

44
D. M. 09/05
Sug
a

DISERTASI

**AKUMULASI Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} DAN Sr^{2+} , SERTA STUDI
PERTUMBUHAN, KANDUNGAN FITOSTEROID DAN ASAM
AMINO PADA KULTUR *Agave amaniensis*, *Costus speciosus*,
Solanum laciniatum DAN *Solanum mammosum***



SUGIJANTO



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2003**

**AKUMULASI Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} DAN Sr^{2+} , SERTA STUDI
PERTUMBUHAN, KANDUNGAN FITOSTEROID DAN ASAM
AMINO PADA KULTUR *Agave amaniensis*, *Costus speciosus*,
Solanum laciniatum DAN *Solanum mammosum***

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
Telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
Pada hari : Selasa
Tanggal : 7 Januari 2003
Pukul 10.⁰⁰ WIB**

Oleh :

**SUGIJANTO
NIM. 099612340 D**

Lembar Pengesahan


DISERTASI INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 7 APRIL 2005

Oleh
Promotor



Prof. Dr. Noor Cholies Zaini
NIP: 130 355 372

Ko-promotor



Prof. Dr. Gunawan Indrayanto
NIP: 130 541 814

Telah diuji oleh Panitia Ujian Disertasi Tahap I (tertutup)

Tanggal 24 Oktober 2002

PANITIA PENGUJI

Ketua : Prof. Soemadi, Drs.

Anggota : 1. Prof. Dr. Noor Cholies Zaini
2. Prof. Dr. Gunawan Indrayanto
3. Prof. Endang Sutariningsih Soetarto, Dra., MSc., PhD.
4. Kuntoro, dr., MPH., Dr. PH.
5. Dr. H. Amiruddin Prawita
6. Dr. Wahjo Dyatmiko
7. Dr. Mulja Hadi Santosa

Ditetapkan dengan Surat Keputusan

Rektor Universitas Airlangga

Nomor : 8898/JO3/PP/2002

Tanggal : 31 Oktober 2002

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji dan syukur kami panjatkan ke hadirat Allah Yang Maha Kuasa, atas segala rahmat dan bimbingan-Nya, sehingga Penelitian Disertasi ini dapat saya selesaikan, sebagai syarat untuk mendapatkan gelar Doktor dalam Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Terima kasih dan penghargaan sebesar-besarnya saya sampaikan kepada Prof. Dr. Noor Cholies Zaini sebagai Promotor yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran dalam upaya memberikan wawasan, bimbingan, arahan dan dorongan semangat, sehingga saya dapat menyelesaikan Disertasi ini.

Terima kasih dan penghargaan sebesar-besarnya saya sampaikan kepada Prof. Dr. Gunawan Indrayanto selaku Ko-promotor yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran dalam upaya memberikan wawasan, bimbingan dan arahan, sehingga saya dapat menyelesaikan Disertasi dan telah memberikan pengalaman yang sangat berharga untuk menulis dalam jurnal internasional.

Dalam kesempatan ini saya sampaikan rasa terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

Menteri Pendidikan Nasional dan mantan Menteri Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia yang telah memberi kesempatan belajar dan berkenan memberikan bantuan finansial, melalui TMPD, sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan pendidikan Doktor.

Prof. Dr. Med. H. Puruhito selaku Rektor Universitas Airlangga, serta Prof. H. Bambang Rahino Setokoesoemo, dr dan Prof. H. Soedarto, dr. DTM&H., Ph.D. selaku mantan Rektor Universitas Airlangga, yang telah memberikan kesempatan untuk menempuh pendidikan Doktor di Universitas Airlangga Surabaya.

Prof. Dr. Med. H. Muhammad Amin, dr. selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, serta Prof. Dr. H. Soedijono Tirtowidarjo, dr. mantan Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, yang telah memberikan kesempatan, fasilitas dan berbagai kemudahan untuk mengikuti pendidikan Doktor dalam Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Prof. Dr. Gde Nyoman Astika selaku Ketua Program Studi Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, dan Prof. Dr. H. Abdul Azis Hubeis selaku mantan Ketua Program Studi Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam pendidikan Doktor Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang telah memberikan arahan dan semangat kepada saya.

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, yang sekarang dijabat Prof. Dr. Noor Cholies Zaini dan kepada yang terhormat Prof. Dr. H. Fasich dan Dr. H. Purwanto selaku mantan Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Doktor.

Direktur Ditbinlitabmas Dirjen Dikti Depdiknas atas dana Proyek Penelitian Dasar dan Kantor Menristek-DRN-BAPPENAS-LIPI-BPPT atas dana Penelitian Riset Unggulan Terpadu (RUT V) sehingga memperlancar penelitian saya.

Terima kasih kami sampaikan kepada orang tua kami Bapak Randiman Kartosentono dan Ibu Laminem (almarhum) yang telah membesarkan, membimbing,

memberi bekal dan mendidik dengan tauladan kesabaran dan keuletan, memberi kebebasan berpikir dan berusaha, dengan arahan bertawakkal kepada Allah SWT, serta doa restunya; demikian pula kepada ibu mertua Hj. Syarifah Fatimah atas doa restu untuk keberhasilan studi ini. Terima kasih tak terhingga saya sampaikan kepada istri tercinta Noor Erma Sugijanto, yang telah banyak berkorban, dengan penuh perhatian dan pengertian, serta dengan setia mendampingi dan memberikan semangat serta berdoa untuk keberhasilan saya; demikian pula kepada anak-anak kami: Rahmat Hidayat dan Kurnia Sofia Rosyada yang kami sayangi, yang penuh pengertian ikut serta berdoa dan memberikan dorongan semangat selama mengikuti pendidikan Doktor. Semoga Allah melimpahkan rahmat dan karunia Nya serta menuntun di jalan ketaqwaan kepada Nya.

Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada mahasiswa S1 dan S2 di Laboratorium Bioteknologi Farmasi Universitas Airlangga dan semua pihak yang tidak mungkin dapat kami sebutkan satu-persatu, yang telah membantu saya baik tenaga, moril maupun materil, sehingga saya dapat menyelesaikan program pendidikan doktor ini.

Semoga Allah SWT membalas kebajikan dari semua pihak, yang telah membantu saya dengan ikhlas untuk menyelesaikan disertasi ini, dengan limpahan rahmat kasih sayang, karunia nikmat, petunjuk dan pahala yang berlipat ganda.

Saya menyadari bahwa apa yang telah saya tulis dalam disertasi ini jauh dari kesempurnaan; namun saya berharap apa yang dapat saya persembahkan dalam disertasi ini semoga bermanfaat bagi bangsa, negara dan almamater tercinta Universitas Airlangga.

RINGKASAN

Kultur jaringan tanaman (KJT) seperti halnya tanaman induknya, ada yang mampu menyerap berbagai ion-ion logam yang ada di dalam media atau lingkungan tempat tumbuhnya, serta mengakumulasi dalam bagian organ-organnya. Selain tanaman utuhnya, KJT juga dapat digunakan untuk eksperimen fitoremediasi.

Sementara itu penelitian tentang respon KJT terhadap ion-ion logam masih sangat beragam. Oleh karena itu dilakukan penelitian akumulasi Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} serta studi pertumbuhan, kandungan fitosteroid dan asam amino pada kultur *A. amaniensis*, *C. speciosus*, *S. laciniatum* dan *S. mammosum*. Untuk penentuan ion-ion logam digunakan ICP-AES, untuk penentuan fitosteroid digunakan TLC-Scanner dan GC, dan untuk penentuan asam amino digunakan Amino Acid Analyzer.

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa kultur suspensi sel *Agave amaniensis* mampu tumbuh pada media yang mengandung kadar tinggi hingga : Cu^{2+} 15 ppm, Cd^{2+} 25 ppm dan Pb^{2+} 40 ppm. Kultur kalus *Costus speciosus* mampu tumbuh pada media yang mengandung kadar tinggi hingga: Cu^{2+} 20 ppm dan Cd^{2+} 20 ppm. Kultur suspensi sel *Costus speciosus* mampu tumbuh pada media yang mengandung kadar tinggi hingga: Cd^{2+} 20 ppm dan Pb^{2+} 40 ppm. Kultur pucuk *Solanum mammosum* mampu tumbuh pada media yang mengandung Cu^{2+} hingga 40 ppm. Kultur pucuk *Solanum laciniatum* mampu tumbuh pada media yang mengandung kadar tinggi hingga: Cd^{2+} 20 ppm dan Sr^{2+} 200 ppm.

Berbagai konsentrasi Cu^{2+} (0-40 ppm), Cd^{2+} (0-25 ppm), Pb^{2+} (0-40 ppm) dan Sr^{2+} (0-200 ppm) berpengaruh terhadap pertumbuhan kultur maupun morfologis dan histologis kultur. Pada umumnya terjadi penurunan IP (lebih rendah dari kontrol), pada kadar yang lebih tinggi, kecuali pada Pb^{2+} 10-30 ppm dapat meningkatkan IP kultur suspensi *C. speciosus* menjadi 1,8 kali dan pada Sr^{2+} 25-50 ppm dapat meningkatkan IP kultur *S. laciniatum* menjadi 1,2 kali dibanding kontrol.

Cu^{2+} 1,25-20 ppm menyebabkan kultur suspensi sel *A. amaniensis* mempunyai permukaan yang lebih berkerut dengan dinding sel yang lebih tebal (1,3-5 kali) dibanding kontrol. Cd^{2+} 20 ppm dan Sr^{2+} 50-100 ppm menyebabkan rasio lebar antara sistem pembuluh dan titik pusat empulur terhadap epidermis dari batang *S. laciniatum* menjadi lebih dari 1,4 kali dibanding kontrol.

Semua kultur *A. amaniensis*, *C. speciosus*, *S. laciniatum* dan *S. mammosum*, melakukan remediasi dan mengakumulasi Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} . Semua kultur tersebut bersifat hiperakumulator, karena akumulasinya di atas batas yang dianggap terjadi hiperakumulasi, yakni untuk Cu^{2+} ($> 100 \mu\text{g.g}^{-1}$ BK), Cd^{2+} ($> 100 \mu\text{g.g}^{-1}$ BK), Pb^{2+} ($> 500 \mu\text{g.g}^{-1}$ BK) dan Sr^{2+} ($> 1000 \mu\text{g.g}^{-1}$ BK).

Cu^{2+} 1,25 ppm meningkatkan kandungan hekogenin kultur suspensi *A. amaniensis*, mencapai 1,7 kali dibanding kontrol. Pada berbagai konsentrasi Cd^{2+} 10-25 ppm dan Pb^{2+} 10-40 ppm, menyebabkan kandungan hekogenin kultur *A. amaniensis* menurun menjadi 0,5-0,2 kali dibanding kontrol. Cu^{2+} 5-30 ppm menyebabkan kandungan sterol bebas *S. mammosum* menurun menjadi 0,7 – 0,2 kali dibanding kontrol dan terbentuk metabolit dengan Rf kromatogramnya identik

solasodina. Cd^{2+} 10 ppm dan Sr^{2+} 50-100 ppm meningkatkan kandungan solasodin 3,3 dan 1,6 kali pada kultur pucuk *S. laciniatum*.

Cu^{2+} 5-10 ppm menyebabkan terjadinya peningkatan kadar asam amino Pro, Asp, Ser, Glu, Gly, Ala, Val, Ile, Hyls dan Lys di dalam medianya rata-rata lebih dari 2 kali dibanding kontrol dan pada Cu^{2+} 10 ppm terjadi peningkatan Pro di dalam biomassa kultur suspensi *Agave amaniensis* menjadi 1,8 kali dibanding kontrol.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang fitokhelatin, pengaruh Pb^{2+} pada kultur suspensi *Costus speciosus* dan lainnya agar diperoleh informasi yang lebih lengkap mengenai mekanisme yang dapat meningkatkan indeks pertumbuhan dan kandungan sitosterol. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh Cu^{2+} pada pembentukan metabolit kultur pucuk *S. mammosum*, senyawa yang mempunyai Rf kromatogram identik dengan solasodina. Perlu dilakukan regenerasi **tanaman** *Agave amaniensis*, *Costus speciosus*, *Solanum laciniatum*, *Solanum mammosum* dan diuji di lapang untuk kemungkinan penerapan fitoremediasi atau aplikasi bioteknologi lingkungan di masa mendatang.



ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the accumulation of Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} and Sr^{2+} and the determination of the growth, phytosteroid and amino acid content of the cultures of *Agave amaniensis*, *Costus speciosus*, *Solanum laciniatum* and *Solanum mammosum*. Metal ions, phytosteroids, and amino acids content were determined by using ICP-AES, TLC-Scanner and GC, and Amino Acid Analyzer, respectively.

Cell suspension cultures of *Agave amaniensis* were able to grow in media containing Cu^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} up to 15 ppm, 25 ppm and 40 ppm, respectively; cell suspension cultures of *Costus speciosus* at Cd^{2+} and Pb^{2+} up to 20 ppm and 40 ppm, respectively; callus cultures of *Costus speciosus* at Cu^{2+} and Cd^{2+} up to 20 ppm each; shoot cultures of *Solanum mammosum* at Cu^{2+} up to 40 ppm and shoot cultures of *Solanum laciniatum* at Cd^{2+} and Sr^{2+} up to 20 ppm and 200 ppm, respectively.

Increasing Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} and Sr^{2+} up to 20 ppm, 25 ppm, 40 ppm and 200 ppm respectively, caused a decrease in growth index of the cultures, except Pb^{2+} 10-30 ppm increased the growth index of *Costus speciosus* by up to 1.8 fold and Sr^{2+} 25-50 ppm increased the growth index of *Solanum laciniatum* by up to 1.2 fold compared to control cultures.

The presence of Cu^{2+} 1.25-20 ppm caused the cell walls to thicken 1.3-5 fold than control cultures and to be more wrinkled. The ratios of the width between the vascular system and central point of the pith to that of the epidermis of the stem of *Solanum laciniatum* treated with Cd^{2+} 20 ppm and Sr^{2+} 50-100 ppm were 1.4 times bigger compared to those cultures cultivated on the medium without Cd^{2+} and Sr^{2+} .

The cultures of *Agave amaniensis*, *Costus speciosus*, *Solanum laciniatum* and *Solanum mammosum* could accumulated Cu^{2+} ($> 100 \mu\text{g.g}^{-1}$ DW), Cd^{2+} ($> 100 \mu\text{g.g}^{-1}$ DW), Pb^{2+} ($> 500 \mu\text{g.g}^{-1}$ DW) and Sr^{2+} ($> 1000 \mu\text{g.g}^{-1}$ DW), hence these cultures acted as hyper-accumulators for those metals ion.

In the media containing Cu^{2+} 1.25 ppm, the hecogenin content in the biomass of the cultures of *A. amaniensis* increased up to 1.7 fold than its control. At Cd^{2+} 10-25 ppm and Pb^{2+} 10-40 ppm, the hecogenin content decreased up to 0.5-0.2 fold than its control. In the media containing Cu^{2+} 5-30 ppm, the free sterols content in the biomass of the cultures of *S. mammosum* decreased up to 0.7-0.2 fold than its control, and its cultures produced metabolite that its chromatogram identically with solasodine. In the media containing Cd^{2+} 10 ppm and Sr^{2+} 50-100 ppm, the solasodine content in the biomass of the cultures of *S. laciniatum* increased up to 3.3 and 1.6 fold than its control.

In the media containing Cu^{2+} 5-10 ppm, certain amino acids including Pro, Asp, Ser, Glu, Gly, Ala, Val, Ile, Hylys and Lys were released in high concentration into the media, 2 fold more than its control; and Pro in the biomass increased 1.8 fold at Cu^{2+} 10 ppm.

Key words : *Agave amaniensis*, amino acids, cadmium, copper, *Costus speciosus*, hyper-accumulation, lead, phytosteroids, *Solanum laciniatum*, *Solanum mammosum*, strontium.

