakit Inveksi pada tahun pertama ini bertujuan untuk 1) mengetahui zat pengatur tumbuh yang dapat menginduksi terbentuknya kalus, 2) mengetahui pengaruh pemberian sukrosa dan elisitor terhadap pertumbuhan kalus; 3) mengetahui jenis elisitor yang dapat memacu terbentuknya senyawa antimalaria, 4) mengetahui profil golongan senyawa yang terdapat dalam kalus *Sonchus arvensis* L., 5) mengetahui aktifitas antimalaria dari masing-masing elisitor yang terdapat dalam kalus *Sonchus arvensis* L.. Bahan penelitian adalah daun *Sonchus Arvensis* L. yang disterilisasi dengan menggunakan Natrium Hypoclorit 5,25% dan ditanam pada medium Murashige & Skoog (MS) dengan perlakuan zat pengatur tumbuh 2,4 D, IAA, IBA, NAA 1ppm dan atau tanpa BAP 0,5 ppm, sukrosa (1% ; 2% ; 3% ; 4% ; 5%) dan elisitor Glutamin (0,25 g dan 0,5 g); Ammonium nitrat (0,5 g dan 1,0 g) ; Kalium nitrat (0,5 g dan 1,0 g) ; Kalium fosphat (0,1 dan 0,2 g) ; Kontrol (tanpa elisitor). Uji aktivitas antimalaria dilakukan secara *in vitro* menggunakan *Plasmodium falciparum*. Identifikasi kandungan senyawa dilakukan dengan KLT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan hormon 2,4 D 1ppm + BAP 0,5 ppm + sukrosa 3% pada kondisi gelap menginduksi kalus tercepat (minggu ke-2). Pemberian elisitor tidak berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan kalus, perlakuan elisitor (Glutamin 500 g ; NH₄NO₃ 0,5 g dan 1,0 g) menunjukkan aktifitas positif antimalaria dengan nilai IC₅₀ = 1-10 µg/mL, dengan kandungan golongan senyawa flavonoid.

Kata kunci : *Sonchus Arvensis* L., kalus, elisitor, antimalaria.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas berkat limpahan rahmatNya, penelitian ini telah terlaksana walaupun belum sebagaimana penulis harapkan. Penulis menyadari bahwa banyak pihak yang telah membantu selama pelaksanaan penelitian ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga
2. Pimpinan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga
3. Ketua Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga
4. Pengelola Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Fakultas Teknologi Pangan Universitas Tjuh Belas Agustus Surabaya
5. Kepala Bagian Fitokimia & Farmakognosi dan Pengelola Laboratorium Uji Antimalaria Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
6. Rekan-rekan yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini yang belum penulis sebutkan satu persatu

Penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun demi kesempurnaan tulisan ini. Akhirnya semoga penelitian ini bermanfaat.

Surabaya, Desember 2009

Penulis

PRAKATA

Puji syukur penulis sampaikan kepada Allah SWT atas berkat limpahan rahmat-Nya, penelitian ini telah terselesaikan walaupun belum sebagaimana penulis harapkan. Penulis menyadari bahwa banyak pihak yang telah membantu selama pelaksanaan penelitian ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga
 2. Pimpinan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga
 3. Ketua Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga
 4. Pengelola Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Fakultas Teknologi Pangan Universitas Tulin Belas Agung Surabaya
 5. Kepala Bagian Fitokimia & Farmakognosi dan Pengelola Laboratorium Uji Antimalaria Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
 6. Rekan-rekan yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini yang belum penulis sebutkan satu persatu
- Penulis mengucapkan kritik dan saran yang bersifat membangun demi kesempurnaan tulisan ini. Akhirnya semoga penelitian ini bermanfaat!

Surabaya,
Desember 2009
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN.....	ii
PRAKATA.....	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vi
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah.....	2
BAB II. STUDI PUSTAKA	3
2.1. Tinjauan Tentang Tempuyung	3
2.2. Kandungan dan Fungsi Bahan Aktif Tempuyung	3
2.3. Induksi Kalus dan Berbagai Penelitian Terkait	3
2.4. Uji Antimalaria Secara <i>In Vitro</i>	5
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	6
2.1. Tujuan Penelitian	6
2.2. Manfaat Penelitian	6
BAB IV. METODE PENELITIAN	7
4.1. Tempat dan Waktu Penelitian	7
4.2. Bahan Penelitian	7
4.3. Alat Penelitian	7
4.4. Prosedur Penelitian	7
4.5. Analisis Data	12
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	13
5.1. Induksi dan Perbanyakkan Kalus	13
5.2. Ekstraksi Kalus	17
5.3. Identifikasi Dengan Kromatografi Lapis Tipis	18
5.4. Uji Antimalaria	19
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	21
6.1. Kesimpulan	21
6.2. Saran	21
DAFTAR PUSTAKA	22
LAMPIRAN	25

DAFTAR ISI

Halaman

i	HALAMAN PENGESAHAN
ii	RINGKASAN
iii	PRAKATA
iv	DAFTAR ISI
v	DAFTAR TABEL
vi	DAFTAR GAMBAR
1	BAB I PENDAHULUAN
1	1.1. Latar Belakang
2	1.2. Rumusan Masalah
3	BAB II STUDI PUSTAKA
3	2.1. Tinjauan Tentang Tempuyung
3	2.2. Kandungan dan Fungsi Bahan Aktif Tempuyung
3	2.3. Induksi Kulus dan Berbagai Penelitian Terkait
3	2.4. Uji Antimalaria Secara In Vitro
6	BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN
6	3.1. Tujuan Penelitian
6	3.2. Manfaat Penelitian
7	BAB IV METODE PENELITIAN
7	4.1. Tempat dan Waktu Penelitian
7	4.2. Bahan Penelitian
7	4.3. Alat Penelitian
7	4.4. Prosedur Penelitian
12	4.5. Analisis Data
13	BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN
13	5.1. Induksi dan Perbanyakkan Kulus
17	5.2. Ekstraksi Kulus
18	5.3. Identifikasi Dengan Kromatografi Lapis Tipis
19	5.4. Uji Antimalaria
21	BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN
21	6.1. Kesimpulan
21	6.2. Saran
22	DAFTAR PUSTAKA
25	LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Macam eksplan, media, elisitor, dan Zat Pengatur Tumbuh yang digunakan untuk induksi kalus pada berbagai tanaman	4
5.1. Waktu induksi kalus, morfologi kalus, dan persentase eksplan membentuk kalus setelah di inkubasi selama 4 minggu	13
5.2. Rerata berat basah dan berat kering kalus dari eksplan helaian daun pada berbagai perlakuan sukrosa + 2,4 D 1 ppm + BAP 0,5 ppm pada kondisi gelap	15
5.3. Rerata berat basah dan berat kering kalus yang dikultur pada media MS + 2,4 D i ppm + BAP 0,5 ppm + sukrosa 3 % pada kondisi gelap dengan bergai perlakuan elisitor	16
5.4. Hasil ekstraksi kalus <i>Sonchus arvensis</i> L.	17
5.5. Persentase parasitemia, pertumbuhan, dan hambatan <i>P. falciparum</i> 3D7 oleh ekstrak <i>Sonchus arvensis</i> L.	19
5.6. Nilai IC ₅₀ dari ekstrak kalus <i>Sonchus arvensis</i> L	20

DAFTAR LABEL

Halaman	Label
4	2.1. Mekanisme ekspirasi, media, elastisitas, dan Zat Pengikat Tunjukkan untuk induksi kalus pada berbagai jaringan
13	2.1. Waktu induksi kalus, morfologi kalus, dan persyaratan ekspirasi untuk kalus setelah di inkubasi selama 4 minggu
13	2.2. Rata-rata berat basah dan berat kering kalus dan ekspirasi jaringan dan pada berbagai kondisi
13	2.3. Rata-rata berat basah dan berat kering kalus yang dikultur pada media MS + 2,4 D 1 ppm + BAP 0,2 ppm pada kondisi gelap
13	2.4. D 1 ppm + BAP 0,2 ppm + sukrosa 3% pada kondisi gelap dengan berbagai konsentrasi eliator
17	2.4. Hasil ekstraksi kalus <i>Sonchus oleraceus</i> L.
19	2.5. Persentase parasitemia, pertumbuhan, dan hambatan P. falciparum 3D7 oleh ekstrak <i>Sonchus oleraceus</i> L.
20	2.6. Nilai IC ₅₀ dan ekstraksi kalus <i>Sonchus oleraceus</i> L.

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
5.1. Pertumbuhan kalus <i>Sonchus arvensis</i> L pada media MS dengan perlakuan 2,4 D 1 ppm + BAP 0,5 ppm. A. Awal penanaman; B. Minggu ke-4 setelah dikultur	14
5.2. Pertumbuhan kalus <i>Sonchus arvensis</i> L pada media MS dengan perlakuan 2,4 D 1 ppm + BAP 0,5 ppm + sukrosa 30 g. A. Awal penanaman; B. Minggu ke-4 setelah dikultur	15
5.3. Pertumbuhan kalus <i>Sonchus arvensis</i> L pada media MS dengan perlakuan 2,4 D 1 ppm + BAP 0,5 ppm + sukrosa 50 g + elisitor KNO ₃ 0,5 g. A. Awal penanaman; B. Minggu ke-4 setelah dikultur	16
5.4. Kromatogram hasil KLT menggunakan fase gerak kloroform : Metanol (95%:5%) dengan penampak noda uap amoniak	18

DAFTAR GAMBAR

Halaman	Gambar
14	2.1. Perumbuhan kalus <i>Sonchus oleraceus</i> L pada media MS dengan bebanan 24 D 1 ppm + BAP 0,2 ppm. A. Awal penanaman; B. Minggu ke-4 setelah dikultur
15	2.2. Perumbuhan kalus <i>Sonchus oleraceus</i> L pada media MS dengan bebanan 24 D 1 ppm + BAP 0,2 ppm + sukrosa 30 g. A. Awal penanaman; B. Minggu ke-4 setelah dikultur
16	2.3. Perumbuhan kalus <i>Sonchus oleraceus</i> L pada media MS dengan bebanan 24 D 1 ppm + BAP 0,2 ppm + sukrosa 20 g + elicitor : KNO ₃ 0,2 g. A. Awal penanaman; B. Minggu ke-4 setelah dikultur
18	2.4. Kromatogram hasil KLT menggunakan fase gerak kloroform : metanol (50% : 50%) dengan pembekuan menggunakan amoniak

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infeksi malaria merupakan masalah klinik bagi negara tropik maupun subtropik, bagi negara berkembang maupun negara maju. Sebanyak 2,4 milyar penduduk dunia beresiko tinggi tertular penyakit malaria dan penyakit ini telah menimbulkan endemik di berbagai negara yang sedang berkembang. Malaria masih menjadi penyakit infeksi utama di Indonesia. Masalah mortalitas malaria berat dan morbiditas mempunyai kaitan erat dengan timbulnya resistensi pengobatan dan kewaspadaan terhadap diagnosa dini serta penanganannya (Ekasari, 2001).

Terapi antimalaria yang telah ada yaitu dengan kina dan derivatnya. Permasalahan yang timbul dari terapi obat-obatan tersebut adalah resistensi dan sensitivitas. Resistensi atau kekebalan parasit malaria (*Plasmodium*) terhadap beberapa jenis obat antimalaria memang bukan hal baru. Munculnya resistensi pertama kali dilaporkan 1973 dari Kutai, Kalimantan Timur yaitu kasus *Plasmodium falciparum* resisten terhadap klorokuin. Kasus lain terjadi pada obat antimalaria artemisin namun resistensi ini terjadi jika digunakan sebagai monoterapi (WHO, 1987).

Upaya penanggulangan penyakit malaria terus dilakukan terutama pencarian obat antimalaria baru. Saat ini trend pengobatan masyarakat mengarah pada bahan alam atau *back to nature*. Pengobatan dengan bahan alam dipercaya masyarakat memiliki efek samping lebih ringan dan relatif mudah didapat dipasaran. Indonesia memiliki lebih kurang 30.000 jenis tanaman obat, namun hanya 1000 jenis tanaman yang telah dimanfaatkan oleh masyarakat dalam upaya penyembuhan dan pencegahan suatu penyakit, peningkatan daya tahan tubuh dan pengembalian kesegaran tubuh. Senyawa flavonoid dari kelompok *Asteraceae* termasuk *Sonchus arvensis* L. merupakan salah satu tanaman yang berpotensi digunakan untuk pengobatan malaria secara empiris (Budavari, 2001).

Tanaman *Sonchus arvensis* L. adalah tanaman obat Indonesia yang hidup liar dan belum banyak dibudidayakan, padahal kandungan senyawa aktifnya yang berupa flavonoid, saponin, zat samak dan polifenol yang berpotensi sebagai antioksidan, hepatoprotektor, diuretic dan antimalaria. Kandungan bahan aktif daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L) mempunyai kesamaan dengan kandungan bahan aktif daun tanaman *Artemisia annua* yaitu saponin, flavonoid, polyfenol dan minyak atsiri. Tanaman *Artemisia* adalah penghasil artemisin yang mempunyai khasiat cepat menghilangkan

BAB I
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infeksi malaria merupakan masalah klinik bagi negara tropik maupun subtropik. Pada negara berkembang maupun negara maju. Sebanyak 2,4 milyar penduduk dunia berisiko tinggi tertular penyakit malaria dan banyak ini telah menimbulkan endemik di berbagai negara yang sedang berkembang. Masalah masih menjadi penyakit infeksi utama di Indonesia. Masalah malaria berat dan kronisitas mempunyai kaitan erat dengan timbulnya resistensi pengobatan dan kewaspadaan terhadap diagnosis dini serta penanganannya (Ekasari, 2001).

Terapi antimalaria yang telah ada yaitu dengan kina dan derivatnya. Farmakologinya yang timbul dan terjadi obat-obatan tersebut adalah resistensi dan selektivitas. Resistensi atau kekebalan parasit malaria (Plasmodium) terhadap beberapa jenis obat antimalaria memang bukan hal baru. Munculnya resistensi pertama kali dilaporkan 1973 dan Kufner (Kalinantan Timur yaitu kasus Plasmodium falciparum resisten terhadap klorokuin. Kasus lain terjadi pada obat antimalaria alternatif namun resistensi ini terjadi jika digunakan sebagai monoterapi (WHO, 1987).

Upaya pengembangan penyakit malaria terus dilakukan terutama penelitian obat antimalaria baru. Saat ini trend pengobatan masyarakat mengarah pada bahan alam atau obat biologi. Pengobatan dengan bahan alam dipercaya masyarakat memiliki efek samping lebih ringan dan relatif mudah didapat di pasaran. Indonesia memiliki lebih kurang 30.000 jenis tanaman obat, namun hanya 1000 jenis tanaman yang telah dimanfaatkan oleh masyarakat dalam upaya penyembuhan dan pencegahan suatu penyakit. Peningkatan daya tahan tubuh dan pengembangan kesadaran tubuh. Senyawa flavonoid dari kelompok Asteraceae termasuk *Senecus javensis* L. merupakan salah satu tanaman yang berpotensi digunakan untuk pengobatan malaria secara empiris (Budwan, 2001).

Tanaman *Senecus javensis* L. adalah tanaman obat Indonesia yang hidup liar dan belum banyak dibudidayakan, padahal kandungan senyawa aktifnya yang berupa flavonoid, saponin, zat emulsi dan glikosida yang berpotensi sebagai antiparasit, hepatoprotektor, diuretic dan antimalaria. Kandungan bahan aktif dan temponyng (*Senecus javensis* L.) mempunyai kesamaan dengan kandungan bahan aktif dan tanaman Artemisia annua yaitu saponin, flavonoid, polifenol dan minyak esensial. Tanaman Artemisia adalah tumbuhan yang mempunyai khasiat obat untuk pengobatan

gejala klinis dan cepat mengeliminasi parasit dalam darah, selama ini digunakan sebagai antimalaria (Yunita dan Lestari, 2008).

