



LAPORAN PENELITIAN DASAR  
TAHUN ANGGARAN 2004

**STUDI OPTIMASI FRAKSINASI AMONIUM SULFAT PADA  
PERCOBAAN ISOLASI PABA GLUKOSIL TRANSFERASE DARI  
KULTUR SUSPENSI SEL SOLANUM LACINIATUM**

Peneliti:

Rr. Retno Widyowati, S.Si., Apt.  
Drs. A.Toto Poernomo, M.Si., Apt.  
Prof.Dr. rer.nat. Gunawan Indrayanto, Apt.

**LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh Proyek Penelitian Pengembangan Ilmu Pengetahuan Terapan

DIP Nomor : 002/XXIII/1/--/2004 Tanggal 1 Januari 2004

Kontrak Nomor : 73/P2IPT/DPPM/PID/III/2004

Dirbinlitabmas Dirjen Dikti, Depdiknas

Nomor Urut : 9.

FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Nopember, 2004

- SOLANUM
- GLUCOSYL TRANSFERASES



LAPORAN PENELITIAN DASAR  
TAHUN ANGGARAN 2004

23/06

LP 14/06

wid  
S

## STUDI OPTIMASI FRAKSINASI AMONIUM SULFAT PADA PERCOBAAN ISOLASI PABA GLUKOSIL TRANSFERASE DARI KULTUR SUSPENSI SEL SOLANUM LACINIATUM

Peneliti:

Rr. Retno Widyowati, S.Si., Apt.  
Drs. A.Toto Poernomo, M.Si., Apt.  
Prof.Dr. rer.nat. Gunawan Indrayanto, Apt.

### LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Proyek Penelitian Pengembangan Ilmu Pengetahuan Terapan

DIP Nomor : 002/XXIII/1/--/2004 Tanggal 1 Januari 2004

Kontrak Nomor : 73/P2IPT/DPPM/PID/III/2004

Dirbinlitabmas Dirjen Dikti, Depdiknas

Nomor Urut : 9.

01406141

FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Nopember, 2004

**STUDI OPTIMASI FRAKSINASI AMONIUM SULFAT PADA  
PERCOBAAN ISOLASI PABA GLUKOSILTRANSFERASE  
DARI KULTUR SUSPENSI SEL *Solanum laciniatum***

Nama peneliti : Rr. Retno. Widyowati, S.Si, Apt  
NIP : 132 300 854  
Kantor/Unit Kerja : Fakultas Farmasi Universitas Airlangga  
Alamat Kantor/Unit Kerja : Jl. Dharmawangsa Dalam Surabaya  
Kode Pos: 60286  
Telepon/Faksimile/E-mail : Telepon : ( 031-5033710 )  
Faksimile : ( 031-5036779 )  
E-mail : retno\_biotek@yahoo.com  
Alamat Rumah : Klampis Ngasem 79 Blok V Surabaya  
Telepon : 031-5915751  
Usulan Jangka Waktu : 10 bulan  
Penelitian  
Biaya yang Diusulkan : Rp. 15.000.000,-

Surabaya, 10 Maret 2005

Peneliti Utama/  
Penanggung Jawab Riset

Dekan Fakultas Farmasi  
Universitas Airlangga



Prof. Dr. Noor Cholies Zaini

NIP. 130 355 372

Rr. Retno Widyowati, S.Si, Apt

NIP. 132 300 854

Mengetahui,

Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga



Prof. Dr. H. Sarmanu, MS.

NIP. 130 701 125

## RINGKASAN

**STUDI OPTIMASI FRAKSINASI AMONIUM SULFAT PADA  
PERCOBAAN ISOLASI PABA-GLUKOSILTRANSFERASE DARI  
KULTUR SUSPENSI SEL *SOLANUM LACINIATUM***

**(Rr. Retno Widyowati, Achmad Toto Poernomo, Gunawan Indrayanto, 2004,  
28 halaman)**

Kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* telah diketahui dapat melakukan reaksi biotransformasi terhadap PABA menjadi PABA-glukosida ( $\beta$ -D-glukose-1-p-aminobenzoate) dan telah dilakukan ekstraksi gubal enzim sehingga diperoleh aktivitas enzim PABA-glukosiltransferase namun hasilnya belum optimum, maka pada percobaan ini dilakukan optimasi fraksinasi amonium sulfat sehingga didapatkan enzim PABA-glukosiltransferase dengan aktivitas terbesar.

Produk glikosida PABA dapat dihasilkan secara in vitro melalui proses penambahan enzim langsung secara bebas dari luar. Oleh sebab itu, glukosiltransferase pada kultur sel *Solanum laciniatum* mempunyai peran penting, karena keterlibatannya sebagai katalisator dalam upaya modifikasi molekul senyawa PABA menjadi senyawa glikosidanya yang mudah larut dalam air, sehingga mempunyai nilai tambah pada proses terapeutik.

Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pada fraksi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  keberapakah mampu mengendapkan PABA-glukosiltransferase sehingga enzim ini mempunyai aktivitas paling besar dan mengetahui pada hari keberapakah sel-sel kultur *Solanum laciniatum* menghasilkan PABA-glukosiltransferase dengan aktivitas terbesar.

Metode yang digunakan adalah isolasi glukosiltransferase dari kultur suspensi sel *Solanum laciniatum*. Isolasi glukosiltransferase dilakukan bertahap. Pertama dilakukan kultivasi kultur jaringan tanaman, setelah kondisi kultur siap untuk dipanen, dilakukan pemanenan. Kultur yang telah dipanen dikeringkan dengan menggunakan corong buchner dan ditimbang beratnya kemudian digerus halus dengan diberi penambahan PVPP dan buffer tris HCl. Kemudian dilakukan ekstraksi enzim pada kultur tanaman tersebut dengan melakukan pemecahan sel melalui proses homogenasi dan sonifikasi sel kultur. Dilanjutkan pengendapan protein enzim menggunakan fraksinasi ammonium sulfat. Lalu masing-masing fraksinasi dilakukan uji aktifitas enzim gubal. Dengan prosedur yang sama, dilakukan juga uji aktivitas enzim pada tiap-tiap usia kultur, dimana usia kultur yang dipilih dalam penelitian ini adalah hari ke 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 dan 15.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa belum diketahui ada/tidaknya enzim pengkatalisa biotransformasi dalam isolat enzim yang diperoleh dengan cara ekstraksi gubal enzimatik yang dilanjutkan dengan fraksinasi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Akan tetapi, uji aktivitas fraksi-fraksi enzim yang diinkubasi bersama PABA dan UDP-glukosa menunjukkan adanya suatu produk baru yang mempunyai sifat hampir sama dengan enzim Glukosil transferase (Produk P). Optimasi fraksinasi dengan amonium sulfat didapatkan aktivitas relatif enzim yang paling besar pada kultur sel usia ke-13 pada fraksi enzim 0-20%.

Disarankan untuk melakukan identifikasi struktur kimia Produk P dengan NMR dan fraksi enzim yang telah diperoleh perlu dimurnikan lebih lanjut dengan menggunakan filtrasi gel

## KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan puji syukur Alhamdulillah kepada Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga kami dapat menyelesaikan penelitian dengan judul **STUDI OPTIMASI FRAKSINASI AMONIUM SULFAT PADA PERCOBAAN ISOLASI PABA-GLUKOSILTRANSFERASE DARI KULTUR SUSPENSI SEL *SOLANUM LACINIATUM***.

Untuk itu kami menyampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Prof. Dr. Drh. Sarmanu yang telah memberi kesempatan kepada kami untuk mengerjakan penelitian ini
2. Direktur Tropical Deases Center (TDC) Univeritas Airlangga beserta staf dan karyawan yang telah berkenan memberikan fasilitas laboratoriumnya
3. Prof. Dr. Noor Cholies Zaini selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan segala fasilitas untuk pengerjaan penelitian
4. Kepala Bagian Ilmu Bahan Alam, Dr. Mulja Hadi Santosa dan Kepala Laboratorium Bioteknologi, Prof. Dr. Gunawan Indrayanto beserta seluruh staf atas segala fasilitas yang telah disediakan
5. Seluruh pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini

Dengan segala kerendahan hati peneliti berharap penelitian ini dapat memberikan manfaat bagi kami maupun pihak lainnya.

Surabaya, 10 Maret 2005

Peneliti

v

**SISTEMATIKA LAPORAN AKHIR  
KEGIATAN PENELITIAN  
ILMU PENGETAHUAN DASAR**

|   | halaman |
|---|---------|
| LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN .....     | ii      |
| RINGKASAN DAN SUMMARY.....                | iii     |
| KATA PENGANTAR.....                       | v       |
| DAFTAR SINGKATAN .....                    | vi      |
| DAFTAR TABEL.....                         | vii     |
| DAFTAR GAMBAR / ILUSTRASI.....            | viii    |
| DAFTAR LAMPIRAN.....                      | ix      |
| I.    PENDAHULUAN .....                   | 1       |
| II.   TINJAUAN PUSTAKA .....              | 4       |
| III.  TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN ..... | 14      |
| IV.  METODE PENELITIAN.....               | 15      |
| V.   HASIL DAN PEMBAHASAN.....            | 20      |
| VI.  KESIMPULAN DAN SARAN.....            | 28      |
| DAFTAR PUSTAKA .....                      | 29      |
| LAMPIRAN.....                             | 31      |

## DAFTAR SINGKATAN

|                     |   |
|---------------------|---|
| Produk P            | = Produk baru hasil biotransformasi dari kultur sel suspensi <i>Solanum laciniatum</i> dengan <i>Para Amino Benzoic Acid</i> (PABA) |
| Kultur suspensi sel | = Kultur tanaman yang menggunakan media suspensi (cair)   |
| PVPP                | = Poly Vinyl Poly Pyrrolidone   |
| PABA                | = Para Amino Benzoic Acid   |
| NAA                 | = 1-Naphthaleneacetic Acid  |
| MS medium           | = Murashige and Skoog Medium  |



## DAFTAR TABEL

halaman

- Tabel 1. Hasil penghitungan jarak noda dan harga Rf pada optimasi antara % penjuhan ekstrak kasar enzim dengan amonium sulfat terhadap luas area noda produk P dan aktivitas relatifnya yang dianalisis dengan KLT-densitometer pada  $\lambda$  272 nm. Lempeng KLT yang digunakan dengan fasa diam Silika Gel 60 F<sub>254</sub> dan fasa gerak etil asetat : metanol : air = 77 : 13: 10.....21
- Tabel 2. Hasil optimasi antara % penjuhan ekstrak kasar enzim dengan amonium sulfat terhadap luas area noda produk P dan aktivitas relatifnya yang dianalisis dengan KLT-densitometri pada  $\lambda$  272 nm. Lempeng KLT menggunakan fasa diam Silika Gel 60 F<sub>254</sub> dan fasa gerak etil asetat : metanol : air = 77 : 13: 10.....23
- Tabel 3. Hasil optimasi antara usia kultur (pada fraksi 0-20 %) terhadap luas area noda produk P hasil inkubasi dan aktivitas relatifnya yang dianalisis dengan KLT-densitometri pada  $\lambda$  272 nm. Lempeng KLT menggunakan fasa diam Silika Gel 60 F<sub>254</sub> dan fasa gerak etil asetat : metanol : air = 77 : 13: 10 .....24
- Tabel 4. Hasil optimasi antara usia kultur (pada fraksi 20-30 %) terhadap luas area noda produk P hasil inkubasi dan aktivitas relatifnya yang dianalisis dengan KLT- densitometri pada  $\lambda$  272 nm. Lempeng KLT menggunakan fasa diam Silika Gel 60 F<sub>254</sub> dan fasa gerak etil asetat : metanol : air = 77 : 13: 10 .....26

## DAFTAR GAMBAR

halaman

- Gambar 1. Analisis KLT dari uji aktivitas enzim hasil fraksinasi dengan kontrolnya. Pemisahan dengan KLT menggunakan fasa diam Silika Gel 60 F<sub>254</sub>, fasa gerak campuran etil asetat : metanol : air = 77 : 13 : 10. penampak noda menggunakan sinar UV .....20
- Gambar 2. Kromatogram PABA-glukosida, Produk P dan PABA, diukur dengan densitometer pada  $\lambda$  200-400 nm. Pemisahan noda menggunakan KLT dengan fasa diam Silika Gel 60 F<sub>254</sub> dan fasa gerak etil asetat : metanol : air = 77 : 13: 10.....22
- Gambar 3. Tiap-tiap fraksi enzim diinkubasi bersama PABA dan UDP-glukosa. Hasilnya dipisahkan dengan KLT dan noda Produk P yang terbentuk diukur luas areanya dengan densitometer .....23
- Gambar 4. Sel-sel kultur yang telah dipindahkan ke media baru, setelah 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 dan 15 hari diambil enzimnya pada fraksi 0-20% kemudian diinkubasi bersama PABA dan UDP-glukosa. Luas area noda produk P pada lempeng KLT diukur dengan densitometer dan dipakai untuk menghitung aktivitas relatif.....25
- Gambar 5. Sel-sel kultur yang telah dipindahkan ke media baru, setelah 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 dan 15 hari diambil enzimnya pada fraksi 20-30% kemudian diinkubasi bersama PABA dan UDP-glukosa. Luas area noda produk P pada lempeng KLT diukur dengan densitometer dan dipakai untuk menghitung aktivitas relatif.....26

## DAFTAR LAMPIRAN

|   | halaman |
|---|---------|
| Lampiran 1. Komposisi Media Murashige Skoog (MS) yang Telah Dimodifikasi<br>Untuk Kultur Suspensi Sel <i>Solanum laciniatum</i> ..... | 31      |
| Lampiran 2. Biografi/Daftar Riwayat Hidup Peneliti.....   | 32      |

## I. PENDAHULUAN

Di dalam tanaman terdapat berbagai bahan alam dengan berbagai struktur kimia dan aktivitas biologi, beberapa di antaranya digunakan dalam bidang kesehatan. Sejak lama ahli kimia sintetik menghadapi tantangan untuk mensintesis bahan aktif tersebut tetapi seringkali dihadapkan pada kompleksnya struktur dan banyaknya tahapan reaksi sehingga jarang ditemukan aplikasinya dalam skala industri seperti yang diharapkan industri farmasi. Maka banyak senyawa aktif diperoleh dengan mengekstraksi dari tanaman, cara tersebut mempunyai beberapa keterbatasan yaitu senyawa aktif yang diperoleh dari ekstrak tanaman jumlahnya sangat kecil, pemisahan senyawa target cukup sulit & cenderung mahal, kandungan senyawa target bervariasi tergantung musim dan waktu panen, terkadang tanaman penghasil hanya tumbuhan pada daerah geografi tertentu (Kutney, 1993).