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Persetujuan	iv
Penetapan Panitia	v
Ucapan terima kasih	vi
Ringkasan.....	ix
Abstrak	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xxi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Permasalahan.....	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.3.1 Tujuan umum	7
1.3.2 Tujuan khusus	7
1.4 Manfaat Penelitian	7

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Kultur Jaringan Tanaman.....	9
2.1.1 Kultur jaringan tanaman <i>Agave amaniensis</i>	10
2.1.2 Kultur jaringan tanaman <i>Costus Speciosus</i>	12
2.1.3 Kultur jaringan tanaman <i>Solanum laciniatum</i>	14
2.1.4 Kultur jaringan tanaman <i>Solanum mammosum</i>	15
2.2 Tinjauan Tentang Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+}	16
2.3 Tinjauan Tentang Akumulasi Ion-ion Logam dan Respon KJT..	19
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN..	22
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian.....	22
3.2 Hipotesis penelitian.....	24
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	26
4.1 Rancangan Penelitian	26
4.2 Sampel Penelitian.....	27
4.3 Variabel Penelitian	27
4.4 Bahan Penelitian	28
4.4.1 Bahan Kimia	28
4.1.3 Media	29
4.5 Alat atau instrumen penelitian.....	30
4.5.1 Alat untuk kultivasi kultur, pengamatan pertumbuhan dan mikroskopi	30
4.5.2 Alat untuk isolasi, pemurnian dan analisis	31
4.6 Lokasi dan waktu penelitian	31

4.7 Cara Kerja	31
4.7.1 Penyiapan kultur jaringan tanaman	31
4.7.1.1 Pembuatan media	31
4.7.1.2 Kultivasi dan perbanyak kultur kalus, suspensi dan pucuk	33
4.7.2 Pengamatan pertumbuhan dan morfologis-histologis KJT	33
4.7.2.1 Pembuatan media perlakuan	33
4.7.2.2 Kultivasi kultur pada media perlakuan	34
4.7.2.3 Pemanenan kultur	34
4.7.2.4 Pengamatan karakter pertumbuhan	35
4.7.2.5 Pengamatan morfologis-histologis KJT	37
4.7.3 Analisis remediasi dan akumulasi Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+}	39
4.7.4 Analisis metabolit	40
4.7.4.1 Ekstraksi dan analisis fitosteroid (hekogenin, solasodina dan sterol)	40
4.7.4.2 Ekstraksi dan analisis asam amino	44
4.7.5 Analisis data	47
BAB 5 HASIL PENELITIAN.....	48
BAB 6 PEMBAHASAN.....	81
6.1 Pengaruh Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} terhadap pertumbuhan dan morfologis-histologis KJT	81
6.2 Remediasi dan akumulasi Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+}	89

6.3 Pengaruh Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} terhadap kandungan .. metabolit	93
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	97
7.1 Kesimpulan.....	97
7.2 Saran.....	98
DAFTAR PUSTAKA.....	100
LAMPIRAN.....	105



DAFTAR TABEL

Nomor Tabel	Halaman
5.1 Hasil pengukuran IP dan PCV, penentuan remediasi dan akumulasi Cu^{2+} , serta kandungan hekogenin kultur suspensi <i>Agave amaniensis</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cu^{2+}	49
5.2 Kandungan asam amino (%BK) di dalam biomassa kultur suspensi <i>Agave amaniensis</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cu^{2+}	50
5.3 Kandungan asam amino di dalam media (% b/v) kultur suspensi <i>A. amaniensis</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cu^{2+}	51
5.4 Hasil pengukuran IP, remediasi dan akumulasi Cu^{2+} di dalam biomassa kultur kalus <i>Costus speciosus</i> umur 3 minggu pada berbagai konsentrasi Cu^{2+}	52
5.5 Hasil pengukuran IP dan PCV kultur suspensi <i>Solanum mammosum</i> umur 7 hari, serta IP, akumulasi Cu^{2+} dalam biomassa dan kandungan sterol total bebas kultur pucuk <i>S. mammosum</i> umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi Cu^{2+}	53
5.6 Hasil pengukuran IP, PCV, remediasi dan akumulasi Cd^{2+} , serta kandungan hekogenin di dalam biomassa kultur suspensi <i>A. amaniensis</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cd^{2+}	54
5.7 Hasil pengukuran IP, PCV, remediasi dan akumulasi Cd^{2+} , serta kandungan sitosterol kultur suspensi <i>Costus speciosus</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cd^{2+}	55
5.8 Hasil pengukuran IP, remediasi dan akumulasi Cd^{2+} di dalam biomassa kultur kalus <i>Costus speciosus</i> umur 3 minggu pada berbagai konsentrasi Cd^{2+}	56
5.9 Hasil pengukuran IP, remediasi dan akumulasi Cd^{2+} , serta kandungan solasodina di dalam biomassa kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi Cd^{2+}	57

- 5.10 Hasil pengukuran IP, PCV, remediasi dan akumulasi Pb^{2+} , serta kandungan hekogenin kultur suspensi *A. amaniensis* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Pb^{2+} 58
- 5.11 Hasil pengukuran IP, PCV, remediasi dan akumulasi Pb^{2+} , serta kandungan hekogenin kultur suspensi *A. amaniensis* umur 14 hari pada berbagai konsentrasi Pb^{2+} 59
- 5.12 Hasil pengukuran IP, PCV, remediasi dan akumulasi Pb^{2+} , serta kandungan sitosterol kultur suspensi *Costus speciosus* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Pb^{2+} 60
- 5.13 Hasil pengukuran IP, remediasi dan akumulasi Sr^{2+} , serta kandungan solasodina di dalam biomassa kultur pucuk *Solanum laciniatum* umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi Sr^{2+} 61



DAFTAR GAMBAR

Nomor Gambar	Halaman
3.1 Kerangka konseptual akumulasi ion logam, respon KJT dan penerapannya	25
5.1 Histogram IP dan % PCV kultur suspensi sel <i>Agave amaniensis</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cu^{2+}	62
5.2 Histogram IP kultur kalus <i>Costus speciosus</i> umur 3 minggu pada berbagai konsentrasi Cu^{2+}	62
5.3 Histogram IP dan % PCV kultur suspensi <i>Solanum mammosum</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cu^{2+} ...	63
5.4 Histogram IP kultur pucuk <i>Solanum mammosum</i> umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi Cu^{2+}	63
5.5 Histogram IP dan % PCV kultur suspensi sel <i>Agave amaniensis</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cd^{2+}	64
5.6 Histogram IP dan % PCV kultur suspensi sel <i>Costus speciosus</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cd^{2+}	64
5.7 Histogram IP kultur kalus <i>Costus speciosus</i> umur 3 minggu pada berbagai konsentrasi Cd^{2+}	65
5.8 Histogram IP kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi Cd^{2+}	65
5.9 Histogram IP dan % PCV kultur suspensi sel <i>Agave amaniensis</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Pb^{2+}	65
5.10 Histogram IP dan % PCV kultur suspensi sel <i>Agave amaniensis</i> umur 14 hari pada berbagai konsentrasi Pb^{2+} ...	66
5.11 Histogram IP dan % PCV kultur suspensi sel <i>Costus speciosus</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Pb^{2+}	66
5.12 Histogram IP kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi Sr^{2+}	67
5.13 Permukaan sel dan dinding sel dari kultur suspensi sel <i>Agave amaniensis</i>	68

5.14	Irisan/penampang melintang batang kultur pucuk <i>Solanum mammosum</i> pada berbagai konsentrasi Cu^{2+}	69
5.15	Irisan melintang batang kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> pada berbagai konsentrasi Cd^{2+}	70
5.16	Irisan melintang batang <i>Solanum laciniatum</i> pada berbagai konsentrasi Sr^{2+}	71
5.17	Histogram remediasi dan akumulasi Cu^{2+} kultur suspensi sel <i>Agave amaniensis</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cu^{2+}	72
5.18	Histogram remediasi dan akumulasi Cu^{2+} kultur kalus <i>Costus speciosus</i> umur 3 minggu pada berbagai konsentrasi Cu^{2+}	72
5.19	Histogram akumulasi Cu^{2+} kultur pucuk <i>Solanum mammosum</i> umur 3 minggu pada berbagai konsentrasi Cu^{2+}	73
5.20	Histogram remediasi dan akumulasi Cd^{2+} kultur suspensi sel <i>A.amaniensis</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cd^{2+} ...	73
5.21	Histogram remediasi dan akumulasi Cd^{2+} kultur suspensi <i>C. speciosus</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cd^{2+}	74
5.22	Histogram remediasi dan akumulasi Cd^{2+} kultur kalus <i>C. speciosus</i> umur 3 minggu pada berbagai konsentrasi Cd^{2+}	74
5.23	Histogram remediasi dan akumulasi Cd^{2+} kultur pucuk <i>S. laciniatum</i> umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi Cd^{2+} .	75
5.24	Histogram remediasi dan akumulasi Pb^{2+} kultur suspensi sel <i>A.amaniensis</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Pb^{2+} ...	75
5.25	Histogram remediasi dan akumulasi Pb^{2+} kultur suspensi sel <i>A.amaniensis</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Pb^{2+}	76
5.26	Histogram remediasi dan akumulasi Pb^{2+} kultur suspensi <i>Costus speciosus</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Pb^{2+}	76
5.27	Histogram remediasi dan akumulasi Sr^{2+} kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi Sr^{2+}	77

5.28	Histogram kandungan hekogenin kultur suspensi sel <i>A.amaniensis</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cu^{2+} ...	77
5.29	Histogram kandungan sterol bebas kultur pucuk <i>S. mammosum</i> umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi Cu^{2+} .	77
5.30	Histogram kandungan hekogenin kultur suspensi sel <i>A.amaniensis</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cd^{2+} ...	78
5.31	Histogram kandungan sitosterol kultur suspensi sel <i>Costus speciosus</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cd^{2+}	78
5.32	Histogram kandungan solasodin kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi Cd^{2+} ...	78
5.33	Histogram kandungan hekogenin kultur suspensi sel <i>A.amaniensis</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Pb^{2+}	79
5.34	Histogram kandungan hekogenin kultur suspensi sel <i>A.amaniensis</i> umur 14 hari pada berbagai konsentrasi Pb^{2+} ...	79
5.35	Histogram kandungan sitosterol kultur suspensi sel <i>C. speciosus</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Pb^{2+}	79
5.36	Histogram kandungan solasodin kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi Sr^{2+}	80

DAFTAR SINGKATAN

Ala	alanine
Arg	arginine
Asp	aspartic acid
BA	benzyl adenosin, benzyl adenin purine
BB	berat basah
BK	berat kering, <i>dry weight</i> (DW)
b/b	berat per berat
Cys	cystine
2,4 D	2,4 dichlorophenoxy acetic acid
DW	<i>dry weight</i>
GC	<i>gas chromatograph</i>
Glu	glutamic acid
Gly	glycine
His	histidine
Hypro	hydroxyproline
Hylys	hydroxylysine
ICP-AES	<i>Inductively coupled plasma – atomic emission spectrophotometer</i>
Ile	isoleucine
IP	indeks pertumbuhan
KJT	kultur jaringan tanaman
KLT	kromatografi lapisan tipis, <i>thin layer chromatography</i> (TLC)
Leu	leucine
Lys	lysine
Met	methionine

MS	Murashige Skoog
NAA	naphtic acetic acid
n	banyaknya replikasi
PCV	<i>packed cell volume</i>
Phe	phenylalanine
ppm	part per million, bagian per juta, mg/l, mg.l ⁻¹
Pro	proline
rpm	<i>rounds per minute</i>
SD	standar deviasi
SEM	Scanning Electron Microscopy
Ser	serine
TEM	Transmission Electron Microscopy
Thr	threonine
TLC	<i>thin layer chromatograph</i> , kromatografi lapisan tipis, KLT
Trp	tryptophan
Tyr	tyrosine
UV	<i>ultra violet</i>
Val	valine

DAFTAR LAMPIRAN

	halaman	
Lampiran 1	Komposisi Media Murashige dan Skoog	105
Lampiran 2	Komposisi Media Murashige dan Skoog yang dimodifikasi untuk pertumbuhan kultur suspensi <i>Agave amaniensis</i>	106
Lampiran 3	Komposisi Media Murashige dan Skoog yang dimodifikasi untuk pertumbuhan kultur suspensi <i>Costus speciosus</i>	107
Lampiran 4	Komposisi Media Murashige dan Skoog yang dimodifikasi untuk pertumbuhan kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i>	108
Lampiran 5	Komposisi Media Murashige dan Skoog yang dimodifikasi untuk pertumbuhan kultur suspensi <i>Solanum mammosum</i>	109
Lampiran 6	Komposisi Media Murashige dan Skoog yang dimodifikasi untuk pertumbuhan kultur pucuk <i>Solanum mammosum</i>	110
Lampiran 7	Contoh hasil analisis Varian (ANOVA) terhadap IP kultur <i>A. amaniensis</i> umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cu^{2+}	111
Lampiran 8	Contoh Hasil Uji Regresi korelasi antara variasi konsentrasi Cu^{2+} dalam media dengan IP kultur <i>A. amaniensis</i>	112
Lampiran 9	Gambar Estimasi kurva regresi hubungan antara variasi konsentrasi ion logam dalam media dengan IP kultur	115
Lampiran 10	Biodata	117

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang permasalahan

Polutan dapat diremediasi tanaman melalui absorpsi, transpor dan translokasi. Dalam fitoremediasi, tanaman digunakan untuk mengekstraksi dan menghilangkan senyawa logam toksik termasuk radioaktif dari tanah atau air, menghilangkan senyawa organik toksik dan mungkin juga melakukan mineralisasi (Macek *et al.*, 2000). Secara alami tanaman mempunyai kemampuan mengatasi gangguan atau stress dari luar, karena adanya mekanisme sistem pertahanan diri terhadap stress. Ada berbagai macam stress, yakni stress medium, fisik, kimiawi dan infeksi. Yang menyebabkan stress kimiawi antara lain ion-ion logam (Brodelius, 1988). Kemampuan tanaman untuk merespon stress dapat beragam; ada yang peka, tidak mampu mengatasi stress dan ada yang tahan terhadap stress karena mempunyai mekanisme pencegahan sehingga toleran terhadap stress dan mengakumulasi ion-ion logam dalam bagian organ-organnya (Hopkins, 1999). Tanaman yang mampu melakukan hiperakumulasi penting untuk fitoremediasi (Chaney *et al.*, 1997; Meagher, 2000), bahkan ada yang dimanfaatkan untuk “phytomining” (Brooks *et al.*, 1998). Kultur jaringan tanaman (KJT) seperti halnya tanaman induknya, ada yang mampu menyerap berbagai mineral dan ion-ion logam yang ada di dalam media atau lingkungan tempat tumbuhnya, serta mengakumulasikan dalam bagian organ-organnya. Selain tanaman utuhnya, KJT juga dapat digunakan untuk eksperimen fitoremediasi (Zikmundova *et al.*, 1995; Gori *et al.*, 1998; Macek *et al.*, 2000). Kultur jaringan tanaman sebagai sistem



yang dapat diatur sesuai kondisi laboratorium yang dikehendaki, tidak tergantung iklim dan seringkali tumbuh lebih cepat (Macek *et al.*, 2000); adanya pengaruh perubahan salah satu faktor terhadap kultur *in vitro* dapat diamati dengan seksama. *Brassica juncea* mengakumulasi Pb^{2+} , Cr^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} dan Ni^{2+} dalam jaringan akarnya (Raskin *et al.*, 1994), kultur akar rambut *Armoraceae rusticana* mengakumulasi Cu^{2+} dan Hg^{2+} (Zikmundova *et al.*, 1995). Dari seleksi kultur kalus *Nicotiana tabacum* yang toleran, dapat diregenerasi menjadi kultur pucuk yang tahan hidup terhadap Cu^{2+} 6,4 ppm (Gori *et al.*, 1998).

Di Laboratorium Bioteknologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, telah dilakukan berbagai penelitian tentang pengaruh berbagai ion logam terhadap pertumbuhan dan kandungan metabolit sekunder kultur jaringan tanaman. Di dalam media yang mengandung Ca^{2+} 480 ppm, Sr^{2+} 197 ppm dan Mg^{2+} 243 ppm, kultur kalus *Agave amaniensis* mampu tumbuh dengan IP > 2,9. Tanpa Ca^{2+} kandungan hekogenin kultur kalus meningkat sekitar 1,8 kali dan dengan penambahan Sr^{2+} 197 ppm meningkat menjadi 1,6 kali, sedangkan penambahan Mg^{2+} 122 ppm meningkatkan kandungan sterol total 2,7 kali, dibanding kultur kalus dengan kadar orisinal ion-ion logam tersebut di dalam medium MS sebagai kontrol (Indrayanto *et al.*, 1993). Adanya $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ dan $CoCl_2 \cdot 2H_2O$ hingga 15 ppm atau setara dengan Cu^{2+} 3,8 ppm dan Co^{2+} 3,7 ppm, semua kultur kalus *A. amaniensis* mampu tumbuh dengan IP > 5,2; demikian pula terhadap Mg^{2+} 49-1216 ppm dengan IP terendah 2,3; Cu^{2+} dan Co^{2+} 0,06-2,5 ppm, serta Mg^{2+} 49-486 ppm, dapat menginduksi produksi sapogenin steroid dan terjadi peningkatan terbesar pada Cu^{2+} 0,6 ppm, Co^{2+} 0,06 ppm dan Mg^{2+} 243 ppm, lebih dari 2,5 kali dibanding kultur kalus dengan kadar orisinal ion-ion logam di dalam

medium MS sebagai kontrol. Sedangkan pada pemberian Cu^{2+} 3,8 ppm dan Mg^{2+} di atas 972 ppm terjadi penurunan kandungan sapogenin steroid menjadi 0,7 kali dibanding kontrol; hal ini mungkin disebabkan efek toksis dari ion logam tersebut (Indrayanto *et al.*, 1996). Di dalam media dengan kadar relatif tinggi dari Ca^{2+} 108-180 ppm, Mg^{2+} 105-129 ppm, Co^{2+} 0,02-0,1 ppm dan Cu^{2+} 0,5-0,8 ppm secara simultan, ternyata semua kultur kalus *A. amaniensis* tetap tahan dengan IP > 3,1 (Andrijany *et al.*, 1999). Yang dimaksud tahan dalam hal ini adalah mampu tumbuh pada media dengan kadar ion logam tersebut, dengan IP > 1. Penelitian pengaruh konsentrasi relatif tinggi Cu^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} dan Sr^{2+} terhadap pertumbuhan dan kandungan diosgenin kultur pucuk *Costus speciosus* telah dilaporkan. Kultur pucuk tersebut tahan terhadap Cu^{2+} dan Co^{2+} 0,6 ppm, Sr^{2+} 197 ppm dan Mn^{2+} 55 ppm, dengan IP > 1,5; serta tahan terhadap Ca^{2+} 600 ppm dan Mg^{2+} 183 ppm dengan IP di atas 1,2. Cu^{2+} 0,6 ppm dan Sr^{2+} 197 ppm menginduksi peningkatan kandungan diosgenin 1,3 kali, sedangkan Co^{2+} menurunkan kandungan diosgenin menjadi 0,9 kali; pada kadar Ca^{2+} , Mg^{2+} dan Mn^{2+} tersebut, kandungan diosgenin kultur pucuk turun menjadi 0-3-0,4 kali dibanding pada kultur dengan kadar orisinal ion-ion logam di dalam medium MS sebagai kontrol (Indrayanto *et al.*, 1999). Penelitian lain menunjukkan bahwa adanya Cu^{2+} sampai 0,6 ppm pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* umur 4 minggu, terjadi penurunan IP menjadi 0,4 kali; sedangkan penggunaan Co^{2+} sampai 0,6 ppm tidak berbeda bermakna ($\alpha=0,05$) pada pertumbuhan, dibanding kultur pucuk dengan kadar orisinal ion-ion logam di dalam medium MS sebagai kontrol; namun demikian semua kultur pucuk tersebut tahan hidup dengan IP > 5.