Pengambilan di alam secara langsung dapat menimbulkan masalah hilangnya sumber plasma nuftah karena adanya kendala dalam budidayanya. Bahkan saat ini disinyalir bahwa bahan herbal yang diedarkan di Indonesia sebagian besar bahan bakunya sudah mulai diimpor dari beberapa negara, sehingga diperlukan peran bioteknologi untuk mengatasi hal ini.

Secara kultur jaringan dapat diproduksi metabolit sekunder yang sama dengan metabolit sekunder yang diproduksi oleh tanaman aslinya. Produksi senyawa aktif suatu tanaman dengan kultur jaringan telah banyak dilaporkan, bahkan untuk skala komersial telah dilakukan pengembangan produksi metabolit sekunder tanaman obat tersebut dengan sistem bioreaktor (Radji, 2005).

Metode produksi senyawa aktif melalui teknik kultur jaringan melalui kultur kalus dipandang jauh lebih efisien jika dibandingkan dengan cara konvensional, karena didalamnya dapat dilakukan perkecambahan sehingga diperoleh senyawa aktif dengan kualitas yang lebih baik dibandingkan dengan secara konvensional (Syamkumar *et al.*, 2007). Penggunaan elisitor dapat memacu produksi metabolit yang diinginkan (Murch *et al.*, 2000; Vanisree *et al.*, 2004).

Kultur kalus *Sonchus arvensis* L. telah berhasil dilakukan, dengan tingkat keberhasilan proliferasi sel sangat cepat sehingga diperoleh kalus dalam jumlah banyak dalam waktu singkat, namun sampai sejauh ini belum ada laporan tentang uji bahan aktif yang terdapat dari kalus yang didapat, sehingga penelitian ini perlu dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang terkandung dalam kalus *Sonchus arvensis* L.. Kajian tentang senyawa aktif *Sonchus arvensis* L. sebagai antimalaria juga belum banyak dilaporkan, sehingga penelitian yang mengungkap potensi senyawa aktif *Sonchus arvensis* L. sebagai antimalaria dari kultur kalus penting untuk dikembangkan.

1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang pada penelitian tahun pertama ini dapat diambil permasalahan sebagai berikut: 1) Zat pengatur tumbuh apa yang dapat menginduksi terbentuknya kalus?; 2) Bagaimana pengaruh pemberian sukrosa dan elisitor terhadap pertumbuhan kalus?; 3) Golongan senyawa apa saja yang terdapat dalam kalus *Sonchus arvensis* L. ?; 4) Bagaimana aktifitas antimalaria dari masing-masing elisitor yang terdapat dalam kalus *Sonchus arvensis* L. ? 5) Jenis elisitor apa yang dapat memacu terbentuknya senyawa antimalaria?

gejala klinis dan cepat mengeliminasi parasit dalam darah, sehingga ini digunakan sebagai antimalaria (Yunus dan Lestari, 2008).

Pengabdian di alam secara langsung dapat menimbulkan masalah khususnya number plasma nutfah karena adanya kendala dalam budidayanya. Bahkan saat ini disinyalir bahwa bahan herbal yang dibedakan di Indonesia sebagai bahan baku utamanya sudah mulai diimpor dari beberapa negara, sehingga diperlukan peran bioteknologi untuk mengatasi hal ini.

Secara kultur jaringan dapat diproduksi metabolit sekunder yang sama dengan metabolit sekunder yang diproduksi oleh tanaman aslinya. Produksi senyawa aktif suatu tanaman dengan kultur jaringan telah banyak dilakukan, bahkan untuk skala komersial telah dilakukan pengembangan produksi metabolit sekunder tanaman obat tersebut dengan sistem bioreaktor (Rahdi, 2005).

Metode produksi senyawa aktif melalui teknik kultur jaringan melalui kultur kalus dibandingkan jauh lebih efisien jika dibandingkan dengan cara konvensional, karena dibolomnya dapat dilakukan pekayaan senyawa sebagai diperoleh senyawa aktif dengan kualitas yang lebih baik dibandingkan dengan secara konvensional (Syamkumar et al., 2007). Penggunaan elitior dapat memacu produksi metabolit yang diinginkan (Murch et al., 2000; Vanisre et al., 2004).

Kultur kalus *Sonchus oleraceus* L. telah berhasil dilakukan dengan tingkat keberhasilan tertinggi sel sangat cepat sehingga diperoleh kalus dalam jumlah banyak dalam waktu singkat, namun sampai sejauh ini belum ada laporan tentang uji bahan aktif yang terdapat dari kalus yang diperoleh sehingga penelitian ini perlu dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang terkandung dalam kalus *Sonchus oleraceus* L. (Jalan tentang senyawa aktif *Sonchus oleraceus* L. sebagai antimalaria juga belum banyak dibicarakan, sehingga penelitian yang menggunakan potensi senyawa aktif *Sonchus oleraceus* L. sebagai antimalaria dan kultur kalus penting untuk dikembangkan).

1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang pada penelitian tahun pertama ini dapat diambil permasalahan sebagai berikut: (1) Zat pengatur tumbuh apa yang dapat meningkatkan terbentuknya kalus? (2) Bagaimana pengaruh pemberian sukrosa dan elitior terhadap pertumbuhan kalus? (3) Golongan senyawa apa saja yang terdapat dalam kalus *Sonchus oleraceus* L. (4) Bagaimana aktifitas antimalaria dan masing-masing elitior yang terdapat dalam kalus *Sonchus oleraceus* L. ? (5) Jenis elitior apa yang dapat memacu terbentuknya senyawa antimalaria?

BAB II STUDI PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang Tempuyung

Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) adalah tanaman obat Indonesia dari keluarga *Asteraceae* mempunyai penyebaran yang sangat luas (Tjitrosoepomo, 2005).

Tempuyung adalah herba menahun, tegak, mengandung getah, sering dengan akar tunggang yang kuat, tingginya 0,6-2m. Batangnya bulat, berongga, gundul dan rapuh. Daunnya gundul, sering keungan bergigi tidak teratur, sedikit banyak berlekuk menyirip dalam. Bunga banyak, kuning cerah. Buah keras, bentuknya memanjang, pipih, berusuk, coklat kekuningan panjangnya 4 mm (Backer *et al.*, 1965).

2.2. Kandungan dan Fungsi Bahan Aktif Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.)

Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) mempunyai rasa pahit dan dingin. Kandungan kimia berupa saponin, flavonoid, zat samak, dan polifenol, oc-lactuserol, l-lactuserol, manitol, inositol, silika, dan taraksasterol (Sugati, dkk., 1991).

Efek farmakologis dari bahan aktif tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) telah banyak dilakukan antara lain ekstrak air dan alkohol daun tempuyung mempunyai daya melarutkan batu ginjal (Hardiyatmo, 1988). Praperlakuan flavonoid fraksi etil asetat daun tempuyung mampu menghambat hepaptoksisitas karbon tetraklorida (CCl₄) yang diberikan pada mencit jantan (Liestyaningsih, 1991).

Secara empiris beberapa senyawa aktif pada daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) telah dipercaya mempunyai banyak fungsi. Flavonoid mempunyai fungsi untuk proteksi terhadap serangan mikroba dan serangga, mengurangi respon terhadap alergen, virus dan karsinogen sehingga flavonoid menunjukkan antialergi, anti inflamasi, antimikrobia, dan antikanker.

2.3. Induksi Kalus dan Berbagai Penelitian terkait

Induksi kalus adalah upaya untuk menumbuhkan bagian tanaman (eksplan), sel-selnya berproliferasi atau membelah-belah tanpa diikuti diferensiasi sehingga membentuk massa sel saja (kalus). Induksi kalus untuk produksi suatu senyawa ternyata setiap spesies membutuhkan media, macam eksplan, jenis serta konsentrasi zat pengatur tumbuh dan jenis elisitor yang berbeda (Tabel 2.1).

BAB II STUDI PUSTAKA

3.1. Tinjauan Tentang Tembungung

Tembungung (*Sonchus oleraceus* L.) adalah tanaman obat Indonesia dari keluarga Asteraceae mempunyai penyebaran yang sangat luas (Tjirosopomo, 2002).

Tembungung adalah berda menuai, tegak, mengandung getas, sering dengan akar tunggang yang kuat, tingginya 0,5-2 m. Batangnya bulat, berongga, gundul dan rapat. Daunnya gundul, sering keanginan bergigi tidak teratur, sedikit banyak berlekuk menyipit dalam. Bunga banyak, kuning cerah. Buah keras, bentuknya memanjang, pipih, berlekuk, corak kekuindingan panjangnya 4 mm (Baker et al., 1982).

3.2. Kandungan dan Fungsi Bahan Aktif Tembungung (*Sonchus oleraceus* L.)

Tembungung (*Sonchus oleraceus* L.) mempunyai rasa pahit dan dingin. Kandungan kimia berupa saponin, flavonoid, zat lemak, dan polifenol, ac-toluenol, l-toluenol, manitol, inositol, sialat, dan tetrakosanol (Sugati, dkk., 1991).

Efek farmakologis dan bahan aktif tembungung (*Sonchus oleraceus* L.) telah banyak dilakukan antara lain ekstrak air dan alkohol dan tembungung mempunyai daya melarutkan batu ginjal (Hardiyanto, 1988). Penderita kolesistolitiasis atau empedolitiasis yang diberikan tembungung mampu menghambat pembentukan kolesterol (CCl₄) yang diberikan pada model tikus (Lestyaningsih, 1981).

Secara empiris beberapa senyawa aktif pada daun tembungung (*Sonchus oleraceus* L.) telah dipercaya mempunyai banyak fungsi. Flavonoid mempunyai fungsi untuk proteksi terhadap serangan mikroba dan serangga, menggunakan respon terhadap serangan virus dan karsinogen sehingga flavonoid menunjukkan antilelektal, antiinflamasi, antimikrobia, dan antikanker.

3.3. Induksi Kalus dan Berbagai Penelitian Terkait

Induksi kalus adalah upaya untuk menumbuhkan psigen tanaman (ekspansi) sel-selnya periferitas atau pembelahan-belah tanpa dikuli diferensiasi sehingga membentuk massa sel saja (kalus) untuk produk suatu senyawa tertentu setiap spesies membutuhkan media, macam ekplan, jenis serta konsentrasi zat pengatur tumbuh dan jenis elicitor yang berbeda (Tabel 2.1).

Tabel 2.1. Macam eksplan, media, elisitor dan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) yang digunakan untuk induksi kalus pada berbagai tanaman

Peneliti, tahun	Tanaman	Kandungan	Media & ZPT untuk induksi kalus	Elisitor
Andrijany <i>et al.</i> , 1999	<i>Agave amaniensis</i>	Saponins	MS + Kinetin (23,2 μ M), 2,4-D (2,26 μ M)	KH ₂ PO ₄ (2,50 μ M), Sucrose (87,64 mM)
Malpathak and David, 1986	<i>Allium sativum</i> L.	Alliin	MS + IAA (11,4 μ M), NAA (10,8 μ M), Kinetin (9,3 μ M)	Coconut water (15%)
Goleniowski and Trippi, 1999	<i>Ambrosia tenuifolia</i>	Altamisine	MS + Kinetin (10 μ M), 2,4-D (1 μ M),	Ascorbic acid and Cysteine (10 μ M)
Nazif <i>et al.</i> , 2000	<i>Cassia acutifolia</i>	Anthraquinones	MS + 2,4-D (1,0 mg/l), Kinetin (0,1 mg/l),	Sucrose (3%), Myo-inositol (100 mg/l)
Zhao <i>et al.</i> , 2001	<i>Catharanthus roseus</i>	Catharanthine	MS + NAA (2 mg/l), IAA (2 mg/l), Kinetin (0,1 mg/l)	Sucrose (3%)
Taniguchi <i>et al.</i> , 2002	<i>Eriobotrya japonica</i>	Triterpenes	LS + NAA (10 μ M), BA (10 μ M)	Casein hydrolysate (200 mg/l), Sucrose (3%)
Wu <i>et al.</i> , 2001	<i>Taxus spp</i>	Taxol	B5 medium + 2,4-D (0,2 mg/l), BA (0,5 mg/l)	Coconut milk(7%), and K+ instead of NH ₄ +
Orihara <i>et al.</i> , 2002	<i>Torreya nucifera var. radicans</i>	Diterpenoids	MS + 2,4-D (10 mg/l)	Glisin (3mg/L), ekstrak ragi (0,5(mg/L), air kelapa (15%,v/v)
Mozar, 2004	<i>Sonchus arvensis</i>		MS+NAA (1,5mg/L), kinetin (0,5 mg/L)	
Ayabe <i>et al.</i> , 1986	<i>Ggycyrrhiza achinata</i>	Flavonoids	MS + IAA (1mg/L), Kinetin (0,1 mg/L)	

Label 2.1. Macam ekstrak, media, elisitor dan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) yang digunakan untuk induksi kalus pada berbagai tanaman

Peneliti Tahun	Tanaman	Kandungan	Media & ZPT untuk induksi kalus	Elisitor
Andriany et al., 1999	<i>Agave americana</i>	Sarcosina	MS + Kinetin (2.5 μM), 2,4-D (2.5 μM)	KH ₂ PO ₄ (2.50 μM), Sucrose (87.84 mM)
Mohamad and David, 1998	<i>Vitum sativum</i>	Alliin	MS + IAA (1.4 μM), NAA (10.8 μM), Kinetin (2.3 μM)	Coconut water (12%)
Goteniowski and Tjip, 1999	<i>Androsace lanata</i>	Alliamine	MS + Kinetin (10 μM), 2,4-D (1 μM)	Ascorbic acid and Cysteine (10 μM)
Mazi et al., 2000	<i>Cassia acutifolia</i>	Anthraquinones	MS + 2,4-D (1.0 mg/l), Kinetin (0.1 mg/l)	Sucrose (3%), M/o-inositol (100 mg/l)
Zhao et al., 2001	<i>Galbanifera rosea</i>	Galbaniferrine	MS + NAA (2 mg/l), IAA (2 mg/l), Kinetin (0.1 mg/l)	Sucrose (3%)
Taniguchi et al., 2002	<i>Epidendrum labrioides</i>	Tripterines	LS + NAA (10 μM), BA (10 μM)	Casain hydrolyzate (200 mg/l), Sucrose (3%)
Wu et al., 2001	<i>Taxus sp.</i>	Taxol	BS medium + 2,4-D (0.2 mg/l), BA (0.2 mg/l)	Coconut milk (2%), and K+ instead of NH ₄ +
Onitara et al., 2002	<i>Tonaya radicans</i>	Diterpenoids	MS + 2,4-D (10 mg/l)	Glycin (3mg/L), ekstrak ragi (0.5 mg/L), air kelapa (1.5% v/v)
Mozar, 2004	<i>Sarcosina arvensis</i>		MS+IAA (1.5 mg/L), Kinetin (0.5 mg/L)	
Vybo et al., 1998	<i>Glycyrrhiza spicata</i>	Flavonoids	MS + IAA (1 mg/L), Kinetin (0.1 mg/L)	

