

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 E B A R 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.

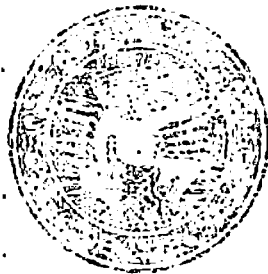
DIBIYAI OLEH DIRJEND PENDIDIKAN TINGGI DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
Sesuai Dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Kegiatan Penelitian Stratnas
Kluster Gizi dan Kesehatan Tahun Anggaran 2008
Nomor: 616/H3.13/PPd/2009 Tanggal: 9 Juli 2009

UNIVERSITAS AIRLANGGA
DESEMBER 2009

KEMENTERIAN KESEHATAN

LAPORAN

HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN SESUAL PRIORITAS NASIONAL BATCH I
(CLUSTER GIZI DAN KESEHATAN)
TAHUN ANGGARAN 2008



UPAYA PENANGANAN PENYAKIT INFeksi
DARI KALUS *Sonchus oleraceus* L.
:
PRODUKSI SENYAWA ANTIMALARIA

TIM PENELITIAN

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

DIPERIKSA OLEH LERJEBID PENDIDIKAN TINGGI DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
Gesual Danyan Satrio Purnomo Petaksono Kesehatan Penelitian Sains
Kluster Gizi dan Kesehatan Tahun Anggaran 2008
Nomor 618/HJ.10.5PR.2008 Tanggal 9 Juli 2008

UNIVERSITAS AIRLANGGA
DESEMBER 2008

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 Sediaan Antimikroba dan Kalus Spons
 2. Ketua Pelaksana : Dr. Eby Setiwi Wida Utami, MS
 a. Nama : Perencanaan
 b. Jenis Kelamin : 13140802
 c. NIP :
 d. Bidang Keahlian : Kultur Jaringan Tumbuhan
 e. Pangkat/Golongan : Pembina Tingkat IV-D. Faktor Keasid
 f. Fakultas : Sains dan Teknologi
 g. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti

No.	Nama	Bidang Keahlian	Fakultas	Perguruan Tinggi
1.	Tulik Sri Wahyuni, Ssi, Msi, Apt.	Farmasi Bahan Alam	Farmasi	Unair
2.	Dwi Kusuma W. Ssi, Msi	Kultur Jaringan Tump	Saintek	Unair
3.	Dr. Wiwid Ekasah, Msi, Apt.	Farmasi Bahan Alam	Farmasi	Unair

3. Pembinaan dan jangka waktu penelitian
 a. Jangka Waktu Kegiatan : 1 tahun
 b. Biaya yang dibutuhkan : Rp. 100.000,00
 c. Biaya yang disetujui : Rp. 30.000,00

Surabaya, Desember 2009

Mengesahkan,
 Dekan FST Universitas Airlangga
 Ketua Pelaksana

Dr. Eby Setiwi Wida Utami, MS
 NIP. 13140802

Dr. Salamun, M. Kes
 NIP. 131682502

Mengesahkan,
 Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

Prof. Dr. Bambang Sektiati Lukman, DEA., drh.
 NIP. 131837004

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 fosfat (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 ; NH_4NO_3 0,5 g dan 1,0 g) menunjukkan aktifitas positif antimalaria dengan nilai IC_{50} = 1-10 $\mu\text{g/mL}$, dengan kandungan golongan senyawa flavonoid.

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

RINGKASAN

Penelitian Produktif Senyawa Antimikroba dan Kalus *Zonchus Avenae* L. Ujaya
Peningkatan Produktif Inyeksi pada tahun pertama ini bertujuan untuk (1) mengetahui zat
pengatur tumbuh yang dapat merangsang terbentuknya kalus, (2) mengetahui
pengaruh pemberian sukrosa dan eliator terhadap pertumbuhan kalus, (3)
mengetahui jenis eliator yang dapat memacu terbentuknya senyawa antimikroba, (4)
mengetahui profil golongan senyawa yang terdapat dalam kalus *Zonchus Avenae*
L. (5) mengetahui aktivitas antimikroba dari masing-masing eliator yang terdapat
dalam kalus *Zonchus Avenae* L. Bahan penelitian adalah daun *Zonchus Avenae* L.
yang disterilisasi dengan menggunakan flatum Hydrochloric 7,52% dan ditanam pada
medium Murashige & Skoog (MS) dengan bekaluan zat pengatur tumbuh 2,4-D, IAA,
BA, NAA 1 ppm dan satu sendok BAP 0,5 ppm, sukrosa (1%; 2%; 3%; 4%; 5%) dan
eliator Glutamin (0,25 g dan 0,5 g); Ammonium nitrat (0,2 g dan 1,0 g); Kalium nitrat (0,2
g dan 1,0 g); Kalium phosphate (0,1 dan 0,2 g); Kontrol (tanpa eliator). Uji aktivitas
antimikroba dilakukan secara in vitro menggunakan *Plasmodium falciparum*. Identifikasi
kandungan senyawa dilakukan dengan KLT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa
keaktifan hormon 2,4-D 1 ppm + BAP 0,5 ppm + sukrosa 3% pada kondisi gelap
mempengaruhi kalus tercepat (minggu ke-2). Perbandingan eliator fisik berpengaruh nyata
terhadap pertumbuhan kalus, efeknya eliator (Glutamin 200 g; NH₄NO₃ 0,2 g dan 1,0
g) menunjukkan aktivitas positif antimikroba dengan nilai IC₅₀ = 1-10 µg/ml, dengan
kandungan golongan senyawa flavonoid.

Kata kunci : *Zonchus Avenae* L., kalus, eliator, antimikroba.

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 Tujuh 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 panjatkan 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 Tujuh Belas Agustus Surabaya
 5. Kepala Bagian Fisiologi & Farmakologi dan Pengelola Laboratorium Uji Antimikroba 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

DAFTAR ISI

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

	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 Batran Akar Tempuyung
3	2.3. Induksi Kalus dan Berbagai Penelitian Terkait
3	2.4. Uji Antimikroba 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 Perbanyakan Kalus
17	5.2. Ekstraksi Kalus
18	5.3. Identifikasi Dengan Kromatografi Lapis Tipis
19	5.4. Uji Antimikroba
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 TABEL

Halaman	Tabel
4	2.1. Miscam ekstrak, media, elisor, dan Zat Pengatur Tumbuh yang digunakan untuk induksi kalus pada berbagai tanaman
13	2.1. Waktu induksi kalus, morfologi kalus, dan persentase ekstrak mendentuk kalus setelah di inkubasi selama 4 minggu
15	2.2. Retas perat pada dan perat kering kalus dan ekstrak isolasi dan pada berbagai behakun sukrosa + 2,4 D 1 ppm + BAP 0,2 ppm pada kondisi gelap
16	2.3. Retas perat pada dan perat kering kalus yang dikultur pada media MS + 2,4 D 1 ppm + BAP 0,2 ppm + sukrosa 3 % pada kondisi gelap dengan perat behakun elisor
17	2.4. Hasil ekstraksi kalus <i>Sonchus olerensis</i> L
19	2.5. Persentase parasitisme, pertumbuhan, dan hambatan P. falciparum 3D7 oleh ekstrak <i>Sonchus olerensis</i> L
20	2.6. Nilai IC ₅₀ dan ekstraksi kalus <i>Sonchus olerensis</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 kultur <i>Sonchus oleraceus</i> L pada media MS dengan bebasan 2,4 D 1 ppm + BAP 0,5 ppm. A. Awal benih B. Minggu ke-4 setelah dikultur
15	2.2. Perumbuhan kultur <i>Sonchus oleraceus</i> L pada media MS dengan bebasan 2,4 D 1 ppm + BAP 0,5 ppm + sukrosa 30 g. A. Awal benih; B. Minggu ke-4 setelah dikultur
16	2.3. Perumbuhan kultur <i>Sonchus oleraceus</i> L pada media MS dengan bebasan 2,4 D 1 ppm + BAP 0,5 ppm + sukrosa 20 g + etilol : KNO ₃ 0,5 g. A. Awal benih; B. Minggu ke-4 setelah dikultur
18	2.4. Kloning hasil KLT menggunakan fase gerak klorion : metanol (50% v/v) dengan benih pada media MS

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 diperkirakan tinggal di daerah tropis dan banyak di antara mereka yang menderita malaria. Masalah ini telah menimbulkan endemik di berbagai negara yang sedang berkembang. Malaria masih menjadi penyebab infeksi utama di Indonesia. Masalah malarialis malaria berat dan morbiditas mempunyai kaitan erat dengan timbulnya resisten pengobatan dan kewaspadaan terhadap diagnosis dini serta penanganannya (Ekasari, 2007).