Pemberian Cu^{2+} dan Co^{2+} 0,6 ppm menyebabkan terjadinya penurunan kandungan solasodin > 0,5 kali dibanding kontrol (Sugijanto *et al.*, 1998).

Sementara itu penelitian tentang respon KJT terhadap ion-ion logam masih sangat beragam. Pada kultur pucuk *Nicotiana tabacum* L. hasil regenerasi yang toleran terhadap Cu^{2+} 6,4 ppm, terjadi respon morfologis-histologis, batangnya lebih besar, silinder pusat lebih berkembang, xylem lebih banyak dengan dinding sekunder yang lebih tebal dibandingkan tanaman kontrol (Gori *et al.*, 1998). Pada KJT *Bacopa moniera*, Cd^{2+} 2,8 ppm menyebabkan pertumbuhan pucuk turun 50 %, terjadi perubahan morfogenik, jumlah dan tinggi tunas, berat basah kultur serta pembentukan akar dan terjadi peningkatan prolin 2 kali dibanding kontrol; sedangkan pada Cd^{2+} 5,6 ppm terjadi kematian kultur (Ali *et al.*, 1998). Kultur sel *Silene vulgaris* merespon Ni^{2+} dengan mengakumulasi pembentukan histidin bebas (Krämer *et al.*, 1996). Secara alami tanaman memberikan respon terhadap ion logam berat, dengan menghasilkan senyawa fitoaleksin sebagai mekanisme pertahanan diri (Brodellius, 1988; Kolodziej, 1989; Threlfall dan Whitehead, 1989), pelepasan fitosiderofor, senyawa pengkhelat peptida kaya sistein (metallothionein, cys-X-cys, X asam amino lain) yang disekresikan ke lingkungan tempat hidupnya (Raskin *et al.*, 1994); pembentukan fitokhelatin, polipeptida $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ (n=2-11) untuk membentuk khelat logam-fitokhelatin (Rauser, 1995; Ochiai, 1995; Meuwley *et al.*, 1995), dalam mekanisme transportasi melalui sitoplasma. Dalam tanaman yang toleran, ion logam berat sering dibentuk menjadi khelat atau presipitat di dalam vakuola (Leopold *et al.*, 1999). Leopold *et al.* (1999) melaporkan adanya akumulasi ion logam dan pembentukan fitokhelatin pada kultur suspensi sel

Silene vulgaris yang toleran terhadap Cu^{2+} 0,6-6,4 ppm, Cd^{2+} 1-10 ppm dan Pb^{2+} 2-20 ppm. Batasan kadar ini 10 kali lebih besar dari kadar yang dipakai untuk kultur sel tomat yang sensitif terhadap ion tersebut.

Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} termasuk bahan berbahaya bagi lingkungan. Batas konsentrasi yang diperbolehkan dalam air limbah yang dapat diolah secara biologis adalah Cu^{2+} dan Cd^{2+} 1 ppm, Pb^{2+} 5 ppm (Förstner & Wittmann, 1981). Batas konsentrasi yang diperbolehkan di dalam air atau badan air untuk keperluan domestik, untuk Sr^{2+} 7 ppm, Cu^{2+} 1 ppm, Cd^{2+} 0,001 ppm, Pb^{2+} 0,03 ppm (Filov *et al.*, 1993). Menurut Peraturan Pemerintah nomor 82 tahun 2001 tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air, kadar maksimum yang diperbolehkan di dalam air, yang digunakan untuk air baku air minum (kelas I): Cu^{2+} 0,02 ppm, Cd^{2+} 0,01 ppm dan Pb^{2+} 0,03 ppm, sedangkan untuk mengairi pertanian (kelas IV): Cu^{2+} 0,2 ppm, Cd^{2+} 0,01 ppm dan Pb^{2+} 1,0 ppm. Di dalam Baku Mutu Limbah Cair Kegiatan Pengolahan Limbah Industri B3 (BMLCK-PPLIB3) ditetapkan batas kadar yang diperbolehkan, untuk Cu^{2+} 2 ppm, Cd^{2+} 0,05 ppm dan Pb^{2+} 0,1 ppm (BAPEDAL, 2001).

Berdasarkan fakta-fakta di atas, menunjukkan bahwa kultur kalus *A. amaniensis* yang telah diteliti tahan terhadap Cu^{2+} 3,8 ppm dan Sr^{2+} 197 ppm; kultur pucuk *C. speciosus* tahan terhadap Cu^{2+} 0,6 ppm dan Sr^{2+} 197 ppm; kultur pucuk *S. laciniatum* tahan terhadap Cu^{2+} 0,6 ppm, dan dalam orientasi penelitian kultur suspensi sel *Solanum mammosum* tahan terhadap Cu^{2+} 5 ppm. Belum diteliti apakah kultur *in vitro* dari tanaman tersebut tahan terhadap kadar tinggi Cu^{2+} hingga 6,4 ppm seperti batas yang dilaporkan Gori *et al.*, 1998 dan Leopold *et al.* 1999 ?, apakah tahan hingga Cd^{2+} 10 ppm dan Pb^{2+} 20 ppm, kadar tertinggi yang dilaporkan Leopold *et al.* 1999 ? Untuk *Solanum laciniatum* apakah juga

tahan terhadap Sr^{2+} hingga 197 ppm, seperti yang pernah dilakukan pada *A. amaniensis* dan *C. speciosus* ? (Indrayanto *et al.*, 1993 dan 1999). Apakah kultur tersebut melakukan remediasi dan akumulasi ion-ion logam di dalam biomasnya ? Apakah ada pengaruh berbagai kadar ion-ion logam tersebut terhadap pertumbuhan dan morfologis-histologis kultur, terhadap pembentukan fitosteroid dan akumulasi asam amino pada KJT ? Untuk menjawab permasalahan tersebut perlu dilakukan penelitian.

1.2 Rumusan masalah

Berdasarkan uraian di atas, penelitian akumulasi Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} serta studi pertumbuhan, kandungan fitosteroid dan asam amino pada kultur *Agave amaniensis*, *Costus speciosus*, *Solanum laciniatum* dan *Solanum mammosum* dirancang untuk menjawab permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah kultur *Agave amaniensis*, *Costus speciosus*, *Solanum laciniatum* dan *Solanum mammosum* tahan atau mampu tumbuh di dalam media yang mengandung ion logam hingga kadar Cu^{2+} 6,4 ppm, Cd^{2+} 10 ppm, Pb^{2+} 20 ppm dan Sr^{2+} 197 ppm ?
2. Apakah Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} pada berbagai konsentrasi mempengaruhi pertumbuhan dan morfologis histologis kultur tersebut ?
3. Seberapa besar kemampuan kultur yang diteliti melakukan remediasi dan akumulasi terhadap berbagai konsentrasi Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} ?
4. Apakah Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} pada berbagai konsentrasi mempengaruhi pembentukan fitosteroid dan akumulasi asam amino pada kultur tersebut ?

1.3 Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Tujuan umum dari penelitian ini ialah menggunakan kultur jaringan tanaman dalam rangka mempelajari akumulasi ion logam serta studi pertumbuhan, kandungan fitosteroid dan asam amino pada kultur jaringan tanaman.

1.3.2 Tujuan khusus

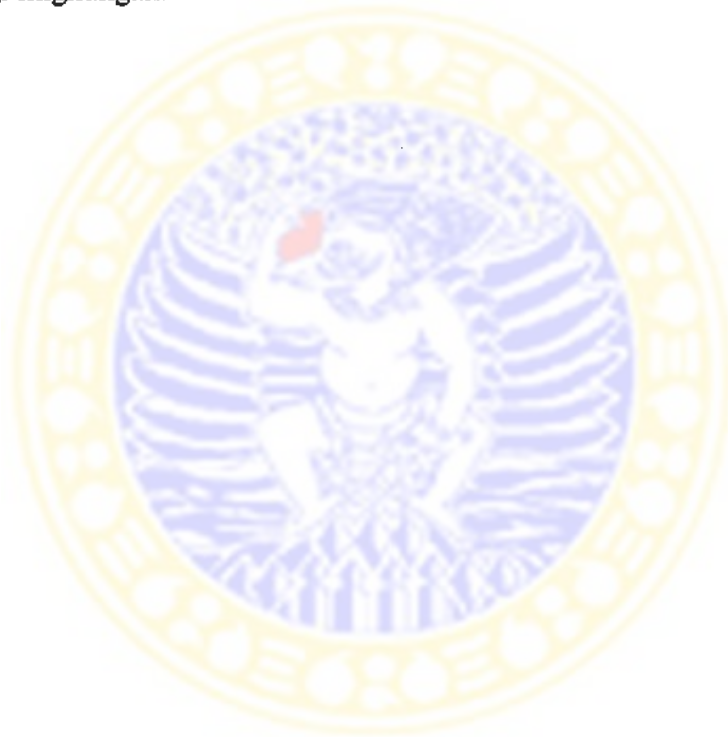
Tujuan khusus yang hendak dicapai dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Meneliti apakah kultur *Agave amaniensis*, *Costus speciosus*, *Solanum laciniatum* dan *Solanum mammosum* mampu tumbuh di dalam media yang mengandung ion logam hingga kadar Cu^{2+} 6,4 ppm, Cd^{2+} 10 ppm, Pb^{2+} 20 ppm dan Sr^{2+} 197 ppm.
2. Meneliti pengaruh berbagai konsentrasi Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} pada pertumbuhan dan morfologis histologis kultur jaringan tanaman.
3. Meneliti kemampuan kultur tersebut melakukan remediasi dan akumulasi terhadap berbagai konsentrasi Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} .
4. Meneliti pengaruh berbagai konsentrasi Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} terhadap pembentukan fitosteroid dan akumulasi asam amino pada kultur.

1.4 Manfaat penelitian

Dari hasil penelitian yang dilakukan, diharapkan dapat diketahui kemampuan kultur *in vitro* *Agave amaniensis*, *Costus speciosus*, *Solanum*

laciniatum dan *Solanum mammosum* untuk tahan hidup terhadap berbagai kadar Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} , kemampuan remediasi dan akumulasinya, pertumbuhan dan morfologis-histologis KJT, pembentukan fitosteroid dan asam amino pada KJT. Demikian pula diharapkan diperoleh kultur yang dapat diregenerasi lebih lanjut menjadi tanaman yang tahan terhadap kadar tinggi ion-ion logam, yang dapat dimanfaatkan untuk penerapan fitoremediasi dalam rangka aplikasi bioteknologi lingkungan.



B A B 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kultur Jaringan Tanaman

Metode bioteknologi sel tanaman secara *in vitro* telah dikembangkan untuk memproduksi metabolit sekunder (bahan baku obat-obatan) melalui sintesis *de novo* ataupun biotransformasi senyawa kimia menggunakan sel tanaman tertentu. Teknik ini juga digunakan untuk mempelajari mekanisme biosintesis dan untuk pemuliaan suatu tanaman (Indrayanto *et al.*, 1997). Perkembangan terakhir kultur *in vitro* digunakan untuk studi bioremediasi (Zikmundova *et al.*, 1995) atau penelitian fitoremediasi (Macek *et al.*, 2000).

Telah diketahui bahwa sel, jaringan, maupun organ tanaman dalam keadaan steril dapat ditumbuhkan pada media sintesis yang mengandung garam-garam anorganik, vitamin, gula, asam amino dan hormon pertumbuhan. Apabila kondisi media cocok, maka eksplan steril (tunas, tangkai daun, daun, akar, serbuk sari dan bagian tanaman lainnya) akan membelah diri dan tumbuh menjadi massa sel meristematis yang belum terdiferensiasi, yang disebut kultur kalus. Untuk memperoleh kultur suspensi, dari kultur kalus dipindahkan ke media cair di dalam labu Erlenmeyer atau fermentor/bioreaktor dan diagitasi dengan alat pengocok (*rotary shaker*), yang umumnya dilakukan 30-150 rpm. Dengan merubah komposisi hormon pertumbuhan dapat diperoleh massa sel yang terdiferensiasi, dan dapat diregenerasikan menjadi tanaman baru (Bhojwani dan Razdan, 1983). Dengan beragam teknik yang telah dikembangkan, dikenal berbagai sistem kultur

yaitu: kultur kalus, kultur suspensi, kultur pucuk, kultur akar, kultur protoplas, kultur anter, kultur sel tanaman amobil dan kultur akar berambut (Indrayanto, 1997). Semua sistem di atas secara umum dapat disebut sebagai kultur jaringan tanaman.

Kultur jaringan tanaman (KJT) didefinisikan sebagai bagian atau jaringan tumbuhan yang telah dipisahkan dari tumbuhan asalnya dan ditanam dalam keadaan steril pada suatu media buatan dan sel-selnya mampu tumbuh dan mengadakan pembelahan (Bhojwani dan Razdan, 1983). KJT mempunyai kemampuan untuk menghasilkan metabolit sekunder dan melakukan reaksi-reaksi biotransformasi terhadap substrat yang ditambahkan ke dalam mediana. Seperti halnya mikroorganisme, maka sistem KJT mampu pula mengadakan reaksi biotransformasi seperti reduksi, oksidasi, hidroksilasi, glikosidasi, epoksidasi, esterifikasi, metilasi, isomerisasi dan lain-lain. Seringkali reaksi tersebut bersifat stereoselektif, spesifik dan tidak dapat dilakukan dengan reaksi kimia biasa ataupun mikroorganisme (Indrayanto, 1997). Demikian pula adanya ion-ion logam, menyebabkan KJT memberikan respon sebagai mekanisme homeostatis untuk mengatasi stress yang terjadi (Rauser, 1995). Hal yang cukup menarik ialah dengan adanya pemberian ion-ion logam, pembentukan metabolit sekunder tertentu dapat distimulasi, dan sistem KJT mampu menarik ion-ion logam dari mediana atau melakukan bioremediasi (Indrayanto, 1997).

2.1.1 Kultur jaringan tanaman *Agave amaniensis*

Agave amaniensis merupakan tanaman herba yang kuat dengan daun-daunnya tersusun dalam bentuk roset, sebagai penghasil serat, tahan terhadap

kekeringan dan tumbuh baik di daerah beriklim tropis. Tanaman ini banyak ditanam sebagai tanaman hias. Klasifikasi tanaman *Agave amaniensis* menurut Strassburger *et al.* (1971) adalah sebagai berikut:

Divisi : Spermatophyta
Anak divisi : Angiospermae
Kelas : Monocotyledonae
Bangsa : Liliales
Suku : Amaryllidaceae
Marga : *Agave*
Jenis : *Agave amaniensis* Trel & Nowell

Berdasarkan penelitian Blunden *et al.* (1978), daun *Agave amaniensis* mengandung diosgenin dan tigogenin; sedangkan penelitian terhadap jenis yang sama, *Agave amaniensis* yang dikoleksi Kebun Raya Purwodadi, Jawa Timur, hanya teridentifikasi hekogenin dan sterol-sterol, tidak dijumpai diosgenin maupun tigogenin (Indrayanto *et al.*, 1996).

Sejak tahun 1988, di Laboratorium Bioteknologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, telah dilakukan inisiasi kultur kalus dari daun muda tanaman *Agave amaniensis* Trel & Nowell yang berasal dari Kebun Raya Purwodadi Jawa Timur. Untuk pertumbuhan optimalnya digunakan media Murashige-Skoog (MS) yang dimodifikasi dengan penambahan kinetin 5 ppm, 2,4-D 0,5 ppm, sukrosa 3 %, agar 0,7 % dan KH_2PO_4 340 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Media S) (Indrayanto *et al.*, 1993). Tanpa Ca^{2+} kandungan hekogenin kultur kalus meningkat sekitar 1,8 kali dan dengan penambahan Sr^{2+} 197 ppm meningkat menjadi 1,6 kali, sedangkan penambahan Mg^{2+} 122 ppm meningkatkan

kandungan sterol total 2,7 kali, dibanding kultur kalus dengan kadar orisinal ion-ion logam tersebut di dalam medium MS sebagai kontrol (Indrayanto *et al.*, 1993). Kultur kalus *Agave amaniensis* menunjukkan kemampuan memproduksi squalene, sterol-sterol (kholesterol, kampesterol, stigmasterol dan sitosterol), hekogenin, manogenin dan kammogenin. Cu^{2+} 0,6 ppm, Co^{2+} 0,06 ppm dan Mg^{2+} 243 ppm menginduksi produksi sapogenin steroid dan terjadi peningkatan lebih dari 2,5 kali dibanding kultur kalus dengan kadar orisinal ion-ion logam di dalam medium MS sebagai kontrol. Sedangkan pada pemberian Cu^{2+} 3,8 ppm dan Mg^{2+} di atas 972 ppm terjadi penurunan kandungan sapogenin steroid menjadi 0,7 kali dibanding kontrol; hal ini mungkin disebabkan efek toksis dari ion logam tersebut (Indrayanto *et al.*, 1996).