2.4. Uji aktivitas antimalaria secara *in vitro*

Untuk pengujian antimalaria dari ekstrak tumbuhan atau isolat hasil kolom, digunakan cara tes mikro yang didasarkan atas tehnik dari Rieckmann dkk yang kemudian disempurnakan oleh WHO tahun 1982 (WHO, 1985). Bahan Uji dilarutkan dalam DMSO, diencerkan sampai kadar tertentu dalam medium RPMI 1640 yang mengandung 10% serum manusia, 25 mM HEPES dan 25 mM NaHCO₃. Larutan disterilkan dengan saringan diameter 0,45µm dan diencerkan secara seri. Masing-masing lempeng sumur mikro diisi dengan larutan bahan uji dan ditambahkan 180 µL suspensi 10% eritrosit dengan parasitemia 1 % sehingga masing-masing sumur berisi 200 µL medium yang mengandung serum dan bahan uji yang diteliti. Lempeng sumur mikro diletakkan dalam desikator kaca yang diberi lilin yang berguna untuk menghilangkan oksigen. Lilin dinyalakan, desikator ditutup, kran udara pada tutup desikator dibuka. Setelah lilin padam, kran udara dibuka, diinkubasikan dalam inkubator CO₂ pada suhu 37° C selama 48 jam, kemudian dilakukan evaluasi hasil dan ditentukan harga IC₅₀ (Ratsimamanga, *et al.*, 1991)

2.4. Uji aktivitas antimalaria secara *in vitro*

Untuk pengujian antimalaria dan ekstrak tumbuhan atau isolat hasil kultur, digunakan cara tes mikro yang didasarkan atas teknik dari Richardson dkk yang kemudian dikembangkan oleh WHO tahun 1982 (WHO, 1982). Bahan Uji dituangkan dalam DM20, dan diperiksa sampai kadar tertentu dalam medium RPMi 1640 yang mengandung 10% serum manusia, 25 mM HEPES dan 25 mM NaHCO₃. Larutan ditetikan dengan serangga dengan diameter 0.4-0.5 mm dan ditunjukkan secara seri. Masing-masing lempeng serum mikro ditetikan dengan larutan bahan uji dan ditampatkan 180 µl suspensi 10% eritrosit dengan parasitemis 1% sehingga masing-masing serum berisi 500 µl medium yang mengandung serum dan bahan uji yang diteliti. Lempeng serum mikro ditetaskan dalam desikator kaca yang diberi lilin yang berguna untuk menghindari oksigen. Lilin ditetaskan, desikator ditutup, dan udara pada tutup desikator dibuka. Setelah lilin pada badan, kan udara dibuka, ditukarkan dalam inkubator CO₂ pada suhu 37° C selama 48 jam, kemudian dilakukan evaluasi hasil dan ditentukan harga IC₅₀ (Ratumananget, et al, 1991).

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

Tahap pertama penelitian ini mempunyai tujuan sebagai berikut: 1) mengetahui zat pengatur tumbuh yang dapat menginduksi terbentuknya kalus, 2) mengetahui pengaruh pemberian sukrosa dan elisitor terhadap pertumbuhan kalus; 3) mengetahui jenis elisitor yang dapat memacu terbentuknya senyawa antimalaria, 4) mengetahui profil golongan senyawa yang terdapat dalam kalus *Sonchus arvensis* L., 5) mengetahui aktifitas antimalaria dari masing-masing elisitor yang terdapat dalam kalus *Sonchus arvensis* L..

3.2 Manfaat Penelitian

Hasil yang ditargetkan pada penelitian tahun pertama ini adalah mendapatkan protokol untuk produksi kalus dari tanaman *Sonchus arvensis* L. yang mempunyai aktifitas antimalaria terbaik dan mengetahui potensi ekstrak kalus dari tanaman *Sonchus arvensis* L. sebagai bahan antimalaria. Pada tahap pertama ini sudah didapatkan protokol untuk induksi kalus dan hasil aktifitas antimalarianya menunjukkan hasil positif, dengan nilai $IC_{50}=1-10\mu\text{g/l}$, artinya kalus *Sonchus arvensis* L. yang dihasilkan berpotensi sebagai bahan antimalaria.

Hasil penelitian ini merupakan temuan baru tentang sumber bahan antimalaria dari tanaman obat Indonesia, walau pemanfaatannya masih membutuhkan rangkaian penelitian yang panjang. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat sebagai berikut:

1. Memberikan informasi sumber bahan antimalaria baru dari tanaman obat Indonesia
2. Memberikan informasi dasar penelitian eksplorasi senyawa antimalaria dari tanaman *Sonchus arvensis* L. dan teknologi produksinya
3. Memacu penelitian tentang teknologi produksi bahan aktif dan eksplorasi senyawa yang berasal tanaman obat Indonesia khususnya yang berkhasiat sebagai bahan antimalaria

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

Tahap pertama penelitian ini mempunyai tujuan sebagai berikut: (1) mengetahui zat pengatur tumbuh yang dapat meningkatkan terbentuknya kalus; (2) mengetahui kandungan senyawa dan ekstrak terhidrat terhidrat kalus; (3) mengetahui jenis ekstrak yang dapat memacu terbentuknya senyawa antimalaria; (4) mengetahui profil golongan senyawa yang terdapat dalam kalus *Zonchus avensis* L.; (5) mengetahui aktivitas antimalaria dan masing-masing ekstrak yang terdapat dalam kalus *Zonchus avensis* L.

3.2 Manfaat Penelitian

Hasil yang diharapkan pada penelitian tahun pertama ini adalah mendapatkan protokol untuk produksi kalus dan tanaman *Zonchus avensis* L. yang mempunyai aktivitas antimalaria terbaik dan mengetahui potensi ekstrak kalus dan tanaman *Zonchus avensis* L. sebagai bahan antimalaria. Pada tahap pertama ini sudah dibagikan protokol untuk isolasi kalus dan hasil aktivitas antimalaria menunjukkan hasil positif dengan nilai IC₅₀=1-10µg, artinya kalus *Zonchus avensis* L. yang dihasilkan berpotensi sebagai bahan antimalaria.

Hasil penelitian ini merupakan temuan baru tentang sumber bahan antimalaria dan tanaman obat Indonesia, yang bermanfaat untuk meningkatkan rangkaian penelitian yang berlanjut. Hasil penelitian ini diharapkan dapat mendorong manfaat sebagai berikut:

1. Memberikan informasi sumber bahan antimalaria baru dan tanaman obat Indonesia
2. Memberikan informasi dasar penelitian ekplorasi senyawa antimalaria dan tanaman *Zonchus avensis* L. dan teknologi produksinya
3. Memacu penelitian tentang teknologi produksi bahan aktif dan ekplorasi senyawa yang berasal tanaman obat Indonesia khususnya yang berkhasiat sebagai bahan antimalaria

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. Untuk analisis bahan aktif dan uji aktifitas senyawa antimalaria dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Penelitian dilakukan selama satu tahun dari Juli 2009 sampai Desember 2009.

4.2 Bahan Penelitian

4.2.1 Bahan Hayati

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman *Sonchus arvensis L.*, diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur. Sebagai sumber eksplan adalah daun. Untuk uji antimalaria *in-vitro* digunakan *Plasmodium falciparum*.

4.2.2 Bahan Kimia

Bahan kimia untuk medium Murashige and Skoog (George and Sherinton, 1992), elisitor, bahan kimia untuk uji antimalaria, dan bahan kimia untuk ekstraksi antimalaria.

4.3 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlemeyer, cawan petri gelas Φ =15 cm, gelas pengaduk, oven, tabung reaksi, pinset, skalpel, lampu bunsen, *scalpel, blade*, tabung sentrifugasi, sentrifuge, inkubator, kulkas, timbangan kasar, timbangan analitik, autoklaf, *Laminair Air Flow* (LAF), tabung soxhlet, flakon, eksikator, rotary vakum, evaporator, seperangkat alat untuk KLT, dan seperangkat alat untuk uji antimalaria.

4.4 Prosedur Penelitian

4.4.1 Induksi dan Perbanyakkan Kalus

Penelitian ini bertujuan untuk optimalisasi zat pengatur tumbuh, sukrosa, kondisi inkubasi, dan elisitor yang sesuai untuk induksi dan perbanyakkan kalus.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. Untuk analisis bahan ekli dan uji aktifitas senyawa antimalaria dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Penelitian dilakukan selama satu tahun dari Juli 2009 sampai Desember 2009.

4.2 Bahan Penelitian

4.2.1 Bahan Hayati

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman *Scolecophorus* *arvensis* L., diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur. Sebagai sumber ekplan adalah daun. Untuk uji aktifitas in-vitro digunakan Paswodadi (dapat).

4.2.2 Bahan Kimia

Bahan kimia untuk medium Murashige and Skoog (Geiger and Sherrington, 1992), elitor, bahan kimia untuk uji antimalaria, dan bahan kimia untuk ekstraksi antimalaria.

4.3 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah eheimeyer, cawan petri gelas 9 =10 cm, gelas penduduk, oven, tabung reaksi, pisau, skalpel, jampan busen, scalpel, gelas, tabung sentrifugal, sentrifuge, inkubator, kukas, timbangan kasar, timbangan analitik, autoklaf, Laminar Air Flow (LAF), tabung Soxhlet, faskon, ekstraktor rotary vakum, evaporator, seperangkat alat untuk KLT, dan seperangkat alat untuk uji antimalaria.

4.4 Prosedur Penelitian

4.4.1 Induksi dan Perbanyakan Kalus

Penelitian ini bertujuan untuk optimalisasi zat pengatur tumbuh, sukrosa, kondisi inkubasi, dan elitor yang sesuai untuk induksi dan perbanyakan kalus.

4.4.1.1 Pengaruh zat pengatur tumbuh terhadap induksi kalus

Eksplan yang dipakai adalah daun. Daun dicuci menggunakan deterjen dan dibilas dengan air, selanjutnya direndam dalam fungisida (1 g dalam 500 mL aquades) selama 15 menit, dan dibilas dengan air sampai bersih. Selanjutnya daun dimasukkan dalam LAF, daun direndam dalam Bayclin (35 mL dalam 500 mL aquades steril) selama 10 menit, dan dibilas 3 kali menggunakan aquades steril @ 3 menit. Daun dipotong menggunakan *blade scalpel* (± 1 cm), kemudian ditanam dalam botol kultur yang diberi perlakuan zat pengatur tumbuh BAP 0,5 ppm (MS₁); IAA 1 ppm (MS₂); IAA 1 ppm + BAP 0,5 ppm (MS₃); IBA 1 ppm (MS₄); IBA 1 ppm + BAP 0,5 ppm (MS₅); NAA 1 ppm (MS₆); NAA 1 + BAP 0,5 ppm (MS₇); 2,4D 1 ppm (MS₈); 2,4D 1 ppm + BAP 0,5 ppm (MS₉); tanpa zat pengatur tumbuh (MS₀) dengan bagian abaksial daun menempel pada media. Setelah itu kultur disimpan diruang inkubasi dalam kondisi gelap dan terang pada suhu 20°C selama 4 minggu. Kalus yang terbentuk difoto menggunakan kamera digital. Pengamatan terhadap waktu terbentuknya kalus dilakukan seminggu sekali. Persentase eksplan membentuk kalus dihitung dengan pendekatan :

$$\frac{\sum \text{eksplan yang membentuk kalus}}{\text{jumlah eksplan}} \times 100\%$$

4.4.1.2 Pengaruh sukrosa terhadap pertumbuhan kalus

Cara kerja yang dilakukan mulai tahapan sterilisasi sampai dengan penanaman eksplan sama dengan cara kerja sebelumnya. Perlakuan sukrosa yang dipakai adalah Sukrosa 1% (N₁); Sukrosa 2% (N₂); Sukrosa 3% (N₃); Sukrosa 4% (N₄); Sukrosa 5% (N₅). Parameter yang diamati adalah berat basah dan berat kering kalus pada minggu keempat setelah dikultur.

4.4.1.3 Pengaruh berbagai elisitor terhadap pertumbuhan kalus

Cara kerja yang dilakukan mulai tahapan sterilisasi sampai dengan penanaman eksplan sama dengan cara kerja sebelumnya. Perlakuan elisitor yang dipakai adalah Glutamin 0,25 g (G₁); Glutamin 0,5 g (G₂); Amonium Nitrat 1,0 g (NN₂); Kalium Nitrat 0,5 g (KN₁); Kalium Nitrat 1,0 g (KN₂); Kalium Phosphat 0,1 g (KP₁); Kalium Phosphat 0,2 g (KP₂); Kontrol (K). Parameter yang diamati adalah berat basah dan berat kering kalus pada minggu keempat setelah dikultur.

4.4.1 Pengaruh zat pengatur tumbuh terhadap indikasi kalus

Eksplan yang dipakai adalah daun. Daun dicuci menggunakan deterjen dan dibilas dengan air selanjutnya drendam dalam fungisida (1 g dalam 500 ml air) selama 15 menit dan dibilas dengan air sampai bersih. Selanjutnya daun dimasukkan dalam LRF, dan drendam dalam Bayclin (30 ml dalam 500 ml air) selama 10 menit, dan dibilas 3 kali menggunakan air steril @ 3 menit. Daun dibolong menggunakan plate scalpel (41 cm) kemudian diletakkan dalam botol kultur yang diberi perlakuan zat pengatur tumbuh BAP 0,5 ppm (M₁); IAA 1 ppm (M₂); IAA 1 ppm + BAP 0,5 ppm (M₃); IBA 1 ppm (M₄); IBA 1 ppm + BAP 0,5 ppm (M₅); NAA 1 ppm (M₆); NAA 1 ppm + BAP 0,5 ppm (M₇); ZAD 1 ppm (M₈); ZAD 1 ppm + BAP 0,5 ppm (M₉); IAA 1 + BAP 0,5 ppm (M₁₀); ZAD 1 ppm (M₁₁); ZAD 1 ppm + BAP 0,5 ppm (M₁₂). Setiap zat pengatur tumbuh (M₁₋₁₂) dengan bagian apikal dan menempel pada media setelah itu kultur jaringan diletakkan dalam kondisi gelap dan terang pada suhu 20°C selama 4 minggu. Kalus yang terbentuk foto menggunakan kamera digital. Pengamatan terhadap waktu terbentuknya kalus dilakukan seminggu sekali. Persentase eksplan membentuk kalus dihitung dengan pendekatan :

$$\frac{\sum \text{eksplan yang membentuk kalus}}{\text{jumlah eksplan}} \times 100\%$$

4.4.2 Pengaruh sukrosa terhadap pertumbuhan kalus

Cara kerja yang dilakukan mulai tahapan sterilisasi sampai dengan penanaman eksplan sama dengan cara kerja sebelumnya. Perakuan sukrosa yang dipakai adalah sukrosa 1% (N₁); Sukrosa 2% (N₂); sukrosa 3% (N₃); Sukrosa 4% (N₄); Sukrosa 5% (N₅). Parameter yang diamati adalah berat basah dan berat kering kalus pada minggu keempat setelah dikultur.

4.4.3 Pengaruh berbagai esitor terhadap pertumbuhan kalus

Cara kerja yang dilakukan mulai tahapan sterilisasi sampai dengan penanaman eksplan sama dengan cara kerja sebelumnya. Perakuan esitor yang dipakai adalah Glutamin 0,25 g (G₁); Glutamin 0,5 g (G₂); Amonium Nitrat 1,0 g (N₁); Kalium Nitrat 0,5 g (K₁); Kalium Nitrat 1,0 g (K₂); Kalium Phosphat 0,1 g (K₃); Kalium Phosphat 0,5 g (K₄); Kontrol (K). Parameter yang diamati adalah berat basah dan berat kering kalus pada minggu keempat setelah dikultur.