Tetapi antimalaria yang telah ada yaitu dengan kina dan derivatnya. Penemuan obat yang timbul dan terjadi obat-obatan tersebut adalah resisten dan selektivitas. Resistensi atau kekebalan parasit malaria (Plasmodium) terhadap beberapa jenis obat antimalaria memang bukan hal baru. Munculnya resistensi pertama kali dilaporkan pada tahun 1973 dan kaitannya dengan Timor 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 jenis dilakukan terutama pencegahan obat antimalaria baru. Saat ini trend pengobatan masyarakat mengarah pada bahan alam atau obat tradisional. 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. Peringkatnya daya tahan tubuh dan pengembangan kesadaran tubuh. Senyawa flavonoid dan kelompok Asteraceae termasuk *Sonchus oleraceus* L. merupakan salah satu tanaman yang berpotensi digunakan untuk pengobatan malaria secara empiris (Budayani, 2001).

Tanaman *Sonchus oleraceus* L. adalah tanaman obat Indonesia yang hidup liar dan belum banyak dibudidayakan. Banyak kandungan senyawa aktifnya yang berupa flavonoid, saponin, zat lemak dan glikosida yang berpotensi sebagai antiparasit. Flavonoid, glikosida dan saponin. Kandungan bahan aktif dan tempung (Sonchus oleraceus L.) mempunyai kesamaan dengan kandungan bahan aktif dan tanaman Artemisia annua yaitu saponin, flavonoid, glikosida dan minyak esensial. Tanaman Artemisia adalah penghasil saponin yang mempunyai khasiat cepat menghancurkan

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 nutfah 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 perekayasa 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, selama ini digunakan sebagai antimalaria (Yunus dan Lestari, 2008).

Pengabdian di alam secara langsung dapat meminimalkan masalah filaria yang muncul plasma nutfah karena adanya kendala dalam budidayanya. Bahkan saat ini disinyalir bahwa darah hewan yang dibreeding di Indonesia sebagai sumber bahan bakunya sudah mulai diimpor dari beberapa negara, sehingga diperlukan peran bioteknologi untuk mengatasi hal ini.

Secara kultur jaringan dapat diproduksi metapoll sekunder yang sama dengan metapoll sekunder yang diproduksi oleh tanaman aslinya. Produksi sel itu suatu tanaman dengan kultur jaringan telah banyak dibuktikan, bahkan untuk skala komersial telah dilakukan pengembangan produk metapoll sekunder tanaman obat tersebut dengan sistem bioreaktor (Rahli, 2005).

Metode produksi sel itu melalui teknik kultur jaringan melalui kultur kalus dipandang jauh lebih efisien jika dibandingkan dengan cara konvensional, karena dibelakangnya dapat dilakukan peternakan sehingga diperoleh sel itu dengan analisis yang lebih baik dibandingkan dengan secara konvensional (Syamkumar et al., 2007). Penggunaan elitior dapat memacu produksi metapoll yang diinginkan (Murch et al., 2000; Vanire et al., 2004).

Kultur kalus *Sonchus oleraceus* L. telah berhasil dilakukan, dengan tingkat keberhasilan profiterasi sel sangat cepat sehingga diperoleh kalus dalam jumlah banyak dalam waktu singkat, namun sampai sejauh ini belum ada laporan tentang uji pahan aktif yang terdapat dari kalus yang didapat, sehingga penelitian ini perlu dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang terkandung dalam kalus *Sonchus oleraceus* L. (Galan tentang senyawa aktif *Sonchus oleraceus* L. sebagai antimalaria pada belum banyak dibuktikan, 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 tersebut penelitian tentang pahan ini dapat diambil permasalahan sebagai berikut: (1) Zat pengatur tumbuh apa yang dapat meningkatkan pertumbuhan 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 keunguan 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

2.1. Tinjauan Tentang Tempuyung

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

Tempuyung adalah herba setahun, tegak, mengandung getas, sering dengan akar tunggang yang kuat, tingginya 0,5-2m. Batangnya bulat, berongga, gundul dan rebul. Daunnya gundul, sering keanginan bergigi tidak teratut, sedikit banyak berlekuk menyempit dalam. Bunga banyak, kuning cerah. Buah ketas, bentuknya memanjang, pipih, bersekat, corak kekiningan panjangnya 4 mm (Baker et al., 1985).

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

Tempuyung (*Sonchus oleraceus* L.) mempunyai rasa pahit dan dingin. Kandungan kimia berupa saponin, flavonoid, zat samak, dan polifenol, oc-lacturonol, lacturonol, manitol, inositol, sialik, dan laktosid (Sugati, dkk., 1991).

Efek farmakologis dari bahan aktif tempuyung (*Sonchus oleraceus* L.) telah banyak dilakukan antara lain efektif an dan alkohol dan tempuyung mempunyai daya melarutkan batu ginjal (Hardiyanto, 1988). Penderita kanker flavonoid taksil erit asetat lain tempuyung mampu menghambat heparoksisitas karbon tetraklorida (CCl₄) yang diberikan pada mencit jantan (Lestyaningrum, 1991).

Secara empiris beberapa senyawa aktif pada daun tempuyung (*Sonchus oleraceus* L.) telah dibuktikan mempunyai banyak fungsi. Flavonoid mempunyai fungsi untuk proteksi terhadap serangan mikroba dan serangga, mengurangi respon terhadap seluler, virus dan karsinogen sehingga flavonoid menunjukkan antibakterial, anti-inflamasi, antimikrobia, dan antitumor.

2.3. Induksi Kanker dan Berbagai Penelitian Lain

Induksi kanker adalah upaya untuk menimbulkan bagian tanaman (ekspansi), sel-selnya berproliferasi atau membelah-belah tanpa dikontrol oleh mekanisme kendali massa sel saja (kanker). Induksi kanker untuk produksi suatu senyawa tertentu spesies-membudidayakan medis, macan ekplan, jenis serta konsentrasi zat pengatur tumbuh dan jenis elisitor 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 eksperimen, 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	Agave americana	Sauvignas	MS + Kinetin (2.5 mg/L)	KH ₂ PO ₄ (2.50 mg/L) Sucrose (87.64 mg/L)
Majbath and David, 1998	Klinton septimum	Alliin	MS + IAA (1.4 mg/L) Kinetin (2.3 mg/L) NAA (10.8 mg/L)	Coconut water (15%)
Golnowski and Tjip, 1999	Androsace lanuola	Alliamine	MS + Kinetin (10 mg/L) 2,4-D (1 mg/L)	Ascorbic acid and Cysteine (10 mg/L)
Mazli et al., 2000	Cassia acutifolia	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	Callantheus roseus	Callantheine	MS + NAA (2 mg/L), Kinetin (0.1 mg/L) IAA (2 mg/L)	Sucrose (3%)
Tsinguchi et al., 2002	Epidendrum labrioides	Triptenes	LS + NAA (10 mg/L) BA (10 mg/L)	Casain hydrolyzate (200 mg/L), Sucrose (3%)
Wu et al., 2001	Taxus sp.	Taxol	BS medium + 2,4-D (0.5 mg/L), BA (0.5 mg/L)	Coconut milk (2%), and K+ instead of NH ₄ +
Onizawa et al., 2002	Toreya nuda var. radicans	Diterpenoids	MS + 2,4-D (10 mg/L)	Glycin (3mg/L), ekstrak tebu (0.5mg/L), air kelapa (15% v/v)
Mozar, 2004	Scaevola aerea		MS+IAA (1 mg/L), Kinetin (0.5 mg/L)	
Vyde et al., 1988	Glycyrrhiza glabra	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)