2.1.2 Kultur jaringan tanaman *Costus speciosus*

Tanaman *Costus spp.* termasuk marga *Costus*, suku Zingiberaceae. Di Indonesia, tanaman ini banyak ditemukan sebagai tanaman liar maupun tanaman hias, yang dikenal dengan nama Jawa : pacing, pacing tawa, tepung tawar, bunto. *Costus speciosus* merupakan tanaman herba, tumbuh baik di tempat yang lembab, pada ketinggian di bawah 1500 m. Batangnya bulat, tegak, berwarna hijau. Daunnya berbentuk lanset, ujung meruncing, batang bawah daun berbulu halus (van Steenis, 1988), dengan klasifikasi sebagai berikut:

Divisi : Spermatophyta
 Anak divisi : Angiospermae
 Kelas : Monocotyledonae
 Bangsa : Zingiberales



Suku : Zingiberaceae
 Marga : Costus
 Jenis : *Costus speciosus* Koen (Sm.)

Dasgupta dan Pandey 1970, melaporkan bahwa dalam rimpang tanaman ini mengandung sapogenin steroid, yaitu senyawa diosgenin, suatu senyawa yang banyak dikenal sebagai precursor obat-obat golongan steroid.

Inisiasi serta pertumbuhan kultur *Costus speciosus* Koen (Sm.) dapat dikembangkan dengan baik dalam media MS yang disertai kombinasi zat pengatur tumbuh sebagai berikut :

- untuk kultur kalus, dengan kinetin 0,2 ppm dan 2,4 D 1 ppm atau kinetin 5 ppm dan 2,4 D 0,5 ppm , konsentrasi KH_2PO_4 2 kali normal.
- untuk kultur akar, dengan kinetin 0,5 ppm dan IBA 5 ppm
- untuk kultur tunas, dengan BA 2 ppm
- untuk kultur planlet, dengan kinetin 0,2 ppm dan NAA 1 ppm (Setiawan, 1993 dan Indrayanto *et al.*, 1993).
- untuk kultur kalus dapat pula dimodifikasi dengan kinetin 0,2 ppm dan 2,4 D 0,5 ppm dan kasein hidrolisat 1 g.l^{-1} (Indrayanto *et al.*, 1999).

Kultur akar dan kultur kalus *Costus speciosus* Koen (Sm.) hanya mampu memproduksi senyawa sterol, tetapi belum mampu memproduksi diosgenin; sedangkan kultur pucuk dan planletnya mampu memproduksi sterol maupun diosgenin. Peningkatan sukrosa menjadi 60 g.l^{-1} dan penghilangan ion kalsium dalam media, dapat menstimulasi pembentukan diosgenin pada kultur pucuk *Costus speciosus* Koen (Sm.). Adanya Cu^{2+} 0,6 ppm dan Sr^{2+} 197 ppm menginduksi terjadinya peningkatan kandungan diosgenin 1,3 kali, sedangkan

Co^{2+} 0,6 ppm menurunkan kandungan disogenin menjadi 0,9 kali; Ca^{2+} 600 ppm, Mg^{2+} 183 ppm dan Mn^{2+} 55 ppm menurunkan kandungan disogenin kultur pucuk menjadi menjadi 0-3-0,4 kali dibanding pada kultur dengan kadar orisinal ion-ion logam di dalam medium MS sebagai kontrol (Indrayanto *et al.*, 1999).

2.1.3 Kultur jaringan tanaman *Solanum laciniatum*

Tanaman *Solanum laciniatum* Ait termasuk familia/suku Solanaceae, marga Solanum yang banyak tumbuh di daerah tropis. Dari berbagai jenis Solanum dapat diisolasi senyawa solasodin, dan yang paling potensial adalah yang berasal dari *S. aviculare* dan *S. laciniatum* (Macek, 1989) dan produksi solasodina dalam kultur pucuk *S. laciniatum* ternyata jauh lebih tinggi daripada kultur kalusnya (Conner, 1987).

Klasifikasi tanaman *Solanum laciniatum* Ait. adalah sebagai berikut (Tjitrosoepomo, 1988):

Divisi : Spermatophyta
Anak divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledonae
Bangsa : Solanales
Suku : Solanaceae
Marga : Solanum
Jenis : *Solanum laciniatum* Ait.

Solanum laciniatum Ait. (poro-poro) merupakan tanaman dengan tinggi 1-3 m, batang berwarna merah, daunnya hijau, bunganya berwarna biru gelap atau

ungu dengan diameter berukuran 5 cm, polennya berdiameter 32-42 μm , buahnya berukuran sekitar 25 x 30 mm dan berwarna kuning pucat (Macek, 1989).

Kultur pucuk *S. laciniatum* berhasil tumbuh dengan baik di dalam media MS yang dimodifikasi dengan penambahan hormon benzyl adenin 4 mg.l^{-1} (Indrayanto *et al.*, 1995). Kultur pucuk ini berasal dari Institut für Ent Wicklung und Molekular Biologic der Pflanzen Heinrich Heine, Universitat Dusseldorf, Jerman. Pemberian Cu^{2+} dan Co^{2+} 0,6 ppm menyebabkan terjadinya penurunan kandungan solasodin > 0,5 kali dibanding kontrol (Sugijanto *et al.*, 1998).

2.1.4 Kultur jaringan tanaman *Solanum mammosum*

Tanaman *Solanum mammosum* L. dikenal dengan nama daerah terong susu, terong tete atau tepel terong. Tanaman ini tumbuh di daerah tropis, termasuk tanaman liar, dapat tumbuh di atas segala jenis tanah termasuk tanah liat yang keras. Termasuk herba tegak dengan tinggi sekitar 0,7 – 1,5 m. Daunnya bulat telur, berbentuk lingkaran dengan pangkal lebar, warna hijau, mengandung duri temple pada tulang daun. Bunga berbentuk terompet, berwarna hijau, buahnya berwarna kuning. Tanaman ini tahan terhadap perubahan musim, dan tahan dalam daerah genangan, tahan terhadap hama dan dapat berbuah sepanjang musim/tahun. Klasifikasi tanaman *S. mammosum* adalah sebagai berikut (van Steenis, 1988):

Divisi : Spermatophyta
Anak divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledonae
Bangsa : Tubiflorae

Suku : Solanaceae
Marga : Solanum
Jenis : *Solanum mammosum*.L.

S. mammosum termasuk tanaman penghasil steroid yang relatif tinggi dibandingkan tanaman lain, dan biasanya terdapat di dalam buahnya (Telek *et al.*, 1977). Sedangkan pada kultur kalusnya, mengandung beberapa sterol, seperti kolesterol, sitosterol, stigmasterol dan kampesterol; tidak terdeteksi adanya solasodina (Isnaeni, 1986).

Kultur kalus *S. mammosum* dapat tumbuh dengan baik di dalam media MS yang dimodifikasi dengan penambahan hormon kinetin 2 ppm dan 2,4-D 0,5 ppm (Isnaeni, 1986). Sedangkan kultur pucuknya dapat tumbuh dalam media MS yang dimodifikasi dengan penambahan hormon pertumbuhan benzyladenin 2 mg/l dan casein hidrolisat 1 g/l.

2.2 Tinjauan tentang Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+}

Ion-ion logam dapat dibedakan menjadi ion-ion logam esensial dan non esensial. Cu^{2+} merupakan elemen runtuhan yang esensial, dalam jumlah berlebih toksik terhadap tanaman dan algae (Manahan, 1979). Kekurangan Cu^{2+} dapat menyebabkan terjadinya nekrosis pada ujung daun muda yang selanjutnya dapat meluas ke bagian lain yang berakibat pada penurunan proses fotosintesis, respirasi dan fiksasi nitrogen.

Dalam tanaman, Cu^{2+} merupakan komponen dari sejumlah enzim tertentu seperti cytochrom oxydase, ascorbic acid oxidase, dan laccase. Cu^{2+} secara tidak langsung terlibat di dalam proses enzimatik dan reaksi oksidasi-reduksi. Cu^{2+}

antara lain berfungsi sebagai transpor elektron dalam proses fotosintesis (Maksymiec, 1997). Cu^{2+} berlebih bersifat toksik bagi tanaman, daun-daunnya menjadi hijau gelap selanjutnya terjadilah klorosis. Batas kadar terendah Cu^{2+} yang belum menunjukkan terjadinya toksisitas, pada kelompok tanaman padi $10 \mu\text{g.g}^{-1}$ BK, dan pada tanaman polong-polongan $32 \mu\text{g.g}^{-1}$ BK. Cu^{2+} berpengaruh terhadap pertumbuhan tanaman, fotosintesis dan sintesis klorofil. Terhadap hewan dan manusia Cu^{2+} berlebih juga bersifat toksik, mampu memblok gugus sulfhydryl dalam protein, khususnya enzim-enzim; bersifat hepatotoksik dan hemolysis serta menghambat sintesis protein (Filov *et al.*, 1993). Cu^{2+} 6,4 ppm bersifat toksik dan menyebabkan kematian kultur kalus *Nicotiana tabacum* (Gori *et al.*, 1998). Sumber utama cemaran Cu^{2+} di lingkungan berasal dari industri pelapisan logam, limbah domestik, limbah industri peleburan logam, limbah industri kimia/farmasi dan pertambangan (Manahan, 1979; Filov *et al.*, 1993).

Cd^{2+} termasuk ion logam non esensial, secara biokimiawi dapat mengganti posisi Zn^{2+} , menyebabkan tekanan darah tinggi, merusak ginjal, jaringan testis dan sel-sel darah merah; serta bersifat toksik terhadap biota akuatik. Keracunan kadmium menyebabkan penyakit *itai-itai*, semacam rheumatik, rasa sakit yang sangat dan terjadi kerusakan tulang (Manahan, 1979). Cd^{2+} dapat menyebabkan terjadinya penurunan produktivitas tanaman, gangguan fotosintesis, transpirasi dan aktivitas enzimatik, mengganggu pembentukan pigmen serta struktur atau integritas membran. Kerusakan yang terjadi, terutama akibat adanya pengeblokan mata rantai transpor elektron dalam fotosintesis (Das *et al.*, 1994). Roses *et al.* (1984) melaporkan bahwa tanaman bakung (*Eichornia crasipes*) yang terpapar $\text{Cd}^{2+} \geq 1,5$ ppm selama 24 jam, mengalami kerusakan fisiologis dan genetik.

Overnell (1975) telah melaporkan bahwa Cd^{2+} : 0,01 – 0,1 ppm mereduksi konsentrasi ATP, klorofil dan menurunkan produksi oksigen pada ganggang (Das *et al.*, 1997). Cd^{2+} 5,6 ppm bersifat toksik dan menyebabkan kematian KJT *Bacopa moniera* (Ali *et al.*, 1998). Sumber cemaran yang mengandung Cd^{2+} berasal dari: industri “electro-plating” atau pelapisan logam, industri baterai, limbah pertambangan, dan pipa-pipa air (Manahan, 1979; Filov *et al.*, 1993). Senyawa kadmium antara lain digunakan sebagai konstituen sejumlah pigmen, katalisator, komposisi stabilizer piroteknik dan bahan laser (Filov *et al.*, 1993).

Pb^{2+} termasuk ion logam non esensial, bersifat toksik terhadap manusia dan hewan. Dapat menyebabkan terjadinya anemia, kerusakan ginjal, sistem reproduksi, hati, otak dan sistem syaraf pusat (Manahan, 1979). Timbal merupakan salah satu pencemar lingkungan, yang berasal dari emisi pembakaran bensin yang mengandung “anti knocking agent” tetraethyllead dan tetramethyllead, limbah penggunaan baterai/aki, industri pertambangan, peleburan dan pengilangan minyak dan lain-lain industri yang menggunakan timbal (Filov *et al.*, 1993). Pb^{2+} mempunyai sifat-sifat kimiawi yang menyerupai atau mirip dengan golongan alkali tanah. Metabolisme Pb^{2+} dan Ca^{2+} keduanya mirip dalam hal deposisi dan mobilisasi dari tulang (Förstner & Wittmann, 1981).

Pb^{2+} dapat diakumulasikan di dalam organ vegetatif tanaman, seperti daun, batang dan akar. Translokasi Pb^{2+} dari tanah ke dalam tanaman, tergantung pada komposisi tanah, pH tanah, tingkat kekuatan kompleks tanah-logam dan kemampuannya melewati membran akar. Pada tanah dengan kadar Pb^{2+} 1,8 $mg.kg^{-1}$, tanaman yang telah mengakumulasi Pb^{2+} 0,11 $ug.g^{-1}$ BK di dalam daunnya, belum terjadi gangguan atau toksisitas. Kadar normal Pb^{2+} pada daun

dan ranting tanaman berkayu $2,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ BK, pada sayur dan padi-padian $0,1-1,0 \mu\text{g.g}^{-1}$ BK dan pada rumput $1,0 \mu\text{g.g}^{-1}$ BK. Pada konsentrasi yang tinggi ($>100 \mu\text{g.g}^{-1}$ tanah) menyebabkan efek toksik, yang nampak pada fotosintesis, pertumbuhan dan lainnya (Filov *et al.*, 1993).

Sr^{2+} termasuk ion logam non esensial, dalam sistem periodik merupakan golongan IIA atau alkali tanah. Biasanya Sr^{2+} terdapat didalam air sungai berkisar $50 - 310 \mu\text{g.l}^{-1}$ (Förstner & Wittmann, 1981). Asupan Sr^{2+} yang meningkat, dapat menyebabkan terjadinya penyakit ricketsia akibat stronsium dan penyakit Kashin-Beck; juga menyebabkan goitrogenik, dan merusak syaraf serta otot. Konsumsi air minum yang mengandung Sr^{2+} sekitar 10mg.l^{-1} dalam jangka waktu lama dapat mempengaruhi pertumbuhan anak, nampak berpengaruh terhadap metabolisme Ca^{2+} . Kadar normal Sr^{2+} untuk pertumbuhan tanaman berkisar $0,6 \text{mg.g}^{-1}$ tanah; pada kadar yang lebih besar ($0,6-1 \text{mg.g}^{-1}$) dapat dikaitkan dengan peningkatan resiko terjadinya penyakit Kashin-Beck. Batas yang diperbolehkan di dalam air atau badan air untuk keperluan domestik adalah Sr^{2+} 7 ppm. Sr^{2+} di alam terdapat dalam bentuk celestite dan strontianite. Sebagai cemaran dapat terjadi akibat adanya aktivitas pyroteknik, fabrikasi baterai, produksi peralatan refrigerator dan sebagai larutan elektrolit untuk mempercepat pelapisan krom (Filov *et al.*, 1993).

2.3 Tinjauan tentang akumulasi ion-ion logam dan respon KJT

Tanaman dan KJT mempunyai kemampuan untuk mengatasi gangguan/rangsangan dari luar, karena adanya mekanisme sistem pertahanan diri terhadap gangguan atau stress dari luar. Ada berbagai macam stress, yakni stress medium,

fisik, kimiawi dan infeksi. Yang termasuk stress kimiawi, antara lain ialah adanya ion-ion logam (Brodelius, 1988). Kemampuan tanaman untuk merespon terhadap stress dapat beragam; ada yang peka dan tidak mampu mengatasi stress dan ada yang tahan terhadap stress, karena adanya mekanisme pencegahan sehingga toleran terhadap stress. Tanaman toleran, ada yang melakukan pencegahan masuknya ion logam melalui selektifitas dari membran sel akar dan ada yang mengakumulasi ion-ion logam di dalam tanaman, yang dikenal sebagai akumulator (Hopkins, 1999). Tanaman dianggap sebagai hiperakumulator apabila mampu mengakumulasi ion logam 100 kali dibanding tanaman non akumulator; untuk kebanyakan unsur atau ion logam batasan minimal akumulasinya adalah sebesar $1000 \mu\text{g.g}^{-1}$ (0,1 %) BK, kecuali Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} dan Se^{2+} ($100 \mu\text{g.g}^{-1}$), Pb^{2+} ($500 \mu\text{g.g}^{-1}$), Au^{2+} ($1 \mu\text{g.g}^{-1}$) dan Zn^{2+} ($10.000 \mu\text{g.g}^{-1}$) (Brooks *et al.*, 1998).

Tanaman yang mampu melakukan hiperakumulasi penting untuk fitoremediasi (Chaney *et al.*, 1997; Meagher, 2000), bahkan ada yang dimanfaatkan untuk "phytomining" (Brooks *et al.*, 1998). Penelitian fitoremediasi, menurut Salt *et al.* (1998) dibagi menjadi beberapa kelompok, yaitu (1) fitoekstraksi, (2) fitodegradasi, (3) rhizofiltrasi, (4) fitostabilisasi, (5) fitovolatilisasi dan (6) pemanfaatan tanaman untuk menghilangkan polutan di udara. Tanaman yang toleran, mempunyai mekanisme pencegahan toksisitas ion logam dengan salah satu atau kombinasi strategi sebagai berikut : (1) ion-ion logam diikat dinding sel tanaman, (2) mereduksi transpor yang melewati membran sel, (3) kompartementalisasi dan (4) pembentukan khelat atau kompleks antara ion logam dengan fitokhelatin, metallothionein, ataupun zat organik.