4.4.2 Ekstraksi kalus *Sonchus arvensis* L dengan metode elisitasi

Ekstraksi sudah dilakukan dengan menggunakan metode maserasi dengan menggunakan pelarut metanol. Kalus dikeringkan dengan oven 40°C sampai kering (kira-kira 2 hari). Setelah kalus kering (simplisia) ditimbang. Simplisia dihaluskan dengan menggunakan mortar. Serbuk/bubuk simplisia ditimbang kembali. Serbuk/bubuk simplisia dituangi metanol sesuai dengan beratnya (maserasi). Ekstraksi maserasi ultrasonic selama 15 menit. Ekstraksi maserasi didiamkan pada suhu kamar selama 24 jam (sampai terbentuk endapan dan cairan di atas). Cairan dipisahkan dari endapan dengan disaring menggunakan kertas saring akan diperoleh cairan warna kuning. Endapan ditambahkan metanol lagi sesuai berat kering simplisia. Endapan ditambahkan metanol lagi metanol lagi lalu disentrifus selama 15 menit. Ekstrak siap untuk diujikan.

4.4.3 Monitoring ekstrak dengan KLT

Masing-masing kandungan bahan kimia ekstrak dimonitor dengan KLT menggunakan fase diam gel GF 254 dan fase gerak CHCl_3 : metanol = 95 : 5. Penampak noda uap amoniak.

4.4.4 Penentuan Aktifitas Antimalaria

4.4.4.1. Bahan untuk uji aktivitas antimalaria *in vitro*

Bahan yang digunakan untuk uji aktifitas antimalaria *in-vitro* adalah: biakan *P. falciparum* strain 3D7 diperoleh dari Lembaga Eijkman Jakarta, medium kultur malaria lengkap (cMCM= complete Malaria Culture Medium): RPMI 1640 (Gibco), HEPES (N-2-hidroksietilpiperazin-N'-2-asam sulfonatetan) (Gibco), NaHCO_3 , gentamicin sulfat, *aquadest steril for irrigation* (Otsuka), darah manusia yang didapatkan dari PMI Surabaya, air suling steril, giemsa 10%, ekstrak kalus *Sonchus arvensis* L., DMSO (dimetilsulfosida), Sorbitol (SIGMA).

4.4.4.2 Prosedur pengujian aktivitas antimalaria secara *In-Vitro*

A. Medium tak lengkap (*Incomplete Medium*)

Dibuat larutan steril yang terdiri dari 10,4 g RPMI-1640, HEPES 5,96 g, Natrium Bikarbonat 2,1 g, Hypoxantin 0,05 g, Gentamycin 0,5 mL dan aquabides 960 mL, kemudian larutan disterilisasi dengan filter berdiameter 0,22 μm , selanjutnya dimasukkan dalam botol dan disimpan pada suhu 4°C. Ini disebut juga medium pencuci (*washing medium*) dan bila akan digunakan, dimasukkan inkubator suhu 37 °C terlebih dahulu.

4.4.3. Ekstraksi Kalus *Sonchus oleraceus* L dengan metode simplisia

Ekstraksi sudah dilakukan dengan menggunakan metode maserasi dengan menggunakan solvent metanol. Kalus dikeringkan dengan oven 40°C sampai kering kira-kira 2 hari. Setelah kalus kering (simplisia) dibentuk. Simplisia dituangkan dengan menggunakan mortar. Serbuk tersebut ditimbang kembali. Serbuk tersebut dimasukkan ke dalam botol dengan penutupnya (maserasi). Ekstraksi maserasi ultrasonik selama 15 menit. Ekstraksi maserasi dibersihkan pada suhu kamar selama 24 jam (sampai terbentuk endapan dan cairan di atas). Cairan dipisahkan dan endapan tersebut digunakan untuk analisis. Endapan dikeringkan dengan menggunakan oven 40°C sampai kering. Endapan ditampatkan ke dalam botol lagi sesuai berat kering simplisia. Endapan ditampatkan ke dalam botol lagi metanol lagi dituangkan selama 15 menit. Ekstrak siap untuk diujikan.

4.4.3. Monitoring ekstrak dengan KLT

Masing-masing kandungan bahan kimia ekstrak dimonitor dengan KLT menggunakan fase diam gel OF 254 dan fase gerak CHCl₃:metanol = 95 : 5. Perambatan pada saat analisis.

4.4.4. Penelitian Aktivitas Antimalaria

4.4.4.1. Bahan untuk uji aktivitas antimalaria in vitro

Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas antimalaria in-vitro adalah plankton *Plasmodium* strain 3D7 diperoleh dari Lembaga Eijkman Jakarta medium kultur adalah lengkap (DMEM= complete Media Culture medium): RPMI 1640 (Gibco), HEPES (H-2-19700), penicillin (Gibco), streptomisin (Gibco), gentamicin sulfit, evanescent steril for injection (Otsuka), darah manusia yang didapatkan dari PMI Surabaya, air suling steril, gema 10%, ekstrak kalus *Sonchus oleraceus* L (DMSO dimethylsulphide), Sorbitol (SIGMA).

4.4.4.2. Prosedur pengujian aktivitas antimalaria secara In-Vitro

A. Medium for lengkap (Incomplete Medium)
 Dikalorikan steril yang terdiri dari 10,4 g RPMI-1640, HEPES 5,96 g, NaClum 2,1 g, Hipoxantin 0,05 g, Gentamycin 0,5 mL dan apuridies 200 mL, kemudian larutan distilasi dengan filter bedaimeter 0,22 µm, selanjutnya dimasukkan dalam botol dan disimpan pada suhu 4°C. Ini disebut juga medium benahi (washed medium) dan bisa akan digunakan, dimasukkan ke dalam botol suhu 37°C terlebih dahulu.

B. Persiapan serum

Diambil darah segar golongan O yang sudah ditambah antikoagulan, kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Plasma diambil dengan pipet pasteur dan di-heat inactivation pada suhu 56°C selama 30 menit, kemudian disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C untuk mengendapkan fibrin, sehingga didapatkan serum. Penyimpanan pada suhu -20°C dan bila akan digunakan, dihangatkan pada suhu 37°C.

C. Medium lengkap (*Complete Medium*)

Medium lengkap adalah medium yang mengandung 10% serum manusia. Medium ini dibuat dengan mencampur medium tak lengkap sebanyak 90 mL dengan 10 mL serum manusia. Medium ini digunakan untuk membiakkan *P. falciparum*.

D. Pembuatan eritrosit 50%

Darah manusia golongan O yang diberi antikoagulan disimpan pada suhu 4°C dapat digunakan tidak lebih dari 3 minggu. Darah dimasukkan dalam tabung dan disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Plasma dipisahkan dan leukosit dibuang. Eritrosit dicuci dengan medium pencuci 1-2 kali volume, disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Proses ini dilakukan sebanyak 2 kali. Eritrosit yang telah dicuci (bebas dari leukosit) ditambah dengan medium lengkap dengan volume yang sama untuk membuat eritrosit 50% dan disimpan pada suhu 4°C. Eritrosit yang telah dicuci dapat digunakan tidak lebih dari dua minggu.

E. Prosedur biakan *P.falciparum*

Prosedur biakan ini didasarkan pada metode Trager & Jensen (1976). Biakan dilakukan di dalam *petridish* dan dikerjakan secara aseptik. Parasit malaria diperoleh dari simpanan beku yang di "thawing" dengan cara tabung yang berisi parasit beku dicairkan pada suhu 37°C. Ditambahkan NaCl 3,5% dengan volume yang sama dan dipindahkan ke tabung sentrifuse menggunakan pipet mikro sambil dicampur perlahan, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan kemudian dibuang. Endapan disuspensikan dengan 5 mL *incomplete medium*, dicampur perlahan dengan pipet mikro dan disentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan kemudian dibuang. Prosedur ini dilakukan sebanyak dua kali.

3. Periapan serum

Dilambil darah segar golongan O yang sudah ditamahi antikoagulan kemudian ditentus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Plasma diambil dengan pipet pasteur dan di-heat inactivation pada suhu 56°C selama 30 menit, kemudian ditentus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C untuk mengendapkan fibrin, sehingga didapatkan serum. Penyimpanan pada suhu -20°C dan bisa akan digunakan ditundakan pada suhu 37°C.

2. Medium lengkap (Complete Medium)

Medium lengkap adalah medium yang mengandung 10% serum manusia. Medium ini dibuat dengan mencampur medium lak lengkap sebanyak 90 ml dengan 10 ml serum manusia. Medium ini digunakan untuk membudidayakan *P. falciparum*.

1. Pembuatan eritrosit 50%

Darah manusia golongan O yang dipisah antikoagulan disimpan pada suhu 4°C dapat digunakan tidak lebih dari 3 minggu. Darah dimasukkan dalam tabung dan ditentus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Plasma dipisahkan dan leukosit dibenci. Eritrosit dicuci dengan medium pencuci 1-2 kali volume. ditentus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Proses ini dilakukan sebanyak 2 kali. Eritrosit yang telah dicuci (bebas dari leukosit) ditamahi dengan medium lengkap dengan volume yang sama untuk membuat eritrosit 50% dan disimpan pada suhu 4°C. Eritrosit yang telah dicuci dapat digunakan tidak lebih dari dua minggu.

1. Prosedur biskin *P. falciparum*

Prosedur biskin ini didasarkan pada metode Trigg & Jensen (1976). Biskin dilakukan di dalam bejana dan dikerjakan secara aseptik. Parasit malaria diperoleh dari jaringan bekul yang di "thawing" dengan cara tabung yang berisi parasit yang dicairkan pada suhu 37°C. Dilampirkan HAc 3.5% dengan volume yang sama dan dipindahkan ke tabung serutase menggunakan pipet mikro sambil dicampur bejana, kemudian ditentus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Substratan kemudian dibuang. Endapan ditentus dengan 5 ml incomplete medium, dicampur bejana dengan pipet mikro dan ditentus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Substratan kemudian dibuang. Prosedur ini dilakukan sebanyak dua kali.

Setelah endapan dicuci, ditambahkan sebanyak 4,5 mL medium lengkap dan 0,5 mL RBC 50% kemudian dicampur perlahan dengan pipet, kemudian dipindahkan ke dalam petridish, dimasukkan dalam *candle jar* dan disimpan di dalam inkubator yang bersuhu 37°C. Selanjutnya dilakukan penggantian medium setiap hari, yaitu dengan membuang medium lama dan menambahkan 4,5 mL medium lengkap yang baru ke dalam kultur parasit. Apabila tingkat parasitemianya lebih dari 2% dapat dilakukan sub biakan.

F. Sub Biakan *P. falciparum*

Eritrosit yang terinfeksi parasit malaria disentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan kemudian dibuang. *Packed cells* disuspensikan dengan medium lengkap baru dengan volume sama, selanjutnya dibagi ke dalam *petridish* baru dan ditambahkan medium lengkap dan eritrosit 50% baru untuk membuat hematokrit 5%.

G. Sinkronisasi Biakan *P. falciparum*

Untuk suatu pengujian aktivitas antimalaria, diperlukan parasit dalam keadaan sinkron yaitu pada stadium cincin. Sinkronisasi dilakukan dengan menggunakan sorbitol 5% (Lambros & Vanderberg, 1979). Sinkronisasi dilakukan dengan cara suspensi parasit yang diperoleh dari biakan berkesinambungan dengan tingkat parasitemia 5-10% (80% stadium cincin) disentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C, kemudian supernatan dibuang. Endapan berupa eritrosit yang terinfeksi parasit disuspensikan dengan sorbitol 5% sebanyak 3-4 kali volume endapan, didiamkan selama 5-10 menit pada temperatur kamar, disentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C dan dibuang supernatannya. Lalu endapan dicuci dengan *incomplete medium* sebanyak 3-4 kali volume dan disentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Proses pencucian ini diulangi sebanyak 3 kali. Setelah dicuci, ditambahkan *complete medium* dan suspensi eritrosit baru (RBC 50%) sampai terbentuk hematokrit 5%. Selanjutnya dibuat hapusan tipis, diwarnai dengan giemsa untuk mengamati stadium parasit dan dihitung persen parasitemianya.

H. Penyiapan Bahan Uji

Bahan uji berupa ekstrak kalus *Sonchus arvensis* L. sebanyak 10 mg sampel dilarutkan dalam 100 µL DMSO dan selanjutnya dibuat pengenceran sehingga didapat konsentrasi uji pada konsentrasi : 100; 10; 1 ; 0,1 ; 0,01µg/mL.

Setelah endapan dicuci, ditambahkan sebanyak 4,5 ml medium lengkap dan 0,5 ml RBC 50% kemudian dicampur dengan pipet. Kemudian dipindahkan ke dalam beaker, dimasukkan dalam wadah yang disimpan di dalam inkubator yang berisi 37°C. Selanjutnya dilakukan penggantian medium setiap hari, yaitu dengan membuang medium lama dan menambahkan 4,5 ml medium lengkap yang baru ke dalam kultur parasit. Apabila tingkat parasitemianya lebih dari 2% dapat dilakukan subdakan.

F. Sub Biakan F. *falciiparum*

Eritrosit yang terinfeksi parasit malaria disentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatant kemudian dibuang. Packed cells disuspensikan dengan medium lengkap baru dengan volume sama, selanjutnya dipadi ke dalam beaker baru dan ditambahkan medium lengkap dan eritrosit 50% baru untuk membuat hematokrit 2%.

G. Sinkronisasi Biakan F. *falciiparum*

Untuk suatu pengukuran aktivitas antimalaria, dibutuhkan parasit dalam keadaan sinkron yaitu pada stadium cincin. Sinkronisasi dilakukan dengan menggunakan *sychlo 2%* (Lambros & Vanderberg, 1978). Sinkronisasi dilakukan dengan cara subpassi parasit yang diperoleh dan lakukan berkeseimbangan dengan tingkat parasitemia 2-10% (80% stadium cincin) disentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C, kemudian supernatant dibuang. Endapan berupa eritrosit yang terinfeksi parasit disuspensikan dengan *sychlo 2%* sebanyak 3-4 kali volume endapan, ditambahkan selama 5-10 menit pada temperatur kamar, disentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C dan dibuang supernatannya. Lalu endapan dicuci dengan *incomplete medium* sebanyak 3-4 kali volume dan disentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Proses pencucian ini diulangi sebanyak 3 kali. Setelah dicuci, ditambahkan *complete medium* dan subpassi eritrosit baru (RBC 50%) sampai terbentuk hematokrit 2%. Selanjutnya dibuat suspensi tipis, diventilasi dengan gelas untuk mengaman stadium parasit dan dihindari plesen parasitemianya.

H. Penyisipan Bahan Uji

Bahan uji berupa ekstrak kalus *Sonchus olerensis* L. sebanyak 10 mg sampel ditambahkan dalam 100 µl DMSO dan selanjutnya dibuat pengenceran sehingga didapat konsentrasi uji pada konsentrasi : 100; 10; 1; 0,1; 0,01µg/ml.

I. Pengujian aktivitas antimalaria *In Vitro*

Pengujian aktivitas anti malaria *in vitro* dilakukan dengan cara diambil 5 μL bahan uji dan ditambahkan medium kompleks sampai 250 μL .

Kedalam tiap-tiap sumur (*well*) dari lempeng mikrotiter datar yang telah diberi 1080 μL medium komplit, (kecuali apada kontrol (-) dimasukkan 500 μL), ditambahkan 120 μL larutan isolat yang diambil dari stok, kemudian dibuat pengenceran sehingga konsentasi akhir pada sumur mikrotiter adalah 100; 10; 1; 0,1; dan 0,01 $\mu\text{g/mL}$ (kultur dibuat duplo).

Suspensi parasit dalam 500 μL eritrosit ditambahkan ke dalam masing-masing sumur (*well*) mikrotiter datar dengan tingkat parasitemia 1% dan hematokrit 5%, kemudian diinkubasi suhu 37°C, sesuai waktu uji yang diperlukan. Kultur dipanen dan dibuat hapusan dengan giemsa untuk selanjutnya dihitung jumlah eritrosit yang terinfeksi *P.falciparum* setiap 5000 eritrosit dengan menggunakan mikroskop cahaya.