5.4. Uji aktivitas antimikroba secara in vitro

Untuk pengujian antimikroba dan ekstrak tumbuhan atau isolat hasil kultur, digunakan cara tes mikro yang didasarkan atas teknik dari Riedmann dkk yang kemudian dikembangkan oleh WHO tahun 1982 (WHO, 1982). Bahan Uji dilarutkan dalam DMSO, dicekakan sampai kadar tertentu dalam medium RPMI 1640 yang mengandung 10% serum manusia, 25 mM HEPES dan 35 mM NaHCO₃. Larutan ditetuhkan dengan larutan disinfektan 0.4% dan dicekakan secara seri. Masing-masing lempeng sumbu mikro diisi dengan larutan bahan uji dan ditampatkan 180 µl suspensi 10% eritrosit dengan parasitemis 1% sehingga masing-masing sumbu berisi 500 µl medium yang mengandung serum dan bahan uji yang diteliti. Lempeng sumbu mikro diletakkan dalam desikator kaca yang diberi lilin yang berguna untuk menghindari oksigen. Lilin dinyatakan, desikator ditutup, kan udara pada tutup desikator dibuka. Setelah lilin pada, kan udara dibuka, dinkubasikan dalam inkubator CO₂ pada suhu 37° C selama 48 jam. Kemudian dilakukan evaluasi hasil dan ditentukan pada IC₅₀

(Rahmawati, et al, 1997)

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 antimalariannya 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 aktif dalam kalus dan esisior terhadap pertumbuhan kalus; (3) mengetahui jenis esisior yang dapat memacu terbentuknya senyawa antimikroba; (4) mengetahui profil golongan senyawa yang terdapat dalam kalus *Sonchus oleraceus* L.; (5) mengetahui aktivitas antimikroba dan masing-masing esisior yang terdapat dalam kalus *Sonchus oleraceus* L.

3.2 Manfaat Penelitian

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

Hasil penelitian ini merupakan tambahan baru tentang sumber bahan antimikroba dan tanaman obat Indonesia, walaupun pembuatannya masih memerlukan rangkaian penelitian yang panjang. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi manfaat sebagai berikut:

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

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 oleraceus* 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 Perbanyakan Kalus

Penelitian ini bertujuan untuk optimalisasi zat pengatur tumbuh, sukrosa, kondisi inkubasi, dan elisitor yang sesuai untuk induksi dan perbanyakan 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 sediaan uji aktifitas senyawa antimikroba dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Mikrobiologi 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 oleraceus* L., diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur. Sebagai sumber ekstrak adalah daun. Untuk uji antimikroba *in-vitro* digunakan *Plasmidom* (Arlangga).

4.2.2 Bahan Kimia

Bahan kimia untuk medium Murashige and Skoog (George and Shenholt, 1982), ekstrak bahan kimia untuk uji antimikroba, dan bahan kimia untuk ekstraksi antimikroba.

4.3 Alat Penelitian

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

4.4 Prosedur Penelitian

4.4.1 Induksi dan Perbanyakan Kalus

Penelitian ini bertujuan untuk optimalisasi zat pengatur tumbuh, sukrosa, kondisi inkubasi, dan etilster 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.

4.4.1.1 Pengaruh zat pengatur tumbuh terhadap induksi kalus

Ekspansi yang dipakai adalah daun. Daun dicuci menggunakan deterjen dan dibilas dengan air selanjutnya drendam dalam fungisida (1 g dalam 500 ml pades) selama 15 menit dan dibilas dengan air sampai bersih. Selanjutnya daun dimasukkan dalam LAF, dan drendam dalam Bayclin (30 ml dalam 500 ml pades steril) selama 10 menit, dan dibilas 3 kali menggunakan pades steril @ 3 menit. Daun dipotong menggunakan blade scalpel (±1 cm) kemudian diletakkan dalam botol kultur yang diberi perlakuan zat pengatur tumbuh BAP 0,5 ppm (M2a); IAA 1 ppm (M2b); IAA 1 ppm + BAP 0,5 ppm (M2c); IBA 1 ppm (M2d); IBA 1 ppm + BAP 0,5 ppm (M2e); NAA 1 ppm (M2f); IAA 1 ppm + BAP 0,5 ppm (M2g); ZAD 1 ppm (M2h); ZAD 1 ppm + BAP 0,5 ppm (M2i); tanpa zat pengatur tumbuh (M2j) dengan bahan apokalis dan menempel pada media setelah itu kultur disimpan dalam 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 ekspansi diberikan kelas dihitung dengan pendekatan :

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

4.4.1.2 Pengaruh sukrosa terhadap pertumbuhan kalus

Cara kerja yang dilakukan mulai tahapan sterilisasi sampai dengan penanaman ekspansi 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.

4.4.1.3 Pengaruh berbagai esitor terhadap pertumbuhan kalus

Cara kerja yang dilakukan mulai tahapan sterilisasi sampai dengan penanaman ekspansi sama dengan cara kerja sebelumnya. Perakuan esitor yang dipakai adalah Glutamin 0,25 g (G); Glutamin 0,5 g (G2); Amonium Nitrat 1,0 g (N1); 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.

4.4.2 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 *Zonchus ovensis* L dengan metode ellipsis

Ekstraksi sudah dilakukan dengan menggunakan metode maselesi dengan menggunakan pelarut metanol. Kalus dikeringkan dengan oven 40°C sampai kering kira-kira 2 hari. Setelah kalus kering (simplicia) diiris. Simplicia dituangkan dengan menggunakan mortar. Serbuk tersebut ditimbang kembali. Serbuk tersebut dianalisis dengan metanol sesuai dengan betany (maselesi). Ekstraksi maselesi ultrasonic selama 15 menit. Ekstraksi maselesi dilakukan pada suhu kamar selama 24 jam (sampai terbentuk endapan dan cairan di atas). Cairan dipisahkan dan endapan tersebut digunakan untuk menganalisis. Endapan dituangkan ke dalam wadah lain. Endapan dituangkan ke dalam wadah lain dan dituangkan ke dalam wadah lain. Endapan dituangkan ke dalam wadah lain dan dituangkan ke dalam wadah lain.

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 CHCl₃:metanol = 95 : 5. Perambatan pada uji amoniak.

4.4.4. Penentuan Aktivitas Antimikroba

4.4.4.1. Bahan untuk uji aktivitas antimikroba in vitro

Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas antimikroba in-vitro adalah bakteri *Staphylococcus aureus* 3D7 diperoleh dari Lembaga Ekman Jakarta medium kultur adalah lengkap (CMC= complete Maxis Culture Medium); RPMI 1640 (Gibco), HEPES (M-2) mikrosteptin-N-2-amin sulfonatan (Gibco), NaHCO₃, gentamicin sulfat, eritromisin stearat for injection (Otsuka), darah manusia yang didapatkan dari PMI Surabaya, air suling steril, garam 10%, ekstrak kalus *Zonchus ovensis* L (CMC: dimethylsulfoxide), Sordicel (SIGMA).

4.4.4.2. Prosedur pengujian aktivitas antimikroba secara in-vitro

A. Medium tak lengkap (Incomplete Medium)
Dituangkan steril yang terdiri dari 104 g RPMI-1640, HEPES 5,96 g, Natrium Glukonat 2,1 g, Hipoxanthin 0,05 g, Gentamycin 0,5 mL dan eritromisin 980 mL, kemudian larutan distilasi dengan filter bediameter 0,22 µm, selanjutnya dimasukkan dalam botol dan disimpan pada suhu 4°C. Ini disebut juga medium bencong (washing medium) dan bila akan digunakan, dimasukkan ke dalam inkubator 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.

1. Fermentasi serum

Dilambil darah segar golongan O yang sudah diampai antikoagulan kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Plasma diambil dengan pipet Pasteur dan di-freeze inactivation pada suhu -26°C selama 30 menit, kemudian disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C untuk mendapatkan supernat, sehingga didapatkan serum. Penyempurnaan pada suhu -26°C dan bisa akan digunakan, dituangkan pada suhu 37°C.

2. 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 memelihara *P. falcatrum*.

3. Perawatan eritrosit 50%

Darin manusia golongan O yang diberi antikoagulan disimpan pada suhu 4°C dapat digunakan tidak lebih dari 3 minggu. Darin dimasukkan dalam tabung dan disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Plasma dipisahkan dan leukosit dibuang. Eritrosit dicuci dengan medium perencui 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 (lepas dari leukosit) ditambahi 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.