Kultur jaringan tanaman (KJT) seperti halnya tanaman induknya, ada yang mampu menyerap berbagai mineral dan ion-ion logam yang ada di dalam media atau lingkungan tempat tumbuhnya, serta mengakumulasikan dalam bagian organ-organannya. Selain tanaman utuhnya, KJT juga dapat digunakan untuk eksperimen fitoremediasi (Zikmundova *et al.*, 1995; Gori *et al.*, 1998; Macek *et al.*, 2000). Sementara itu penelitian tentang respon KJT terhadap ion-ion logam, yang mendasari toleransi terhadap ion logam masih sangat beragam. Kultur pucuk *Nicotiana tabacum* merespon Cu^{2+} 6,4 ppm dengan perubahan morfologis-histologis pada (Gori *et al.*, 1998); terhadap Cd^{2+} 2,8 ppm terjadi perubahan morfogenik pada KJT *Bacopa moniera* (Ali *et al.*, 1998). Ion logam dapat mempengaruhi pembentukan fitoaleksin sebagai mekanisme pertahanan diri (Brodellius, 1988; Kolodziej, 1989; Threlfall dan Whitehead, 1989), pembentukan fitosteroid (Indrayanto *et al.* 1996 dan 1999; Sugijanto *et al.* 1998), terjadinya pelepasan fitosiderofor (Raskin *et al.*, 1994); pembentukan fitokhelatin (Rauser, 1995; Ochial, 1995; Meuwley *et al.*, 1995), akumulasi prolin (Ali *et al.*, 1998) ataupun akumulasi histidin bebas (Krämer *et al.*, 1996).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Polutan dapat diremediasi tanaman melalui absorpsi, transpor dan translokasi (Macek *et al.*, 2000). Tanaman dan KJT dapat digunakan untuk eksperimen fitoremediasi (Zikmundova *et al.*, 1995; Gori *et al.*, 1998; Macek *et al.*, 2000). Kultur akar rambut *Armoraceae rusticana* mampu mengakumulasi Cu^{2+} (Zikmundova *et al.*, 1995). Dari seleksi kultur kalus *Nicotiana tabacum* yang toleran, dapat diregenerasi menjadi kultur pucuk yang resistan terhadap Cu^{2+} 6,4 ppm (Gori *et al.*, 1998).

Kultur kalus *A. amaniensis* tahan terhadap Cu^{2+} hingga 3,8 ppm dengan IP > 5,2 dan terhadap Sr^{2+} 197 ppm dengan IP > 2,9. Yang dimaksud tahan dalam hal ini adalah kultur tersebut mampu tumbuh pada media dengan kadar ion logam tersebut, dengan IP > 1. Cu^{2+} 0,6 ppm dapat menginduksi produksi sapogenin steroid 2,5 kali dan Sr^{2+} 197 ppm meningkatkan 1,6 kali dibanding kontrol, kultur kalus dengan kadar orisinal ion-ion logam di dalam medium MS (Indrayanto *et al.*, 1993 dan 1996). Kultur pucuk *C. speciosus* tahan terhadap Cu^{2+} 0,6 ppm dan Sr^{2+} 197 ppm, dengan IP > 1,5 dan terjadi peningkatan kandungan diosgenin 1,3 kali dibanding kontrol (Indrayanto *et al.*, 1999). Kultur pucuk *S. laciniatum* tahan terhadap Cu^{2+} 0,6 ppm, dengan IP > 5, dan terjadi penurunan kandungan solasodin > 0,5 kali dibanding kontrol (Sugijanto *et al.*, 1998).

Sementara itu penelitian tentang akumulasi ion-ion logam dan respon KJT yang terjadi, yang mendasari toleransi terhadap ion logam masih sangat beragam.

Terjadi respon morfologis-histologis pada kultur pucuk *Nicotiana tabacum* yang toleran terhadap Cu^{2+} 6,4 ppm, batangnya lebih besar, silinder pusat lebih berkembang, xylem lebih banyak dengan dinding sekunder yang lebih tebal dibandingkan tanaman kontrol (Gori *et al.*, 1998). Ion logam dapat mempengaruhi pembentukan fitoaleksin sebagai mekanisme pertahanan diri (Brodelius, 1988; Kolodziej, 1989; Threlfall dan Whitehead, 1989), pembentukan fitosteroid (Indrayanto *et al.* 1996 dan 1999; Sugijanto *et al.* 1998), terjadinya pelepasan fitosiderofor (Raskin *et al.*, 1994); pembentukan fitokhelatin (Rauser, 1995; Ochial, 1995; Meuwley *et al.*, 1995), akumulasi prolin (Ali *et al.*, 1998) ataupun akumulasi histidin bebas (Leopold *et al.*, 1998). Leopold *et al.* (1999) meneliti akumulasi ion logam dan pembentukan fitokhelatin pada kultur suspensi sel *Silene vulgaris* yang toleran terhadap Cu^{2+} 0,6-6,4 ppm, Cd^{2+} 1-10 ppm dan Pb^{2+} 2-20 ppm. Batasan kadar ini 10 kali lebih besar dari kadar yang dipakai untuk kultur sel tomat yang sensitif (tidak toleran). Secara ringkas, remediasi dan akumulasi ion logam disertai adanya respon KJT pada: pertumbuhan, morfologis-histologis, pelepasan fitosiderofor, metabolit, fitoaleksin, peningkatan asam amino, pembentukan fitokhelatin atau metallothionein.

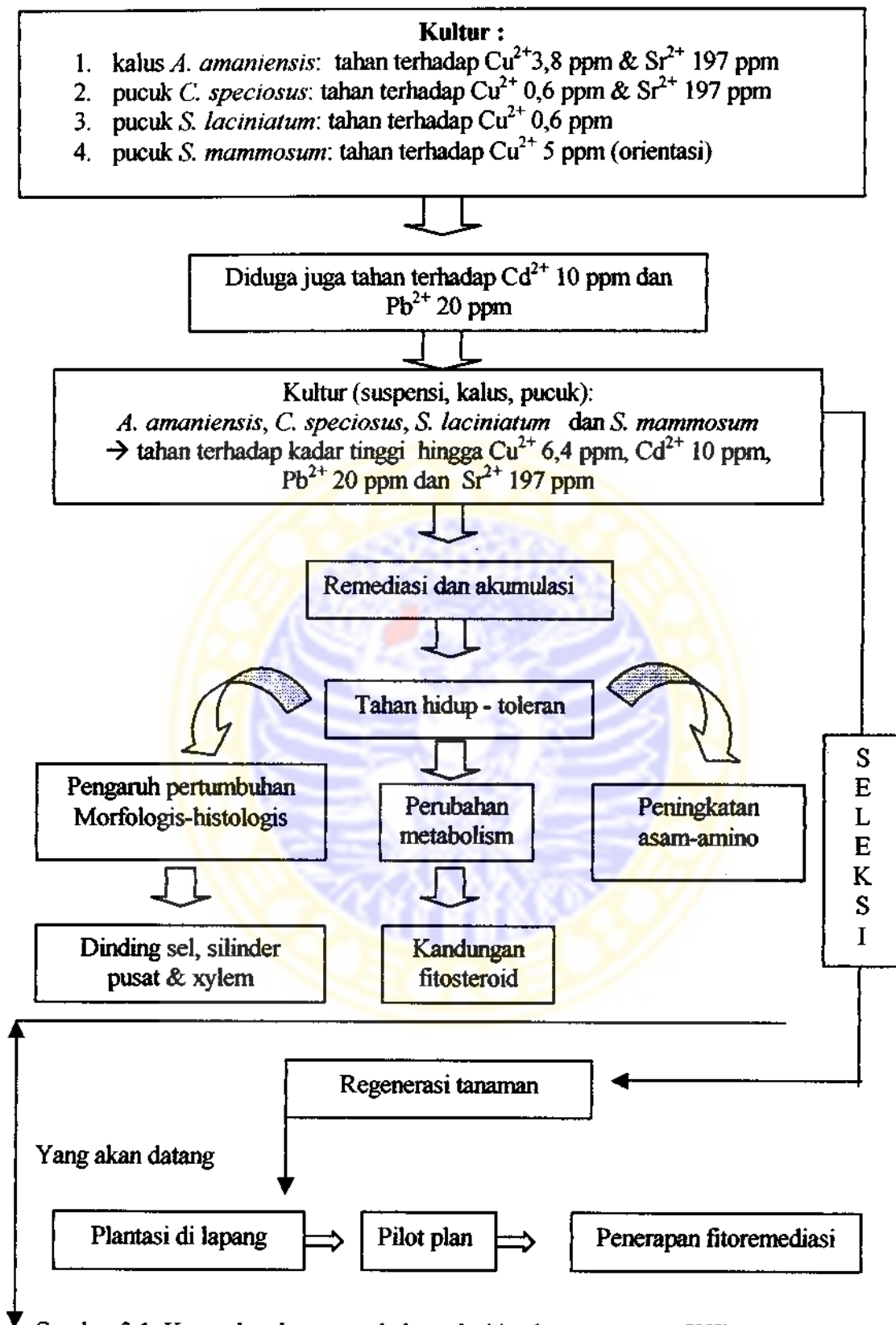
Berdasarkan fakta, bahwa kultur kalus *A. amaniensis* tahan terhadap Cu^{2+} 3,8 ppm dan Sr^{2+} 197 ppm; dengan kadar Cu^{2+} tersebut mempunyai $\text{IP}=6$, maka diduga masih tahan terhadap kadar Cu^{2+} yang lebih tinggi, demikian pula pada kultur pucuk *C. speciosus* yang tahan terhadap Cu^{2+} 0,6 ppm dengan $\text{IP}=2,4$ dan tahan Sr^{2+} 197 ppm, serta kultur pucuk *S. laciniatum* yang tahan terhadap Cu^{2+} 0,6 ppm dengan $\text{IP}=5,4$. Kultur suspensi sel *S. mammosum* dalam orientasi penelitian tahan pada Cu^{2+} 5 ppm. Diduga kultur jaringan tanaman tersebut tahan terhadap

kadar tinggi Cu^{2+} hingga 6,4 ppm seperti batas yang dilaporkan Gori *et al.*, 1998 dan Leopold *et al.* 1999; Cd^{2+} 10 ppm dan Pb^{2+} 20 ppm, kadar tertinggi yang dilaporkan Leopold *et al.* 1999. Untuk *Solanum laciniatum* diduga juga tahan terhadap Sr^{2+} 197 ppm seperti yang pernah dilakukan pada kultur *A. amaniensis* dan *C. speciosus* (Indrayanto *et al.*, 1993 dan 1999). Diduga kultur jaringan tanaman tersebut melakukan remediasi dan akumulasi ion-ion logam di dalam biomasnya, ada pengaruh berbagai kadar ion-ion logam terhadap pertumbuhan dan morfologis-histologis kultur, serta terhadap pembentukan fitosteroid dan akumulasi asam amino pada KJT. Secara ringkas, garis besar kerangka konseptual penelitian dapat dilihat pada gambar 3.1.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konseptual, diajukan hipotesis sebagai berikut:

1. Kultur *Agave amaniensis*, *Costus speciosus*, *Solanum laciniatum* dan *Solanum mammosum* tahan atau mampu tumbuh di dalam media yang mengandung ion logam hingga kadar Cu^{2+} 6,4 ppm, Cd^{2+} 10 ppm, Pb^{2+} 20 ppm dan Sr^{2+} 197 ppm.
2. Berbagai konsentrasi Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} mempengaruhi pertumbuhan dan morfologis histologis kultur.
3. Kultur tersebut melakukan remediasi dan akumulasi Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} pada berbagai konsentrasi.
4. Berbagai konsentrasi Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} mempengaruhi pembentukan fitosteroid dan akumulasi asam amino pada kultur tersebut.



Gambar 3.1 Kerangka konseptual akumulasi ion logam, respon KJT dan penerapannya

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Untuk mencapai tujuan penelitian ini, dilakukan penelitian eksperimental laboratoris, untuk meneliti akumulasi Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} pada berbagai konsentrasi di dalam media, meneliti pertumbuhan, kandungan fitosteroid dan asam amino pada KJT, dirancang dengan tahapan sebagai berikut:

1. Penyiapan kultur jaringan tanaman
 - a. pembuatan media
 - b. kultivasi dan perbanyakan kultur kalus, suspensi dan pucuk
2. Pengamatan pertumbuhan dan morfologis-histologis KJT
 - a. pembuatan media perlakuan dengan Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+}
 - b. kultivasi kultur pada media perlakuan
 - c. pemanenan kultur
 - d. pengamatan karakter pertumbuhan dan morfologis-histologis KJT
3. Analisis remediasi dan akumulasi berbagai konsentrasi Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} pada KJT
 - a. remediasi Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} oleh KJT
 - b. akumulasi Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} dalam biomassa KJT
4. Analisis metabolit
 - a. Ekstraksi dan analisis fitosteroid
 - b. Ekstraksi dan analisis asam amino

kultur, morfologis-histologis kultur, kandungan fitosteroid dan asam amino pada KJT.

Untuk pertumbuhan, KJT dinyatakan masih tahan atau mampu tumbuh pada media yang mengandung berbagai konsentrasi ion logam, apabila menunjukkan IP lebih besar dari 1. Yang dimaksud akumulasi ion logam ialah banyaknya ion logam yang terserap dan tersimpan di dalam biomassa kultur selama waktu kultivasi, dinyatakan dalam $\mu\text{g/g}$ berat kering biomassa. Sedangkan remediasi ion logam adalah banyaknya ion logam yang dibersihkan atau diambil dari media tempat tumbuhnya kultur, dinyatakan dalam %. Lamanya waktu kultivasi untuk kultur suspensi sel adalah 7 hari, sedangkan untuk kultur kalus 3 minggu, dan kultur pucuk 4 minggu. Dalam penelitian ini, pada kultur *Agave amaniensis* dan *Costus speciosus* diteliti akumulasi dan remediasi Cu^{2+} , Cd^{2+} dan Pb^{2+} , serta pertumbuhan dan kandungan fitosteroidnya; sedangkan untuk *Solanum laciniatum* yang terkait dengan perlakuan Cd^{2+} dan Sr^{2+} , dan untuk kultur *Solanum mammosum* yang terkait dengan perlakuan Cu^{2+} dalam mediana. Penelitian atau analisis asam amino dilakukan pada kultur *Agave amaniensis* yang mendapat perlakuan Cu^{2+} dalam mediana.

4.4 Bahan Penelitian

4.4.1 Bahan Kimia

Semua bahan kimia yang dipakai dalam penelitian ini berasal dari E. Merck, BDH dengan derajat pro analisis, kecuali apabila disebutkan lain. Bahan kimia yang dipakai meliputi ammonium nitrat, kalium nitrat, kalsium klorida dihidrat, magnesium sulfat hepta hidrat, kalium dihidrogen fosfat, besi (II) sulfat

hepta hidrat, dinatrium EDTA dihidrat, mangan sulfat butahidrat, seng sulfat hepta hidrat, asam borat, kalium iodida, natrium molibdat dihidrat, tembaga sulfat penta hidrat, kobalt klorida heksa hidrat, asam nikotinat, piridoksin hidroklorida, tiamin hidroklorida, glisin, mio-inositol, sukrosa, kadmium klorida mono hidrat, timbal nitrat, stronsium klorida heksa hidrat, asam asetat, antimon triklorida, asam klorida, natrium hidroksida, kloroform, etanol, anisaldehyd, asam sulfat pekat, dapar fosfat, hydrogen peroksida, asam nitrat, standar asam amino. Agar yang dipakai adalah Bacto Agar Difco Laboratories, Detroit-Michigan USA. Hormon-hormon kinetin, benzyladenine, NAA, 2,4 D, serta standar hecogenin, progesteron, sitosterol, kampesterol, kholesterol, stigmasterol dan solasodin adalah produksi Sigma, St. Luis, MO, USA.

4.4.2 Media

Media yang digunakan untuk kultur suspensi sel/kalus *Agave amaniensis* adalah media MS (Murashige dan Skoog, 1962) yang dimodifikasi dengan penambahan KH_2PO_4 340 mg.l^{-1} , hormon pertumbuhan kinetin 5 mg.l^{-1} dan 2,4-D $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ (Indrayanto *et al.*, 1996). Untuk kultur suspensi sel/kalus *Costus speciosus* digunakan media MS yang dimodifikasi dengan penambahan casein hydrolysisate 1 g.l^{-1} , hormon pertumbuhan kinetin 2 mg.l^{-1} dan 2,4-D $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ (Indrayanto *et al.*, 1999). Untuk kultur pucuk *Solanum laciniatum* digunakan media MS yang dimodifikasi dengan penambahan hormon benzyl adenin 4 mg.l^{-1} dan casein hydrolysisate 100 mg.l^{-1} (Indrayanto *et al.*, 1995). Untuk kultur suspensi sel *Solanum mammosum* digunakan media MS yang dimodifikasi dengan penambahan hormon pertumbuhan kinetin 2 mg.l^{-1} dan 2,4-D $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ (Isnaeni,

1986) dan untuk kultur pucuk *Solanum mammosum* digunakan media MS yang dimodifikasi dengan penambahan hormon benzyl adenin 2 mg.l^{-1} dan casein hydrolisate 1 g.l^{-1} (Indrayanto *et al.*, 1998). Untuk mengetahui secara lengkap berbagai media yang digunakan, dapat dilihat dalam lampiran 1 s.d. 5.

4.5 Alat atau Instrumen Penelitian

4.5.1 Alat untuk kultivasi kultur, pengamatan pertumbuhan dan mikroskopi

1. Autoklaf (SMIC type WS2-84-64) untuk sterilisasi media
2. Neraca analitik (Sartorius L 420S)
3. Almari steril (laminar air flow) (Dalton model San Ei, Seisakusho, Ltd., Type PCV - 750-APG) untuk pekerjaan aseptis
4. pH meter (Fischer Accumet Model 230A) untuk mengatur dan mengukur pH larutan media
5. Mesin pengocok (rotary shaker) buatan sendiri dengan putaran ± 100 rpm, disinari dengan 4 buah lampu neon Philip 54/TL 40 Watt (ca. 2000 lux) yang berada di dalam ruang kultur, dengan temperatur atau suhu kamar $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
6. Digital lightmeter Lutron LX 102.
7. Nikon Microscope HFX-DX (Tokyo, Japan)
8. Scanning electron microscopy, SEM JMS-T100 (Jeol Ltd/Jeol Technics Ltd, Tokyo-Japan).
9. Transmission electron microscopy, TEM JEM-1900S (Jeol Ltd/Jeol Technics Ltd, Tokyo-Japan).