Untuk mengatasi keterbatasan tersebut penggunaan metoda kultur jaringan/sel tanaman merupakan salah satu alternatif yang sangat prospektif. Keunggulan metode ini antara lain (Kutney, 1993) kondisi pertumbuhan dapat dikontrol sehingga keterulangan hasil lebih terjamin, parameter pertumbuhan seperti pH, nutrisi media, temperatur, cahaya dapat dioptimasi agar dihasilkan produk metabolit yang lebih tinggi dibanding tanamannya, pemisahan senyawa target lebih mudah karena berkurangnya kompleksitas ekstrak, dapat diusahakan memperoleh galur sel dengan tingkat produksi. Sel tanaman merupakan sumber enzim, dimana enzim tersebut dapat dimanfaatkan untuk mengkatalisir reaksi-reaksi biotransformasi juga untuk mempelajari jalur biosintesis.

Salah satu dari reaksi biotransformasi yang menarik adalah konjugasi glikosil (glikosilasi/glikosidasi) yang merupakan reaksi pengikatan gula dengan suatu senyawa kimia (aglikon) untuk membentuk suatu glikosida atau gliko ester dengan pertolongan katalisis enzim glukosiltransferase. Reaksi ini oleh kultur sel tanaman bersifat selektif dan spesifik, secara kimia sulit dilakukan dan tidak ditemukan pada mikroorganisme (Dowbrowskiet al., 1992). Juga merupakan reaksi biotransformasi yang karakteristik dari kultur sel tanaman dan mempunyai potensi untuk diaplikasikan dalam industri sebagai biokatalis (Kutney, 1993).

Jerman dan Jepang telah banyak melakukan penelitian tentang kemampuan kultur suspensi berbagai tanaman dalam usaha memodifikasi struktur molekul sehingga diperoleh senyawa dengan aktivitas terapi dan sifat fisiko kimia yang lebih baik seperti asam salisilat oleh Umetami et al. (1982), salisil alkohol oleh Mizukami et al. (1986), asam fenilpropionat oleh Furuya et al., (1988, 1989), senyawa-senyawa fenol oleh Tabata et al. (1988), isomer asam hidroksi benzoat oleh Tanaka et al. (1990), salisil alkohol dan asam salisilat oleh Dombrowski et al. (1992), hidrokuinon oleh Lutterbach et al. (1992,) metabolisme asam benzoat dan fenol oleh Barz et al. (1978) Bahkan perusahaan Shiseido, Jepang merencanakan secara komersil produksi arbutin (glikosida dengan aktivitas antiseptik saluran cerna) yang dibuat secara biotransformasi dari hidrokuinon (> 90% dalam 7 hari; 5,6 g/liter media) dengan menggunakan kultur sel *Cantharanthus roseus*.

Dalam bentuk glikosida, senyawa aglikon mengalami perubahan sifat fisiko kimia, aktifitas farmakokinetik dan farmakodinamikanya sehingga diperoleh nilai tambah farmaseutik baru dibandingkan senyawa awal. Umetami (1986) melaporkan konversi asam salisilat menjadi o-glikosidanya dengan kultur suspensi sel *Mallotus japonicus*. Salisilat dalam bentuk glikosida ternyata memberikan efek analgesik lebih cepat dan lama dibandingkan asam salisilat. Suatu obat antikanker dikembangkan dari senyawa yang semula secara klinik tidak berguna (podophyllotoxin) karena ketidaklarutan & toksisitasnya, dengan dimodifikasi struktur kimianya menjadi bentuk glikosida (teniposida dan etoposida) sehingga lebih larut dan dapat ditransport menuju reseptor dengan efek terapi antikanker (Cave, 1986).

Seperti diketahui senyawa golongan asam aminobenzoat dipakai untuk kosmetika sebagai *sunscreen*. tetapi mempunyai kerugian karena kelarutannya dalam air terbatas. Adanya derivat glikosida yang mudah larut dalam air akan sangat menarik pada bidang industri kosmetika, karena akan memudahkan untuk diformulasi dalam bentuk krem, *lotion* dan lainnya. Untuk mengoptimalkan produktivitas suatu metabolit sekunder tertentu dengan menggunakan sistem kultur jaringan tanaman, dapat digunakan beberapa pendekatan yaitu seleksi/skrining sel, elisitasi, optimasi media, amobilisasi sel dan rekayasa genetika (Furuya et al., 1998).

Telah diteliti proses biotransformasi *para-amino benzoic acid* (PABA) oleh kultur suspensi sel *Solanum mammosum* dan *Solanum laciniatum* menjadi

glikosidanya yaitu  $\alpha$ -D-glucose-1-p-amino benzoate. Sedangkan dengan penambahan substrat *orto-amino benzoic acid* (OABA) pada kultur *Solanum mammosum* L., dihasilkan senyawa baru yaitu *orto amino benzoic acid 7-O- $\beta$ -D-( $\beta$ -D-glucopyranosyl) glucopyranosyl ester* dan *orto amino benzoic acid 7-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester*. Suatu senyawa glikosida PABA dan OABA yang mudah larut dalam air. Biokonversi diatas merupakan reaksi konjugasi glikosil (Syahrani et al., 1999)

Produk biotransformasi ini diakumulasi di dalam sel (kemungkinan di dalam vakuola). Sedikit sekali yang didapatkan pada media (diluar sel). Hal ini merupakan kendala untuk pengaplikasian dalam skala yang lebih besar karena terdapat kesulitan apabila setiap kali isolasi produk glikosidanya, harus dilakukan dengan mengekstraksi massa sel, padahal massa sel diperlukan untuk melakukan biotransformasi. Walaupun demikian ada keterbatasan penggunaan suspensi sel tanaman maupun kultur fermentor tanaman untuk memproduksi bahan alam, yaitu ketidakstabilannya selama dilakukan subkultur. Selain itu pada sistem kultur sel tanaman, nutrien, pH kultur, dan temperatur mempengaruhi produk biomassa yang dihasilkan (Dougal et al., 1983; Scragg, 1993).

Keterbatasan kondisi tersebut tentunya tidak diinginkan dalam produksi suatu bahan tertentu. Untuk itu perlu dicari suatu pemecahannya dengan menggunakan enzim yang diisolasi dari kultur sel tanaman. Glikosida PABA dihasilkan dari dalam sel *Solanum laciniatum* dengan cara biotransformasi dan ekstraksi massa sel yang membutuhkan waktu lebih panjang, maka dari penelitian ini diharapkan dengan penambahan enzim secara langsung (*invitro*) dapat menghasilkan produk glikosida PABA tanpa melakukan proses biotransformasi.

Maka dari uraian tersebut diatas dapat dirumuskan suatu masalah penelitian sebagai berikut :

1. Pada fraksi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  berapakah PABA-glukosiltransferase mempunyai aktivitas paling besar ?
2. Pada hari keberapakah sel-sel kultur *Solanum laciniatum* menghasilkan PABA-glukosiltransferase dengan aktivitas terbesar ?

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Tinjauan Tentang Biotransformasi

Biotransformasi pada kultur jaringan tanaman adalah suatu teknik yang menggunakan enzim-enzim dalam sel tanaman untuk mengubah gugus fungsional dari senyawa kimia yang ditambahkan dari luar. Biotransformasi banyak digunakan untuk meningkatkan aktivitas biologis suatu senyawa kimia (Morris *et.al.*, 1985). Penelitian biotransformasi pada kultur jaringan tanaman dapat dilakukan dengan kultur kalus, kultur suspensi sel, kultur fermentor, sel-sel amobil, dan sistem bebas sel (Indrayanto *et.al.*, 1990).

Reaksi biotransformasi yang terjadi pada kultur jaringan tanaman bisa bervariasi, tetapi reaksi glikosilasi senyawa organik oleh kultur sel tanaman adalah reaksi yang paling menarik karena biotransformasi ini jarang didapatkan pada mikroorganisme, tetapi sering terjadi pada kultur sel tanaman. Contohnya glikosilasi hidrokuinon dengan kultur sel *Catharanthus roseus* menjadi arbutin yang akan diproduksi secara komersial (Dombrowski *et al.*, 1992).

Dari Jepang telah dilaporkan pemurnian dan karakterisasi enzim salisil alkohol glukosiltransferase dari kultur suspensi sel *Gardenia jasminoides* (Mizukami *et al.*, 1985). Dombrowski *et al* (1992) telah berhasil mengisolasi dan mengkarakterisasi enzim yang berperan mengkatalisir reaksi glikosilasi salisil alkohol dan asam salisilat pada kultur suspensi sel *Salix matsudana*. Alfermann *et al* (1980) melaporkan kemampuan hidroksilasi kultur sel amobil *Digitalis lanata* lebih besar 1,5 kali dibandingkan kultur suspensi selnya dengan kelebihan yang lain bahwa kultur sel amobil dapat bertahan berproduksi lebih dari 60 hari.

Syahrani (1997) telah berhasil memproduksi glikosida dengan substrat salisilamida menjadi salisilamida-2-O- $\beta$ -D-glukopiranosida dan salisil alkohol menjadi salisil alkohol-2-O- $\beta$ -D-glukopiranosida (salisin) menggunakan kultur suspensi sel *Solanum mammosum* (cell line : sm) (Syahrani *et al.* 1997b). Selain itu *Solanum laciniatum* (cell line sl-7) Syahrani *et al.* (1999a) telah pula berhasil mengkonversi salisil alkohol menjadi salisil alkohol-7-O- $\beta$ -D-glukopiranosida; (isosalisin) dan senyawa baru salisil alkohol-7-O- $\beta$ -D-( $\beta$ -1,6-D-glucopiranosil)-

glucopiranososa (Syahrani et al., 1999b). Konsentrasi substrat yang ditambahkan 800-1000 mg/l media, konsentrasi ini lebih besar daripada yang pernah dilaporkan beberapa peneliti lain. Telah pula diteliti kinetika reaksi biotransformasinya, substrat dikonversi menjadi produk glikosida salisilamida pada hari ke 5 sebesar  $\pm$  80%, glikosida salisil alkohol pada hari ke 3 sebesar  $\pm$  50%.

Indrayanto et al., telah berhasil mengisolasi 5 metabolit baru yaitu senyawa glukosida *p-amino benzoic acid 7-O- $\beta$ -D-glucopiranosyl ester* (1), *N-acetyl p-aminobenzoic acid 7-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester* (2), *o-aminobenzoic acid 7-O- $\beta$ -D-( $\beta$ -D-1,6-glucopyranosyl) glucopyranosyl ester* (3), *o-aminobenzoic acid 7-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester* (4) dan *N-formyl-p-aminobenzoic acid* (5) dengan menggunakan substrat asam p-amino benzoat (PABA) (6), asam o-amino benzoat (OABA) (7) dan *N-acetyl-p-amino benzoic acid* (8). Selain itu senyawa 8 juga dapat diisolasi bila pada kultur diberikan substrat 6. Hasil penelitian ini telah dilaporkan pada jurnal internasional *Phytochemistry* (Pergamon Press, UK; Syahrani et al., 1999). Sedangkan percobaan dengan menggunakan substrat asam m-amino benzoat tidak menghasilkan metabolit yang cukup berarti.

Syahrani et.al. telah berhasil melakukan penelitian biotransformasi (glikosilasi atau glikosidasi) sejumlah senyawa dengan menggunakan kultur suspensi *Solanum mammosum* dan *Solanum laciniatum*. Senyawa salisilamida mengalami biotransformasi menjadi *salicylamide 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranoside*; salisil alkohol ditransformasi menjadi *salicyl alcohol 7-O- $\alpha$ -D-glucopyranoside* (isosalicin); asam p-aminobenzoat menjadi *p-aminobenzoic acid 7-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl ester* (produk utama) dan dua produk lain yaitu asam N-asetil p-aminobenzoat dan asam N-formil p-aminobenzoat; asam o-aminobenzoat menjadi *o-aminobenzoic acid 7-O- $\alpha$ -D-( $\alpha$ -1,6-O-D-glucopyranosyl) glucopyrano-syl ester* dan *o-aminobenzoic acid 7-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl ester*; serta asam N-asetil-p-aminobenzoat menjadi *N-acetyl p-aminobenzoic acid 7-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl ester*. Hasil penelitian ini menunjukkan kapasitas biotransformasi kedua macam kultur suspensi sel cukup tinggi (Syahrani et.al.,1999; Syahrani et.al., 1998; Syahrani et.al., 1997a; Syahrani et.al. 1997b). Kultur *Solanum mammosum* ternyata juga dapat melakukan biotransformasi terhadap asam salisilat tetapi dengan kapasitas yang kecil (Syahrani et al., 1997a).