4. Prosedur biakan *P. falcatrum*

Prosedur biakan ini didasarkan pada metode Tjader & Jensen (1976). Biakan dilakukan di dalam bejana dan dikondisikan secara aseptik. Parasit malaria diperoleh dari siropas dan yang di "inang" dengan cara tabung yang berisi parasit beku dicairkan pada suhu 37°C. Ditambahkan 4% 3.5% dengan volume yang sama dan dipindahkan ke tabung sentrifuge menggunakan pipet mikro sambil dicampur perlahan, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatant kemudian dibuang. Endapan disentrifuse dengan 5 ml incomplete medium, dicampur perlahan dengan pipet mikro dan disentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatant 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 ; 0,01 µg/mL.

Setelah erodan dicuci, ditampahkan sebanyak 4,5 ml medium lengkap dan 0,5 ml RBC 50% kemudian dicampur dengan dengan pipet kemudian dipindahkan ke dalam erodan, dimasukkan dalam erodan yang akan digunakan di dalam inkubator yang ber suhu 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 kultur.

F. Sub Kultur P. falciparum

Eritrosit yang terinfeksi parasit malahan 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 erodan baru dan ditampahkan medium lengkap dan eritrosit 50% baru untuk mendapat hematokrit 2%.

G. Sinkronisasi Bakteri P. falciparum

Untuk erodan pengujian aktivitas sintesis parasit dalam keadaan sinkron yaitu pada stadium cincin. Sinkronisasi dilakukan dengan menggunakan sorbitol 5% (Lampson & Vanderberg, 1978). Sinkronisasi dilakukan dengan cara erodasi parasit yang diperoleh dan lakukan berkesinambungan dengan tingkat parasitemia 2-10% (80% stadium cincin) disentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C, kemudian supernatant dibuang. Eradasi berupa eritrosit yang terinfeksi parasit disuspensikan dengan sorbitol 5% sebanyak 3-4 kali volume erodasi, ditampahkan selama 3-10 menit pada temperatur kamar, disentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C dan dibuang supernatannya. Lalu erodasi dicuci dengan incomplete medium sebanyak 3-4 kali volume dan disentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Proses erodasi ini diulangi sebanyak 3 kali. Setelah dicuci, ditampahkan complete medium dan erodasi eritrosit baru (RBC 50%) sampai terbentuk hematokrit 2%. Selanjutnya dipadatkan isotonis, diawetkan dengan glikerasol untuk mengawali stadium parasit dan ditirid parasitemianya.

H. Penyisipan Eradasi Uji

Eradasi uji berupa ekstrak kalus *Zonitrus anversis* 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 µg/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 enzimatis in vitro dilakukan dengan cara diambil 5 ml bahan uji dan ditambahkan medium kompleks sampai 20ml.

Kedalam tabung suntur (well) dan tempung mikrotiter dasar yang telah diberi 1000 µl medium kontrol (kecuali pada kontrol (-) dimasukkan 500 µl), ditambahkan 150 µl larutan substrat yang diambil dari stok, kemudian dibuat pengenceran sehingga konsentrasi akhir pada suntur mikrotiter adalah 100; 10; 1; 0,1; dan 0,01 µg/ml (kultur dibuat duplo).

Suspensi basal dalam 200 µl enzim ditambahkan ke dalam masing-masing suntur (well) mikrotiter dasar dengan tingkat gasifikasi 1% dan hematokrit 5%, kemudian diinkubasi dalam 37°C sesuai waktu uji yang diperlukan. Kultur diberikan dan dibuat hapusan dengan gelas untuk selanjutnya dituang jumlah enzim yang terakresi. Setelah itu selip 500 enzim dengan menggunakan mikroskop cahaya.

1. Perhitungan dituang dengan rumus :

$$\% \text{ Perhitungan} = \frac{\sum \text{enzim yang terakresi}}{5000 \text{ enzim}} \cdot 100\%$$

Perhitungan dituang dengan rumus :

$$\% \text{ Pengurangan} = 100\% - \left[\frac{\sum X_p}{\sum X_k} \cdot 100\% \right]$$

Keterangan :

Xp = Perhitungan bakteria

Xk = Perhitungan kontrol negative

4.2. Analisis Data

Data yang diperoleh berupa data statistik kualitatif dan kuantitatif. Data statistik

analisis secara statistik dengan membandingkan antara kontrol dan perlakuan. Data

kuantitatif dianalisis dengan ANOVA dan diuji 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 menjadii 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 Perenyakan 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 (BAF) 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).

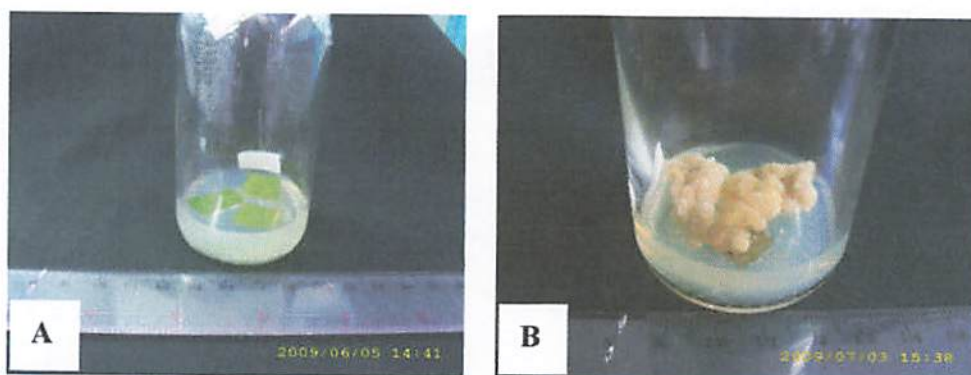
Tabel 5.1 Waktu induksi kalus, morfologi kalus, dan persentase ekspansi membran kalus setelah diinkubasi selama 4 minggu

Perlakuan	Horison	Waktu terbentuknya kalus (Minggu)		Persentase Ekspansi Kalus	Deskripsi morfologi kalus
		Inkubasi Terang	Inkubasi Gelap		
M ₂		0	0	0	Tidak terbentuk kalus, eksplan hanya menguning
M ₁		2	2	100	Kalus pada tajuk eksplan berkembang membentuk tunas yang banyak sekali
M ₃		2	2	100	Kalus sangat kompak dan tidak berkembang
M ₄		2	2	100	Kalus berkembang menjadi tunas
M ₅		2	2	100	Kalus berkembang menjadi tunas dan eksplan
M ₆		2	2	100	Kalus berkembang menjadi tunas dan eksplan
M ₇		2	2	100	Kalus sangat kompak dan tidak berkembang
M ₈		2	2	100	Kalus berkembang menjadi tunas dan eksplan
M ₉		2	2	100	Kalus tidak berkembang pesat
M ₁₀		2	2	100	Kalus kompak dan berkembang maksimal

Keterangan: M₁ = BAF 0,5 ppm; M₂ = IAA 1 ppm; M₃ = IAA 1 ppm; M₄ = IAA 1 ppm + BAF 0,5 ppm; M₅ = IAA 1 ppm; M₆ = IBA 1 ppm; M₇ = IBA 1 ppm + BAF 0,5 ppm; M₈ = NAA 1 ppm; M₉ = NAA 1 ppm + BAF 0,5 ppm; M₁₀ = 2,4-D 1 ppm; M₁₁ = 2,4-D 1 ppm + BAF 0,5 ppm; M₁₂ = IBA 1 ppm + BAF 0,5 ppm; M₁₃ = IAA 1 ppm + BAF 0,5 ppm.

Kombinasi hormon 2,4D 1ppm dan BAP 0,5 ppm mampu menghasilkan kalus dengan kondisi terbaik dengan waktu pembentukan 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.