J. Parasitemia dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Parasitemia} = \frac{\sum \text{eritrosit yang terinfeksi}}{5000 \text{ eritrosit}} \times 100\%$$

Persentase penghambatan dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Penghambatan} = 100\% - \left[\frac{X_p}{X_k} \times 100\% \right]$$

Keterangan :

X_p = Parasitemia perlakuan

X_k = Parasitemia kontrol negative

4.5. Analisis Data

Data yang diperoleh berupa data diskriptif kualitatif dan kuantitatif. Data diskriptif dianalisis secara diskriptif dengan membandingkan antara kontrol dan perlakuan. Data kuantitatif dianalisis dengan ANOVA dan diuji lanjut dengan Uji Duncan.

Pengujian aktivitas senyawa in vitro

Pengujian aktivitas anti malaria in vitro dilakukan dengan cara diambil 5 ml darah uji dan ditambahkan medium komplek sampai 250µl.

Kedua tabung suntur (well) dan tabung mikrotiter standar yang telah diberi 100µl medium kontrol, (kecuali pada kontrol (-) dimasukkan 200 µl.) ditambahkan 150 µl larutan sel yang diambil dari stok, kemudian dibuat pengenceran sehingga konsentrasi akhir pada suntur mikrotiter adalah 100; 10; 1; dan 0,1 µg/ml (kultur dibuat duplo).

Suspensi parasit dalam 200 µl erlenmeyer ditambahkan ke dalam masing-masing suntur (well) mikrotiter dasar dengan tingkat parasitemia 1% dan hematokrit 5%, kemudian dikulivasi suhu 37°C sesuai waktu uji yang dibutuhkan. Kultur diberikan dan dibuat hapusan dengan gelas objek selanjutnya dilubangi erlenmeyer yang terinfeksi. Parasitemia seliap 200 erlenmeyer dengan menggunakan mikroskop cahaya.

1. Parasitemia dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Parasitemia } = \frac{\sum \text{erlenmeyer yang terinfeksi}}{2000 \text{ erlenmeyer}} \cdot 100\%$$

Parasitemia pengendalian dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Pengendalian} = 100\% - \left[\frac{Xp}{Xk} \cdot 100\% \right]$$

Keterangan :

Xp = Parasitemia bahan

Xk = Parasitemia kontrol negative

4.2. Analisis Data

Data yang diperoleh berupa data dikriptik kualitatif dan kuantitatif. Data dikriptik dianalisis secara dikriptik dengan membandingkan antara kontrol dan perlakuan. Data kuantitatif dianalisis dengan ANOVA dan uji lanjut dengan Uji Duncan.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Induksi dan Perbanyakan Kalus

5.1.1 Pengaruh berbagai kombinasi zat pengatur tumbuh terhadap induksi kalus

Zat pengatur tumbuh dari golongan auksin (2,4 D, IAA, IBA, NAA) dan sitokinin (BAP) digunakan untuk menginduksi kalus. Pengaruh berbagai kombinasi zat pengatur tumbuh terhadap induksi kalus pada *Sonchus arvensis* L. berdasarkan hasil pengamatan memberikan respon yang berbeda-beda (Tabel 5.1)

Tabel 5.1 Waktu induksi kalus, morfologi kalus, dan persentase eksplan membentuk kalus setelah diinkubasi selama 4 minggu

Perlakuan Hormon	Waktu terbentuknya kalus (Minggu ke)		Persentase Eksplan Membentuk Kalus%	Diskripsi morfologi kalus
	Inkubasi Gelap	Inkubasi Terang		
MS ₀	0	0	0	Tidak terbentuk kalus, eksplan hanya menggulung
MS ₁	2	3	100	Kalus pada tahap akhir berkembang membentuk tunas yang banyak sekali
MS ₂	2	2	100	Kalus sangat kompak dan tidak berkembang
MS ₃	2	3	100	Kalus berkembang menjadi tunas
MS ₄	2	3	100	Kalus berkembang menjadi tunas dan akar
MS ₅	2	2	100	Kalus berkembang menjadi tunas dan akar
MS ₆	2	3	100	Kalus sangat kompak dan tidak berkembang
MS ₇	2	3	100	Kalus berkembang menjadi tunas dan akar
MS ₈	2	3	100	Kalus tidak berkembang pesat
MS ₉	2	3	100	Kalus kompak dan berkembang maksimal

Keterangan: MS₁= BAP 0,5 ppm; MS₂ = IAA 1 ppm; MS₃=IAA 1ppm +BAP 0,5 ppm; MS₄ = IBA 1 ppm; MS₅ = IBA 1 ppm + BAP 0,5 ppm; MS₆ = NAA 1 ppm; MS₇ =NAA 1 ppm + BAP 0,5 ppm; MS₈ = 2,4D 1 ppm; MS₉ = 2,4D 1 ppm + BAP 0,5 ppm; MS₀ = tanpa zat pengatur tumbuh.

BAB V
HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Induksi dan Perbanyakan Kalus

5.1.1 Pengaruh berbagai komposisi zat pengatur tumbuh terhadap induksi kalus

Zat pengatur tumbuh dari golongan auksin (2,4-D, IAA, IBA, NAA) dan sitokinin (BAP) digunakan untuk menginduksi kalus. Pengaruh berbagai komposisi zat pengatur tumbuh terhadap induksi kalus pada *Sonchus oleraceus* L. berdasarkan hasil pengamatan memberikan respon yang berbeda-beda (Tabel 5.1).

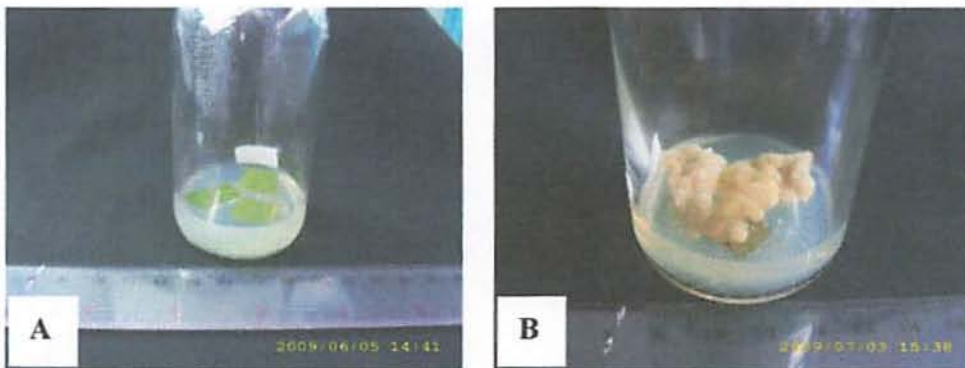
Tabel 5.1 Waktu induksi kalus, morfologi kalus, dan persentase eksplan membentuk kalus setelah diinkubasi selama 4 minggu

Perlakuan Horison	Waktu terbentuknya kalus (Minggu)		Persentase Eksplan Membentuk Kalus	Morfologi kalus
	Induksi Terang	Induksi Gelap		
M2	0	0	0	Tidak terbentuk kalus
M1	2	2	100	eksplan hanya menguning
1	-	-	-	Kalus pada bagian akhir berkembang membentuk tunas yang banyak sekali
M2	2	2	100	Kalus sangat kompak dan tidak berkembang
M2	2	2	100	Kalus berkembang menjadi tunas
M2	2	2	100	Kalus berkembang menjadi tunas dan akar
M2	2	2	100	Kalus berkembang menjadi tunas dan akar
M2	2	2	100	Kalus sangat kompak dan tidak berkembang
M2	2	2	100	Kalus berkembang menjadi tunas dan akar
M2	2	2	100	Kalus tidak berkembang
M2	2	2	100	Kalus kompak dan post

Keterangan: M2 = BAP 0,2 ppm; M1 = IAA 1 ppm; M2 = IAA 1 ppm; M2 = IAA 1 ppm + BAP 0,2 ppm; M2 = IAA 1 ppm + IBA 1 ppm + BAP 0,2 ppm; M2 = IAA 1 ppm; M2 = IBA 1 ppm + BAP 0,2 ppm; M2 = IAA 1 ppm; M2 = NAA 1 ppm + BAP 0,2 ppm; M2 = 2,4-D 1 ppm; M2 = 2,4-D 1 ppm + BAP 0,2 ppm; M2 = IBA 1 ppm + BAP 0,2 ppm; M2 = IBA 1 ppm + BAP 0,2 ppm + BAP 0,2 ppm.

Kombinasi hormon 2,4D 1ppm dan BAP 0,5 ppm mampu menghasilkan kalus dengan kondisi terbaik dengan waktu pembentukkan kalus 2 minggu, inkubasi gelap. Pada awal pertumbuhan kalus yang tumbuh berwarna kuning cerah dan friabel, dan pada pertumbuhan selanjutnya kalus menjadi kuning kecoklatan dan struktur kalusnya kompak (gambar 5.1). Kombinasi hormon ini yang akan digunakan untuk induksi kalus berikutnya.

Penggunaan hormon 2,4 D untuk induksi kalus merupakan pilihan terbaik untuk menghasilkan kalus (Indrianto, 2003), seperti iduksi kalus pada tanaman tebu (Yamani, 2009) dan pada tanaman teh (Sutini, 2008), walau responnya sangat tergantung pada genotif masing-masing tanaman (George and Sherington, 1992). Menurut Saptowo,dkk (2004) makin tinggi konsentrasi 2,4D, eksplan makin mudah membentuk kalus terutama yang dikombinasikan dengan BA.



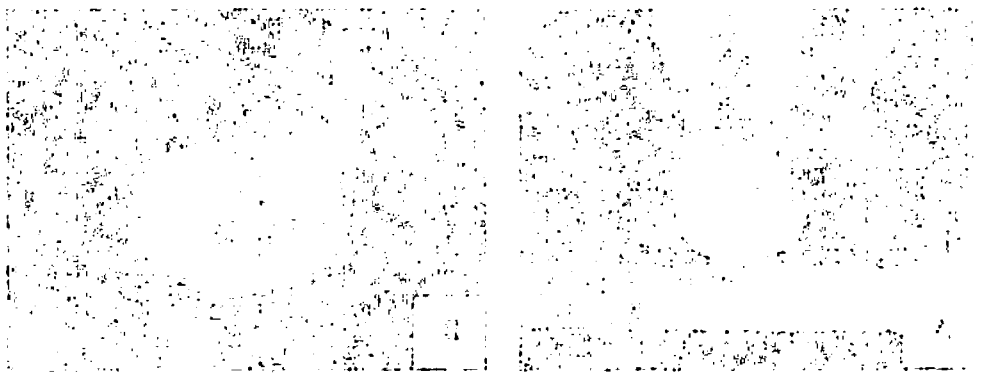
Gambar 5.1 Pertumbuhan kalus *Sonchus arvensis* L. pada media MS dengan perlakuan 2,4D 1 ppm + BAP 0,5 ppm.(A) Awal penanaman; (B) minggu ke-4 setelah dikultur.

5.1.2 Pengaruh sukrosa terhadap pertumbuhan kalus

Sukrosa adalah sumber karbon yang mudah ditransportasi dalam tubuh tumbuhan. Perlakuan sukrosa diberikan dalam berbagai konsentrasi (tabel 5.2). Keberadaan sumber karbon sangat menentukan produksi metabolit sekunder. Pengaruhnya dapat berkorelasi positif maupun negatif terhadap efisiensi produksi metabolit yang diinginkan. Perlakuan sukrosa diberikan dalam bentuk konsentrasi diatas dan di bawah standar (20%-30%).

Kombinasi hormon SAG 1 ppm dan BAF 0,5 ppm sangat mempengaruhi fotosintesis dengan kondisi terakumulasi karbohidrat dalam jaringan. Pada awal pertumbuhan karbohidrat yang terakumulasi dalam jaringan sangat berpengaruh terhadap fotosintesis karbohidrat yang terakumulasi dalam jaringan (gambar 5.1). Kombinasi hormon ini yang akan digunakan untuk induksi kalus selanjutnya.

Penggunaan hormon SAG 0 untuk induksi kalus merupakan pilihan terbaik untuk menginduksi kalus (Indrianto, 2003), seperti induksi kalus pada tanaman lemon (Lemon 2006) dan pada tanaman teh (Setiawan, 2008). Waktu responnya sangat tergantung pada jenis masing-masing tanaman (George and Sheldrake, 1992). Menurut Setiawan dan (2004) media untuk konsentrasi SAG 0 adalah media terbaik untuk kalus tanaman yang dikombinasikan dengan BA.



Gambar 5.1. Perumbuhan kalus *Composita sennawix L* pada media MS dengan konsentrasi SAG 1 ppm + BAF 0,5 ppm. (A) Awal pertumbuhan, (B) minggu ke-4 setelah dikultur.

5.1.3. Pengaruh sukrosa terhadap pertumbuhan kalus

Sukrosa adalah sumber karbon yang mudah ditransporasi dalam jaringan tumbuhan. Perilaku sukrosa berbeda dalam berbagai konsentrasi (tabel 5.2). Perbedaan sumber karbon sangat memengaruhi produksi metabolit sekunder. Pengaruhnya dapat berkorelasi positif maupun negatif terhadap efisiensi perkecambahan yang diinginkan. Perilaku sukrosa diberikan dalam bentuk konsentrasi tabel dan di bawah tabel (20%-30%).

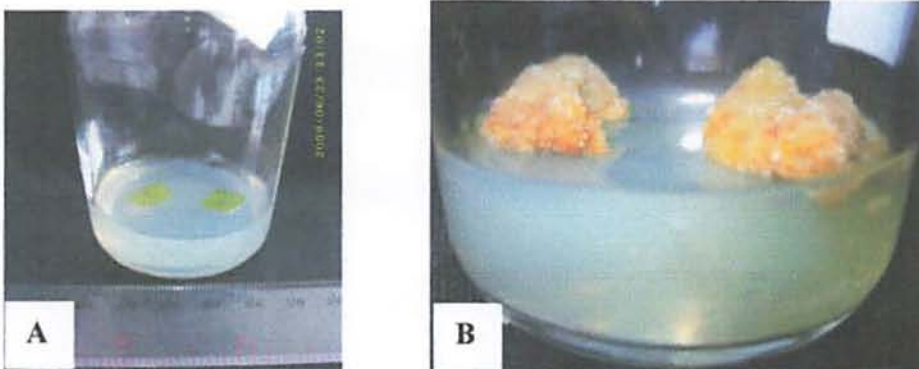
Tabel 5.2 Rerata berat basah dan berat kering kalus dari eksplan helaian daun pada berbagai perlakuan sukrosa + 2,4D 1 ppm + BAP 0,5 ppm pada kondisi gelap

Perlakuan	Helaian daun	
	Berat basah (g)	Berat kering (g)
N1	0,47 ^a	0,03 ^a
N2	0,70 ^{bc}	0,04 ^b
N3	0,86 ^c	0,06 ^c
N4	1,07 ^{cd}	0,07 ^c
N5	0,61 ^{ab}	0,05 ^{bc}

Keterangan: Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata antar perlakuan ($\alpha=5\%$)

Keterangan: N₁ = Sukrosa 1%
 N₂ = Sukrosa 2%
 N₃ = Sukrosa 3%
 N₄ = Sukrosa 4%
 N₅ = Sukrosa 5%

Berdasarkan hasil analisa varian rerata berat basah dan berat kering kalus menunjukkan adanya beda nyata antar perlakuan sukrosa ($\alpha=5\%$, lampiran 1). Pengaruh sukrosa terhadap berat basah dan berat kering kalus meningkat sampai pada konsentrasi 4% setelah itu menurun pada konsentrasi 5%, namun hasil uji lanjut antara perlakuan 3%, 4%, dan 5% tidak menunjukkan hasil yang berbeda nyata sehingga untuk kepentingan induksi kalus untuk produksi senyawa antimalaria digunakan sukrosa 3%.