## 2.2. Tinjauan Tentang Enzim

Enzim merupakan katalisator reaksi-spesifik, hampir semua enzim merupakan katalisator protein. Pada hakekatnya semua reaksi biokimia dikatalisis oleh enzim, kebanyakan reaksi biokimia akan berlangsung sangat lambat jika tidak dikatalisis oleh enzim. Berbeda dengan katalisator nonprotein, setiap enzim mengkatalisis sejumlah kecil reaksi dan sering hanya satu reaksi. Sebagai katalisator, enzim mempercepat reaksi kimia, mengalami perubahan fisik selama reaksi tetapi berubah kembali pada keadaan semula setelah selesai reaksi.

Banyak enzim memerlukan molekul organik yang spesifik, stabil terhadap panas dan mempunyai berat molekul rendah yaitu suatu koenzim yang berikatan secara kovalen atau nonkovalen dengan enzim. Jenis-jenis reaksi yang membutuhkan koenzim mencakup reaksi oksidoreduksi, reaksi pengalihan gugus serta isomerisasi dan reaksi yang membentuk ikatan kovalen. Reaksi lisis, termasuk reaksi hidrolisis yang dikatalisis oleh enzim, misalnya enzim pencernaan, tidak memerlukan koenzim (Murray et al., 1995). Kebanyakan enzim glukosiltransferase mamalia dan tumbuhan memerlukan ion-ion logam sebagai kofaktor agar aktivitasnya maksimal (Hasegawa et al., 1997)

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah konsentrasi enzim dan substrat, suhu, pH, adanya inhibitor dan kofaktor atau koenzim. Aktivitas enzim meningkat bersamaan dengan meningkatnya suhu, kebanyakan kecepatan reaksi enzimatik meningkat dua kali tiap kenaikan  $10^{\circ}\text{C}$ . Sampai pada rentang suhu tertentu enzim menjadi stabil dan aktivitasnya maksimum, tetapi di atas suhu optimum ini aktivitas enzim menurun tajam karena denaturasi (kebanyakan enzim terinaktivasi pada suhu  $\pm 55 - 60^{\circ}\text{C}$ ). Perubahan pH yang relatif kecil saja dapat mempengaruhi aktivitas enzim (Murray et al., 1995)

Jumlah enzim yang kecil akan mempersulit pengukuran jumlah suatu enzim. Akan tetapi, aktivitas katalisis yang dimiliki suatu enzim memberikan pemeriksaan yang sensitif dan spesifik untuk pengukuran jumlah enzim itu sendiri, yaitu dengan mengukur laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim dalam sampel. Dalam kondisi yang tepat, hasil pengukuran laju reaksi harus sebanding dengan jumlah enzim yang ada (Murray et al., 1995)

### 2.3. Tinjauan Tentang Cara Isolasi Enzim

Metode isolasi dan pemurnian enzim dapat dilakukan dengan cara :

#### 1. Ekstraksi enzim

Ekstraksi enzim adalah pembebasan enzim dari sel atau organel sel. Ekstraksi dapat dilakukan pertama-tama dengan perusakan dinding atau membran sel secara mekanik, fisik atau kimia. Untuk mengekstraksi enzim-enzim ekstraseluler kadang-kadang perlu mengubah media cair untuk menyempurnakan disosiasi. Dekstruksi mekanik bisa dilakukan dengan ultrasonik, pemotongan mekanik, tekanan dan penggilingan. Cara dekstruksi nonmekanik dilakukan dengan desikator atau cara lisis. Enzim dari sel yang telah didekstruksi dilarutkan dalam suatu pelarut. Umumnya pelarut adalah suatu dapar yang mengandung bahan-bahan lain untuk meningkatkan kestabilan enzim (garam-garam, surfaktan, pengikat logam, ligan dan inhibitor protease). Campuran disentrifuse 100.000 g/menit pada 0-4<sup>0</sup>C

#### 2. Pemekatan massa enzim dengan cara pengendapan

Teknik pengendapan ini menggunakan prinsip mengganggu atau menetralsir energi yang menstabilkan protein dalam larutannya. Pengendapan enzim yang dapat digunakan yaitu fraksinasi dengan amonium sulfat, penggunaan pelarut organik, NaCl dan garam valensi satu lainnya, denaturasi dengan panas dan pH ekstrim jika enzim stabil. Kemudian campuran disentrifuse 100.000 g/menit pada 0-4<sup>0</sup>C. Endapan dilarutkan kembali dalam sejumlah kecil dapar yang sesuai. Penghilangan amonium sulfat, jika diinginkan dapat dilakukan dengan filtrasi gel atau dialisis

#### 3. Pemurnian dengan metode kromatografi

Ada berbagai macam metode yang dapat dipilih antara lain kromatografi pertukaran ion, filtrasi gel, kromatografi protein pada kolom hidroksiapatit, kromatografi hidrofobik, kromatografi pada pewarna reaktif terimobilisasi dan kromatografi afinitas.

#### 4. Pemurnian dengan metode elektroforetik

Metode-metode yang dapat dilakukan antara lain elektroforesis gel satu dimensi dan elektroforesis gel poliakrilamid dua dimensional resolusi tinggi untuk analisis protein.

Walaupun demikian, semua metode ini relatif tidak selektif karena tidak dapat memisahkan protein dari yang lainnya, kecuali bila metode-metode tersebut digabungkan. Pemisahan protein lebih mudah dilakukan dengan kromatografi afinitas yang memakai ligan terimobilisasi (biasanya substrat atau derivat koenzim yang secara kovalen melekat pada penyangga seperti sephadex) yang mengadakan interaksi secara spesifik dengan enzim yang ingin dimurnikan (Murray et al., 1995)

#### 2.4. Tinjauan Tentang Pengendapan Enzim

Enzim untuk tujuan preparatif dapat diendapkan dengan membuat suatu gangguan terhadap pelarut berkaitan dengan pH, kekuatan ion dan suhu untuk mengganggu atau menetralkan energi yang menstabilkan protein dalam larutannya. Teknik pengendapan dipakai sebagai langkah awal untuk memekatkan protein menuju langkah berikutnya yaitu kromatografi. Teknik ini dilakukan dengan penambahan berbagai konsentrasi garam-garam tertentu atau pelarut organik yang tercampurkan.

Cara pengendapan enzim yang dapat dilakukan adalah :

1. Fraksinasi dengan amonium sulfat, merupakan pengendap yang paling banyak dipakai untuk *salting out* enzim dan protein

2. Penggunaan pelarut organik

Pelarut organik menyebabkan pengendapan protein dengan mengubah kelarutan protein dalam air. Pelarut organik yang dipakai adalah aseton, etanol, metanol atau butanol. Semuanya dapat campur dengan air, tetapi menghasilkan panas yang bermakna pada larutan, juga mempunyai kecenderungan mendenaturasi protein khususnya pada suhu di atas 0°C

3. Penggunaan NaCl dan garam-garam valensi satu lainnya

Dahulu digunakan sebagai pengendap dan pelarut beberapa protein tapi penggunaannya terbatas karena kurangnya kekuatan ion larutan NaCl jenuh dibandingkan dengan amonium sulfat. Garam ini dapat digunakan untuk fraksinasi fibrinogen, epidermin, miosin, tropomiosin dan kolagen

4. Denturasi dengan panas dan pH sebagai tambahan metode dalam pemurnian enzim

Teknik pengendapan dengan fraksinasi amonium sulfat paling banyak dipakai saat ini karena mempunyai beberapa keuntungan :

1. Amonium sulfat mempunyai molaritas yang cukup tinggi pada saat penjuhan sehingga dapat mengendapkan sebagian besar protein
2. Tidak mengeluarkan banyak panas larutan, panas yang timbul dapat segera hilang
3. Sekalipun larutan jenuhnya (4,04 M pada 20<sup>0</sup>C) mempunyai berat jenis 1,235 g/cm, tidak mengganggu sedimentasi protein-protein yang terendapkan dengan sentrifugasi
4. Larutan jenuhnya mencegah atau membatasi pertumbuhan sebagian besar bakteri
5. Dalam larutan amonium sulfat protein terlindungi terhadap denaturasi

Selain itu penggunaan amonium sulfat mempunyai keterbatasan yaitu :

1. Fraksinasi yang bagus ketika konsentrasi ditingkatkan untuk mendapatkan fraksi berikutnya
2. Pemurnian yang dicapai biasanya 2-5 kali dari fraksi sebelumnya.
3. Jika konsentrasi amonium sulfat yang digunakan untuk ekstraksi jaringan mencapai 25 % seringkali menghasilkan endapan yang mengandung partikel tertentu seperti ribosom, fragmen membran, protein besar dan protein yang terdenaturasi.

Fraksinasi dilakukan terhadap ekstrak kasar yang mengandung 5-30 mg/ml protein. Kadar protein yang tinggi akan mendukung stabilitas protein dengan meminimalkan denaturasi. Fraksinasi dilakukan dengan menambahkan amonium sulfat dengan pengadukan yang konstan pada suhu 0<sup>0</sup>C dan jika perlu dilakukan penyesuaian pH menggunakan NH<sub>4</sub>OH 1 N. Setelah seluruh garam ditambahkan, pengadukan dilanjutkan 15-30 menit untuk memberi kesetimbangan antara pelarut dan protein. Kemudian campuran disentrifuse 100.000 g/menit pada 0-4<sup>0</sup>C. Endapan dilarutkan kembali dalam sejumlah kecil dapar yang sesuai.

Penghilangan amonium sulfat dapat dilakukan dengan filtrasi gel atau dialisis, endapan dipindahkan secara kuantitatif dan didialisis pada 0-4<sup>0</sup>C dengan beberapa kali penggantian larutan dapar yang sama sambil diaduk terus. Setelah dialisis selesai, isi kantung dialisis dipindahkan dan ditambahkan dapar sampai

volume tertentu kemudian dilakukan analisa kandungan protein dan aktivitasnya (Englard et al., 1990)

## 2.5. Tinjauan Terhadap Beberapa Penelitian Isolasi Glukosiltransferase

Penelitian mengenai isolasi, pemurniaan dan karakterisasi glukosiltransferase telah banyak dilakukan antara lain Li et.al. (1997) meneliti enzim UDP-glucose: 4-hydroxybenzoate yang dapat mengubah 4-hidroksibenzoat menjadi glikosidanya yaitu shikonin. Isolasi dan pemurnian enzim ini dari kultur sel *Lithospermum erythrorhizon* dilakukan pada suhu 4-8 °C dengan cara: kultur suspensi yang telah dipindahkan ke media baru (25 – 35 jam) disaring, dicampur dengan bufer K-Pi (0,1 M, pH 6,5) mengandung 20 mM DTT, 40 mM PMSF, dan PVPP 10%, dihaluskan pada mortir dilanjutkan dengan *Branson sonifier*, lalu disentrifugasi 17.000 g selama 20 menit. Ekstrak enzim ditambah larutan protamin sulfat 2% dalam 0,5 M buffer K-Pi pH 6,5 (1 ml larutan/200 mg protein), diaduk 10 menit lalu disentrifugasi 17.000 g, 20 menit. Ditambahkan padatan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pada supernatan sambil terus-menerus diaduk, pH larutan ekstrak dipertahankan 6,5 dengan menambahkan 5 M  $\text{NH}_3$  selama proses pengendapan. Endapan pada fraksi 33 – 55% dikumpulkan dengan sentrifugasi 17.000g selama 20 menit. Pemurnian lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom dengan DEAE Sephacel, Superdex 200, hidroksiapatit, *HiTrap blue*, Mono P dan Mono Q. Diperoleh enzim berupa monomer 51 kDa dengan SDS-PAGE dan aktivitas spesifik meningkat 27.300 kali daripada ekstrak kasar. Enzim diuji dengan mencampurkan 4-hidroksibenzoat, UDP-glukosa, BSA, dan fraksi enzim; pH 7,6; diinkubasi 37 °C selama 60 menit; reaksi dihentikan dengan larutan TCA. Produk diukur secara kuantitatif dengan HPLC, sebagai internal standar ditambahkan asam dihidroksibenzoat. Untuk menguji enzim secara cepat digunakan UDP-glukosa radioaktif.

Pada pemurnian parsial dan karakterisasi salisil alkohol glukosiltransferase dari kultur sel *Gardenia jasminoides*, ekstraksi enzim dilakukan dengan menggunakan buffer Tris HCl pH 7,5 yang ditambahkan PVPP lalu *dihomogenize* setelah itu disentrifugasi. Kemudian ekstrak kasar ini dimurnikan dengan cara penambahan amonium sulfat, kromatografi dan gel filtrasi. Penentuan protein

digunakan metode *Bradford* dengan *BSA* sebagai standar. Penentuan aktivitas enzim digunakan *TLC* dan radioaktif. Hasilnya didapatkan aktivitas 110 kali lebih besar daripada ekstrak kasarnya dan berat molekul protein yang didapat dari gel filtrasi sebesar 51000. Enzim salisil alkohol glukosiltransferase ini menunjukkan pH optimumnya antara 9,0 – 9,5 dan penghambatan aktivitas enzim dilakukan oleh gugus sulfhidril dan beberapa kation divalen (Mizukami et al., 1985).