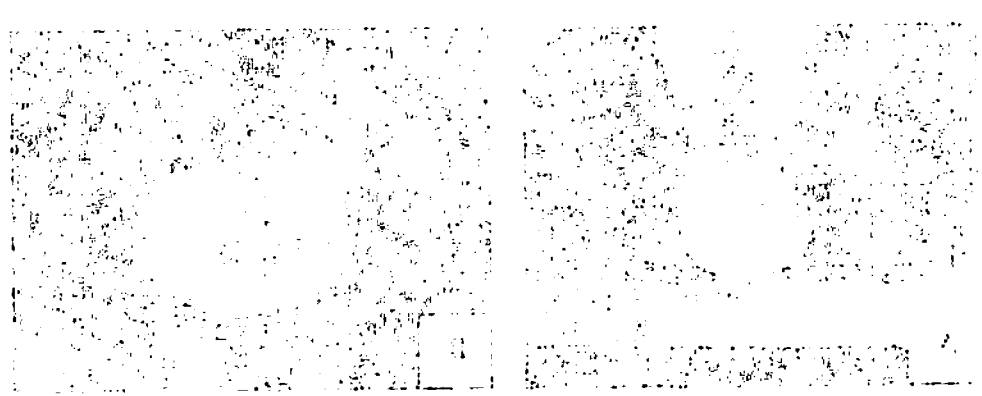
Gambar 5.1 Pertumbuhan kalus *Sonchus arvensis* L. pada media MS dengan perlakuan 2,4D 1 ppm + BAP 0,5 ppm.(A) Awal penanaman; (B) minggu ke-4 setelah dikultur.

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 SA, IAA dan BAP 0,5 ppm mampu meningkatkan kalus dengan kondisi terbaik dengan waktu pembesaran kalus 2 minggu, ukuran seluler pada awal pertumbuhan kalus yang tumbuh dibawah kuaring cariri dan tidak, dan cara pertumbuhan seluler kalus menjadi kuring kecoklatan dan seluler kalusnya konus (gambar 5.1). Kombinasi hormon ini yang akan digunakan untuk induksi kalus seluler.

Penggunaan hormon SA 0 untuk induksi kalus merupakan pilihan terbaik untuk mengaktifkan kalus (Indrianto, 2003) seperti induksi kalus pada tanaman lemon (Yamari, 2009) dan pada tanaman teh (Sari, 2008) waktu responnya sangat tergantung pada profil masing-masing tanaman (George and Shaugton, 1993). Menurut Setiawan dkk (2004) media untuk konsentrasi SA 0 efektif makin mudah membentuk kalus tanaman yang dikombinasikan dengan BA.



Gambar 5.1. Perumbuhan kalus *Centrosema pubescens* L pada media MS dengan konsentrasi 2,4-D 0,5 ppm + BAP 0,5 ppm. (A) Awal pertumbuhan kalus menggunakan setelah dikultur.

5.1.3. Pengaruh sukrosa terhadap pertumbuhan kalus

Sukrosa adalah sumber karbon yang mudah dimanfaatkan dalam kultur tumbuhan. Perilaku sukrosa identik dalam sebagai konsentrasi (tabel 5.2). Keberadaan sumber karbon sangat menentukan produksi metabolit sekunder yang artinya dapat berkorelasi positif maupun negatif terhadap efisiensi produksi metabolit yang diinginkan. Perilaku sukrosa diberikan dalam bentuk konsentrasi rates dan di pswan standar (20%-30%).

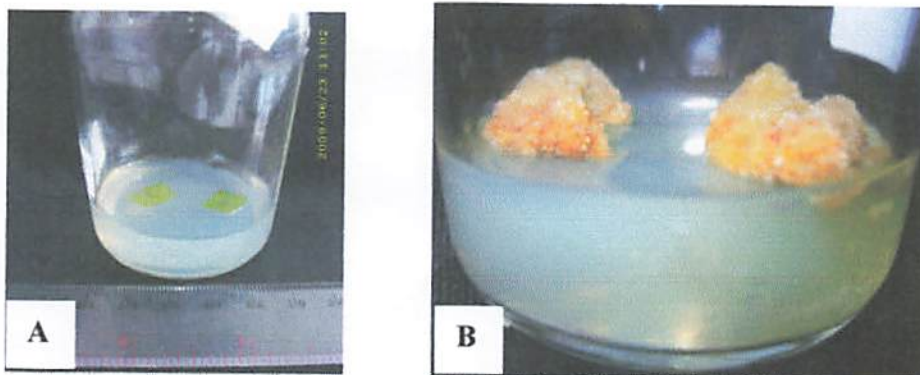
Tabel 5.2 Rerata berat basah dan berat kering kalus dari eksplan helaian daun pada berbagai perlakuan sukrosa + 2,4D 1 ppm + BAP 0,5 ppm pada kondisi gelap

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.

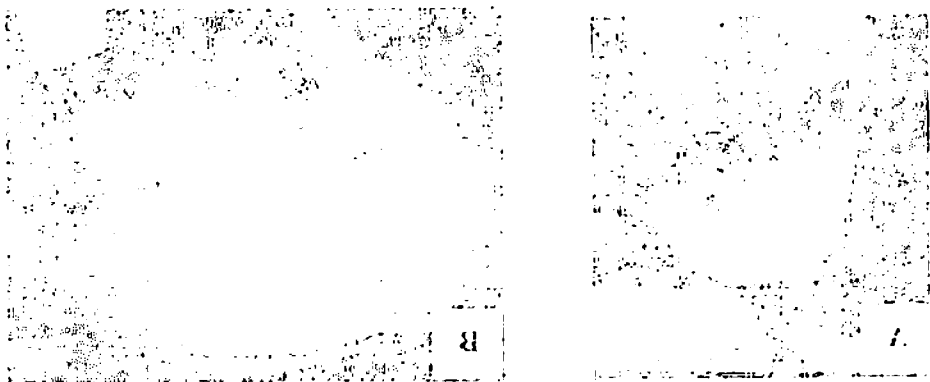
Tabel 2 Rata-rata hasil uji analisis varian rata-rata berat keping kalus dan ekspansi jaringan dalam wadah berbagai perlakuan sukrosa + S-AD 1 ppm + BAP 0,5 ppm pada kondisi gelap

Perlakuan	Helaian dan Berat keping	
	Berat bahan (g)	Berat keping (g)
M1	0,47%	0,03%
M2	0,40%	0,04%
M3	0,39%	0,03%
M4	1,02%	0,07%
M5	0,51%	0,05%

Keterangan: Untuk yang berbeda perlakuan analisis varian (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 keping kalus menunjukkan adanya perbedaan antara perlakuan sukrosa (1-5%, lampiran 1). Perlakuan sukrosa terhadap berat keping kalus menjadi sangat penting karena 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 indikator kalus untuk produk selanjutnya digunakan perlakuan sukrosa 3%.



Gambar 2 Pertumbuhan kalus *Zonchus xylophilis* L pada media M2 dengan perlakuan S-AD 1 ppm + BAP 0,5 ppm + sukrosa 30 g (A) Awal pertumbuhan (B) minggu ke-4 setelah dikultur

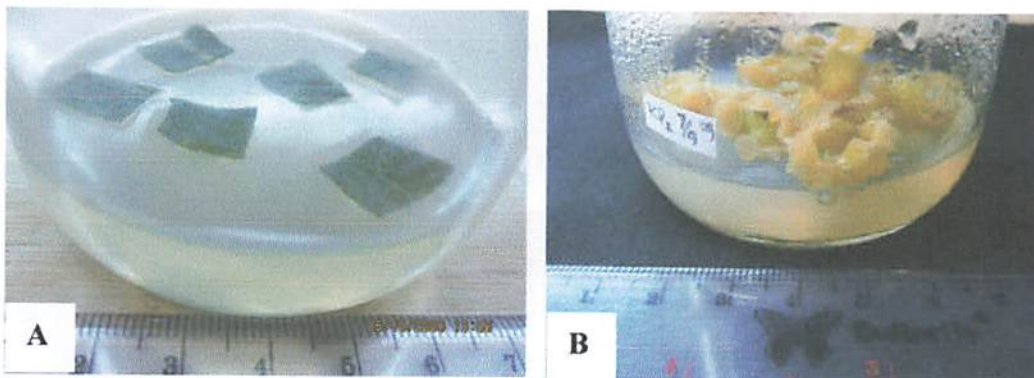
5.1.3 Pengaruh berbagai elisitor terhadap pertumbuhan kalus

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.