4.5.2 Alat untuk isolasi, pemurnian dan analisis

1. TLC Scanner Shimadzu CS 930 untuk pengamatan spektrum absorban-reflektan noda senyawa fitoaleksin
2. Hewlett Packard Gas Chromatograph 5890 Series II, untuk identifikasi komponen fitosteroid (sterol)
3. Amino Acid Analyzer Hitachi Model 835-50 untuk analisis asam-asam amino.
4. ICP-AES Plasma Vision 10 untuk analisis ion-ion logam

4.6 Lokasi dan waktu penelitian

Lokasi penelitian meliputi Laboratorium Bioteknologi Farmasi Bagian Bahan Alam dan Laboratorium Analisis Farmasi Bagian Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Laboratorium dasar Bersama Universitas Airlangga, Laboratorium UPT Mikroskop Elektron Universitas Airlangga dan Laboratorium Instrumen (ICP-AES) Fakultas Farmasi Universitas Surabaya. Waktu penelitian dilaksanakan mulai tahun 1997 hingga akhir 2001.

4.7 Cara Kerja

4.7.1 Penyiapan kultur jaringan tanaman

4.7.1.1 Pembuatan Media

Pembuatan media dilakukan sesuai dengan metode Murashige-Skoog (Bhojwani dan Razdan 1983); untuk *A. amaniensis* (Indrayanto *et al.* 1996), *C. speciosus* (Indrayanto *et al.* 1999), *S. laciniatum* (Indrayanto *et al.* 1995) dan *S. mammosum* (Indrayanto *et al.* 1998). Masing-masing komponen media dibuat

larutan stok, kecuali mio-inositol, kasein hidrolisat dan sukrosa. Untuk membuat 1 liter media, masing-masing larutan stok diambil dalam jumlah yang sesuai dan dicampur menjadi satu dalam gelas piala. Kemudian ditambahkan ke dalamnya mio-inositol, casein hidrolisat, hormon pertumbuhan dan sukrosa serta air suling sampai 950 ml dan diukur serta diatur pH nya menggunakan pH meter, menjadi 5,6 - 5,7 dengan penambahan HCl 0,1 N atau NaOH 0,1 N, selanjutnya ditambah air suling hingga volume akhir 1000 ml. Untuk kultur suspensi sel, larutan media dituang ke dalam labu Erlenmeyer 300 ml, masing-masing sebanyak 50 ml. Sedangkan untuk kultur kalus @ 12,5 ml dan kultur pucuk digunakan wadah bermulut lebar @ 20 ml. Untuk media padat diperlukan penambahan agar 0,7 %. Setelah mulut labu/wadah ditutup rapat dengan kertas aluminium, lalu disterilkan dengan autoklaf pada temperatur 121 °C selama 20 menit. Sebelum digunakan untuk kultivasi, media steril ini disimpan di dalam ruang kultur dengan temperatur sekitar 25 ± 1 °C.

Pembuatan media padat untuk perbanyakan kalus, dilakukan dengan cara sama seperti di atas, setelah pengaturan pH 5,6-5,7 ditambahkan agar 0,7 % (b/v) dan ditambah air suling sampai volume yang ditentukan, lalu dipanaskan sampai jernih dan diaduk terus menerus. Selanjutnya dituang ke dalam botol bermulut lebar (@ 12,5 ml), ditutup rapat dengan aluminium foil dan disterilkan seperti di atas. Untuk media kultivasi *Agave amaniensis*, *Costus speciosus*, *Solanum laciniatum* dan *Solanum mammosum*, cara pembuatannya sama, hanya saja yang berbeda adalah komposisi dan jumlah hormon yang dipakai. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat dalam lampiran 2 s.d. 5.

4.7.1.2 Kultivasi dan perbanyakan kultur kalus, suspensi dan pucuk

Untuk memperoleh kalus dalam jumlah yang cukup, dilakukan subkultur yaitu satu botol kultur kalus yang berusia 2 minggu dipindahkan ke beberapa media segar, secara aseptis dan disimpan di dalam ruang kultur dengan suhu ruangan $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Untuk kultivasi masing-masing kultur suspensi sel *Agave amaniensis* dan *Costus speciosus* dilakukan dengan memasukkan masing-masing 10,000 dan 6,000 gram kalus ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi 50 ml media steril, kemudian labu diletakkan di atas mesin pengocok yang disinari (1500 - 2000 lux) dan berputar 100 rpm secara terus menerus, di dalam ruang kultur dengan suhu ruangan $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Subkultur dilakukan setelah 7-10 hari (Indrayanto *et al.*, 1996 dan 1999). Untuk kultur pucuk *Solanum laciniatum* dan *Solanum mammosum* dalam jumlah yang cukup, dilakukan subkultur yaitu satu botol kultur pucuk yang berusia 3-4 minggu dipindahkan ke beberapa media segar, secara aseptis dan disimpan di dalam ruang kultur dengan suhu ruangan $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (Indrayanto *et al.*, 1995 dan 1998).

4.7.2 Pengamatan pertumbuhan dan morfologis-histologis KJT

4.7.2.1 Pembuatan media perlakuan

Media perlakuan untuk masing-masing kultur mempunyai komposisi yang sesuai dengan komposisi seperti di atas, diberi perlakuan tanpa dan dengan penambahan ion-ion logam Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} atau Sr^{2+} . Untuk penelitian ini secara umum digunakan perlakuan dengan berbagai kadar yaitu Cu^{2+} 0 – 30 ppm, Cd^{2+} 0 – 20 ppm, Pb^{2+} 0-40 ppm dan Sr^{2+} 0-200 ppm. Cara pembuatannya sama seperti cara pembuatan media untuk kultivasi dan perbanyakan kultur, tetapi dengan

penambahan garam Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} atau Sr^{2+} sesuai kadar yang diperlukan. Garam yang dipakai tersebut adalah $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ dan $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

4.7.2.2 Kultivasi kultur pada media perlakuan

Untuk kultivasi masing-masing kultur suspensi sel *Agave amaniensis* dan *Costus speciosus* dilakukan menurut cara Indrayanto *et al.* (1996 dan 1999), dengan memasukkan masing-masing 10,000 dan 6,000 gram kalus ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi 50 ml media perlakuan steril, kemudian labu diletakkan di atas mesin pengocok yang disinari (1500 - 2000 lux) dan yang berputar 100 rpm secara terus menerus di dalam ruang kultur dengan suhu ruangan $25 \pm 1^\circ\text{C}$ dan kultivasi dilakukan selama 7 hari. Untuk kultur kalus digunakan kalus sebanyak 1-2,000 gram kalus dan dikultivasi selama 3 minggu dengan suhu ruangan $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Untuk kultur pucuk *Solanum laciniatum* dan *Solanum mammosum* dilakukan menurut cara Indrayanto *et al.* (1995 dan 1998), digunakan sebanyak 1-2,000 gram kultur pucuk tanaman, dan dikultivasi selama 4 minggu dengan suhu ruangan $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.7.2.3 Pemanenan kultur

Untuk kultur suspensi sel dipanen setelah dikultivasi selama 7 hari, kultur kalus setelah 3 minggu dan kultur pucuk setelah 4 minggu. Masing-masing kelompok dengan replikasinya dapat dilihat di dalam tabel 5.1 s.d. 5.13.

Semua kultur suspensi sel dan pucuk yang dipanen, dipisahkan dari medianya, dengan cara disaring, kemudian sel/kalus dan pucuk tersebut dicuci

dengan aquadest. Biomassa yang dihasilkan ditimbang dan dikeringkan di dalam oven pada suhu 50°C hingga kadar airnya < 2 %. Setelah kering lalu diserbuk. Media cair yang dipisahkan dianalisis sisa ion logamnya.

4.7.2.4 Pengamatan karakter pertumbuhan

Untuk pengamatan karakter pertumbuhan, masing-masing kultur suspensi sel setelah 1 minggu kultivasi, diamati warna sel, bentuk/ukuran sel, mikroskopi sel, berat basah biomassa dan berat keringnya, IP (indeks pertumbuhan) dan PCV (*Packed Cell Volume*).

Untuk kultur kalus dipanen setelah 3 minggu, diamati warna sel/kalus, mikroskopis sel, berat basah dan berat kering biomasanya. Untuk kultur pucuk dipanen setelah 4 minggu inkubasi, diamati warna dan mikroskopis tanamannya, serta berat basah dan berat kering biomasanya.

4.7.2.4.1 Pengamatan berat basah

Massa sel yang telah diperoleh dari hasil penyaringan di atas, dimasukkan ke dalam cawan petri kosong yang telah ditimbang sebelumnya. Berat cawan petri yang berisi biomassa basah dikurangi berat cawan petri kosong merupakan berat basah biomassa.

4.7.2.4.2 Pengamatan berat kering

Pengamatan berat kering dilakukan dengan cara sebagai berikut, massa sel basah yang telah diketahui beratnya diletakkan di bawah lampu 60-100 watt beberapa hari hingga kering (hingga kadar air maksimum 2 % b/b), lalu diserbuk

dan dihomogenkan. Penentuan susut pengeringan (kadar air) dilakukan menurut prosedur atau metode Farmakope Indonesia edisi IV (1995).

4.7.2.4.3 Pengamatan pertumbuhan kultur

Pertumbuhan kultur *in vitro* (suspensi, kalus dan pucuk) dari *Agave amaniensis*, *Costus speciosus*, *Solanum laciniatum* dan *Solanum mammosum* akibat perlakuan ion-ion logam selama kultivasi dalam waktu tertentu, dapat diamati dan dinyatakan dalam bentuk indeks pertumbuhan (IP); sedangkan untuk kultur suspensi sel juga dilakukan pengukuran *packed cell volume* (PCV) (Indrayanto *et al.* 1999).

Pengamatan IP

IP merupakan rasio (perbandingan) antara berat akhir biomassa basah pada saat panen dengan berat awal biomassa basah pada saat penanaman; atau rasio antara berat akhir biomassa kering hasil panen dengan berat awal biomassa kering yang ditanam.

Pengamatan PCV

Suspensi sel masing-masing dari kultur suspensi sel *Agave amaniensis* dan *Costus speciosus* dituang ke dalam gelas ukur 100 ml, dibiarkan selama 20 menit kemudian diamati volume sel yang mengendap di bagian bawah gelas ukur dan volume total suspensinya. PCV adalah rasio (perbandingan) antara volume massa sel dengan volume total suspensi dikalikan 100 % (Indrayanto *et al.*, 1999).

4.7.2.5 Pengamatan morfologis-histologis KJT

Pengamatan morfologis-histologis akibat adanya perlakuan ion-ion Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} atau Sr^{2+} , untuk masing-masing sistem kultur jaringan tanaman dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis meliputi pengamatan warna, ukuran dan atau bentuk massa sel, serta organel-organel, serta pengamatan perubahan lain yang terjadi menggunakan mikroskop. Sedangkan untuk salah satu model pengaruh ion logam diamati dari pengaruh Cu^{2+} terhadap kultur sel *Agave amaniensis* menggunakan SEM dan TEM dengan prosedur yang sesuai (Mercer dan Birbeck, 1966).

Bahan kalus/sel-sel suspensi difiksasi dengan 2 ml larutan glutaraldehid 3 % dalam larutan dapar fosfat 0,1 M pH 7,4 di dalam botol, ditutup dan dipertahankan suhunya 0-4°C selama 2 jam. Kemudian larutannya diisap dan dibuang, lalu dicuci dengan larutan dapar fosfat 0,1 M pH 7,4 secukupnya yang telah didinginkan 4°C, dilakukan 3 sampai 5 kali. Kemudian dilakukan fiksasi berikutnya dengan 2 ml larutan osmium tetroksida 1 % dalam larutan dapar fosfat 0,1 M pH 7,4 dan dicuci dengan dapar fosfat seperti cara fiksasi pertama.

Tahap berikutnya pengikatan sel/jaringan (penanaman dalam epon). Setelah fiksasi dan pencucian, sediaan didehidrasi dengan 2 ml alkohol selama 15 menit, bergantian mulai dari konsentrasi 70, 80, 85, 90 dan 95% pada suhu 4°C. Dehidrasi diulang lagi dengan alkohol 95 %, baru diganti alkohol absolut dua kali masing- masing 20 menit pada suhu 4°C. Selanjutnya diganti 2 ml larutan perantara oksida propilen dua kali masing- masing 20 menit pada suhu 4°C, baru diganti campuran epon dengan oksida propilen (1:1), dimasukkan eksikator dalam almari es antara suhu 4 – 10°C selama 10 menit, lalu campuran diisap dan

dibuang. Berikutnya diberi campuran epon murni dimasukkan eksikator dalam almari 4 – 10°C selama semalam, lalu beberapa kultur/sel dikeluarkan dan diletakkan dalam kapsul gelatin/cetakan khusus dan diberi campuran epon murni, dimasukkan inkubator pada suhu 40 °C (1 hari), 50 °C (1 hari), 60 °C (1 hari). Apabila kapsul epon masih lunak, biarkan beberapa waktu lagi dalam inkubator hingga mengeras.

Proses berikutnya pemotongan balok epon untuk irisan tebal memakai ultramikrotom dengan tebal sekitar 1 mikron (0,5 sampai 2 mikron), dan pewarnaan memakai tetesan 2 % Toluidin biru di atas gelas obyek ditaruh di atas pemanas 4-5 kali hingga kering, kemudian diperiksa di bawah mikroskop cahaya, dipilih bagian yang akan diamati TEM dan bagian yang tidak diperiksa dibuang (dikepris). Balok epon yang mengandung bahan yang akan diperiksa dipotong lagi berbentuk kubus/trapesium, luas permukaan diperkecil lagi, dihaluskan dengan ultramikrotom, dilakukan pemotongan tipis. Irisan sampel diambil dengan kisi tembaga, setelah menempel dikeringkan dan dimasukkan petri disk.

Tahap berikutnya pewarnaan untuk menambah kontras irisan jaringan/sel pada kisi tembaga, memakai larutan pereaksi uranil asetat lalu pereaksi plumbum sitrat, dan dicuci berulang kali dengan aquades lalu kisi dikeringkan dan diamati dengan TEM.

Untuk SEM, bahan setelah difiksasi dengan cara sama seperti di atas, dilakukan dehidrasi masing-masing selama 15 menit dalam aseton atau eter konsentrasi 25, 50, 75 dan 90%, lalu dengan konsentrasi 100 % tiga kali. Selanjutnya pengeringan titik kritis memakai alat *Sample drying at the critical*

point (SAMDRI-780), lalu sediaan yang telah kering, dilekatkan di atas pegangan sediaan dan dilapis emas dengan cara vakum, baru diamati dengan SEM.

4.7.3 Analisis remediasi dan akumulasi Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+}

Untuk mengetahui remediasi ion-ion logam tersebut dapat dianalisis dari sisa ion-ion metal dalam mediana. Atau dari hasil perhitungan berdasarkan banyaknya ion-ion metal yang diserap dan diakumulasikan di dalam biomasanya.

Untuk analisis ion-ion logam, sisa media hasil pemisahan dipreparasi menurut prosedur ASL (analytical Service Laboratories) (Hugdahl, 1993) atau dari biomassa kering dipreparasi sesuai prosedur ASL (Fred Chen, 1993). Ditimbang biomassa yang setara dengan 0,3000 gm serbuk kering ditambah 2 ml asam nitrat dipanaskan di atas hotplate sampai larut. Larutan yang berwarna kekuningan didinginkan, lalu ditambah 0,5 ml larutan H_2O_2 10 % dipanaskan lagi sampai larutan jernih. Kemudian didinginkan dan dipindah kuantitatif dalam labu ukur diad kan sampai 25,0 ml dengan aquadem. Untuk sisa media diuapkan airnya sampai hampir kering baru diperlakukan dengan penambahan asam nitrat dan seterusnya seperti di atas. Selanjutnya diamati intensitasnya secara ICP-AES (Inductively coupled plasma atomic emission spectrophotometry) dengan alat ICP-AES Plasma Vision 10, pada panjang gelombang 224,700 nm atau 324,754 nm untuk Cu^{2+} , 228,802 nm untuk Cd^{2+} , 283,306 nm untuk Pb^{2+} dan 407,771 nm untuk Sr^{2+} . Kadar dihitung berdasarkan interpolasi intensitas sampel terhadap persamaan regresi kurva baku masing-masing ion logam yang sesuai dan yang diamati pada waktu hampir bersamaan dengan panjang gelombang yang sama.

Sebelumnya dilakukan validasi metode terlebih dahulu menggunakan modifikasi metode Funk *et al.* (1992).

4.7.4 Analisis metabolit

4.7.4.1 Ekstraksi dan analisis fitosteroid (hekogenin, solasodina dan sterol)

Ekstraksi sapogenin steroid dan sterol dari serbuk kering dilakukan menggunakan prosedur modifikasi Indrayanto *et al.* (1999). 1,000 gram serbuk kering diekstraksi 3 kali masing-masing menggunakan 5 ml khloroform. Setiap kali ekstraksi dilakukan menggunakan ultrasonik 15 menit dan “vortex-mixer” 10 menit. Semua ekstrak dikumpulkan dan diuapkan hingga kering (ekstrak fraksi khloroform). Residu dihidrolisis dengan 7,5 ml HCl 2N (100°C, selama 2 jam) atau HCl 2N dalam metanol (70-75°C, selama 2 jam), lalu didinginkan, dan dinetralkan dengan 10 N NaOH, selanjutnya diekstraksi 3 kali, setiap kali dengan 7,5 ml khloroform dan disentrifugasi selama 10 menit dengan putaran 2500 rpm. Fase khloroform dikumpulkan dan diuapkan hingga kering (ekstrak fraksi hidrolisat). Apabila digunakan untuk analisis, ekstrak kering dilarutkan dalam kloroform.

Ekstrak fraksi kloroform digunakan untuk sterol bebas, sedangkan ekstrak fraksi hidrolisat untuk analisis sterol terikat dan solasodina atau hekogenin.