Hasegawa et al (1997) meneliti pemurnian enzim Limonoid glucosyltransferase dari jaringan albedo jeruk navel dengan cara jaringan albedo dihomogenkan dengan bufer Tris-HCl pH 8, DTT, 2-merkaptotanol, larutan PMSF dalam DMSO, KCl dan PVP, dengan kecepatan rendah-sedang selama 4 menit. Kemudian disentrifugasi 8.000g, 20 menit. Supernatan ditambahkan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sampai 40%, diaduk 1 jam pada suhu 0°C, endapan dipisahkan dengan sentrifugasi pada 20.000g, 30 menit. Supernatan dijenuhkan sampai 80% dengan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , diaduk 1 jam pada 0°C dan endapan diambil dengan sentrifugasi. Endapan dilarutkan kembali dan dihilangkan garamnya dengan kolom filtrasi gel PD-10. Pemurnian selanjutnya menggunakan kromatografi afinitas UDP-asam glukoronat dan HPLC pertukaran ion DEAE pada pH 7,0 dan 8,0. Prosedur ini menghasilkan peningkatan pemurnian enzim 452 kali lipat. Dengan SDS-PAGE diketahui berat molekul enzim 56–58k. Enzim menunjukkan aktivitas optimum pada pH 8,0, dan ion  $\text{Mn}^{2+}$  dapat menstimulasi aktivitas enzim 66% lebih besar daripada aktivitas yang diteliti dengan EDTA. Pengujian aktivitas enzim dilakukan dengan mencampur fraksi enzim dengan UDP-glukosa,  $\text{Mn}^{2+}$  dan  $^{14}\text{C}$ -nomilin (substrat) pada pH 7,0–8,0. Diinkubasi pada 34°C selama 15 atau 30 menit, reaksi dihentikan dengan HCl 1M. Glukosida nomilin diidentifikasi dengan KLT dan diukur radioaktivitasnya.

## 2.6. Tinjauan Tentang *Solanum laciniatum*

### a. Klasifikasi tanaman (Tjitrosoepomo, 1988)

- Divisi : Spermatophyta
- Sub divisi : Angiospermae
- Kelas : Dicotyledonae
- Sub Kelas : Sympetalae
- Bangsa : Tubiflorae (Solanales)
- Suku : Solanaceae
- Marga : Solanum
- Jenis : Solanum laciniatum

### b. Habitat dan Deskripsi Tanaman

#### - Habitat:

Daerah dari ujung utara New Zealand menuju utara sejauh Adelaide

#### - Deskripsi

Tinggi tanaman 1-3 m dengan batang berwarna merah, daun hijau dan bunga biru gelap/ungu. Diameter berukuran hingga 5 cm, pollen 32-42  $\mu\text{m}$ , sedangkan buah 25x30 mm dan kuning pucat

### c. Kandungan Kimia dan Kegunaan Tanaman

Kandungan kimia yang terpenting dalam *Solanum laciniatum* adalah glikoalkaloid solasodin yang mempunyai nilai farmaseutikal tinggi sebagai bahan awal untuk sintesa kortikosteroid dan senyawa kontrasepsi (Conner et al., 1987). Glikoalkaloid yang paling banyak ditemukan adalah solamargin dan solasodin yang terdistribusi dalam buah, daun dan akarnya (Macek et al., 1989). Terdapat juga kandungan kolesterol, kampeserol, stigmasterol, sitosterol, isofucosterol dan diosgenin pada tanaman ini (Indrayanto et al., 1983)

## 2.7. Tinjauan Tentang Metode Analisis PABA dan PABA-glukosida dengan Densitometri

Panjaitan et al. (2000) telah mengembangkan cara yang cepat dan mudah untuk pengujian asam p-aminobenzoat dan  $\beta$ -D-glukosa-1-p-aminobenzoat dalam kultur suspensi sel tanaman dengan densitometri. Metode yang diteliti ini terbukti selektif, presisi dan akurat sehingga dapat digunakan untuk analisis secara rutin.

Medium dilakukan dengan cara mengencerkan 0,5 ml medium dengan metanol 0,5 ml lalu ditotolkan 2  $\mu$ l pada pelat KLT. Sampel medium dan ekstrak sel dalam metanol yang telah ditotolkan pada pelat KLT dielusi dengan campuran eluen etil asetat : metanol : air = 77 : 13 : 10.

Kemurnian dan identifikasi noda analit ditentukan dengan mengukur absorban-reflektan noda pada 270-370 nm dibandingkan terhadap standar. Pengujian secara kuantitatif dilakukan dengan mengukur absorbansi-reflektan noda pada 272 nm. Kondisi pengukuran dengan densitometri Shimadzu CS-930  $\lambda$  ganda adalah lebar celah 2, tinggi celah 4, linear scanning, sensitivitas deteksi sedang/medium.



### III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pada fraksi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  keberapakah mampu mengendapkan PABA-glukosiltransferase sehingga enzim ini mempunyai aktivitas paling besar dan mengetahui pada hari keberapakah sel-sel kultur *Solanum laciniatum* menghasilkan PABA-glukosiltransferase dengan aktivitas terbesar.

Dengan diketahuinya fraksi enzim hasil pengendapan dengan amonium sulfat yang aktivitasnya optimum ini dapat dilakukan pemurnian lebih lanjut sehingga diperoleh PABA-glukosiltransferase murni. PABA-glukosiltransferase yang diperoleh dengan fraksinasi ini juga dapat digunakan untuk biotransformasi PABA secara in vitro tanpa memerlukan peran dari sel-sel kultur *Solanum laciniatum* lagi walaupun aktivitasnya belum terlalu besar sehingga biotransformasi berjalan lebih efisien tanpa pengaruh variasi biologis kultur.

## IV. METODE PENELITIAN

### 4.1. Bahan

#### 4.1.1. Bahan Tanaman

Kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* (kode SL4) berasal dari kultur kalus *Solanum laciniatum* Laboratorium Bioteknologi Farmasi, Bagian Ilmu Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

#### 4.1.2. Bahan-bahan untuk Membuat Media Kultur

Bahan-bahan dan stok larutan untuk media dasar digunakan Murashige Skoog yang dimodifikasi dengan penambahan hormon Kinetin 2 ppm dan NAA 0,5 ppm, di mana bahan-bahannya berasal dari E. Merck dan Sigma dengan derajat kemurnian pro analisa. Penyesuaian pH menggunakan HCl dan NaOH encer, berasal dari HCl pekat dan NaOH padat derajat pro analisa. Pelarut media adalah aquades teknis dan tutup media menggunakan aluminium foil.

#### 4.1.3. Bahan-bahan untuk Ekstraksi dan Uji Aktivitas Enzim

1. *Polyvinylpolypirrolidone* (PVPP), UDP-glukosa, *Para Amino Benzoic Acid* (PABA), Sigma dengan derajat kemurnian pro analisa
2. Bahan untuk buffer adalah Trizma Hydrochloride, Sigma dengan derajat kemurnian pro analisa.
3. Standar  $\alpha$ -D-glukosa-1-*p*-aminobenzoat (PABA-glikosida) diperoleh dari isolasi sel *Solanum mammosum* L hasil biotransformasi dan telah dielusidasi strukturnya.
4. Metanol, Etil asetat, dan Aseton, Riedel de Haën dengan derajat kemurnian pro analisa
5. Amonium Sulfat, Riedel de Haen dengan derajat kemurnian pro analisa
6. HCl derajat kemurnian pro analisa
7. Pelat kromatografi lapis tipis Kieselgel 60 F<sub>254</sub> 0,2 mm (Merck)
8. Kertas saring, tabung efendof

## 4.2. Alat

1. Alat-alat gelas dan logam
2. Neraca analitik *Sartorius L 4205*
3. *pH meter Fisher Accument model 230 A*
4. *25 L American Portable Autoclave WAV Co. Inc.*
5. *Laminar Air Flow Cabinet (L AFC) Bassaire, model S-4 nomor serial S 4645.*
6. *Rotary Shaker ( $\pm 100$  rpm) dengan disinari 2 buah lampu TL 40 Watt ( $\pm 2000$  lux)*
7. Mikropipet dan kapiler 2  $\mu$ l
8. *TLC Scanner Shimadzu model CS 930*
9. *Centrifuge*
10. Mortir dan Stamper
11. *Hair Dryer*
12. *Vortex Thermolyne (subsidiary of Syborn), Type 16700 mixer*
13. *Waterbath shaker*
14. Corong Buchner
15. *Magnetic stirrer & hot plate*
16. *Sonifier, Refrigerated Centrifuge*
17. Lampu UV 254 nm

## 4.3. Metode Penelitian

### 4.3.1. Pembuatan Media Kultur Sel *Solanum lacinatum*.

Media kultur adalah Media Murashige-Skoog (Wetter, 1982) yang dimodifikasi dengan penambahan hormon pertumbuhan kinetin 2 ppm dan NAA 0,5 ppm.

Cara pembuatan 1 liter media kultur *Solanum laciniatum*:

1. Diambil 10 ml volume tertentu larutan stok media MS sesuai dengan komposisi media MS masukkan dalam gelas piala 1 Liter. Ditambahkan 20 ml larutan hormon kinetin (kadar larutan stok 1 mg/ 10 ml) dan 10 ml larutan NAA (kadar stok 0,5 mg/10 ml) sehingga diperoleh kadar kinetin pada media sebesar 2 ppm dan NAA sebesar 0,5 ppm.

2. Ditambahkan bahan-bahan padat yaitu 1 g kasein, 100 mg mio-inositol inaktif, dan 30 g sukrosa, diaduk sampai larut. Ditambahkan akuades sampai volumenya mendekati 1 Liter ( $\pm$  950 ml).
3. Dicek pH-nya, mula-mula dengan kertas indikator pH universal, kemudian dengan pH meter. Media diatur pada pH 5,6 -5,7 dengan penambahan HCl 0,1N atau NaOH 0,1 N sampai tercapai pH tersebut.
4. Dipindahkan ke gelas ukur, ditambahkan akuades sampai tepat 1 liter, diaduk homogen, kemudian disaring.
5. Media dibagi-bagi ke dalam erlenmeyer, masing-masing 50 ml (diperoleh 20 buah media), lalu ditutup dengan alumunium foil.
6. Media disterilisasi dengan cara pemanasan basah menggunakan autoklaf dengan suhu sterilisasi 121 °C selama 25 menit

#### 4.3.2. Kultivasi Kultur Suspensi *Solanum lacinatedum*.

Kultur suspensi ini dibuat dengan memindahkan kurang lebih 5 gram sel kalus dari media padat ke media cair dalam erlenmeyer. Kultur ditempatkan pada ruang kultur dan diagitasi pada shaker dengan kecepatan  $\pm$  100 rpm. Subkultur dilakukan setiap 7 hari sekali.

Kultivasi kultur suspensi dilakukan di dalam LAFC dengan cara:

1. LAFC dibersihkan dengan alkohol 70%. Peralatan-peralatan yang akan dipakai dan media steril disemprot dengan alkohol 70% dan dimasukkan ke dalam LAFC. Aliran udara dan lampu UV dinyalakan selama 20 menit.
2. Lampu UV dimatikan, dinyalakan lampu TL. Bagian luar wadah kultur yang akan dikultivasi (erlenmeyer) disemprot dengan alkohol 70% dan dimasukkan dalam LAFC. Tutup wadah dibuka dengan pinset dan mulut wadah disterilkan dengan dipanasi pada pembakar spiritus.
3. Kira-kira 10 gram kultur dipindahkan ke media baru dengan sendok steril (dengan dipanasi sebelumnya pada pembakar spiritus).
4. Mulut wadah disterilkan kembali dengan dipanasi dan ditutup dengan alumunium foil yang telah disterilkan dengan pembakar spiritus. Bagian mulut wadah yang ditutup alumunium foil disterilkan lagi dengan dipanasi pada pembakar spiritus.