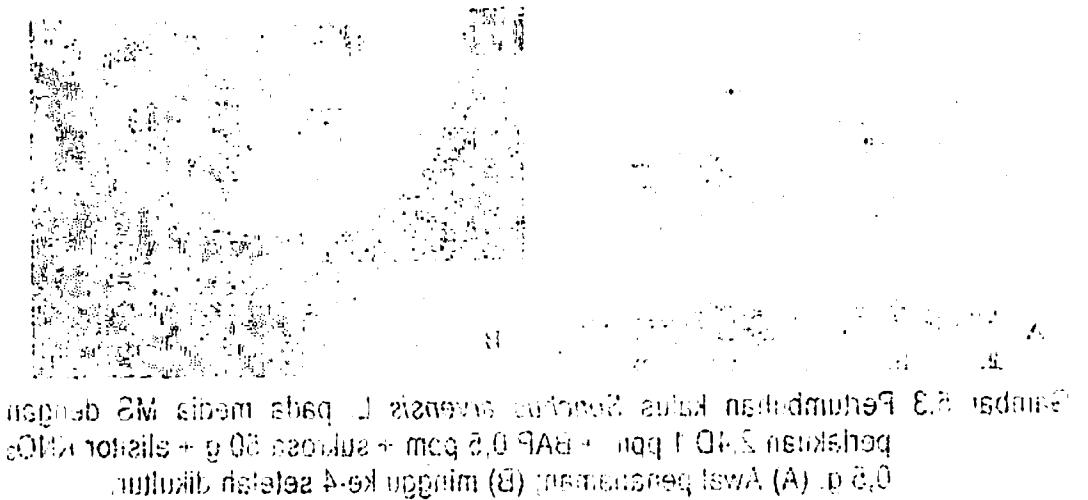
2.1.3 Pengaruh berbagai elastor terhadap pertumbuhan kalus

Elastor digunakan untuk membuat produk selulosa, bukan untuk membuat pertumbuhan. Pengaruh elastor terhadap berat basah dan berat kering kalus tidak ada beda nyata setelah dilakukan analisis anova varian ($\alpha=5\%$ lamatis).

Tabel 3.3. 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 elastor.

Perlakuan	Berat basah (g)	Berat kering (g)
G1	8,75	0,28
G2	8,19	0,29
M1	7,67	0,32
M2	7,95	0,34
K1	8,37	0,33
K2	8,22	0,34
KP1	7,12	0,3
KP2	8,82	0,35
K	7,88	0,30

Keterangan: G1 = Glutamin 0,25 g; G2 = Glutamin 0,5 g; M1 = Amonium Nitrat 0,5 g; M2 = Amonium Nitrat 1g; K1 = Kalium Nitrat 0,5 g; K2 = Kalium Nitrat 1 g; KP1 = Kalium Pochel 0,1 g; KP2 = Kalium Pochel 0,2 g; K = Kontrol



Gambar 3.3. Pertumbuhan kalus *Sacchara avensis* L pada media MS dengan perlakuan 2,4D 1 ppm + BAP 0,5 ppm + sukrosa 3% + elastor KNO₃ 0,5 g (A) Awal perenangan; (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 dibanen selanjutnya dibandingkan berat basah dan berat keringnya, setelah kalus kering, dituliskan dengan mortar dan selanjutnya diekstraksi dengan menggunakan belat metanol. Hasil ekstraksi tersaji 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	0,03
K2	18,73	1,0	0,9	0,11
K3	31,30	2,3	2,2	0,20
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
G1	40,01	3,4	3,2	0,43
G2	41,91	3,0	2,8	0,48

5.3. Hasil Identifikasi Secara Kromatografi Lapis Tipis

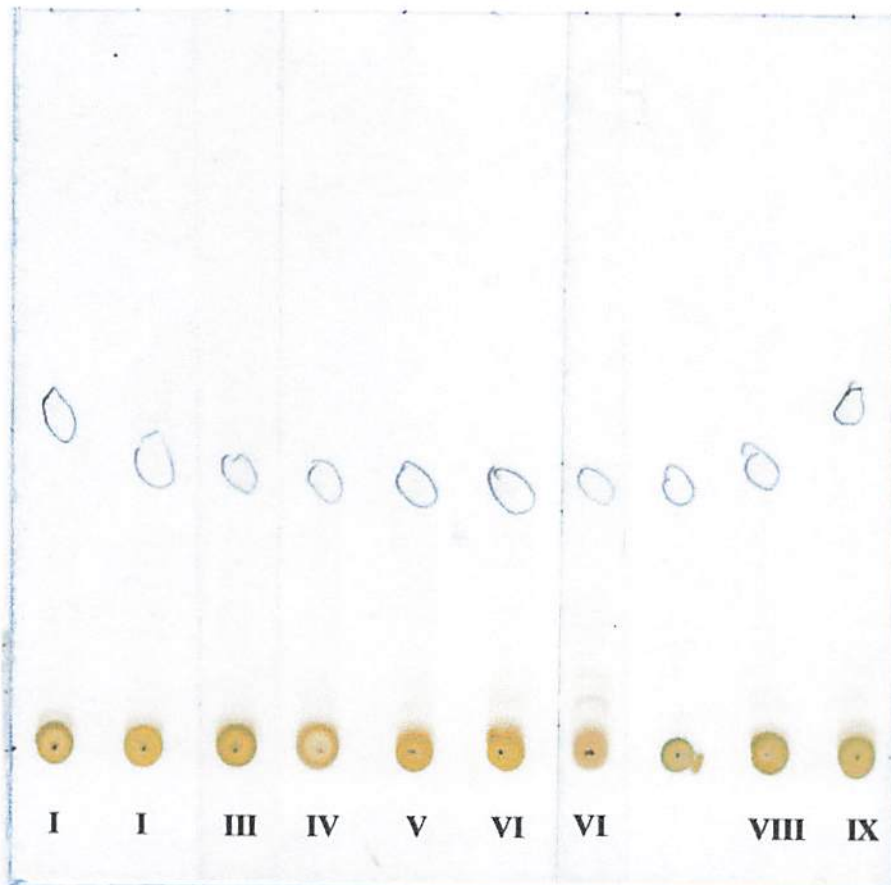
Hasil ekstraksi dari kalus *Sonchus arvensis* L. diamati dengan Kromatografi Lapis

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:

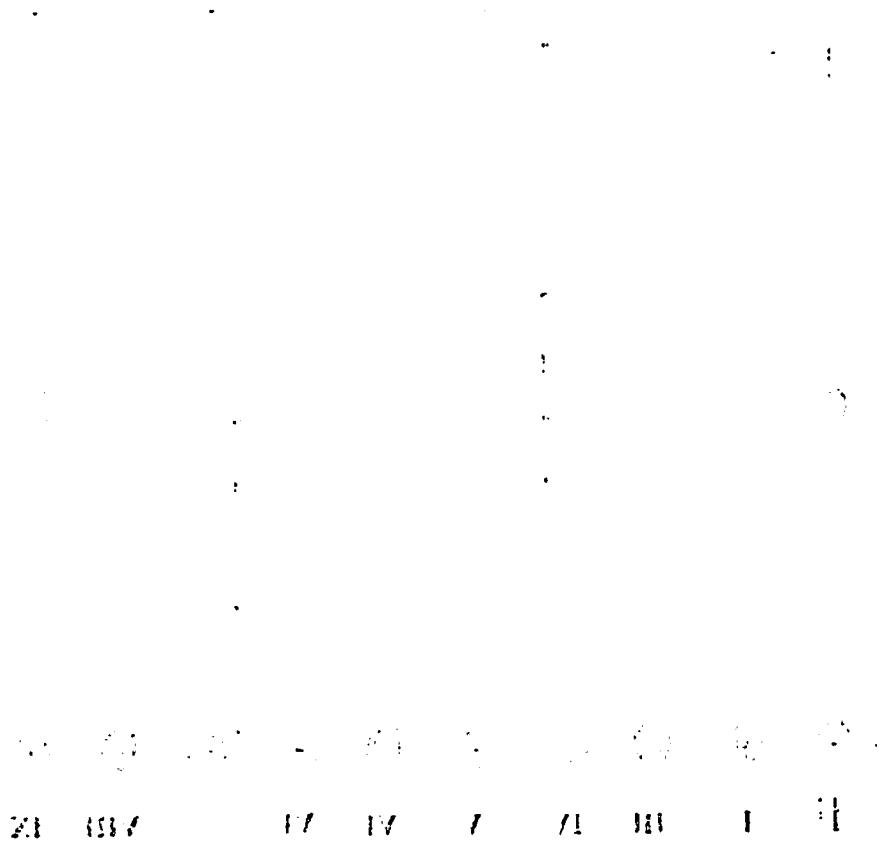
- I : Ekstrak dari kalus perlakuan KP2
- II : Ekstrak dari kalus perlakuan KP1
- III : Ekstrak dari kalus perlakuan NN2
- IV : Ekstrak dari kalus perlakuan KN2
- V : Ekstrak dari kalus perlakuan NN1
- VI : Ekstrak dari kalus perlakuan G1
- VII : Ekstrak dari kalus perlakuan KN1
- VIII : Ekstrak dari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