Gambar 5.2 Pertumbuhan kalus *Sonchus arvensis* L. pada media MS dengan perlakuan 2,4D 1 ppm + BAP 0,5 ppm + sukrosa 30 g. (A) Awal penanaman; (B) minggu ke-4 setelah dikultur.

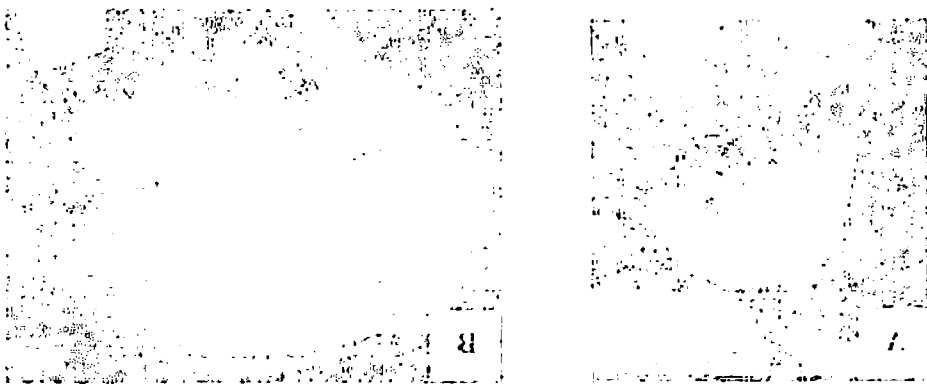
Tabel 2 Rata-rata berat badan, berat kering kalus dan ekspansi selulosa dalam waktu berbeda terhadap perubahan sukrosa = 2,40 ppm + BAP 0,2 ppm pada kondisi gelap

Perlakuan	Helaian daun	
	Berat basah (g)	Berat kering (g)
M1	0,47 ^a	0,03 ^a
M2	0,47 ^a	0,04 ^a
M3	0,49 ^a	0,06 ^a
M4	1,07 ^{ab}	0,07 ^a
M5	0,61 ^b	0,08 ^a

Kemungkinan nilai yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan (p < 0,05)

- M1 = Sukrosa 1%
- M2 = Sukrosa 2%
- M3 = Sukrosa 3%
- M4 = Sukrosa 4%
- M5 = Sukrosa 5%

Berdasarkan hasil analisis varian rata-rata berat badan, berat kering kalus menunjukkan adanya perbedaan nyata antar perlakuan sukrosa (p < 0,05). Perlakuan sukrosa terhadap berat badan dan berat kering kalus meningkat sampai pada konsentrasi 4% setelah itu menurun pada konsentrasi 5%, namun hasil uji lanjut antara perlakuan 3%, 4%, dan 5% tidak menunjukkan hasil yang berbeda nyata sehingga untuk kepentingan induksi kalus untuk produksi senyawa antimikroba digunakan sukrosa 3%.



Gambar 2 Pertumbuhan kalus *Sonchus oleraceus* L. pada media MS dengan perlakuan 2,40 ppm + BAP 0,2 ppm + sukrosa 30 g (A) Awal perambatan (B) minggu ke-4 setelah dikultur

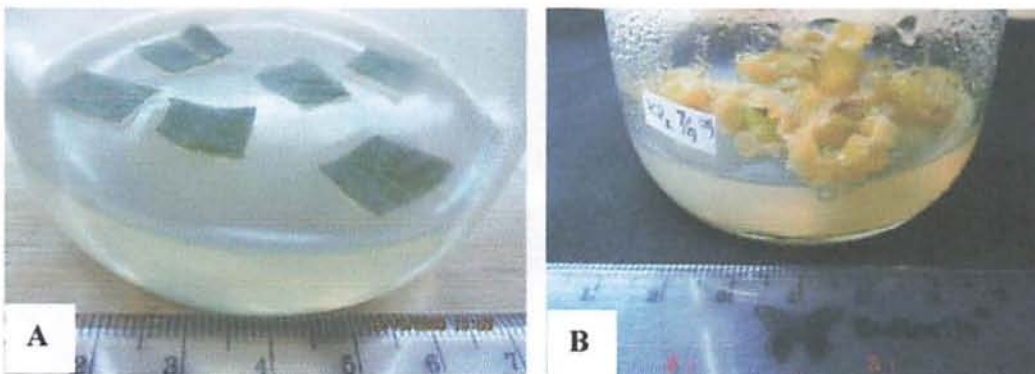
5.1.3 Pengaruh berbagai elisitor terhadap pertumbuhan kalus

Elisitor digunakan untuk memacu produksi senyawa antimalaria, bukan untuk memacu pertumbuhan. Pengaruh elisitor terhadap berat basah dan berat kering kalus tidak ada beda nyata setelah dilakukan analisa antar varian ($\alpha=5\%$, lampiran 2).

Tabel 5.3 Rerata berat basah dan berat kering kalus yang dikultur pada media MS + 2,4D 1 ppm + BAP 0,5 ppm + sukrosa 3% pada kondisi gelap dengan perlakuan berbagai elisitor.

Perlakuan	Berat basah (g)	Berat kering (g)
G1	8,5	0,28
G2	8,19	0,29
NN1	7,67	0,32
NN2	7,69	0,34
KN1	9,37	0,33
KN2	8,22	0,34
KP1	7,15	0,3
KP2	6,63	0,26
K	7,65	0,30

Keterangan : G₁ = Glutamin 0,25 g; G₂ = Glutamin 0,5 g; NN₁ = Amonium Nitrat 0,5 g; NN₂ = Amonium Nitrat 1g; KN₁ = Kalium Nitrat 0,5 g; KN₂ = Kalium Nitrat 1 g; KP₁ = Kalium Posphat 0,1 g; KP₂ = Kalium Posphat 0,2 g; K = Kontrol



Gambar 5.3 Pertumbuhan kalus *Sonchus arvensis* L. pada media MS dengan perlakuan 2,4D 1 ppm + BAP 0,5 ppm + sukrosa 50 g + elisitor KNO₃ 0,5 g. (A) Awal penanaman; (B) minggu ke-4 setelah dikultur.

5.2 Ekstraksi Kalus *Sonchus arvensis* L.

Kalus usia 4 bulan dipanen selanjutnya ditimbang berat basah dan berat keringnya. setelah kalus kering, dihaluskan dengan mortar dan selanjutnya diekstraksi dengan menggunakan pelarut methanol. Hasil ekstraksi tersaji pada tabel 5.4.

Tabel 5.4. Hasil ekstraksi kalus *Sonchus arvensis* L.

Sampel	Berat basah	Berat kering	Berat serbuk	Berat ekstrak
K	43,24	3,2	3,2	0,63
KN1	18,73	1,0	0,9	0,11
KN2	31,39	2,3	2,2	0,29
NN1	44,42	3,3	3,1	0,53
NN2	57,26	4,6	4,2	0,57
KP1	30,42	2,4	2,2	0,40
KP2	24,77	1,8	1,7	0,27
G1	49,61	3,4	3,2	0,43
G2	41,91	3,0	2,8	0,48

5.2. Ekstraksi Kalus *Sonchus oleraceus* L.

Kalus usia 4 bulan diberikan selanjutnya dibandingkan berat basah dan berat keringnya. setelah kalus kering, dituliskan dengan nomor dan selanjutnya diekstraksi dengan menggunakan pelarut metanol. Hasil ekstraksi terdapat pada tabel 5.4.

Tabel 5.4. Hasil ekstraksi kalus *Sonchus oleraceus* L.

Sampel	Berat basah	Berat kering	Berat serbuk	Berat ekstrak
K1	43,24	3,2	3,2	0,93
K2	18,73	1,0	0,9	0,11
K3	31,30	2,3	2,2	0,29
K4	44,42	3,3	3,1	0,23
K5	27,20	4,0	4,2	0,27
K6	30,42	2,4	2,2	0,40
K7	24,77	1,8	1,7	0,27
K8	40,01	3,4	3,2	0,43
K9	41,91	3,0	2,8	0,48

5.3. Hasil Identifikasi Secara Kromatografi Lapis Tipis

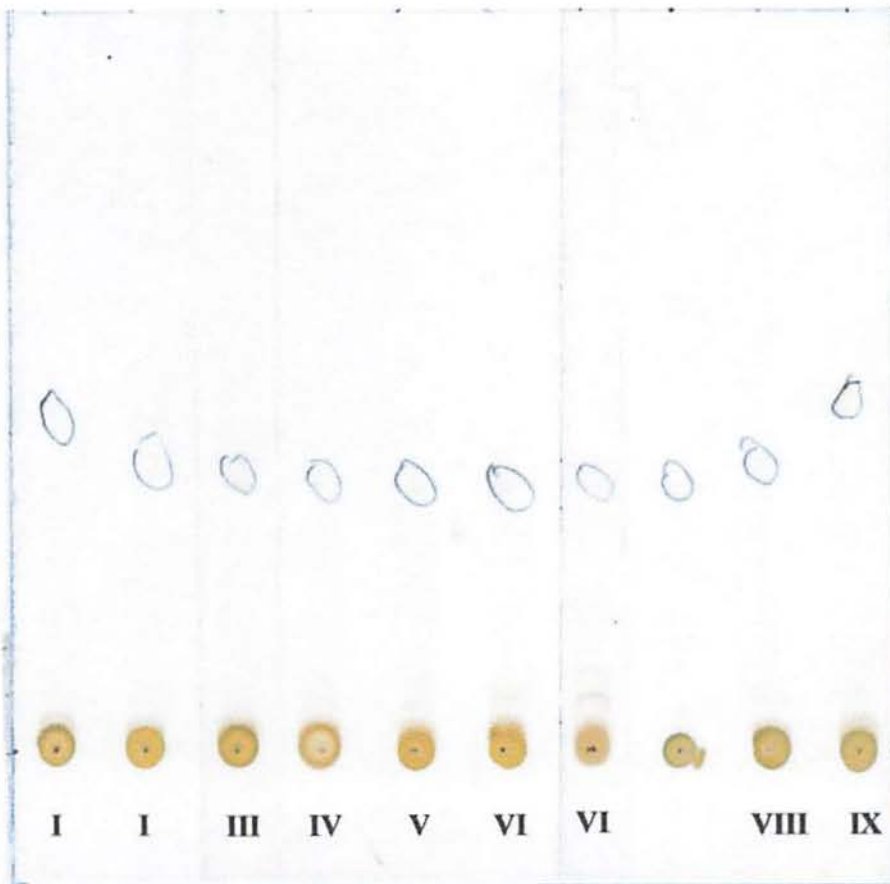
Hasil ekstraksi dari kalus *Sonchus arvensis* L. diamati dengan Kromatografi Lapis

Tipis menggunakan:

Fasa diam : Silika gel GF 254

Fasa gerak : CHCl_3 : metanol = (95 : 5)

Penampak noda : Uap amoniak



Gambar 5.4 Kromatogram hasil KLT menggunakan fase gerak kloroform:metanol (95%:5%) dengan penampak noda uap amoniak

Keterangan gambar:

- I : Ekstrak dari kalus perlakuan KP2
- II : Ekstrak dari kalus perlakuan KP1
- III : Ekstrak dari kalus perlakuan NN2
- IV : Ekstrak dari kalus perlakuan KN2
- V : Ekstrak dari kalus perlakuan NN1
- VI : Ekstrak dari kalus perlakuan G1
- VII : Ekstrak dari kalus perlakuan KN1
- VIII : Ekstrak dari kalus perlakuan K
- IX : Ekstrak dari kalus perlakuan G2

3.3. Hasil Identifikasi Senyawa Kromatografi Lapis Tipis

Hasil ekstraksi dan kalus senyawa senyawa Lapis Tipis dengan Kromatografi Lapis

tipis menggunakan:

- fase diam : Silika gel GF 254
- fase gerak : CHCl_3 metanol = (90 : 10)
- penyempit nada : Uap amoniak

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21

Gambar 3.4 Kromatogram hasil KLT menggunakan fase gerak kloroform:metanol (90:10) dengan penyempit nada uap amoniak

Keterangan gambar:

- I : Ekstrak dan kalus behkuan KPS
- II : Ekstrak dan kalus behkuan KPT
- III : Ekstrak dan kalus behkuan NNS
- IV : Ekstrak dan kalus behkuan KNS
- V : Ekstrak dan kalus behkuan NNI
- VI : Ekstrak dan kalus behkuan GI
- VII : Ekstrak dan kalus behkuan KI
- VIII : Ekstrak dan kalus behkuan K
- IX : Ekstrak dan kalus behkuan QS

Harga Rf hasil kromatografi lapis tipis dari ekstrak methanol kalus *Sonchus arvensis* L. adalah Rf:0,49. Hasil identifikasi dengan KLT tersebut adalah flavonoid.

5.4. Uji Antimalaria

Hasil pengamatan aktifitas penghambatan pertumbuhan parasit *P. falciparum* dari ekstrak kalus *Sonchus arvensis* L. disajikan dalam tabel 5.5 dan tabel 5.6.

Tabel 5.5 Persentase parasitemia, pertumbuhan dan hambatan *P. falciparum* 3D7 oleh Ekstrak *Sonchus arvensis* L.

Bahan	Dosis ($\mu\text{g/ml}$)	Replikasi	% parasitemia	% pertumbuhan parasit	% penghambatan	Rata-rata % penghambatan
G2	Do	1	0,62	-	-	-
		2	0,62	-	-	-
	K	1	2,59	1,97	0	0
		2	2,68	2,06	0	
	100	1	0,48	-	100	100
		2	0,40	-	100	
	10	1	0,89	0,27	86,29	85,38022
		2	0,94	0,32	84,47	
	1	1	2,52	1,90	3,55	4,203834
		2	2,58	1,96	4,85	
	0,1	1	3,03	2,41	0	0
		2	2,72	2,10	0	
0,01	1	3	2,38	0	0	
	2	2,86	2,24	0		
NN1	Do	1	0,62	-	-	-
		2	0,62	-	-	-
	K	1	2,26	1,64	0	0
		2	2,12	1,5	0	
	100	1	-	-	100	100
		2	-	-	100	
	10	1	0,19	-	100	100
		2	0,18	-	100	
	1	1	1,85	1,23	25	20,83
		2	1,87	1,25	16,67	
	0,1	1	2,48	1,86	0	0
		2	2,37	1,75	0	
0,01	1	2,99	2,37	0	0	
	2	2,90	2,28	0		
NN2	Do	1	0,62	-	-	-
		2	0,62	-	-	-
	K	1	2,71	2,09	0	0
		2	2,82	2,2	0	
	100	1	0	0	100	100
		2	0	0	100	
	10	1	0,5	0	100	100
		2	0,4	0	100	
	1	1	1,77	1,15	44,98	46,8
		2	1,75	1,13	48,64	
	0,1	1	2,93	2,31	0	0
		2	2,81	2,19	0,45	
0,01	1	3,29	2,67	0	0	
	2	3,29	2,67	0		

Hasil pengamatan aktivitas pertumbuhan perbandingan hasil P. falcataria dan ekstrak kalus *Sonchus oleraceus* L. adalah 0,49. Hasil identifikasi dengan KLT tersebut adalah sebagai berikut.

2.4. Uji Antimalaria

Hasil pengamatan aktivitas pertumbuhan perbandingan hasil P. falcataria dan ekstrak kalus *Sonchus oleraceus* L. disajikan dalam tabel 2.5 dan tabel 2.6.