#### 4.3.3. Metode Ekstraksi Enzim dengan Menggunakan Pengendap Amonium Sulfat pada Berbagai Konsentrasi

Pada metode ini ekstraksi dilakukan secara nonsteril dan suhu selama pengerjaan dijaga pada 0 - 4°C dengan bantuan nitrogen cair/dry ice; dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Farmasi FUA. Langkah-langkah ekstraksi:

1. Kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* ( $\pm$  3 erlenmeyer kultur hari ke 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 dan 15) disaring dengan corong Buchner, lalu ditimbang sebanyak 50 gram.
2. Sel-sel kultur dibekukan kemudian digerus dengan mortir dan stamper sampai diperoleh serbuk kultur yang halus, kemudian segera dicampurkan PVPP 10 % (5 gram) untuk menjaga stabilitas enzim dengan cara menghilangkan komponen fenolik.
3. Ditambahkan Buffer Tris HCl pH 6 (hasil optimasi oleh Putra, 2000) 1,5 kali berat sel (75 ml), diaduk sampai homogen. Buffer Tris yang digunakan mengandung PMSF 0,1 mM dan Gliserol 2,5 %.
4. Disentrifugasi  $\pm$  3500 rpm selama 1 jam. Supernatan diambil sebanyak 50 g kemudian ditambahkan dengan Ammonium sulfat 20 % dari berat supernatannya (10 g) sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan menggunakan stirer (Kondisi tetap dingin). Sisa supernatan yang tidak ditambah dengan Amonium sulfat disebut sebagai enzim gubal.
5. Hasil dari penambahan supernatan tersebut (1) disentrifuse kembali  $\pm$  3500 rpm selama 1 jam . Pisahkan supernatan dari endapannya dan timbang berat supernatan yang didapatkan dari sentrifuse tersebut, lalu tambahkan Amonium sulfat 30 % dari berat supernatannya sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan stirer. Lakukan sentrifuse kembali  $\pm$  3500 rpm selama 1 jam.
6. Ulangi prosedur diatas (5) untuk penambahan amonium sulfat 40 %, 50 % dan 60 %
7. Setelah selesai semua hingga fraksi amonium sulfat 60 %, masing-masing endapan dari tiap-tiap fraksi enzim (0-60%) dilarutkan kembali dengan 1 ml buffer. Dinamakan sebagai fraksi enzim 0-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50% dan 50-60%

#### 4.3.4. Pengujian aktivitas enzim hasil ekstraksi

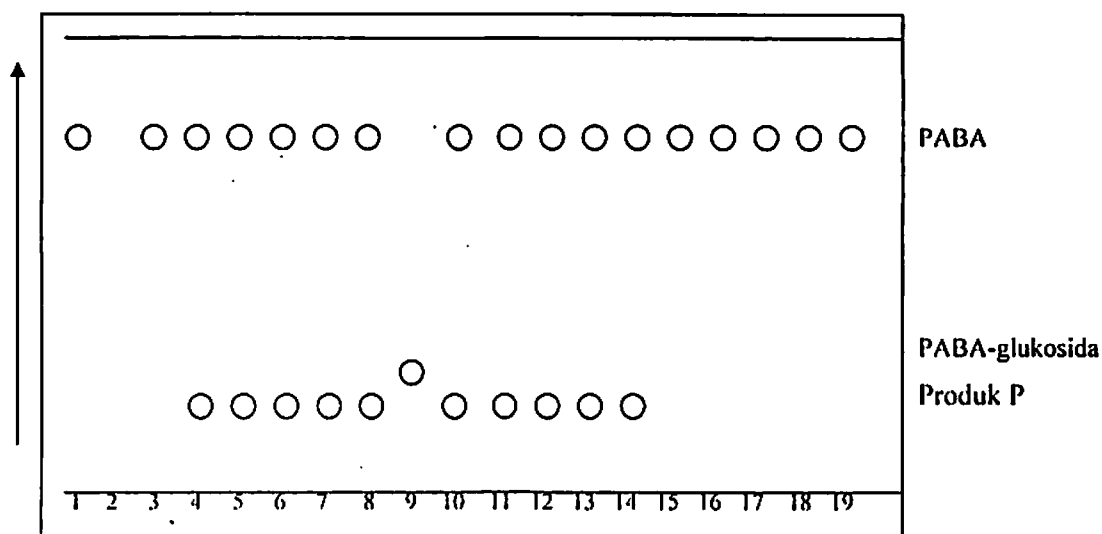
1. Ekstrak enzim gubal dan fraksi enzim dari 0-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50% dan 50-60% masing-masing diambil sebanyak 180  $\mu$ l, ditambahkan 60  $\mu$ l 7,3 mM PABA kemudian ditambah 60  $\mu$ l 7,3 mM UDP-Glukosa dan 340  $\mu$ l Buffer tris HCl, dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 2 jam pada *waterbath shaker*.
2. Reaksi dihentikan dengan pemberian 360  $\mu$ l aseton, dihomogenkan dengan vortex.
3. Diambil 4  $\mu$ l larutannya, ditotolkan pada lempeng KLT. Sebagai standar ditotolkan larutan PABA-glikosida dalam buffer sebanyak 4  $\mu$ l pada lempeng yang sama. Sebagai pembanding digunakan 180  $\mu$ l buffer tris yang ditambahkan 60  $\mu$ l 7,3 mM PABA dan 60  $\mu$ l 7,3 mM UDP-glukosa dengan perlakuan seperti pada langkah 1 dan 2.
4. Diekluasi dengan eluen Etil Asetat : Metanol : Air = 77 : 13 : 10. Noda dilihat dibawah Lampu UV 254 nm. Nilai  $R_f$  dan spektra noda produk hasil uji aktivitas dibandingkan dengan standar PABA-glikosida.  
(Dombrowski dan Alfermann, 1992, yang dimodifikasi)

## V. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1. Optimasi Enzim

Masing-masing fraksi enzim dari 0-60% diinkubasi bersama substrat PABA, UDP-Glukosa dan Buffer tris HCl. Kemudian hasilnya dianalisis dengan KLT. Sebagai kontrol dilakukan berbagai perlakuan yaitu Blanko (PABA + UDP Glukosa + Larutan dapar tris), PABA, dan UDP-glukosa. Sebagai standar digunakan PABA-Glukosida hasil biotransformasi.

Dalam penelitian ini jumlah ekstrak kasar atau fraksi enzim yang ditambahkan sebanyak 180  $\mu$ l, jumlah substrat PABA 60  $\mu$ l dengan konsentrasi 7,3 mM dan jumlah UDP-glukosa sebanyak 60  $\mu$ l dengan konsentrasi 7,3 mM.



Gambar 1. Analisis KLT dari uji aktivitas enzim hasil fraksinasi dengan kontrolnya. Pemisahan dengan KLT menggunakan fasa diam Silika Gel 60 F<sub>254</sub>, fasa gerak campuran etil asetat : metanol : air = 77 : 13 : 10. penampak noda menggunakan sinar UV

Keterangan tiap lajur eluasi :

|                        |                      |                       |                       |
|------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1. PABA                | 6. Fraksi 0-20% II   | 11. Fraksi 20-30% III | 16. Fraksi 40-50% II  |
| 2. UDP                 | 7. Fraksi 0-20% III  | 12. Fraksi 30-40% I   | 17. Fraksi 40-50% III |
| 3. Blanko              | 8. Fraksi 20-30% I   | 13. Fraksi 30-40% II  | 18. Fraksi 50-60% I   |
| 4. Ekstrak enzim gubal | 9. PABA glukosida    | 14. Fraksi 30-40% III | 19. Fraksi 50-60% II  |
| 5. Fraksi 0-20% I      | 10. Fraksi 20-30% II | 15. Fraksi 40-50% I   |                       |

Pada hasil inkubasi fraksi enzim dari 0-40% dengan PABA dan UDP-glukosa (gambar 1) didapatkan bahwa fraksi enzim menghasilkan 2 noda yaitu Produk P (produk baru hasil biotransformasi) dan PABA yang belum tertransformasi. Sedangkan hasil inkubasi ekstrak enzim gubal dengan PABA dan UDP-Glukosa juga menghasilkan 2 noda yang sama. Hal ini terjadi karena Produk P tersebut bisa berasal dari transformasi PABA bersama UDP-Glukosida dan transformasi PABA-Glukosida. Tetapi pada fraksi enzim 40-50 % dan 50-69 % diperoleh hasil satu noda karena pada fraksi tersebut sudah tidak terjadi proses biotransformasi sehingga noda yang tampak adalah sisa PABA yang belum tertransformasi.

Tabel 1. Hasil penghitungan jarak noda dan harga Rf pada optimasi antara % penjuhan ekstrak kasar enzim dengan amonium sulfat terhadap luas area noda produk P dan aktivitas relatifnya yang dianalisis dengan KLT-densitometer pada  $\lambda$  272 nm. Lempeng KLT yang digunakan dengan fasa diam Silika Gel 60 F<sub>254</sub> dan fasa gerak etil asetat : metanol : air = 77 : 13: 10.

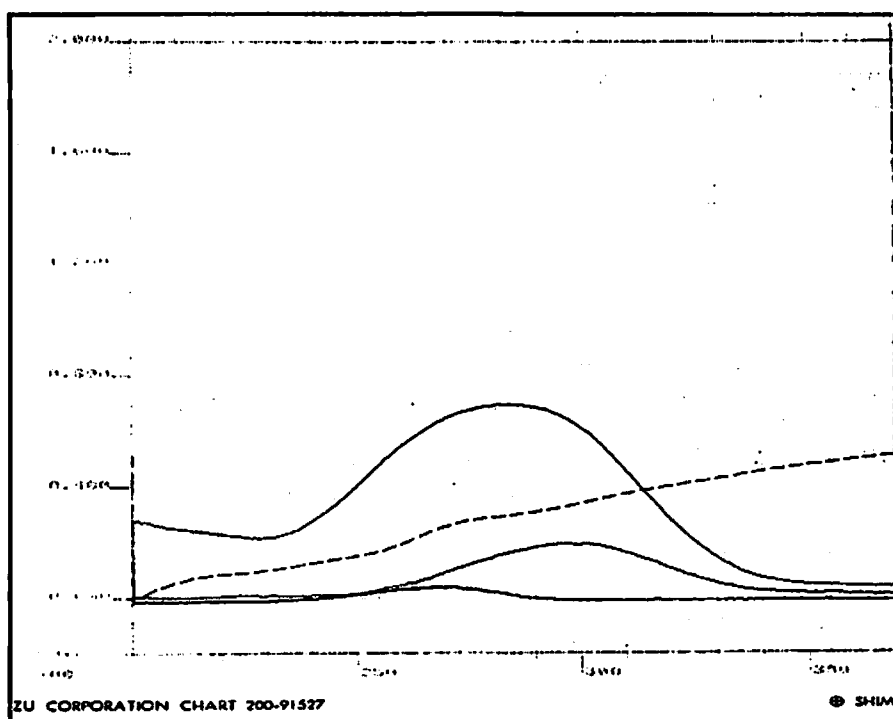
| Senyawa             | Replikasi I<br>Berat = 50.005 g |       | Replikasi II<br>Berat = 50.008 g |       | Replikasi III<br>Berat = 50.001 g |       |
|---------------------|---------------------------------|-------|----------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|
|                     | Jarak Noda                      | Rf    | Jarak noda                       | Rf    | Jarak noda                        | Rf    |
| PABA                | -                               | -     | -                                | -     | -                                 | -     |
| UDP                 | -                               | -     | -                                | -     | -                                 | -     |
| Blanko              | -                               | -     | -                                | -     | -                                 | -     |
| PABA glukosida      | 38.3                            | 0.479 | -                                | -     | -                                 | -     |
| Ekstrak kasar enzim | 34.9                            | 0.436 | 34.5                             | 0.431 | 34.7                              | 0.434 |
| Fraksi enzim 0-20%  | 34.4                            | 0.430 | 34.6                             | 0.432 | 34.4                              | 0.430 |
| Fraksi enzim 20-30% | 34.3                            | 0.429 | 34.5                             | 0.431 | 34.6                              | 0.432 |
| Fraksi enzim 30-40% | 34.7                            | 0.434 | 34.6                             | 0.432 | 34.7                              | 0.434 |
| Fraksi enzim 40-50% | -                               | -     | -                                | -     | -                                 | -     |
| Fraksi enzim 50-60% | -                               | -     | -                                | -     | -                                 | -     |

$$*Rf = \frac{\text{Jarak noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}}$$



Dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (etil asetat : metanol : air = 77 : 13 : 10), senyawa-senyawa hasil inkubasi bisa terpisahkan dengan baik, tidak saling tumpang tindih dan Rf noda-noda yang ada terletak dalam kisaran 0,429 - 0,436 (tabel 1) sedangkan Rf standar PABA-glukosida adalah 0.479. Harga Rf Produk P lebih kecil dari Rf PABA-Glukosida yang berarti Produk P lebih polar daripada PABA-Glukosida, reaksi biotransformasi PABA-Glukosida menjadi Produk P mungkin merupakan suatu reaksi penempelan gugus yang bersifat polar.