3.3. Hasil Identifikasi Secara Kromatografi Lapis Tipis

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

tipis menggunakan:

Fase diam : Silika gel GF 254
 Fase gerak : CHCl_3 : metanol = (99 : 1)
 Pembekuan : Uap amoniak



Gambar 3.4. Kromatogram hasil KLT menggunakan fase gerak kloroform:metanol (99:1) dengan pembekuan uap amoniak

- Keterangan gambar:
- I : Ekstrak dari kalus behakun KP2
 - II : Ekstrak dari kalus behakun KP1
 - III : Ekstrak dari kalus behakun NNS
 - IV : Ekstrak dari kalus behakun KNS
 - V : Ekstrak dari kalus behakun NNI
 - VI : Ekstrak dari kalus behakun GI
 - VII : Ekstrak dari kalus behakun KI
 - VIII : Ekstrak dari kalus behakun K
 - IX : Ekstrak dari kalus behakun GS

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 (µg/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 Rf hasil kromatografi lapis tipis dari ekstrak metanol kalus *Sonchus oleraceus* L adalah Rf:0,49. Hasil identifikasi dengan KLT tersebut adalah flavonoid.

2.4. Uji Antimikroba

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

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

Parasit	Dosis (µg/ml)	Replikasi	% parasitemia	% pertumbuhan parasit	% penghambatan	Rata-rata % penghambatan
G2	Do	1	0,82	-	-	-
	K	1	0,82	1,97	-	0
		2	0,82	2,08	-	0
	100	1	0,48	0,48	-	100
		2	0,40	0,40	-	100
	10	1	0,80	0,32	0,32	60,00
K		1	0,04	0,32	84,37	0
		2	1,82	1,90	3,88	0
0,1		1	2,98	1,88	4,82	0
		2	2,03	2,41	0	0
0,01		1	2,12	2,10	0	0
	2	2,32	2,38	0	0	
NM1	Do	1	0,82	-	-	-
	K	1	0,82	1,84	-	0
		2	2,12	1,2	-	0
	100	1	-	-	-	100
		2	-	-	-	100
	NM1	10	1	0,18	-	-
K		1	0,18	-	-	100
		2	1,88	1,22	38	20,83
1		1	1,82	1,28	10,81	0
		2	2,48	1,88	0	0
0,01		1	2,32	1,28	0	0
	2	1,88	1,82	0	0	
NM2	Do	1	0,82	-	-	-
	K	1	0,71	2,00	-	0
		2	2,82	2,2	-	0
	100	1	0	0	-	100
		2	0	0	-	100
	10	1	0,2	0,2	-	100
2		0,4	0,4	-	100	
1	1	1,12	1,18	1,18	48,8	
	2	1,18	1,12	1,12	10,84	
0,1	1	2,03	2,31	0	0	
	2	2,81	2,18	0,48	0	
0,01	1	2,20	2,81	0	0	
	2	2,20	2,81	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).

Sambar saat ini belum semua sampel diujikan, baru tiga beberapa ekstraksi yang diujikan yaitu behkuan Glutamin 500g, NH₄NO₃ 5g dan NH₄NO₃ 1g. Dan hasil uji rata-rata daya hambat ekstrak kalus yang diujikan diperoleh nilai IC₅₀ pada Tabel 2.6.

Tabel 2.6 Nilai IC₅₀ dan ekstrak kalus *Sonchus oleraceus* L.

Bahan uji	Rata-rata % penghambatan				
	100 (µg/ml)	10 (µg/ml)	1 (µg/ml)	0,1 (µg/ml)	0 (µg/ml)
G2	100	88	42	0	0
MN1	100	100	20,8	0	0
MN2	100	100	40,8	0	0

Keterangan: G2=Glutamin 500g, MN1=NH₄NO₃ 5g, MN2=NH₄NO₃ 1g

Dan tabel 2.6 dapat dilihat bahwa nilai IC₅₀ beberapa antara 1-10 (µg/ml). Weenen (1990) menyebutkan bahwa untuk ekstrak yang mempunyai harga IC₅₀ sambar dengan 10 (µg/ml) termasuk dalam golongan bahan yang mempunyai aktifitas tinggi/kuat sebagai antimikroba. Rata-rata persentase penghambatan antar behkuan menunjukkan bahwa behkuan ekstraksi NH₄NO₃ 1g lebih besar dibanding behkuan Glutamin 500g dan NH₄NO₃ 5g. Baik glutamin maupun NH₄NO₃ ditambahkan sebagai tambahan sumber nitrogen pada medium, dengan maksud dapat meningkatkan produksi alkaloid, sebagaimana banyak penelitian menyatakan bahwa ekstrak 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

6.1. Kesimpulan

1. Dan hasil dan pembahasan yang dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:
Kombinasi hormon terbaik untuk induksi kalus *Sonchus oleraceus* L adalah kombinasi $1 \mu\text{M}$ IAA dan $0,5 \mu\text{M}$ BAP.
2. Perakuan sukrosa memberikan pengaruh yang berbeda untuk setiap bahan. Perakuan sukrosa 4% memberikan pengaruh paling baik terhadap hasil basal dan perakuan kalus.
3. Perakuan disitokinin memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata untuk setiap bahan terhadap basal dan perakuan kalus.
4. Golongan senyawa yang terdapat pada kalus *Sonchus oleraceus* adalah flavonoid.
5. Ekstrak kalus dengan bahan glutamine 500g, NH_4NO_3 0,5 g, dan NH_4NO_3 1 g mempunyai aktifitas antimutagenik dengan nilai $\text{IC}_{50} = 1-10 \mu\text{g/L}$.

1.1. Saran

Uji aktifitas antimutagenik ekstrak kalus *Sonchus oleraceus* L menunjukkan bahwa kalus *Sonchus oleraceus* L berpotensi dikembangkan sebagai sumber senyawa antimutagenik. Untuk mengkonfirmasi kandungan bahan aktif kalus *Sonchus oleraceus* L yang mempunyai aktifitas antimutagenik perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang uji aktifitas antimutagenik ekstrak dan kalus *Sonchus oleraceus* 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 Kephelas ,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 Sherinthon, 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.A. and Zawal, A.B.A.H. 2007. In-vitro embryonal test of *Wiggelia salva* (Bisack) (seed) different extracts. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*. 2(2): 46-50
- Akmalia, F., Papadakis, D., Pantielis, F., and Kapsalas, T. 2000. Flavonoidignan production from *Stygium minimum* transformed and untransformed root cultures. *Fitochemia*. 71: 379-384.
- Ayub, S., K. Iqbal, and T. Faruq. 1989. Isolation of stress metabolites in immobilized *Glycyrrhiza echinata* cultured cells. *Plant Cell Rep*. 8: 188-189.
- Baker, A.J. and Van Der Biek, D. 1989. *Flora of Java*. Vol II. Noordhoff N.V. Groningen. The Netherlands
- Classah, W. 2001. *Daya hambat senyawa alkaloid daun Cassia sianea pada diakan in-vitro Plasmodium falciparum*. Thesis Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga
- Fischer, H., He, M., Ludwig, M., & Kottmann, A. 1994. Mechanism of the proliferation and differentiation of plant cell culture systems. *Int. J. Dev. Biol.* 38: 287-299
- George, E.F. and Shethanion, P.D. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. England. Excerpta Limited
- Golenowski, M. and V.S. Thipp. 1999. Effect of growth medium composition on peroxidase activities and saponin production. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 58: 215-218.
- Haryanto. 1998. Pengaruh Ekstrak air dan ekstrak alcohol daun tempuyung terhadap volume urine tikus in-vivo dan belatutan batu ginjal in-vitro. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada
- Indahati, A. 2003. *Kultur Jaringan Tumbuhan*. Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada
- Lambre, G. and Manderberg, J.B. 1978. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage in culture. *The Journal Parasitology*. 3: 418-421.
- Liesjonningsari, A. 1991. *Prapertukuan flavonoid irksai etil asetat daun tempuyung untuk menghambat Hepatofektis karbon tetraklorida (CCl4) pada mencit jantan*. Skripsi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada
- Maitland, N.P. and David, S.B. 1988. Flavon formation in tissue cultures of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep*. 7: 448-451

- 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.
- Saplowo, 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.** Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Trager, W. and Jensen, J.B., 1976. Human malarial parasites in continous culture. **Science.** 193: 673-676.