Analisis hekogenin

Hekogenin dideterminasi dengan metode densitometri menurut Indrayanto *et al.*, 1996 dengan alat Shimadzu CS-930 TLC-Scanner. Filtrat hasil ekstraksi dan zat pembanding (standar hekogenin) ditotolkan pada lempeng atau pelat KLT Kieselgel 60 F₂₅₄ (E.Merck) dan dieluasi dengan fase gerak khloroform : etil

asetat (4:1). Setelah eluasi pelat KLT tersebut dikeringkan di udara terbuka pada suhu kamar, lalu disemprot dengan penampak noda anisaldehyd-asam sulfat pekat. Selanjutnya dipanaskan di dalam oven 100 °C selama 5 menit. Secara densitometri dapat diamati absorban-reflektansinya pada panjang gelombang antara 370 – 700 nm. Panjang gelombang maksimum terjadi pada 430 nm.

Untuk analisis kuantitatif, ekstrak fraksi hidrolisat dilarutkan kembali dengan kloroform 2,0 ml, lalu ditotolkan 10 µl/spot pada lempeng/pelat KLT Kieselgel 60 F₂₅₄ dengan pembanding standar hekogenin (0,01 – 10,00 µg/spot), dieluasi seperti cara analisis kualitatif di atas dan noda yang terjadi diukur areanya dengan TLC Scanner pada panjang gelombang 430 nm. Penetapan kadar sample ditentukan dengan cara intrapolasi area noda sampel ke dalam persamaan garis regresi kurva baku hekogenin tersebut (Sigma) sebagai standar eksternal pada pelat KLT yang sama.

Analisis solasodina

Solasodina dideterminasi dengan metode densitometri menurut Indrayanto *et al.*, 1995 dengan alat Shimadzu CS-930 TLC-Scanner. Ekstrak fraksi hidrolisat dilarutkan dalam kloroform, bersama pembanding (standar solasodina) ditotolkan pada lempeng Kieselgel 60 F₂₅₄ dan dieluasi dengan campuran kloroform : metanol : dietilamin (20 : 2 : 0,5). Setelah eluasi, pelat KLT tersebut dikeringkan di udara terbuka pada suhu kamar, selanjutnya disemprot dengan penampak noda anisaldehyd-asam sulfat, dipanaskan 100 °C selama 5 menit dalam oven. Warna noda dan harga R_f dibandingkan dengan standar solasodina.

Identifikasi yang lain dengan mengamati absorbans-reflektansinya dengan alat TLC Scanner Shimadzu CS-930 pada panjang gelombang 370 – 700 nm. Profil spektra yang dihasilkan dibandingkan dengan standar solasodina pada KLT yang sama.

Untuk analisis kuantitatif, ekstrak fraksi hidrolisat dilarutkan kembali dengan kloroform 2,0 ml, lalu ditotolkan 4 μ l/spot pada lempeng/pelat KLT Kieselgel 60 F₂₅₄ dengan pembanding standar solasodina (0,4 – 1,6 μ g/spot), dieluasi seperti cara di atas dan noda yang terjadi diukur areanya dengan TLC Scanner pada panjang gelombang maksimum 385 nm. Penetapan kadar sample ditentukan dengan cara intrapolasi area noda sampel ke dalam persamaan garis regresi kurva baku solasodina tersebut (Sigma) sebagai standar eksternal pada pelat KLT yang sama.

Analisis sterol-sterol

Untuk identifikasi adanya sterol digunakan metode TLC-densitometri menurut Indrayanto *et al.*, 1999. Ekstrak fraksi kloroform atau fraksi hidrolisat dilarutkan dalam kloroform, ditotolkan pada lempeng Kieselgel 60 F₂₅₄ dan dieluasi dengan campuran kloroform : etil asetat (4 : 1), selanjutnya disemprot dengan penampak noda anisaldehyd-asam sulfat, dipanaskan 100 °C selama 5 menit dalam oven. Warna noda dan harga R_f dibandingkan dengan standar kolesterol atau sitosterol maupun standar fitosterol lainnya. Identifikasi dapat dilakukan dengan mengamati absorbans-reflektansinya dengan alat TLC Scanner Shimadzu CS-930 pada panjang gelombang 370 – 700 nm. Profil spektra yang dihasilkan dibandingkan dengan standar fitosterol pada KLT yang sama.

Dapat dilakukan pula analisis kualitatif dengan GC menggunakan standar fitosterol dari SIGMA (seperti kolesterol, kampesterol, stigmasterol, sitosterol). Pada sampel dan standar campuran (berisi kolesterol, kampesterol, stigmasterol, sitosterol) ditambahkan standar internal progesterone, lalu diinjeksikan ke dalam inlet sistem GC. Waktu retensi relatif sampel yang diperoleh dari kromatogram dibandingkan dengan waktu retensi relatif dari senyawa standar. Jika waktu retensi relatif sampel dan standar sama, maka sampel tersebut mengandung senyawa yang identik dengan senyawa standar. Untuk kromatografi gas, digunakan alat Hewlett Packard Gas Chromatograph 5890 Series II. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan metode modifikasi Indrayanto *et al.* (1998). Detector yang digunakan adalah Flame Ionization Detector suhu 280°C; dengan kolom HP 5 (cross-linked 5 % phenyl methyl silicone, 25 m x 0.32 mm x 0.17 µm film thickness), gas pembawa nitrogen 1,7 kg/cm²; alat suntik Hamilton Micro Syringe 10 µL, dengan volume penyuntikan sampel 2 µL; split rasio 1:100, suhu injector 280 °C; memakai recorder Integrator HP, Chart speed 0,5 cm/menit, attenuation 5, minimum area 10000, treshold 4; program suhunya dimulai dengan suhu awal 240 °C selama 5 menit, dinaikkan menjadi 280 °C dengan kecepatan 5 °C per menit, suhu akhir 280 °C selama 20 menit.

Untuk analisis kuantitatif fitosterol, secara total dapat dilakukan dengan KLT-densitometri seperti di atas, tetapi dengan pembanding standar sterol berbagai kadar tertentu, diamati area nodanya pada panjang gelombang 395 nm memakai alat TLC Scanner Shimadzu CS-930. Selain cara itu dapat pula penetapan kadar dengan menggunakan gas kromatograf, dengan kondisi analisis

seperti di atas. Estimasi kadar sterol sampel dihitung berdasarkan kurva kalibrasi standar sitosterol. Kadar sterol sesungguhnya adalah :

$$C = C_k \times F_p \times \frac{1}{B_s} \times \frac{100}{(100 - \% S_s)}$$

Dengan keterangan :

- C = kadar sterol dalam sampel ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ BK)
- C_k = kadar sterol dari analit yang diinjeksikan ke dalam GC
- F_p = factor pengenceran
- B_s = berat penimbangan serbuk sampel
- $\% S_s$ = prosen susut kering serbuk sampel

4.7.4.2. Ekstraksi dan analisis asam amino

Analisis kandungan asam amino dilakukan mengikuti prosedur Hitachi Scientific Instrument Technical Data Sheet (1988), melalui tahapan analisis : hidrolisis sampel, pembuatan larutan pereaksi ninhidrin, pembuatan larutan eluen, pembuatan larutan standar asam amino, preparasi sampel hasil hidrolisis, pengamatan dengan Amino Acid Analyzer (AAA) dan perhitungan hasil.

Hidrolisis sampel

Ditimbang teliti 1,0 mg sampel biomassa atau 1,0 ml sisa media yang telah disaring dengan kertas Whatman 41 ditambah 1 ml HCl 6 N, dikocok sampai homogen, kemudian dioven pada suhu 110 °C selama 22 jam. Cairan hasil pemanasan ini diuapkan dengan cara mengalirkan gas Nitrogen sampai kering. Hasilnya disiapkan untuk analisis.

Pembuatan larutan ninhidrin

Ditimbang natrium asetat anhidrat sebanyak 82,000 gram, dilarutkan dalam 150 ml air suling steril, ditambah 25 ml asam asetat anhidrat, lalu diencerkan dengan air suling sampai volumenya hampir 250 ml. Larutan dikocok homogen, diatur pHnya 5,5 lalu ditambah 750 ml sellulov, diaduk homogen sambil dialiri gas nitrogen selama 20 menit (larutan A).

Ditimbang 20,000 gram ninhidrin dalam botol kedap udara, dimasukkan ke dalam larutan A sambil diaduk agar larut sempurna, sambil dialiri gas nitrogen selama 15 menit (larutan B). Ke dalam larutan B ditambahkan 1,7 ml larutan titanous klorida dan diaduk sambil dialiri gas nitrogen selama 10 menit. Kemudian ditambah dapar sampai volumenya menjadi 1 liter. Larutan ini sebaiknya disimpan di dalam almari es.

Pembuatan larutan eluen

Larutan eluen ini merupakan larutan dapar yang tersusun atas berbagai komposisi bahan air suling, natrium sitrat, natrium hidroksida, natrium klorida, asam sitrat, etil alkohol, bensil alkohol, tiodiglikol, larutan Bryj-35, dan asam kaproat, sehingga pH nya diatur untuk berbagai eluen tersebut dengan pH : 3,3 ; 3,2; 4,3; dan 4,9.

Pembuatan larutan standar asam amino

Dipipet 0,20 ml larutan standar yang mengandung 18 macam asam amino baku, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml. Kemudian diencerkan dengan

larutan dapar sitrat 0,2 N dan pH diatur 2,2 dan larutan disiapkan untuk pengukuran pada alat penganalisis asam-asam amino.

Penyiapan sampel hasil hidrolisis

Hasil hidrolisis yang kering kehitaman ditambah 0,5 ml NaOH 0,01 N diaduk sampai homogen dengan alat ultrasonik selama 15 menit. Ke dalam campuran tersebut ditambahkan 1,5 ml HCl 0,02 N dan diaduk homogen, lalu dipipet suspensinya dengan injektor 2 ml. Campuran yang terambil ini disaring dengan filter Millex – HA 0,45 μm . Hasil saringan dimasukkan ke dalam tabung sampel 500 μL untuk siap dianalisis.

Kondisi alat :

Waktu analisis	: 144 menit
Volume optimum sampel	: 10 nmol
Ukuran kolom	: 4 x 150 mm (2819 °F)
Kecepatan alir larutan buffer	: 0,475 ml/menit
Tekanan kolom	: 39 kg/cm ²
Temperatur kolom	: 53 °C

Temperatur tempat pencampuran anantara sampel dan ninhirin : 95 – 96 °C.

Perhitungan

Asam amino di dalam sampel beratnya (mg) :

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

Sedangkan persen kadar asam amino = % AA = $C_x / BS \times V_s / V_i \times 100 \%$.

A_x = area asam amino sampel

A_{st} = area asam amino standar

C_x = berat (mg) asam amino sampel

C_{st} = kadar asam amino dalam standar/volume standar yang
diinjeksikan

BM_{st} = berat molekul asam amino standar

BS = berat sampel atau volume sampel

V_s = volume sampel setelah dihidrolisis

V_i = volume sampel yang diinjeksikan (μL)

4.7.5 Analisis data

Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pengaruh konsentrasi masing-masing ion Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} atau Sr^{2+} terhadap pertumbuhan dan kandungan fitosteroid dalam kultur (suspensi, kalus, pucuk) *Agave amaniensis*, *Costus speciosus*, *Solanum laciniatum* dan *Solanum mammosum* maka dilakukan uji Anova. Dalam penelitian ini digunakan analisis varians "Fixed Effect Model" dengan rancangan rambang lugas (One Way Anova). Untuk mengetahui ada tidaknya hubungan antara kadar Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} atau Sr^{2+} dalam media dengan indeks pertumbuhan kultur digunakan analisis statistik regresi (Steel dan Torrie, 1995).

BAB 5

HASIL PENELITIAN

Untuk perlakuan Cu^{2+} , hasil pengamatan IP dan PCV, remediasi dan akumulasi Cu^{2+} , serta kandungan metabolit pada kultur *A. amaniensis*, *C. speciosus* dan *S. mammosum* dapat dilihat dalam Tabel 5.1 s.d. 5.5. Sedangkan untuk perlakuan Cd^{2+} pada kultur *A. amaniensis*, *C. speciosus* dan *S. laciniatum* hasilnya dapat dilihat dalam Tabel 5.6 s.d. 5.9, untuk perlakuan Pb^{2+} pada kultur *A. amaniensis* dan *C. speciosus* hasilnya dapat dilihat dalam Tabel 5.10 s.d. 5.12 dan untuk perlakuan Sr^{2+} pada kultur *S. laciniatum* hasilnya dapat dilihat dalam Tabel 5.13.

Gambar histogram hasil pengamatan IP dan PCV kultur pada berbagai konsentrasi Cu^{2+} dapat dilihat dalam gambar 5.1 s.d. 5.4; untuk Cd^{2+} pada gambar 5.5 s.d. 5.8; untuk Pb^{2+} pada gambar 5.9 s.d. 5.11; untuk Sr^{2+} pada gambar 5.12. Gambar morfologis-histologis kultur pada berbagai konsentrasi ion logam dapat dilihat dalam gambar 5.13 s.d. 5.16. Histogram hasil remediasi dan akumulasi Cu^{2+} pada kultur dapat dilihat pada gambar 5.17 s.d. 5.19; untuk Cd^{2+} pada gambar 5.20 s.d. 5.23; untuk Pb^{2+} pada gambar 5.24 s.d. 5.26 dan untuk Sr^{2+} pada gambar 5.27. Histogram kandungan fitosteroid kultur pada berbagai konsentrasi Cu^{2+} dapat dilihat pada gambar 5.28 dan 5.29; untuk Cd^{2+} pada gambar 5.30 s.d. 5.31; untuk Pb^{2+} pada gambar 5.32 s.d. 5.35 dan untuk Sr^{2+} pada gambar 5.36.

Semua pembahasan tabel dan gambar histogram tersebut secara rinci dapat dilihat pada BAB 6 PEMBAHASAN.

Tabel 5.2 Kandungan asam amino (% BK)^a di dalam biomassa kultur suspensi *Agave amaniensis* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cu²⁺.

Asam Amino	Cu ²⁺ 0 ppm	Cu ²⁺ 0,006 ppm ^b	Cu ²⁺ 5 ppm	Cu ²⁺ 10 ppm	Cu ²⁺ 15 ppm	Cu ²⁺ 20 ppm	Cu ²⁺ 30 ppm
Hypro	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,1	2,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Pro	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Asp	2,7 ± 0,2	2,1 ± 0,3	2,1 ± 0,2	2,0 ± 0,1	2,6 ± 0,5	2,1 ± 0,1	2,5 ± 0,3
Thr	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,0	1,4 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,2
Ser	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,6 ± 0,3	1,3 ± 0,1	1,6 ± 0,2
Glu	1,9 ± 0,0	3,9 ± 0,2	2,9 ± 0,2	3,9 ± 0,1	4,8 ± 0,4	4,7 ± 0,7	4,5 ± 0,4
Gly	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,3	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,8 ± 0,3	1,2 ± 0,2	1,7 ± 0,1
Ala	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,3	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,0	1,7 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,6 ± 0,1
Cys	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Val	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,6 ± 0,3	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,2
Ile	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,4 ± 0,3	2,0 ± 0,1	1,3 ± 0,2
Leu	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	2,4 ± 0,3	1,7 ± 0,2	2,3 ± 0,2
Tyr	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Phe	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,4 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,3 ± 0,1
Hylys	1,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,1
Lys	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	2,0 ± 0,2	1,5 ± 0,2	2,0 ± 0,1
His	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Arg	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,6 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,1

^a Hasil dinyatakan dalam rata-rata ± SD (n = 3); ^b kadar Cu²⁺ orisinal di dalam media MS. Asam amino ditentukan menggunakan Amino Acid Analyzer.

Table 5.3 Kandungan asam amino di dalam media (% b/v)^a kultur suspensi *A. amaniensis* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cu²⁺

Asam Amino	Cu ²⁺ 0 ppm	Cu ²⁺ 0,006 ppm ^b	Cu ²⁺ 1,25 ppm	Cu ²⁺ 2,5 ppm	Cu ²⁺ 5 ppm	Cu ²⁺ 10 ppm	Cu ²⁺ 20 ppm
Pro	0,5 (± 0,3)	0,5 (± 0,5)	0,5 (± 0,3)	0,6 (± 5,2)	0,6 (± 0,6)	1,3 (± 0,0)	1,8 (± 5,0)
Asp	0,5 (± 8,0)	0,3 (± 2,8)	0,3 (± 8,5)	0,4 (± 3,8)	1,1 (± 3,1)	1,0 (± 4,1)	5,3 (± 0,5)
Ser	0,1 (± 2,8)	0,1 (± 23)	0,1 (± 18)	0,1 (± 7,2)	0,7 (± 5,4)	1,0 (± 10)	2,8 (± 0,4)
Glu	0,5 (± 11)	0,3 (± 0,8)	0,3 (± 5,0)	0,4 (± 0,4)	1,9 (± 3,5)	0,9 (± 5,3)	10,2 (± 3,0)
Gly	0,3 (± 14)	0,2 (± 1,8)	0,2 (± 1,3)	0,2 (± 1,9)	0,8 (± 11)	0,5 (± 14)	3,9 (± 4,5)
Ala	0,5 (± 10)	0,3 (± 2,7)	0,2 (± 0,3)	0,3 (± 7,0)	0,9 (± 12)	0,6 (± 9,1)	3,5 (± 4,2)
Cys	0,3 (± 1,9)	0,3 (± 9,6)	0,3 (± 3,3)	0,2 (± 13)	0,2 (± 7,4)	0,3 (± 9,0)	0,5 (± 2,4)
Val	0,4 (± 6,4)	0,3 (± 5,9)	0,2 (± 5,2)	0,3 (± 12)	0,6 (± 5,9)	0,6 (± 11)	3,4 (± 4,7)
Ile	0,3 (± 5,8)	0,2 (± 4,4)	0,2 (± 3,8)	0,3 (± 0,0)	0,6 (± 14)	0,7 (± 21)	2,2 (± 2,0)
Leu	0,4 (± 4,0)	0,3 (± 1,2)	0,3 (± 0,8)	0,4 (± 1,4)	0,8 (± 11)	0,4 (± 14)	3,4 (± 3,8)
Phe	0,2 (± 5,6)	0,2 (± 5,5)	0,2 (± 5,4)	0,2 (± 5,4)	0,3 (± 13)	0,2 (± 9,5)	2,1 (± 9,3)
Hyls	0,3 (± 11)	0,1 (± 2,1)	0,1 (± 2,9)	0,2 (± 2,5)	0,2 (± 6,2)	0,3 (± 10)	7,3 (± 4,1)
Lys	0,2 (± 7,9)	0,2 (± 5,1)	0,1 (± 1,2)	0,2 (± 3,5)	0,5 (± 4,5)	0,4 (± 3,9)	3,8 (± 1,9)

^a Hasil dinyatakan dalam rata-rata analisis duplo (± % deviasi dari rata-rata pengukuran); ^b kadar Cu²⁺ orisinal di dalam media MS. Asam amino ditentukan menggunakan Amino Acid Analyzer.