Kromatogram antara Produk P dengan PABA-Glukosida pada  $\lambda$  200-400 nm memperlihatkan profil dan  $\lambda$  maks yang sedikit berbeda. Jadi Produk P tidak identik dengan PABA-Glukosida hasil biotransformasi tapi Produk P mungkin suatu senyawa glukosida dari PABA karena produk ini terbentuk bila ada PABA, fraksi enzim dan UPD-Glukosa diinkubasi bersama-sama



Gambar 2. Kromatogram dari : PABA-glukosida, Produk P dan PABA, diukur dengan densitometer pada  $\lambda$  200-400 nm. Pemisahan noda menggunakan KLT dengan fasa diam Silika Gel 60 F<sub>254</sub> dan fasa gerak etil asetat : metanol : air = 77 : 13 : 10

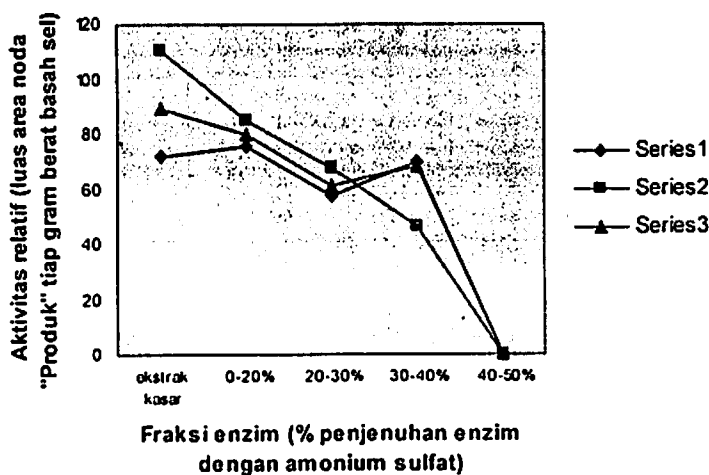
Keterangan :

1. Kromatogram PABA-Glukosida
2. Kromatogram Produk P
3. Kromatogram PABA

Tabel 2. Hasil optimasi antara % penjuanan ekstrak kasar enzim dengan amonium sulfat terhadap luas area noda produk P dan aktivitas relatifnya yang dianalisis dengan KLT-densitometri pada  $\lambda$  272 nm. Lempeng KLT menggunakan fasa diam Silika Gel 60 F<sub>254</sub> dan fasa gerak etil asetat : metanol : air = 77 : 13: 10

| Fraksi Enzim        | Replikasi I<br>Berat = 50.005 g |                   | Replikasi II<br>Berat = 50.008 g |                   | Replikasi III<br>Berat = 50.001 g |                   |
|---------------------|---------------------------------|-------------------|----------------------------------|-------------------|-----------------------------------|-------------------|
|                     | Luas Area                       | Aktivitas Relatif | Luas Area                        | Aktivitas Relatif | Luas Area                         | Aktivitas Relatif |
| Ekstrak kasar enzim | 3614.2                          | 72.2833           | 5518.8                           | 110.3742          | 4472.9                            | 89.4562           |
| Fraksi enzim 0-20%  | 3799.6                          | 75.9912           | 4267.7                           | 85.3526           | 4002.6                            | 80.0504           |
| Fraksi enzim 20-30% | 2859.2                          | 57.1834           | 3288.8                           | 67.7749           | 3052.3                            | 61.0048           |
| Fraksi enzim 30-40% | 3508.9                          | 70.1773           | 2312.0                           | 46.2393           | 3418.7                            | 68.3726           |
| Fraksi enzim 40-50% | -                               | -                 | -                                | -                 | -                                 | -                 |
| Fraksi enzim 50-60% | -                               | -                 | -                                | -                 | -                                 | -                 |

\*Aktivitas Relatif =  $\frac{\text{Luas Area}}{\text{Berat kultur (g)}}$



Gambar 3. Tiap-tiap fraksi enzim diinkubasi bersama PABA dan UDP-glukosa. Hasilnya dipisahkan dengan KLT dan noda Produk P yang terbentuk diukur luas areanya dengan densitometer

Dari tabel 2 dapat disimpulkan bahwa aktivitas terbesar terjadi pada fraksi enzim 0-20%. Perhitungan aktivitas relatif enzim pada penelitian ini berdasarkan luas area noda Produk P dan berat basah sel kultur yang terekstraksi. Digunakan

luas area noda karena senyawa Produk P belum diidentifikasi sehingga tidak ada zat standar yang bisa dibuat kurva bakunya. Didasarkan pada berat basah sel kultur karena pada saat ekstraksi kasar enzim (penggerusan) ditambahkan sejumlah PVPP sehingga berat kering sel kultur yang terekstraksi tidak bisa diketahui secara pasti.

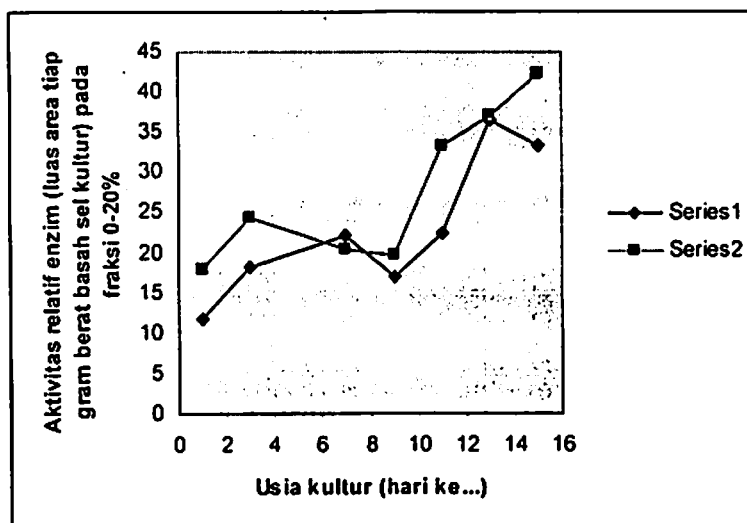
Aktivitas relatif ekstrak enzim gubal hasilnya lebih besar dibandingkan yang telah difraksinasi dengan amonium sulfat karena pada ekstrak enzim gubal mengandung banyak sekali jenis enzim di dalamnya, bukan hanya satu protein sehingga aktivitasnya besar.

## 5.2.Optimasi Usia Kultur

Pada uji optimasi usia kultur, hasil eluasi KLT dari tiap-tiap titik menghasilkan 2 noda yaitu Produk P dan PABA yang belum tertransformasi. Rf dan spektranya masing-masing sama seperti pengujian awal (optimasi fraksi % penjuenan). Produk P muncul pada semua usia kultur yang diuji.

Tabel 3. Hasil optimasi antara usia kultur (pada fraksi 0-20 %) terhadap luas area noda produk P hasil inkubasi dan aktivitas relatifnya yang dianalisis dengan KLT-densitometri pada  $\lambda$  272 nm. Lempeng KLT menggunakan fasa diam Silika Gel 60 F<sub>254</sub> dan fasa gerak etil asetat : metanol : air = 77 : 13: 10

| Usia Kultur (hari ke..) | Replikasi I  |           |                   | Replikasi II |           |                   |
|-------------------------|--------------|-----------|-------------------|--------------|-----------|-------------------|
|                         | Berat Kultur | Luas Area | Aktivitas Relatif | Berat Kultur | Luas Area | Aktivitas Relatif |
| 1                       | 50.6860      | 591.4     | 11.6679           | 50.1950      | 902.6     | 17.9819           |
| 3                       | 50.3266      | 911.2     | 18.1057           | 50.4803      | 1227.6    | 24.3184           |
| 7                       | 50.1885      | 1114.8    | 22.2123           | 50.1989      | 1027.7    | 20.4726           |
| 9                       | 50.0026      | 845.9     | 16.9171           | 50.0560      | 986.6     | 19.7100           |
| 11                      | 50.0232      | 1119.3    | 22.3756           | 50.0502      | 1661.3    | 33.1927           |
| 13                      | 50.1641      | 1832.8    | 36.5361           | 50.0984      | 1849.8    | 36.9233           |
| 15                      | 50.1606      | 1669.4    | 33.2811           | 50.1746      | 2125.0    | 42.3521           |



Gambar 4. Sel-sel kultur yang telah dipindahkan ke media baru, setelah 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 dan 15 hari diambil enzimnya pada fraksi 0-20% kemudian diinkubasi bersama PABA dan UDP-glukosa. Luas area noda produk P pada lempeng KLT diukur dengan densitometer dan dipakai untuk menghitung aktivitas relatif

Dari tabel 3 dan gambar 4 diperoleh hasil bahwa kultur usia ke 13 pada fraksi enzim 0-20% memberikan aktivitas tertinggi. Hal ini terjadi karena pada kultur yang terlalu muda produksi enzim oleh sel-sel kultur belum terlalu banyak. Usia sel kultur yang masih muda mengalami fase adaptasi sehingga sel kultur masih menyesuaikan dengan media pertumbuhannya yang baru walaupun dengan komposisi media yang sama. Pada tahap ini reaksi biologis di dalam sel kultur belum terlalu banyak dan sintesa enzim pun belum banyak dihasilkan, sehingga aktivitas enzim masih rendah.

Dari grafik diatas terlihat bahwa aktivitas relatif enzim pada hari ke-9 sampai hari ke-15 relatif lebih tinggi daripada aktivitas enzim minggu pertama (hari ke-1 sampai hari ke-7). Hal ini menunjukkan kemungkinan kultur suspensi sel *Solanum lacinitum* pada usia yang masih muda membutuhkan fase adaptasi yang lebih lama sehingga aktivitas enzimnya belum terlalu tinggi. Memasuki hari ke-9, terjadi peningkatan aktivitas enzim, hal ini dikarenakan kultur sel telah memasuki fase pertumbuhan dimana kebutuhan energi lebih banyak daripada fase sebelumnya. Proses pembentukan energi ini tentu saja melibatkan banyak enzim untuk mengkatalisis reaksi kimia dalam sel tanaman untuk pertumbuhannya. Pada hari ke-13 dicapai aktivitas enzim tertinggi dimana

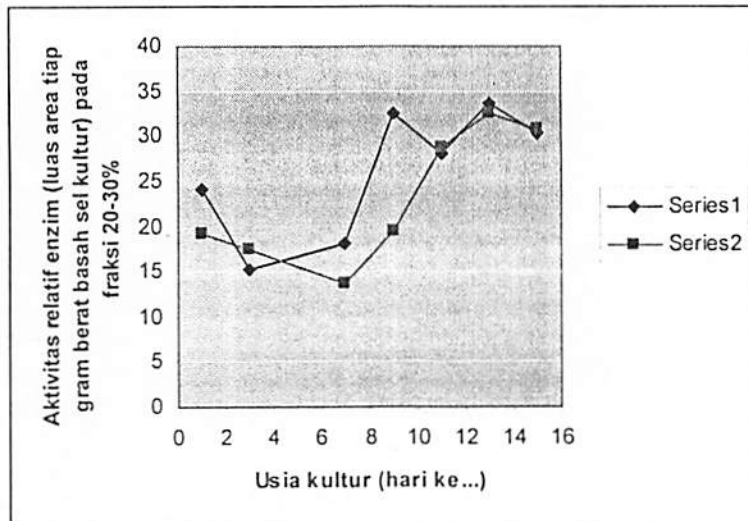
kemungkinan pertumbuhan dari kultur sel telah optimal. Pada hari ke-15 mulai terjadi penurunan aktivitas enzim karena kultur sel telah memasuki fase stasioner yang kemudian akan memasuki fase kematian. Pada fase ini pertumbuhan sudah tidak terjadi karena nutrisi di dalam medium dan energi sudah mulai habis sehingga tidak banyak reaksi kimia yang terjadi dalam sel. Namun pada hari ke-15 replikasi 2 aktivitas enzim meningkat daripada pada replikasi 1, hal ini terjadi karena pada saat fraksinasi mungkin ada protein sel tanaman tidak terendapkan dengan sempurna sehingga menambah jumlah aktivitas enzim.

Tabel 4. Hasil optimasi antara usia kultur (pada fraksi 20-30 %) terhadap luas area noda produk P hasil inkubasi dan aktivitas relatifnya yang dianalisis dengan KLT- densitometri pada  $\lambda$  272 nm. Lempeng KLT menggunakan fasa diam Silika Gel 60 F<sub>254</sub> dan fasa gerak etil asetat : metanol : air = 77 : 13 : 10

| Usia Kultur (hari ke..) | Replikasi I  |           |                   | Replikasi II |           |                   |
|-------------------------|--------------|-----------|-------------------|--------------|-----------|-------------------|
|                         | Berat Kultur | Luas Area | Aktivitas Relatif | Berat Kultur | Luas Area | Aktivitas Relatif |
| 1                       | 50.6860      | 1216.7    | 24.0047           | 50.1950      | 964.9     | 19.2230           |
| 3                       | 50.3266      | 765.6     | 15.2106           | 50.4803      | 884.3     | 17.5177           |
| 7                       | 50.1885      | 906.8     | 18.0679           | 50.1989      | 692.1     | 13.7872           |
| 9                       | 50.0026      | 1624.3    | 32.4843           | 50.0560      | 977.9     | 19.5361           |
| 11                      | 50.0232      | 1407.8    | 28.1429           | 50.0502      | 1433.8    | 28.6472           |
| 13                      | 50.1641      | 1683.3    | 33.5559           | 50.0984      | 1632.0    | 32.5759           |
| 15                      | 50.1606      | 1513.6    | 30.1751           | 50.1746      | 1541.5    | 30.7227           |

Pada penelitian ini dihitung aktivitas relatif enzim berdasarkan luas area noda Produk-P dan berat basah kultur yang diekstraksi. Digunakan luas area noda Produk-P karena senyawa Produk-P belum diidentifikasi, sehingga tidak ada zat standar untuk kurva bakunya. Didasarkan berat basah sel kultur karena pada saat ekstraksi (penggerusan) ditambahkan sejumlah PVPP sehingga berat kering sel kultur yang diekstraksi tidak diketahui secara pasti. Metode pengujian aktivitas enzim dapat ditentukan berdasarkan dua hal yaitu laju reaksi katalisis enzim (menghitung laju reaksi katalisis enzim dengan menghitung kadar produk yang terbentuk atau menghitung kadar substrat yang hilang selama reaksi

berlangsung setiap waktu) dan aktivitas spesifik (unit enzim tiap mg protein) bertujuan untuk mengetahui tingkat kemurnian enzim. Pada penelitian ini digunakan metode pertama yaitu dengan menghitung kadar produk yang terbentuk saat reaksi enzimatik berlangsung.