Tabel 2.5. Perentase parasitemia, pertumbuhan dan hambatan P. falcataria 3D7 oleh Ekstrak *Sonchus oleraceus* L.

Baran	Time (jam)	Replikasi	% parasitemia	% pertumbuhan	% hambatan	Rata-rata % pertumbuhan
G3	Do	1	0,82	-	-	-
		2	0,82	-	-	-
	K	1	2,39	1,97	0	0
		2	2,39	2,06	0	0
	100	1	0,48	-	100	100
		2	0,40	-	100	100
10	1	1	0,89	0,24	69,39	68,3882
		2	0,04	0,24	84,17	1,30384
	1	1	2,52	1,90	3,88	0
		2	2,98	1,88	4,88	0
	0,1	1	2,03	2,41	0	0
		2	2,12	2,10	0	0
0,01	1	1	2,39	2,39	0	0
		2	2,52	2,24	0	0
	Do	1	0,82	-	-	-
		2	0,02	-	-	-
	K	1	2,28	1,84	0	0
		2	2,11	1,8	0	0
100	1	1	-	-	100	100
		2	-	-	100	100
	10	1	0,19	-	100	100
		2	0,18	-	100	100
	1	1	1,98	1,22	28,83	0
		2	1,87	1,28	16,87	0
0,1	1	1	2,49	1,88	0	0
		2	2,24	1,28	0	0
	0,01	1	1,89	1,87	0	0
		2	2,20	2,20	0	0
	Do	1	0,82	-	-	-
		2	0,82	-	-	-
K	1	1	2,21	2,09	0	0
		2	2,82	2,2	0	0
	100	1	0	0	100	100
		2	0	0	100	100
	10	1	0,8	0	100	100
		2	0,4	0	100	100
1	1	1	1,21	1,18	44,88	48,8
		2	1,18	1,13	48,84	0
	0,1	1	2,03	2,31	0	0
		2	2,81	2,18	0,42	0
	0,01	1	2,29	2,67	0	0
		2	2,29	2,67	0	0

Sampai saat ini belum semua sampel diujikan, baru tiga perlakuan elisitor yang diujikan yaitu perlakuan Glutamin 500g, NH_4NO_3 0,5g, NH_4NO_3 1g. Dari hasil uji rerata daya hambat ekstrak kalus yang diujikan diperoleh nilai IC_{50} pada Tabel 5.6.

Tabel 5.6 Nilai IC_{50} dari ekstrak kalus *Sonchus arvensis* L.

Bahan uji	Rata-rata % penghambatan					IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
	100($\mu\text{g/ml}$)	10($\mu\text{g/ml}$)	1($\mu\text{g/ml}$)	0,1 ($\mu\text{g/ml}$)	0,01 ($\mu\text{g/ml}$)	
G2	100	85	4,2	0	0	1-10
NN1	100	100	20,8	0	0	1-10
NN2	100	100	46,8	0	0	1-10

Keterangan: G2=Glutamin 500g, NN1= NH_4NO_3 0,5g, NN2= NH_4NO_3 1g

Dari tabel 5.6 dapat dilihat bahwa nilai IC_{50} berkisar antara 1-10 ($\mu\text{g/ml}$). Weenen (1990) menyebutkan bahwa untuk ekstrak yang mempunyai harga IC_{50} sampai dengan 10 ($\mu\text{g/ml}$) termasuk dalam golongan bahan yang mempunyai aktifitas tinggi/poten sebagai antimalaria.

Rerata persentase penghambatan antar perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan elisitor NH_4NO_3 1g lebih besar dibanding perlakuan Glutamin 500g dan NH_4NO_3 0,5g. Baik glutamin maupun NH_4NO_3 ditambahkan sebagai tambahan sumber nitrogen pada medium, dengan maksud dapat meningkatkan produksi alkaloid, sebagaimana banyak penelitian menyatakan bahwa alkaloid adalah golongan senyawa yang paling potensial sebagai antimalaria (Ekasari, 2001).

2
 Sampel saat ini belum semua sampel diujikan, karena tidak bisa melakukan uji kultur yang
 diujikan yaitu bakteri Glutamin 500g, NH₄NO₃ 0,2g, NH₄NO₂ 1g. Dan hasil uji relatif daya
 sampel ekstrak kalus yang diujikan diperoleh nilai IC₅₀ pada Tabel 5.6.
 Tabel 5.6 Nilai IC₅₀ dari ekstrak kalus *Zonitrus aureus* L.

Bahan uji	Relatif-rata % penghapusan				IC ₅₀ (µg/ml)
	100 (µg/ml)	10 (µg/ml)	0,1 (µg/ml)	0,01 (µg/ml)	
GS	100	88	4,2	0	1-10
NI1	100	100	26,8	0	1-10
NI2	100	100	46,8	0	1-10

Keterangan: GS=Glutamin 500g, NI1=NH₄NO₃ 0,2g, NI2=NH₄NO₂ 1g

Dari tabel 5.6 dapat dilihat bahwa nilai IC₅₀ berkisar antara 1-10 (µg/ml). Weenen (1990)
 menyebutkan bahwa untuk ekstrak yang mempunyai harga IC₅₀ sampel dengan 10 (µg/ml)
 termasuk dalam golongan bahan yang mempunyai aktifitas tinggi/kuat sebagai antimikroba.
 Relatif persentase penghapusan antar bakteri menunjukkan bahwa bakteri
 indikator NH₄NO₂ lebih besar dibanding bakteri Glutamin 500g dan NH₄NO₃ 0,2g. Baik
 glutamin maupun NH₄NO₂ ditampakan sebagai tumbuhan sumber nitrogen pada medium,
 dengan maksud dapat meningkatkan produksi alkaloid, sebagaimana banyak penelitian
 menyatakan bahwa alkaloid adalah golongan senyawa yang paling potensial sebagai
 antimikroba (Ekasari, 2001).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Dari hasil dan pembahasan yang dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Kombinasi hormon terbaik untuk induksi kalus *Sonchus arvensis* L. adalah kombinasi 1ppm 2,4D dan 0,5ppm BAP.
2. Perlakuan sukrosa memberikan pengaruh yang berbeda untuk setiap perlakuan, perlakuan sukrosa 4% memberikan pengaruh paling baik terhadap berat basah dan berat kering kalus
3. Perlakuan elisitor tidak memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata untuk setiap perlakuan terhadap berat basah dan berat kering kalus.
4. Golongan senyawa yang terdapat pada kalus *Sonchus arvensis* adalah flavonoid
5. Ekstrak kalus dengan perlakuan glutamine 500g, NH_4NO_3 0,5 g, dan NH_4NO_3 1 g mempunyai aktifitas antimalaria dengan nilai $\text{IC}_{50}=1-10\mu\text{g/l}$.

1.1. Saran

Uji aktifitas antimalaria ekstrak kalus *Sonchus arvensis* L. menunjukkan bahwa kalus *Sonchus arvensis* L. berpotensi dikembangkan sebagai sumber senyawa antimalaria. Untuk mengeksplorasi kandungan bahan aktif kalus *Sonchus arvensis* L. yang mempunyai aktifitas antimalaria perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang uji aktifitas antimalaria fraksi dari kalus *Sonchus arvensis* L.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

2.1. Kesimpulan

- 1. Dan hasil dan pembahasan yang dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:
- 1. Kombinasi hormon steroid untuk induksi kalus *Zonchus siveas* L. dalam kombinasi 100 mg SFD dan 0,5 ppm BAP.
- 2. Perilaku sukrosa memberikan pengaruh yang berbeda untuk setiap bahan.
- 3. Perilaku sukrosa 4% memberikan pengaruh paling baik terhadap peral pasak dan peral keung kalus
- 4. Perilaku ester 10% memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata untuk setiap bahan terhadap peral pasak dan peral keung kalus.
- 5. Gorden senyawa yang terdapat pada kalus *Zonchus siveas* adalah flavonoid
- 6. Ekstrak kalus dengan behkuan glutamine 500g NH₄NO₃ 0,5 g dan NH₄NO₃ 1 g mempunyai aktifitas antimalaria dengan nilai IC₅₀=1-10µg/l.

1.1. Saran

Uji aktifitas antimalaria ekstrak kalus *Zonchus siveas* L. menunjukkan bahwa kalus *Zonchus siveas* L. berpotensi dikembangkan sebagai sumber senyawa antimalaria. Untuk mengoptimasi kandungan bahan aktif kalus *Zonchus siveas* L. yang mempunyai aktifitas antimalaria perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang uji aktifitas antimalaria terkait dan kalus *Zonchus siveas* L.



DAFTAR PUSTAKA

- Abdulelah, H.A.A. and Zaenal, ABAH.2007. In-Vivo antimalarial test of *Nigella sativa* (Black Seed) different extracts. **American Journal of Farmacology and Toxicology**. 2(2): 46-50
- Alikaridis, F., Papadakis,D., Pantelia, K., and Kephalas ,T.. 2000. Flavonolignan production from *Silybum marianum* transformed and untransformed root cultures. **Fitoterapia**. 71: 379-384.
- Ayabe, S., K. Iida, and T. Furuya. 1986. Induction of stress metabolites in immobilized *Glycyrrhiza echinata* cultured cells. **Plant Cell Rep**. 3: 186-189.
- Backer, C.A. and Van Der Brink, B.. 1965. **Flora of Java**. Vol II. Noodhoff NVP. Groningen. The Netherlands.
- Ekasari, W. 2001. **Daya hambat senyawa alkaloid daun *Cassia siamea* pada biakan in-vitro *Plasmodium falciparum***. Thesis. Program Pasca Sarjana. Universitas Airlangga.
- Fukuda, H., Ito, M., Sugiyama, M. & Komamine, A. 1994. Mechanism of the Proliferation and Differentiation of Plant Cell Culture Systems. **Int. J. Dev. Biol**. 38: 287-299
- George, E.F. and Sherimthor, P.D.1984. **Plant propagation by tissue culture**. England. Exegetis Limited.
- Goleniowski, M. and V.S. Trippi. 1999. Effect of growth medium composition on pilostachyinolides and altamisine production. **Plant Cell Tiss. Org. Cult**. 56: 215-. 218.
- Hardyatmo. 1998. **Pengaruh Ekstrak air dan ekstrak alcohol daun tempuyung terhadap volume urine tifus in-vivo dan pelarutan batu ginjal in-vitro**. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Gadjah Mada.
- Indrianto, A. 2003. **Kultur Jaringan Tumbuhan**. Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada
- Lambros, C. and Vanderberg, J.B. 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage in culture. **The Journal Paracitology**. 3: 418-421.
- Liestyaningsih, A. 1991. **Praperlakuan flavonoid fraksi etil asetat daun tempuyung untuk menghambat Hepatotoksisitas karbon tetraklorida (CCl₄) pada mencit jantan**. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Gadjah Mada.
- Malpathak, N.P. and David, S.B.. 1986. Flavor formation in tissue cultures of garlic (*Allium sativum* L.). **Plant Cell Rep**. 5: 446-447

DAFTAR PUSTAKA

Abdelnour, H.A. and Zanol, A.B.A.H. 2007. In-vivo antimalarial test of *Widia salina* (Erick) (seed) ekstrak. *American Journal of Pharmacology and Toxicology* 2(2): 46-50

Alkhalidi, F., Papadakis, D., Pantielis, K. and Kefalas, T. 2000. Flavonoid production from *Stygium mianum* transformed and untransformed root cultures. *Fitochemis* 71: 379-384

Ayabe, S., K. Iida, and T. Furuya. 1999. Induction of stress metabolites in immobilized *Glycyrrhiza echinata* cultured cells. *Plant Cell Rep* 3: 186-189

Baker, C.A. and Van Der Bilt, A. 1985. *Flora of Java*. Vol II. Noordhoff N.V. Groningen, The Netherlands

Classah, W. 2001. *Daya hambat senyawa alkaloid daun Cassia siamea pada diaskan in-vitro Plasmodium falciparum*. Thesis Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga

Costa, H. Jr., M. Sudjaima, M. & Komar, A. 1994. Mechanism of the proliferation and differentiation of Plant Cell Culture System. *Int. J. Dev. Biol* 38: 287-299

George, E.F. and Shethnath, P.D. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. England: Excerpta Limited

Golenowski, M. and V.S. Thipp. 1999. Effect of growth medium composition on parastachyoides and stamine production. *Plant Cell Tiss. Org. Cult* 58: 215-219

Hidayatno. 1998. *Pengaruh Ekstrak air dan ekstrak alcohol daun tempuyung terhadap volume urine (in-vivo dan betatan batu ginjal in-vitro)*. Skripsi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

Indahati, A. 2003. *Kultur Jaringan Tumbuhan*. Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada

Lambert, G. and Vandenberg, J.B. 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage in culture. *The Journal Parasitology* 3: 418-421

Lesjanyingsih, A. 1991. *Preparasi dan ekstrak flavonoid ekstrak etil asetat daun tempuyung untuk menghambat Hepatokelitis karbon tetraclorida (CCl4) pada mencit jantan*. Skripsi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

Maitland, R. P. and David, S.B. 1988. Flavan formation in tissue cultures of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep* 7: 448-449

- Mozar, R. 2004. **Morfogenesis Planlet Pada Kalus Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.)** Thesis. Departemen Biologi. ITB. Bandung.
- Murch, S.J., Ray, K. and Saksena, P.K. 2000. Tryptophan is precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in-vitro generated St. John'swort. **Plant Cell Rep.** 19:698-704.
- Nazif, N.M., M.R. Rady, and M.M. Seif E1-Nasr. 2000. Stimulation of anthraquinone production in suspension cultures of *Cassia acutifolia* by salt stress. **Fitoterapia.** 71: 34-40.
- Orihara, Y., J.W. Yang, N. Komiya, K. Koge, and T. Yoshikawa. 2002. Abietane diterpenoid from suspension cultured cells of *Torreya nucifera* var. *radicans*. **Phytochemistry.** 59: 385-389.
- Radji, M. 2005. Peranan bioteknologi dan mikroba endofit dalam pengembangan obat herbal. **Majalah Ilmu Kefarmasian.** Vol. II: 3.113 – 126.
- Ratsimamanga-Usreg, S. et al., 1991. Antimalarial activity and cytotoxicity of *Ficus pyrifolia* and *Rhus taratana* leaf extracts. **Phytoter. Res.** 5 (1): 32-34
- Yamani, R.A. 2009. **Optimasi induksi pembentuk kalus pada enam varietas tebu (*Saccharum officinarum*) dalam berbagai formulasi vitamin pada media MS.** Skripsi. Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Airlangga.
- Saptoowo, J.P., Mariska, I., Lestari, EG., dan Slamet. 2004. Regenerasi tanaman dan transformasi genetik salak pondoh untuk rekayasa buah partenokarpi. **Jurnal Bioteknologi Pertanian.** Vol 9: 2, pp. 49-55
- Shyamkumar, B., Anjaneyulu ,C. and Giri , C. C. 2007. Genetic transformation of *Terminalia chebula* Retz. and detection of tannin in transformed tissue. **Current Science.** Vol. 92. No. 3.
- Sutini, B., W.Tatik, W. Wahyu, dan Sumitro, S.B. 2008. Meningkatkan produksi flavan-3-ol melalui kalus *Camellia sinensis* dengan Elisitor Cu^{2+} . **Berk. Penel. Hayati:** 14(39-44).
- Taniguchi, S., Y. Imayoshi, E. Kobayashi, Y. Takamatsu, H. Ito, T. Hatano, H. Sakagami, H. Tokuda, H. Nishino, D. Sugita, S. Shimura, and T. Yoshida. 2002. Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. **Phytochemistry.** 59: 315-323.
- Tjitrosoepomo, G. 2005. **Taksonomi Tumbuhan Spermatophyta.** Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Trager, W. and Jensen, J.B., 1976. Human malarial parasites in continous culture. **Science.** 193: 673-676.