Wolozin, R. 2004. *Mortgongensis* Plantlet Pada Kalus Tempung (*Sonchus oleraceus* L.) Thesis Departemen Biologi, IIR Bandung

Wu, S.J., Ray, K. and Sarkar, P.K. 2000. Tylophora is precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in-vitro-generated Sri Lankan Plant Cell Rep. 19:698-704.

Yadav, M.M., M.R. Bady and M.M. Saei Et-Nasr. 2000. Stimulation of antriradipone production in suspension cultures of *Cassia acutifolia* by salt stress. *Fitoterapia*. 71: 34-40.

Yeh, J.W. and N. Karmay, K. Koger, and T. Yasnikawa. 2002. Aβ1-stimulated diacylglycerol from suspension cultured cells of *Forsyia nucleata* var. *radicans*. *Phytochemistry*. 55: 385-389.

Yusuf, M. 2005. *Peranan bioteknologi dan mikrobiologi dalam pengembangan obat herbal*. *Majalah Ilmu Keperawatan*, vol. 1, 3: 113-118

Zakaria, S. et al. 1991. Antimutagenic activity and cytotoxicity of *Ficus virens* and *Ficus tomentosa* leaf extracts. *Phyoter. Res.* 5 (1): 32-34

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

Zakaria, R.A., Mahsika, I., Lestari, E.C. dan Hamet. 2004. Regenerasi tanaman dan transformasi genetik salak pondok untuk rekayasa buah panenskripsi. *Jurnal Bioteknologi Pertanian*. Vol 9, 2, pp. 49-55

Zakaria, R.A., Anjanyulu, G. and Gini, G. 2007. Genetic transformation of *Ternstroemia chinensis* Fenz and detection of tannin in transformed tissue. *Current Science*, Vol. 92, No. 3.

Zakaria, R.A., W. Tatiq, W. Watiq, dan Sumro, S.B. 2008. Meningkatkan produksi flavan-3-ol melalui kalus *Camellia sinensis* dengan Etilasi. *Berk. Panel. Hayati*. 14(39-41).

Zakaria, R.A., Y. Imvostri, E. Kobayashi, Y. Takamatsu, H. Ito, T. Hatanaka, H. Sakagami, H. Tokuda, H. Nishino, D. Sugita, S. Shimura, and T. Yoshida. 2002. Production of bioactive flavanones by *Embryophyta japonica* calli. *Phytochemistry*. 55: 315-323.

Zakaria, R.A. 2000. *Teknologi Tumbuhan Spermatophyta*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

Zakaria, R.A. and Jensen, J.S. 1978. 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. **Jurnal 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.

vanisree, M., Lee, C. L., & Malawade, 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.* 44:1-32

Werner, H. 1990. Antimicrobial activity of Tanzanian medicinal plants. *J. Planta Medica*. 56: 396-370.

World Health Organization, 1985. Special program for research and training in tropical disease research. TDR seventh program report. Manila (S) WHO special program for tropical disease pp:13.

Yu, J., C. Wang, and X. Mei. 2001. Stimulation of taxol production and excretion in *Taxus spp.* cell cultures by rare earth chemical treatment. *J. Biotechnol.* 85: 67-73.

Yunus, R. dan Lestari, E.G., 2008. Perbaikan kultur jaringan *Adiantum annua* secara in-vitro. *Jurnal Agrirogen*. Vol.4:1.

Zhang, J., W. Zhu, and Q. Hu. 2001. Enhanced ginsenoside production in *Ginseng* 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	100	34			
Batas Rendah	Within groups	100	30	100		
	Between groups	0	4	0	100	100
Batas Besar	Total	100	34			
	Within groups	100	30	100		
	Between groups	0	4	0	100	100
	Total	100	34			
	Within groups	100	30	100		
	Between groups	0	4	0	100	100

ANOVA

Batas Rendah	100	30	100
Batas Besar	100	30	100
Total	100	30	100

Test of Homogeneity of Variances

OUTPUT

- p. Output from data
- a. Test distribution is normal

Value of (calculated)		100	100	100
Kolmogorov-Smirnov Z		100	100	100
Differences	Negative	100	100	100
	Positive	100	100	100
Most Extreme	Absolute	100	100	100
	Sign deviation	100	100	100
Normal Parameters	Mean	100	100	100
N		100	100	100
		Batas Rendah	Batas Rendah	Batas Besar

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

Batas Besar	100	100	100	100
Batas Rendah	100	100	100	100
Batas Rendah	100	100	100	100
	N	Mean	Std. Deviation	Minimum
				Maximum

Descriptive Statistics

1. Pengujian signifikansi batas besar dan batas rendah

ANALISIS STATISTIK
 GAMBAR 1: Hasil uji statistik
 GAMBAR-GAMBAR

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
			N2	.37200*	.09140	.001	.1813	.5627
			N3	.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
			N4	-.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
			N4	-.01200	.00820	.159	-.0291	.0051

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

Robust Tests of Equality of Means

Statistic	df1	df2	Significance
Post Hoc Tests	4	10.000	.000
Post Hoc Tests	4	10.000	.000

Asymptotically F distributed.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Post Hoc Tests	df1	df2	Statistic	Significance	Lower Bound		Upper Bound	
					Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound
Post Hoc Tests	4	10.000	12.729	.000	0.000	0.000	0.000	0.000
					0.000	0.000	0.000	0.000
					0.000	0.000	0.000	0.000
					0.000	0.000	0.000	0.000
					0.000	0.000	0.000	0.000
					0.000	0.000	0.000	0.000
					0.000	0.000	0.000	0.000
					0.000	0.000	0.000	0.000
					0.000	0.000	0.000	0.000
					0.000	0.000	0.000	0.000
Post Hoc Tests	4	10.000	7.643	.000	0.000	0.000	0.000	0.000
					0.000	0.000	0.000	0.000
					0.000	0.000	0.000	0.000
					0.000	0.000	0.000	0.000
					0.000	0.000	0.000	0.000
					0.000	0.000	0.000	0.000
					0.000	0.000	0.000	0.000
					0.000	0.000	0.000	0.000
					0.000	0.000	0.000	0.000
					0.000	0.000	0.000	0.000

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	-.060
Kolmogorov-Smirnov Z		.741	.564
Asymp. Sig. (2-tailed)		.642	.908

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Homogeneous Subsets

Berat Basah

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Duncan M1	5	1740			
M2	5	2100	2100		
M3	5		1980	1980	
M4	5			1950	1950
Std		102	102	102	102

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

Berat Kering

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan M1	5	0380		
M2	5		0440	
M3	5		0840	0840
M4	5			0950
M1	5			0980
Std		1000	327	181

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

5. Pengaruh Elisior Terhadap Berat Basah dan Berat Kering Kalua
 Injar Teste

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

Statistic	Normal Parameters ^a	Most Extreme Differences	Positive	Negative	Kolmogorov-Smirnov Z	Asymp. Sig. (2-tailed)
1	Mean = 4.7400	.113	.107	-.113	.747	.908
2	Std. Deviation = 1.38801	.088	.088	-.088	.884	.908

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	Sig.
partial homogeneity	2.870	2	34	.038
partial homogeneity	2.047	8	34	.011

ANOVA

	Total	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
partial homogeneity	Total	321	42			
partial homogeneity	Between Groups	131	2	.006	.088	.718
partial homogeneity	Within Groups	190	39			
partial homogeneity	Total	24021	42			
partial homogeneity	Between Groups	62.088	2	1.829	.850	.360
partial homogeneity	Within Groups	17.965	39	1.495		
partial homogeneity	Total	11.965	41			