Gambar 5. Sel-sel kultur yang telah dipindahkan ke media baru, setelah 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 dan 15 hari diambil enzimnya pada fraksi 20-30% kemudian diinkubasi bersama PABA dan UDP-glukosa. Luas area noda produk P pada lempeng KLT diukur dengan densitometer dan dipakai untuk menghitung aktivitas relatif

Untuk membuktikan bahwa aktivitas relatif enzim yang terbesar terjadi pada usia ke 13, selain dilakukan pengujian pada kultur fraksi enzim 0-20% juga dilakukan penghitungan aktivitas relatif usia kultur pada fraksi 20-30%. Ternyata dari tabel 4 dan gambar 5 fraksi enzim 20-30 % mempunyai aktivitas relatif enzim terbesar juga pada kultur usia ke 13. Profil kurva aktivitas enzim pada fraksi 0-20% dan 20-30% terlihat mirip dimana aktivitas relatif enzim pada minggu I (hari ke-1 sampai ke-7) lebih rendah dibandingkan pada minggu ke-2 (hari ke-9 sampai ke-15)

Selain itu dilakukan perbandingan besar aktivitas antara fraksi enzim 0-20 % dengan fraksi enzim 20-30 % pada usia ke 13, dimana harga aktivitas relatif enzim terbesar pada fraksi enzim 0-20% yaitu 36.5361 dan 36.9233 sedangkan aktivitas relatif enzim pada fraksi 20-30% adalah 33.5559 dan 32.5759.

## VI. KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil suatu kesimpulan :

1. PABA-glukosiltransferase (ditunjukkan dengan keberadaan Produk P, produk baru hasil reaksi biotransformasi) mempunyai aktivitas terbesar pada fraksi enzim 0-20 %
2. Sel-sel kultur *Solanum laciniatum* menghasilkan PABA-glukosiltransferase (Produk P) dengan aktivitas terbesar jika diambil dari sel kultur usia ketiga belas

### 6.2. Saran

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan disarankan untuk :

1. Dilakukan identifikasi Produk P dengan menggunakan NMR atau Maldi Thoff sehingga diketahui stuktur kimianya
2. Fraksi enzim yang telah diperoleh perlu dimurnikan lebih lanjut dengan menggunakan filtrasi gel atau cara-cara kromatografi lainnya
3. Dilakukan penghitungan kadar protein dalam fraksi enzim dengan menggunakan metode lowry sehingga diperoleh aktivitas protein secara absolut di dalam masing-masing fraksi enzim.

## DAFTAR PUSTAKA

- Barz, W., Schlepffhorst, Wilhem, P., Kratzl, K., Tengler, E., (1978) Metabolism of Benzoic Acids and Phenols in Cell Suspension Cultures of Soybean and Mung Bean. *Z. Naturf.* 33c, 363-367.
- Cave, A. (1986) Methodology Reserach on Medicinal Plants , in : Barton, D. And Ollis, W.D. (Eds) *Advances Medicinal Phytochemistry*, John Libbey, London, 47-56.
- Dombrowski, K., Alfermann, A.W. (1992) Biotransformation of Salicylic acid Derivatives by Plant Cell Suspension Cultures, *Planta Medica*, 58, A576-A577.
- Dougal, D.K., LaBrake, S., and Whitten, G.H., (1983 a), The Effects of Limiting Nutrients, Dilutions Rate, Culture pH, and Temperature on The Yield Constant and Antocyanin Accumulation of Carrot Cells Grown in Semicontinuous Chemostat Cultures, *Biotechno. Bioeng.* P. 569-579.
- Dougal, D.K., LaBrake, S., and Whitten, G.H., (1983 b), Growth and Anthocyanin Accumulation Rates of Carrot Suspension Cultures Grown with Excess Nutrients after Semicontinuous Culture with Different Limiting Nutrients at Several Dilutions Rate, pH, and Temperatures, *Biotechno. Bioeng.* (25), p.581-594.
- Englard, S., Scifter, S. (1990) *Precipitation Techniques In Deutscher, M.P* (ed) Guide to Protein Purification, San Diego, Academic Press, Inc., 291
- Furuya, T., Ushiyama, M., Asada, Y., Yoshikawa, T., Orihara, Y., (1988) Biotransformation of phenylacetic acid and 2-phenyl-propionic acid in suspension culture of *Coffea arabica*, *Phytochemistry*, 27, 803-807.
- Furuya, T., Ushiyama, M., Asada, Y., Yoshikawa, T. (1989) Biotransformation of 2-Phenylpropionic Acid in Root Culture of *Panax Ginseng*, *Phytochemistry*, 28, 483-487.
- Hasegawa, S., Suhadya C., Hsu., Robertson, G., (1997) Purification of Limonoid Glucosyltransferase from Navel Orange Albedo Tissue, *Phytochemistry*, 46 (1) : 33-37
- Indrayanto, G., Isnaeni, Sutarjadi. (1983) Sterols in callus cultures of *Solanum mammosum*, *Planta Medica*, 5, 413.
- Indrayanto, G., Rahman A., 1990, Biotransformation by Plant Cell Cultures, *Buletin ISFI*, vol. 20 (1-2), p. 18-25.
- Indrayanto, G., Syahrani, A., Sondakh, R., Utami, W., *Solanum mammosum* : In Vitro Cultures and The Production of Steroid alkaloids and other secondary metabolite. in : Bajaj YPS (Ed.), *Medicinal and Aromatic Plants X*, Springer Verlag, Heidenburg-New York. (in press)
- Kutney, J.P. (1993) Plant Cell Culture and Synthetic Chemistry Route to Clinically Important Compound, in : Downum et al. (Eds), *Phytochemical Potential of Tropical Plants*, Plenum Press, New York, 235-265.
- Li, S. M., Wang, Z. X., Heide, L., (1997), Purification of 4-Hydroxybenzoate Glucosyltransferase from Cell of *Lithospermum crythrorhizon*, *Phytochemistry*, vol. 46 (1) : 27-32.



- Lutterbach, R., and Stöckigt, J., (1992) High yield formation of arbutin from hydroquinone by cell suspension cultures of *Rauwolfia serpentina*, *Helvetica Chimica Acta*, 75, 2009-2011.
- Lutterbach, R., and Stöckigt, J., (1993) p-Hydroxyphenyl-O- $\beta$ -D-primeveroside, A novel glycoside formed from hydroquinone by cell suspension cultures of *Rauwolfia serpentina*, *Journal of Natural Product*, 56 (8), 1421-1422.
- Mizukami, H., Terao, T., Amano, A., Ohashi, H., (1985), Partial Purification and Characterization of UDP-Glucose: Salicyl Alcohol Glucosyltransferase from *Gardenia jasminoides* Cell Culture, *Planta Medica*, 46: p. 104-107
- Mizukami, H., Terao, T., Amano, A., Ohashi, H., (1986), Glucosylation of Salicyl Alcohol by *Gardenia jasminoides* Cell Cultures, *Plant Cell Physiology*, 27 (4) : 645-650.
- Morris, P., Scragg, A., Smart, N., Stafford (1985) A Secondary Product Formation In : Dixon, R.A (ed) *Plant Cell Culture – A Practical Approach* Oxford : IRL Press : 160
- Murray, R., Granner D., Mayes, P., Rodwell, V., (1995) *Biokimia Harper* 22<sup>nd</sup> ed. Alih Bahasa : Hartono, A., Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC : 69-
- Syahrani, A., Indrayanto, G., Sutarjadi, Wilkins, A., (1997a) Bioconversion of Salicylamide by Cell Suspension Cultures of *Solanum mammosum*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 43 (3), 555-557
- Syahrani, A., Indrayanto, G., Sutarjadi, Wilkins, A., (1997b) Glycosylation of Salicyl alcohol by Cell Suspension Cultures of *Solanum mammosum*, *Natural Product Sciences*, 3 (1), 71-74
- Syahrani, A., Ivi, W., Indrayanto, G., Wilkins, A., (1999a) , Biotransformation of salicyl alcohol by Cell Suspension Cultures of *Solanum laciniatum*, *The Journal of Oriental Natural Product Research* 1, 111-117.
- Syahrani, A., Ratnasari, E., Indrayanto, G., and Wilkins, A. (1999c) Biotransformation of *o*- and *p*-aminobenzoic acids and N-acetyl *p*-aminobenzoic acid by cell suspension cultures of *Solanum mammosum* *Phytochemistry*, 51, 615-620.
- Tabata, M., Umetami, Y., Ooya, M., Tanaka, S., (1988): Glucosylation of Phenolic compounds by Plant Cell Cultures, *Phytochemistry*, 27 (3), 809
- Tanaka, S., Hayakawa, K., Umetami, Y., Tabata, M., (1990): Glucosylation of isomeric hydroxybenzoic acid by Cell Suspension Cultures of *Mallotus japonicus*, *Phytochemistry*, 29 (5), 1555-1558.
- Tjitrosoepomo, G (1988) Gambar 5. Sel-sel kultur yang telah dipindahkan ke media baru. setelah 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 dan 15 hari diambil enzimnya pada fraksi 20-30% kemudian diinkubasi bersama PABA dan UDP-glukosa. Luas area noda produk P pada lempeng KLT diukur dengan densitometer dan dipakai untuk menghitung aktivitas relatif, Yogyakarta : Gajah Mada University Press
- Umetami, Y., Tanaka, S., Tabata, M. (1982) Glucosylation of extrinsic compounds by various plant cell culture, in : Fujiwara, A. (Ed.) *Plant Tissue Culture 1982*. Proc. 5th Intl Cong. Plant Tissue Cell Culture, Maruzen-Tokyo., 382-384.
- Umetani, Y., Tanaka, S., Tabata, M., (1986), Glucosylation of Extrinsic Compounds by Various Plant Cell Culture, Proc. 5 th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture. *Plant Tissue Culture*, p. 383-384.

**LAMPIRAN I**  
**KOMPOSISI MEDIA MURASHIGE SKOOG (MS) YANG TELAH**  
**DIMODIFIKASI UNTUK KULTUR SUSPENSI SEL *SOLANUM***  
***LACINIATUM***

| KOMPONEN    |   | JUMLAH (mg/L)  |
|-------------|---|----------------|
| Makroelemen | NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                     | 1.650          |
|             | KNO <sub>3</sub>                                    | 1.900          |
|             | CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O                | 440            |
|             | MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 370            |
|             | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 170            |
| Mikroelemen | FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 27,80          |
|             | Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O              | 37,30          |
|             | MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O                | 22,30          |
|             | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 6,20           |
|             | ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O                | 8,60           |
|             | KI  | 0,83           |
|             | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,25           |
|             | CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                | 0,025          |
|             | CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 0,025          |
|             | Vitamin   | Asam Nikotinat |
| Piridoksin  |   | 0,50           |
| Thiamin HCl |   | 0,10           |
| Fitohormon  | Kinetin   | 2,0            |
|             | NAA   | 0,5            |
| Asam Amino  | Glisin  | 2,0            |
| Bahan Padat | Sukrosa   | 30.000         |
|             | Myoinositol   | 100            |
|             | Casein Hidrolisat                                   | 1.000          |

**LAMPIRAN 2**  
**BIOGRAFI/ DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENELITI**

**Peneliti 1**

Nama : Rr.Retno Widyowati, S.Si, Apt  
 NIP : 132 300 854  
 Tempat tanggal lahir : Tuban, 5 Januari 1977  
 Jenis Kelamin : Perempuan

**Pendidikan**

| No | Tempat pendidikan      | Gelar    | Tahun lulus | Bidang studi |
|----|------------------------|----------|-------------|--------------|
| 1  | Fakultas Farmasi UNAIR | Ssi      | 2001        | Farmasi      |
| 2  | Fakultas Farmasi UNAIR | Apoteker | 2002        | Apoteker     |

**Pengalaman Riset**

| No | Judul riset  | Tahun |
|----|--|-------|
| 1  | Uji Aktivitas Antimalaria Senyawa Diterpen Lakton, <i>Andrographis paniculata</i> , pada stadium gametosit invitro terhadap kultur <i>Plasmodium falcifarum</i>                        | 2000  |
| 2. | Studi Optimasi Fraksinasi Amonium Sulfat pada Percobaan Isolasi PABA Glukosil Transferase dari Kultur Suspensi Sel <i>Solanum laciniatum</i> (Penelitian Dasar, Ketua Peneliti)        | 2004  |
| 3. | Studi Optimasi Fraksinasi Amonium Sulfat pada Percobaan Isolasi OABA Glukosil Transferase dari Kultur Suspensi Sel <i>Solanum laciniatum</i> (Penelitian Dosen Muda, Anggota Peneliti) | 2004  |

**Publikasi**

| No | Judul riset  |
|----|--|
| 1  | Retno Widyowati., I.G.P. Santa, A. Rahman, Indah, Aty W (2003), Uji in Vitro Aktivitas Antimalaria Isolat dari <i>Andrographis paniculata</i> terhadap <i>Plasmodium falcifarum</i> pada stadium gametosit, Majalah Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya  |
| 2  | Hadi Poerwono, Retno Widyowati, Hajime Kubo, Kimio Higashiyama, and Gunawan Indrayanto, Mefenamic acid-Comprehensive Profile, <i>Profiles of Drugs Substances, Excipients and Related Methodology</i> , Vol. 30, Elsevier Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, Submitted |

**Peneliti 2**

Nama : Drs. Achmad Toto Poernomo, Msi, Apt  
 NIP :  
 Tempat dan Tgl.Lahir : Surabaya, 18 September 1959  
 Jenis Kelamin : Pria