Wozar, R. 2004. *Morfogenesis Plantel Pada Kalus Tempung (Sonchus oleraceus L.)*. Thesis Departemen Biologi, UIR Bandung.

Wu, S.J., Ray, K. and Sakens P.K. 2000. Tyrotophan is precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in-vitro-generated St. John's wort Plant Cell Rep. 19:698-704.

Yadav, M.M., M.R. Prady and M.M. Sati. 2000. Stimulation of antracynone production in suspension culture of *Cassia acutifolia* by salt stress. *Fitoestesia*. 71: 34-40.

Yeh, Y. J.W. and N. Komiyas, K. Kogel, and T. Yasnikawa. 2002. Adipic acid diesteroid from suspension cultured cells of *Fomaya nucleata* var. *radicans*. *Phytochemistry*. 59: 385-389.

Yusuf, M. 2006. *Peranan bioteknologi dan mikrobiologi dalam pengembangan obat herbal*. *Manajemen dan Kefarmasian*. Vol. 1: 8-13-14.

Zakaria, A. 1991. *Antimutagenic activity and cytotoxicity of Ficus pyrifolia and Ficus tertiae leaf extracts*. *Phyoter. Res.* 5 (1): 32-34.

Zaman, R.A. 2009. *Optimalisasi industri pembuatkan kalus pada erant varietas tebu (Saccharum officinarum) dalam berbagai formulasi vitamin pada media MS*. Skripsi Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.

Zubrow, J.P., Mariska, I., Lestari, E.C. dan Haimet. 2004. *Regenerasi tanaman dan transformasi genetik salak pondok untuk rekayasa buah panenskripsi Jurnal Bioteknologi Pertanian*. Vol 9, 2, pp. 45-55.

Zuhriyanti, B., Anjanayulu, G. and Gini, G. G. 2007. *Genetic transformation of Terminalia chebula Fritz and detection of tannin in transformed tissue*. *Current Science*. Vol. 92, No. 8.

Zuhriyanti, B., W. Wati, dan Sumarto, S.B. 2008. *Meningkatkan produksi flavan-3-ol melalui kemas Camellia sinensis dengan Enjinor Cof. Berk. Panel. Hayati*. 14(39-44).

Zuhriyanti, S., Y. Imvostri, E. Kobayashi, Y. Takamatsu, H. Ito, T. Hatano, H. Sakagami, H. Tokuda, H. Aihara, D. Sugita, S. Shirata, and T. Yoshida. 2002. *Production of bioactive flavanones by Eudobrya japonica cells*. *Phytochemistry*. 59: 315-323.

Zuhriyanti, G. 2008. *Teknologi Tumbuhan Spermatophyta*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

Zuber, W. and Jensen, J.S. 1976. *Human malaria parasites in continuous culture*. *Science*. 193: 673-676.

- Vanisree, M., Lee, C., Lo, S., Nalawade, S. M., Lin, C.Y. and Tsay, H. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Bot. Bull. Ac. Sin.** 45:1-22
- Weenen, H. 1990. Antimalarial activity of Tanzanian medicinal plants. **J. Planta Medica.** 56: 386-370.
- World Health Organization, 1985. **Special program for research and training in tropical disease research.** TDR seventh program report. Malaria (2) WHO spec. program for trop. disease. pp2-13.
- Wu, J., C. Wang, and X. Mei. 2001. Stimulation of taxol production and excretion in *Taxus* spp cell cultures by rare earth chemical lanthanum. **J. Biotechnol.** 85: 67-73.
- Yunita, R. dan Lestari E.G., 2008. Perbanyakkan tanaman *Artemisia annua* secara in-vitro. **Jumal Agrobiogen.** Vol.4: 1.
- Zhao, J., W. Zhu, and Q. Hu. 2001. Enhanced catharanthine production in *Catharanthus roseus* cell cultures by combined elicitor treatment in shake flasks and bioreactors. **Enzyme. Microb. Technol.** 28: 673-681.

- Wang, M., Lee, C., Lo, S., Nakawade, S., M., Liu, C.Y. and Tsay, H. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Ac. Sin.* 45:1-33
- Wagner, H. 1990. Antimalarial activity of Tanzanian medicinal plants. *J. Planta Medica*. 56: 366-370.
- World Health Organization, 1985. Special program for research and training in tropical disease research. TDR seventh program report. *Malawi* (2). WHO special program for tropical disease pp:1-13.
- Wu, J., C. Wang and X. Mei. 2001. Stimulation of taxol production and excretion in *Taxus sp.* cell cultures by rare earth chemical treatment. *J. Biotechnol.* 88: 67-73.
- Yunus, R. dan Lestari, E.G., 2008. Perbanyakkan tanaman *Azadirachta indica* secara in-vitro. *Jurnal Agribisnis*. Vol.4: 1.
- Zhang, J., W. Zhu, and Q. Hu. 2001. Enhanced callus and lignin production in *Campylotaxis roseus* cell cultures by combined elicitor treatment in shake flasks and bioreactors. *Enzyme. Microb. Technol.* 28: 673-681.

LAMPIRAN-LAMPIRAN
LAMPIRAN 1: Hasil Uji Statistik
HASIL ANALISA STATISTIK

1. Pengaruh Sukrosa terhadap berat basah dan berat kering kalus

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Perlakuan	25	3.0000	1.44338	1.00	5.00
Berat Kering	25	.0504	.01881	.01	.08
Berat Basah	25	.7428	.24862	.42	1.26

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Perlakuan	Berat Kering	Berat Basah
N		25	25	25
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	3.0000	.0504	.7428
	Std. Deviation	1.44338	.01881	.24862
Most Extreme Differences	Absolute	.156	.148	.175
	Positive	.156	.148	.175
	Negative	-.156	-.132	-.099
Kolmogorov-Smirnov Z		.779	.742	.876
Asymp. Sig. (2-tailed)		.579	.640	.427

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Berat Basah	4.288	4	20	.011
Berat Kering	2.248	4	20	.100

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Berat Basah	Between Groups	1.066	4	.266	12.759	.000
	Within Groups	.418	20	.021		
	Total	1.484	24			
Berat Kering	Between Groups	.005	4	.001	7.643	.001
	Within Groups	.003	20	.000		
	Total	.008	24			

	total	002	34			
Bezet Kenud	Minim Group	001	30	000		
	Between Group	002	4	001	1000	001
	total	1004	34			
Bezet Besar	Minim Group	018	30	001		
	Between Group	1002	4	000	1000	000
	total	2006	38	001		000

ANOVA

Bezet Kenud	1000	4	30	100
Bezet Besar	1000	4	30	011
	total	2000	38	200

Test of Homogeneity of Variances

ONEWAY

p. Descriptive Statistics

a. Test distributed in normal

Value of Sig. (2-tailed)		000	000	000
Kolmogorov-Smirnov Z		000	000	000
	Normal	-000	-000	-000
Differences	Positive	000	000	000
Kolmogorov-Smirnov	Asymptotic	000	000	000
	Sig. Distribution	00000	00001	00000
Normal Parameters	Mean	30000	00000	10000
N		30	30	30
		Bezet Besar	Bezet Kenud	Bezet Besar

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

Bezet Besar	30	0000	00000	00	100
Bezet Kenud	30	0000	00001	01	00
Bezet Besar	30	00000	00000	000	000
	N	Mean	Sig. Distribution	Minimum	Maximum

Descriptive Statistics

1. Bagaimana distribusi terdapat pada besar dan besar kenud kaitan

ANALISIS STATISTIK

ANALISIS : Hasil Uji Statistik

ANALISIS-GAMBARAN

Robust Tests of Equality of Means

		Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Berat Basah	Brown-Forsythe	12.759	4	7.345	.002
Berat Kering	Brown-Forsythe	7.643	4	10.492	.004

a. Asymptotically F distributed.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
Berat Basah	LSD	N1	N2	-.22400*	.09140	.024	-.4147	-.0333
			N3	-.38800*	.09140	.000	-.5787	-.1973
			N4	-.59600*	.09140	.000	-.7867	-.4053
			N5	-.13600	.09140	.152	-.3267	.0547
			N2	.22400*	.09140	.024	.0333	.4147
		N2	N3	-.16400	.09140	.088	-.3547	.0267
			N4	-.37200*	.09140	.001	-.5627	-.1813
			N5	.08800	.09140	.347	-.1027	.2787
			N3	.38800*	.09140	.000	.1973	.5787
			N2	.16400	.09140	.088	-.0267	.3547
		N3	N4	-.20800*	.09140	.034	-.3987	-.0173
			N5	.25200*	.09140	.012	.0613	.4427
			N4	.59600*	.09140	.000	.4053	.7867
			N1	-.59600*	.09140	.001	-.1813	.5627
			N2	.20800*	.09140	.034	.0173	.3987
		N4	N5	.46000*	.09140	.000	.2693	.6507
			N1	.13600	.09140	.152	-.0547	.3267
			N2	-.08800	.09140	.347	-.2787	.1027
			N3	-.25200*	.09140	.012	-.4427	-.0613
			N5	-.46000*	.09140	.000	-.6507	-.2693
Berat Kering	LSD	N1	N2	-.01800*	.00820	.040	-.0351	-.0009
			N3	-.03600*	.00820	.000	-.0531	-.0189
			N4	-.04000*	.00820	.000	-.0571	-.0229
			N5	-.02800*	.00820	.003	-.0451	-.0109
			N2	.01800*	.00820	.040	.0009	.0351
		N2	N3	-.01800*	.00820	.040	-.0351	-.0009
			N4	-.02200*	.00820	.014	-.0391	-.0049
			N5	-.01000	.00820	.237	-.0271	.0071
			N3	.03600*	.00820	.000	.0189	.0531
			N2	.01800*	.00820	.040	.0009	.0351
		N3	N4	-.00400	.00820	.631	-.0211	.0131
			N5	.00800	.00820	.341	-.0091	.0251
			N4	.04000*	.00820	.000	.0229	.0571
			N2	.02200*	.00820	.014	.0049	.0391
			N3	.00400	.00820	.631	-.0131	.0211
		N4	N5	.01200	.00820	.159	-.0051	.0291
			N1	.02800*	.00820	.003	.0109	.0451
			N2	.01000	.00820	.237	-.0071	.0271
			N3	-.00800	.00820	.341	-.0251	.0091
			N5	-.01200	.00820	.159	-.0291	.0051

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Robust Tests of Equality of Means

Statistic	df1	df2	Stat
Postel Keating Brown-Forsythe	4	10.492	0.01
Boal Beach Brown-Forsythe	4	7.342	0.02

Asymptotically F distributed.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable	Comparison	t-Statistic	df	p-Value	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
Semi Beach	NS	15	10	.0000	1.0000	1.0000	
		16	10	.0000	1.0000	1.0000	
		17	10	.0000	1.0000	1.0000	
		18	10	.0000	1.0000	1.0000	
	NS	19	10	.0000	1.0000	1.0000	
		20	10	.0000	1.0000	1.0000	
		21	10	.0000	1.0000	1.0000	
		22	10	.0000	1.0000	1.0000	
	NS	23	10	.0000	1.0000	1.0000	
		24	10	.0000	1.0000	1.0000	
		25	10	.0000	1.0000	1.0000	
		26	10	.0000	1.0000	1.0000	
	NS	27	10	.0000	1.0000	1.0000	
		28	10	.0000	1.0000	1.0000	
		29	10	.0000	1.0000	1.0000	
		30	10	.0000	1.0000	1.0000	
	Postel Keating	NS	31	10	.0000	1.0000	1.0000
			32	10	.0000	1.0000	1.0000
			33	10	.0000	1.0000	1.0000
			34	10	.0000	1.0000	1.0000
NS		35	10	.0000	1.0000	1.0000	
		36	10	.0000	1.0000	1.0000	
		37	10	.0000	1.0000	1.0000	
		38	10	.0000	1.0000	1.0000	
NS		39	10	.0000	1.0000	1.0000	
		40	10	.0000	1.0000	1.0000	
		41	10	.0000	1.0000	1.0000	
		42	10	.0000	1.0000	1.0000	
NS		43	10	.0000	1.0000	1.0000	
		44	10	.0000	1.0000	1.0000	
		45	10	.0000	1.0000	1.0000	
		46	10	.0000	1.0000	1.0000	
NS		47	10	.0000	1.0000	1.0000	
		48	10	.0000	1.0000	1.0000	
		49	10	.0000	1.0000	1.0000	
		50	10	.0000	1.0000	1.0000	

The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Berat Basah

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Duncan ^a N1	5	.4740			
N5	5	.6100	.6100		
N2	5		.6980	.6980	
N3	5			.8620	
N4	5				1.0700
Sig.		.152	.347	.088	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Berat Kering

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Duncan ^a N1	5	.0260		
N2	5		.0440	
N5	5		.0540	.0540
N3	5			.0620
N4	5			.0660
Sig.		1.000	.237	.181

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

2. Pengaruh Elisitor Terhadap Berat Basah dan Berat Kering Kalus NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		berat basah	berat kering
N		43	43
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	4.7400	.3053
	Std. Deviation	1.32801	.07252
Most Extreme Differences	Absolute	.113	.086
	Positive	.107	.086
	Negative	-.113	-.080
Kolmogorov-Smirnov Z		.741	.564
Asymp. Sig. (2-tailed)		.642	.908

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Homogeneous Subjects

Berat Basah

Perlakuan	N	Subject for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Duncan N1	5	1740			
N2	5	8100	8100		
N3	5		8880	8880	
N4	5			8920	10700
Std		102	247	282	1000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000

Berat Kering

Perlakuan	N	Subject for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan N1	5	0240		
N2	5	0440	0840	
N3	5		0840	0840
N4	5			0920
N5	5			0980
Std		1000	227	181

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000

2. Pengujian Elisior Terhadap Berat Basah dan Berat Kering Kalua
 Injar Teste

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

Statistic	Asymp. Sig. (2-tailed)	Kolmogorov-Smirnov Z	Most Extreme Difference	Absolute	Std. Deviation	Mean	Normal Parameters
1	.000	.247	.000	.113	.247	1740	Mean
2	.000	.247	.000	.113	.247	8100	Std. Deviation
3	.000	.247	.000	.113	.247	8100	Most Extreme Difference
4	.000	.247	.000	.113	.247	8100	Absolute
5	.000	.247	.000	.113	.247	8100	Positive
6	.000	.247	.000	.113	.247	8100	Negative
7	.000	.247	.000	.113	.247	8100	Kolmogorov-Smirnov Z
8	.000	.247	.000	.113	.247	8100	Asymp. Sig. (2-tailed)

a. Test distribution is Normal.
 b. Calculated from data.

Oneway**Test of Homogeneity of Variances**

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
berat basah	3.047	8	34	.011
berat kering	2.570	8	34	.026

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
berat basah	Between Groups	11.982	8	1.498	.820	.590
	Within Groups	62.089	34	1.826		
	Total	74.071	42			
berat kering	Between Groups	.030	8	.004	.665	.718
	Within Groups	.191	34	.006		
	Total	.221	42			

Test of Homogeneity of Variances

	Statistic	df1	df2	Significance
Levene Statistic	2.047	8	34	.011
Levene Statistic	2.870	8	34	.038

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Significance
Total	24.021	42			
Between Groups	11.667	8	1.458	8.850	.000
Within Groups	12.354	34	.363		
Total	32.1	42			
Between Groups	12.1	8	1.513	8.850	.000
Within Groups	20.0	34	.588		