**Pendidikan :**

| Nama Sekolah              | Tempat     | Tahun Lulus             |
|---------------------------|------------|-------------------------|
| Fakultas Farmasi UNAIR    | Surabaya   | 1985 ( Sarjana )        |
| Fakultas Farmasi UNAIR    | Surabaya   | 1986 ( Apoteker )       |
| Program Pasca Sarjana UGM | Yogyakarta | 1996 ( Magister Sains ) |

**Pengalaman Riset :**

| Judul Riset  | Tahun     |
|--|-----------|
| ▪ Uji aktivitas proteolitik <i>Streptomyces violaceuniger</i> pada media susu skim-NA (peneliti utama)   | 1994      |
| ▪ <i>Streptomyces griceus</i> ATCC 10137 Amobil dan Karakter Proteasenyanya (peneliti utama)   | 1995      |
| ▪ Optimasi Analisis Kuantitatif Digoksin di dalam Plasma secara Invitro dengan Metode Spektrofluorometri (peneliti anggota)  | 1997      |
| ▪ Uji Aktivitas Enzim Proteolitik Hasil Fermentasi Curah <i>Bacillus subtilis</i> : Tinjauan Terhadap Pengaruh pH, Suhu dan Ion Logam (peneliti utama)   | 1997      |
| ▪ Penetapan Kadar Metil pada Hasil Reaksi DNA dengan N-metil-N- Nitrosourea secara Invitro (peneliti anggota)  | 1998      |
| • Pengaruh (-)-Epigallocatekin Galat The Hijau Pada Sistem Perbaikan DNA:Kajian Terhadap Hambatan Mutasi <i>p53</i> dan Ekspresi <i>p21</i> (peneliti anggota pada DOMESTIC COLLABORATIVE RESEARCH GRANT PROGRAM - 2000) | 2000/2001 |
| ▪ Analisis Protein, Asam Amino, Lemak, Cemaran mikroba dan logam berat dalam daging Keong kol dan Remis (anggota peneliti pada QUE PROJECT BATCH III tahun ke I)   | 2000-2001 |
| ▪ Penentuan kadar alkohol pada produk olahan makanan dengan metode Kromatografi Gas (anggota peneliti pada QUE PROJECT BATCH III tahun ke II)  | 2001-2002 |
| ▪ Produksi Antibiotika Amino Glikosida dengan media ampas tahu (anggota peneliti pada QUE PROJECT BATCH III tahun ke III)  | 2002-2003 |

**Publikasi :**

| No | Judul Riset   |
|----|---|
| 1  | Toto P.A., G. Indrayanto, Sutarjadi (1995), Isolasi Sterol dari Biji <i>Ceiba pentandra</i> Gaertn. Seminar Tumbuhan Obat V, Surabaya.  |
| 2  | Toto P.A., Supardi Wongsosupantio, Endang Sutriswati R., (1996), <i>Streptomyces griceus</i> ATCC 10137 Amobil dan Karakter Proteasenyanya , Seminar Konggres ISFI, Semarang. |

|   |  |
|---|--|
| 3 | Toto,P.A. Karakterisasi Enzim Proteolitik <i>Streptomyces griceus</i> ATCC 10137 Amobil, (1996), Seminar Sehari Dies Natalis Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.                     |
| 4 | Toto,P.A. Proses Penggunaan Ulang Sel <i>Streptomyces griceus</i> ATCC 10137 Amobil untuk Produksi Protease, (1998), Pameran Poster Dies Natalis Fakultas Farmasi UNAIR, Surabaya. |

**Peneliti 3**

Nama : Prof. Dr. Rer. Nat.Gunawan Indrayanto, Apt  
 NIP : 130 541 814  
 Tempat tanggal lahir : Kediri, 27 Maret 1949  
 Jenis Kelamin : Laki-laki

**Pendidikan**

| Tempat Pendidikan                        | Kota/Negara        | Tahun Lulus | Bidang Studi         |
|--|--------------------|-------------|----------------------|
| Fakultas Farmasi UNAIR (S-1)             | Surabaya/Indonesia | 1974        | Ilmu Farmasi         |
| Fakultas Farmasi UNAIR (Apt)             | Surabaya/Indonesia | 1974        | Ilmu Farmasi         |
| Universitas Tubingen<br>(Doctor)         | Tubingen/Jerman    | 1983        | Biologi Farmasi      |
| Universitas Leiden<br>(Post Doctor)      | Leiden/Belanda     | 1989        | Bioteknologi tanaman |
| Universitas Duesseldorf<br>(Post Doctor) | Dusseldorf/Jerman  | 1994        | Bioteknologi tanaman |

**Pengalaman Riset**

| No | Judul Riset  | Tahun     |
|----|--|-----------|
| 1. | G. Indrayanto, A. Syahrani, Sutarjadi, Produksi glikosida salisilat secara biotransformasi dengan kultur suspensi sel <i>S. mammosum</i> dan <i>S. laciniatum</i> , Proyek Penelitian Dasar. | 1996      |
| 2. | A. Syahrani, G. Indrayanto, Sutarjadi, Biotransformasi salisilamida dengan kultur suspensi sel <i>S. mammosum</i> , Penelitian SUDR  | 1995      |
| 3. | G. Indrayanto, L. Rahayu, W. Utami, A. Rahman, Induksi pembentukan steroid pada kultur <i>A. amaniensis</i> , Penelitian Dasar   | 1992      |
| 4. | Isnaeni, G. Indrayanto, N.E. Soegianto, Pengaruh beberapa elisitor terhadap kandungan steroid kalus <i>D. pentaphylla</i> , Penelitian DPPM  | 1991      |
| 5. | W. Utami, G. Indrayanto, A. Rahman, Inisiasi kultur akar <i>Dioscorea spp.</i> dan <i>Solanum spp.</i> Penelitian SPP/DPP  | 1991/1992 |

## Publikasi Internasional :

1. Indrayanto, W. Voelter and E. Reinhard (1983), Steroide and Triterpene in Zellkulturen, *Chemiker Zeitung*, 107, 238-239.
2. G. Indrayanto, N. Cholies and Wahyudi (1985) Influence of fruit size of *Solanum wrightii* on its solasodine content, *Planta Medica*, No5, 470.
3. G. Indrayanto, Isnacni, Sutarjadi (1986) Sterols in callus cultures of *Solanum mammosum*, *Planta Medica* No.5, 413.
4. G. Indrayanto, D.L. Trisna, M.H. Santosa, R. Handayai, T. Agustono and P. Sucipto (1992) Thiamphenicol, in :Brittain, H.G. (ed.) *Analytical Profiles of Drug substances and Excipients, Vol. 22*, Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto pp.461-488.
5. G. Indrayanto, L. Rahayu, A. Rahman, P.E. Noerani (1993) Effect of calcium, strontium and magnesium ions on the formation of phytosteroids in callus cultures of *Agave amaniensis*, *Planta Medica* 59, 97-98.
6. G. Indrayanto and R. Handayani (1993) Quantitative determination of ambroxol hydrochloride in tablets, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 11, 781-784.
7. G. Indrayanto, H. Studiawan and N. Cholies (1994), Isolation and Quantitation of Manogenin and Kammogenin from callus cultures of *Agave amaniensis*, *Phytochemical Analysis*, 5, 24-26.
8. G. Indrayanto, W. Utami, M.H. Santosa and A. Syahrani (1994) Diosgenin, in : Brittain, H.G. (ed.) *Analytical Profiles of Drugs and Excipients, Vol. 23*, Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, pp.99-124.
9. G. Indrayanto, B. Setiawan and N. Cholies (1994) Defferential diosgenin accumulation in *Costus speciosus* and its tissue cultures, *Planta Medica* 60, 483-484.
10. G. Indrayanto, Mugihardjo and R. Handayani (1994) Compatibility study between famotidine and some excipients using Differential Scanning Calorimetry, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 20, 911-920.
11. G. Indrayanto and R. Handayani (1994) Quantitative determination of ambroxol hydrochloride in syrups by RP-HPLC and UV Spectroscopy, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 20, 1639-1647.
12. G. Indrayanto, A. Sunarto and Y. Adriani (1995) Simultaneous assay of phenylpropanolamine HCl, caffeine, paracetamol, glycerylguaiacolate and chlorpheniramine maleate in Silabat<sup>TM</sup> using HPLC with diode array detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 13, 1555-1559.
13. G. Indrayanto, T. Erawati aand M.H. Santosa (1995) Effect of L-arginine, casein hydrolysate, banana powder aand sucrose on growth and solasodine production in shoot cultures of *Solanum laciniatum*, *Plant Cell and Organ Culture*, 43, 237-240.
14. G. Indrayanto, S. Emiliawati, N. Nuryati, Chairunnisa, M.H. Santosa and W. Utami (1996) Influence of Sucrose, calcium ions and Casein hydrolysate on growth aand nitrogen content in shoot cultures of *Agave amaniensis*, *Annales Bogoriensis (New Series)*, 4, 35-440.
15. G. Indrayanto, R. Sondakh, A. Syahrani and W. Utami, (1996) Solasodine, in : Brittain, H.G. (ed.) . *Analytical Profiles of Drugs Substances and*

- Excipients Vol. 24*. Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto pp. 487-522.
16. **G. Indrayanto, W. Utami and A. Syahrani (1996)** *Agave amaniensis*: In vitro cultures and the production of phytosteroids, in : Bajaj, Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 37, Medicinal and Aromatic Plants IX*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 1-15.
  17. **G. Indrayanto (1996)** Simultaneous densitometric determination of dextromethorphan HBr and doxylamine succinate in Syrups and its validation, *Journal of Planar Chromatography*, 9, 282-285..
  18. **G. Indrayanto, R. Sondakh, W. Utami and A. Syahrani, Solanum mammosum**: In vitro cultures and the production of secondary metabolites, in : Bajaj, Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 41, Medicinal and Aromatic Plants Vol. X*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, in Press.
  19. **A. Syahrani, G. Indrayanto, Sutarjadi and A. Wilkins (1997)**, Bioconversion of salicylamide by cell suspension cultures of *Solanum mammosum*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 43:555-557 .
  20. **G. Indrayanto, I. Wahyuningsih and R.Y. Salim**, Simultaneous densitometric determination of betamethasone valerate and clioquinol in cream and its validation. *Journal of Planar Chromatography*, In Press.
  21. **A. Syahrani, G. Indrayanto, A. Wilkins and Sutarjadi**, Glucosylation of salicyl alcohol by cell suspension cultures of *Solanum mammosum*, *Natural Product Science*, In Press.
  22. **G. Indrayanto, A. Syahrani, Moegihaardjo, Soeharyono, T. Liniawati, I. Wahyuningsih, L. Aditama, Pentoxifylline**, in : Brittain, H.G. (ed.), *Analytical Profiles of Drugs Substances and Excipients Vol. 25*, Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto. In Press
  23. **G. Indrayanto, W. Utami and A. Syahrani, Costus speciosus**: In Vitro Cultures, Micropropagation, Production of Diosgenin and other phytosteroids, in : Bajaj, Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Medicinal and Aromatic Plants Vol. .* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, in Press.

#### Daftar Publikasi Nasional/Regional

1. **G. Indrayanto (1994)** Pengaruh beberapa sumber karbon terhadap kecepatan pertumbuhan dan produktivitas relatif hekogenin, *Majalah farmasi Airlangga* 3 (1-2), 32-36. ISSN :0852-1050
2. **G. Indrayanto (1993)** Kemungkinan adanya kesalahan pada penentuan akurasi dengan metoda GC-FID. (Suatu studi dengan menggunakan larutan efedrina HCl). *Majalah Farmasi Indonesia* 4 (3), 94-100. ISSN :0126-1037
3. **G. Indrayanto, S. Palupi, MH.Santosa (1995)** GC-MS analysis of ether extracts from tissue cultures of *Curcuma zedoaria*, *Majalah Farmasi Indonesia* 6 (2), 52-60.
4. **G. Indrayanto, B. Pratainingsih, MH. Santosa (1996)** The influence of molybdate and calcium ions on the sapogenin content in callus cultures of *Agave amaniensis*. *Majalah Farmasi Indonesia* 7 (1), 21-27.

5. W. Utami, J. Rusmawati, IGP. Santa, **G. Indrayanto** (1996) Effect of nitrogen sources in medium on the growth and sapogenin production in callus cultures of *Agave amaniensis*, *Majalah Farmasi Indonesia* 7 (3), 121-126.
6. H. Studiawan, N. Cholies, **G. Indrayanto** (1993) Isolasi Hecogenin dari kalus *Agave amaniensis*, *Jurnal Pasca Sarjana Universitas Airlangga* 4 (1), 352-366. ISSN: 0853 - 0661.
7. **G. Indrayanto** (1994) Metoda validasi pada analisa dengan kromatografi, *Medika* 20 (2), 49-51. ISSN: 0126 - 0901.
8. N. Erma, **G. Indrayanto**, Soemadi (1995) Biotransformasi diosgenin dengan *A. simplex* dan *M. phlei*, *Cermin Dunia Farmasi* 23, 27-30. ISSN : 1025 - 913X.
9. N. Erma, Soemadi, **G. Indrayanto** (1992) Biotransformasi hidrokortison oleh *R. nigricans*, *Medika* 18 (8), 26-31.
10. **G. Indrayanto** (1994) Validasi Metoda analisa dengan kromatografi, *Bulletin ISFI Jatim*, 22, 21-25. ISSN :
11. **G. Indrayanto** (1994) Validation of analysis method II, *Buletin ISFI Jatim* 23, 35-38