Tabel 5.4 Hasil pengukuran IP, remediasi dan akumulasi Cu^{2+} di dalam biomassa kultur kalus *Costus speciosus* umur 3 minggu pada berbagai konsentrasi Cu^{2+} .

Cu^{2+} di dalam media (ppm)	IP ^a	Remediasi Cu^{2+} terhitung (%) ^a	Akumulasi Cu^{2+} ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ BK) ^b
0	5,7 ± 0,6	-	1 ± 0
0,006 ^c	5,7 ± 0,6	93 ± 24	2 ± 0
1	6,3 ± 0,7	59 ± 13	42 ± 5
2.5	6,4 ± 0,5	44 ± 7	78 ± 8
5	6,0 ± 0,6	47 ± 8	163 ± 16
10	5,2 ± 0,9	42 ± 10	318 ± 17
20	3,7 ± 1,3	30 ± 11	594 ± 41

Hasil dinyatakan sebagai : rata-rata ± SD (^an=19, ^bn=3); ^ckadar Cu^{2+} orisinal di dalam media MS. Cu^{2+} ditentukan kadarnya menggunakan ICP-AES.

Tabel 5.5 Hasil pengukuran IP dan PCV kultur suspensi *Solanum mammosum* umur 7 hari, serta IP, akumulasi Cu^{2+} dalam biomassa dan kandungan sterol total bebas kultur pucuk *S. mammosum* umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi Cu^{2+} .

Kultur suspensi <i>S. mammosum</i>			Kultur pucuk <i>S. mammosum</i>			
Kadar Cu^{2+} dalam media (ppm)	IP ^a	PCV (%) ^a	Kadar Cu^{2+} dalam media (ppm)	IP ^b	Akumulasi Cu^{2+} dalam biomassa ($\mu\text{g g}^{-1}$ BK) ^c	Sterol bebas ($\mu\text{g g}^{-1}$ BK) ^d
0	3,5 ± 0,2	89 ± 5	0	3,9 ± 1,0	3 ± 0	561 ± 125
0,006 ^e	3,9 ± 0,3	93 ± 5	0,006 ^e	9,3 ± 2,5	4 ± 0	593 ± 117
5	3,7 ± 0,1	90 ± 4	5	6,5 ± 2,3	51 ± 1	439 ± 63
10	3,4 ± 0,2	90 ± 4	10	6,8 ± 2,0	104 ± 6	467 ± 47
20	2,2 ± 0,2	61 ± 5	20	4,8 ± 1,6	130 ± 1	358 ± 76
30	0,7 ± 0,0	28 ± 1	40	2,3 ± 0,3	415 ± 3	147 ± 45

Hasil dinyatakan dalam rata-rata ± SD (^a n = 9; ^b n = 18; ^c n = 3; ^d n = 4). ^eMedium orisinal modifikasi MS (kontrol). Cu^{2+} ditentukan menggunakan ICP-AES dan sterol menggunakan TLC-densitometer.

Tabel 5.6 Hasil pengukuran IP, PCV, remediasi dan akumulasi Cd^{2+} , serta kandungan hekogenin di dalam biomassa kultur suspensi *A. amaniensis* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cd^{2+} .

Kadar Cd^{2+} dalam media (ppm)	IP ^a	PCV (%) ^a	Remediasi Cd^{2+} hasil perhitungan (%) ^a	Akumulasi Cd^{2+} dalam biomassa ($\mu\text{g g}^{-1}$ BK) ^b	Kandungan hekogenin ($\mu\text{g g}^{-1}$ BK) ^c
0 ^d	2,7 ± 0,1	75 ± 3	-	-	63 (± 3)
10	1,9 ± 0,1	52 ± 2	25 ± 2	184 ± 5	10 (± 8)
15	1,7 ± 0,1	49 ± 2	29 ± 1	312 ± 18	20 (± 12)
20	1,5 ± 0,1	48 ± 3	41 ± 2	596 ± 6	27 (± 4)
25	1,2 ± 0,1	41 ± 2	45 ± 2	900 ± 7	12 (± 8)

Hasil dinyatakan sebagai rata-rata ± SD (^a n = 10; ^b n = 3). ^c Hasil dinyatakan sebagai rata-rata dua kali analisis (± % deviasi dari rata-rata).

^dMedium orisinal modifikasi MS (kontrol). Cd^{2+} ditentukan kadarnya menggunakan ICP-AES; hekogenin ditentukan menggunakan TLC-densitometer.

Tabel 5.7 Hasil pengukuran IP, PCV, remediasi dan akumulasi Cd²⁺, serta kandungan sitosterol kultur suspensi *Costus speciosus* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cd²⁺.

Kadar Cd ²⁺ dalam media (ppm)	IP ^a	PCV (%) ^a	Remediasi Cd ²⁺ hasil perhitungan (%) ^a	Akumulasi Cd ²⁺ dalam biomassa (µg g ⁻¹ BK) ^b	Sitosterol bebas (µg g ⁻¹ BK) ^c	Sitosterol terikat (µg g ⁻¹ BK) ^c
0 ^d	2.0 ± 0.3	35 ± 4	-	-	235 (± 6)	217 (±14)
5	1.5 ± 0.1	33 ± 1	22 ± 1	173 ± 10	138 (± 4)	205 (± 9)
10	1.4 ± 0.1	31 ± 2	21 ± 2	278 ± 29	259 (± 2)	144 (± 7)
15	1.3 ± 0.0	31 ± 1	18 ± 1	472 ± 55	204 (±22)	160 (±4)
20	1.2 ± 0.1	25 ± 4	17 ± 3	533 ± 61	96 (± 1)	261 (±21)

Hasil dinyatakan dalam rata-rata ± SD (^an = 10; ^bn = 3). ^cHasil dinyatakan dalam rata-rata dua kali analisis (± % deviasi dari rata-rata).

^d Medium orisinal modifikasi MS (kontrol). Cd²⁺ ditentukan menggunakan ICP-AES dan sitosterol menggunakan GC.

Tabel 5.8 Hasil pengukuran IP, remediasi dan akumulasi Cd^{2+} di dalam biomassa kultur kalus *Costus speciosus* umur 3 minggu pada berbagai konsentrasi Cd^{2+} .

Cd^{2+} di dalam media perlakuan (ppm)	IP ^a	Remediasi Cd^{2+} (%) ^b	Akumulasi Cd^{2+} ($\mu\text{g g}^{-1}$ BK) ^b
0 ^d	4,9 ± 0,9	-	-
0,5	4,9 ± 0,7	83 ± 5	16 ± 1
1	4,0 ± 1,2	77 ± 3	30 ± 3
2,5	3,6 ± 0,9	63 ± 10	56 ± 3
5	2,4 ± 0,7	46 ± 3	150 ± 6
10	1,8 ± 0,4	62 ± 0	258 ± 1
20	1,1 ± 0,2	46 ± 10	578 ± 14

Hasil dinyatakan sebagai: rata-rata ± SD (^a n = 19, ^b n = 3). ^c Medium orisinal modifikasi MS (kontrol). Cd^{2+} ditentukan menggunakan ICP-AES.

Tabel 5.9 Hasil pengukuran IP, remediasi dan akumulasi Cd²⁺, serta kandungan solasodina di dalam biomassa kultur pucuk *Solanum laciniatum* umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi Cd²⁺.

Cd ²⁺ di dalam media perlakuan (ppm)	IP ^a	Remediasi Cd ²⁺ terhitung (%) ^a	Akumulasi Cd ²⁺ (µg g ⁻¹ BK) ^b	Solasodina di dalam biomassa (µg g ⁻¹ BK) ^c
0 ^d	4,5 ± 0,8	-	-	714 (± 27)
5	4,3 ± 0,7	64 ± 11	120 ± 20	394 (± 1)
10	3,4 ± 0,8	57 ± 13	236 ± 9	2365 (± 4)
15	2,9 ± 0,7	59 ± 14	447 ± 62	1024 (± 6)
20	2,8 ± 0,6	63 ± 12	633 ± 82	754 (± 2)

Hasil dinyatakan sebagai: rata-rata ± SD (^a n = 20, ^b n = 6), ^c Hasil dinyatakan sebagai rata-rata dua kali analisis (± % deviasi dari rata-rata).

^d Medium orisinal modifikasi MS (kontrol). Cd²⁺ ditentukan menggunakan ICP-AES; solasodina menggunakan TLC-densitometer.

Tabel 5.10 Hasil pengukuran IP, PCV, remediasi dan akumulasi Pb^{2+} , serta kandungan hekogenin kultur suspensi *A. amaniensis* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Pb^{2+} .

Kadar Pb^{2+} dalam media (ppm)	IP	PCV (%)	Remediasi Pb^{2+} hasil perhitungan (%) ^a	Akumulasi Pb^{2+} dalam biomassa ($\mu g g^{-1}$ BK) ^b	Hekogenin ($\mu g g^{-1}$ BK) ^c
0 ^d	2,7 ± 0,1	75 ± 3	-	-	63 (± 3)
10	2,4 ± 0,2	65 ± 5	79 ± 7	468 ± 4	30 (± 16)
20	2,1 ± 0,1	50 ± 2	78 ± 4	890 ± 25	27 (± 15)
30	2,0 ± 0,1	54 ± 3	75 ± 4	1367 ± 31	23 (± 4)
40	2,2 ± 0,1	60 ± 2	64 ± 5	1395 ± 27	22 (± 4)

Hasil dinyatakan sebagai: rata-rata ± SD (^a n = 10; ^b n = 3). ^c Hasil dinyatakan sebagai: rata-rata dua kali analisis (± % deviasi dari rata-rata). ^dMedium orisinal modifikasi MS (kontrol). Pb^{2+} ditentukan menggunakan ICP-AES; hekogenin menggunakan TLC-densitometer.

Tabel 5.11 Hasil pengukuran IP, PCV, remediasi dan akumulasi Pb^{2+} , serta kandungan hekogenin kultur suspensi *A. amaniensis* umur 14 hari pada berbagai konsentrasi Pb^{2+} .

Pb^{2+} dalam media (ppm)	IP ^a	PCV (%) ^a	Remediasi Pb^{2+} (%) ^b	Pb^{2+} dalam biomassa ($\mu g \cdot g^{-1}$ BK) ^c	Kadar Hekogenin ($\mu g \cdot g^{-1}$ BK) ^d
0 ^e	2,5 ± 0,1	78 ± 3	-	-	72 (± 1)
10	2,5 ± 0,1	78 ± 2	94 ± 2	548 ± 22	50 (± 1)
20	1,8 ± 0,2	58 ± 4	73 ± 3	875 ± 93	38 (± 4)
30	2,3 ± 0,1	64 ± 2	96 ± 1	1.348 ± 50	34 (± 7)
40	2,4 ± 0,1	59 ± 3	73 ± 1	1.558 ± 53	24 (± 4)

Hasil dinyatakan sebagai: rata-rata ± SD (^a n = 9; ^b n = 5; ^c n = 3). ^d Hasil dinyatakan sebagai: rata-rata dua kali analisis (± % deviasi dari rata-rata). ^eMedium orisinal modifikasi MS (kontrol). Pb^{2+} ditentukan menggunakan ICP-AES dan hekogenin menggunakan TLC-densitometer.

Tabel 5.12 Hasil pengukuran IP, PCV, remediasi dan akumulasi Pb²⁺, serta kandungan sitosterol kultur suspensi *Costus speciosus* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Pb²⁺.

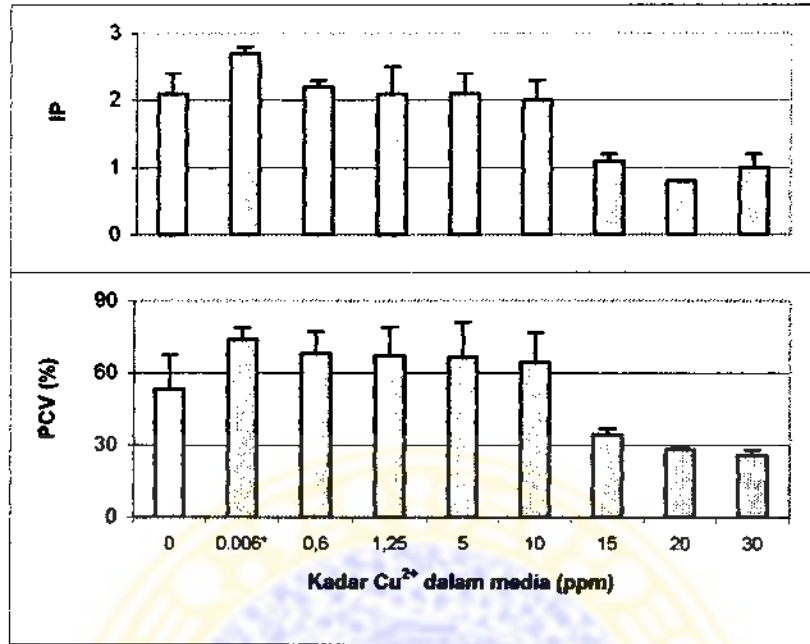
Kadar Pb ²⁺ dalam media (ppm)	IP	PCV (%)	Remediasi Pb ²⁺ hasil perhitungan (%) ^b	Akumulasi Pb ²⁺ dalam biomassa (µg g ⁻¹ BK) ^b	Sitosterol bebas (µg g ⁻¹ BK) ^e	Sitosterol terikat (µg g ⁻¹ BK) ^e
0 ^d	2,0 ± 0,3	35 ± 4	-	-	235 (± 6)	217 (±14)
10	2,4 ± 0,1	46 ± 4	35 ± 2	244 ± 5	153 (±21)	444 (± 6)
20	2,4 ± 0,2	58 ± 6	38 ± 3	521 ± 8	164 (± 8)	285 (± 2)
30	3,4 ± 0,3	77 ± 5	36 ± 3	580 ± 38	234 (± 4)	338 (± 3)
40	1,2 ± 0,1	33 ± 2	31 ± 2	1167 ± 55	318 (±18)	283 (±4)

Hasil dinyatakan sebagai: rata-rata ± SD (^a n = 10; ^b n = 3). ^c Hasil dinyatakan sebagai: rata-rata dua kali analisis (± % deviasi dari rata-rata). ^d Medium orisinal modifikasi MS (kontrol). Pb²⁺ ditentukan menggunakan ICP-AES dan sitosterol menggunakan GC.

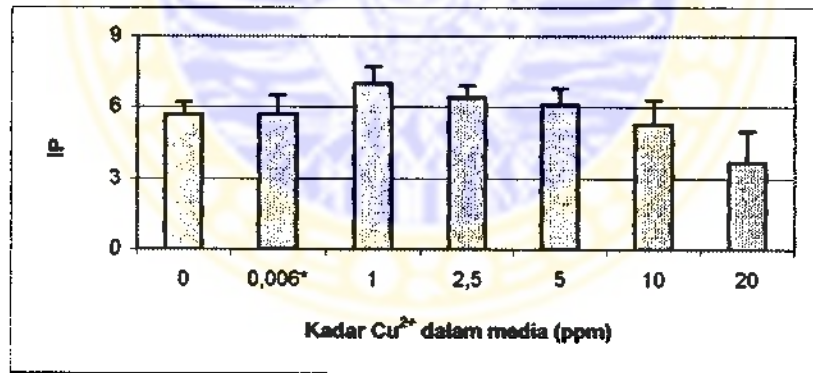
Tabel 5.13. Hasil pengukuran IP, remediasi dan akumulasi Sr^{2+} , serta kandungan solasodina di dalam biomassa kultur pucuk *Solanum laciniatum* umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi Sr^{2+} .

Sr^{2+} di dalam media (ppm)	IP ^a	Remediasi Sr^{2+} dari media (%) ^b	Akumulasi Sr^{2+} di dalam biomassa ($\mu\text{g g}^{-1}$ BK) ^b	Solasodina (mg g^{-1} BK) ^b
0	2,8 ± 0,3	-	-	1,2 ± 0,2
25	3,4 ± 0,8	75 ± 1	189 ± 6	1,4 ± 0,2
50	3,3 ± 0,3	81 ± 1	391 ± 10	1,9 ± 0,1
100	2,9 ± 0,3	74 ± 1	634 ± 100	1,6 ± 0,1
200	2,9 ± 0,3	54 ± 1	1312 ± 132	1,3 ± 0,1

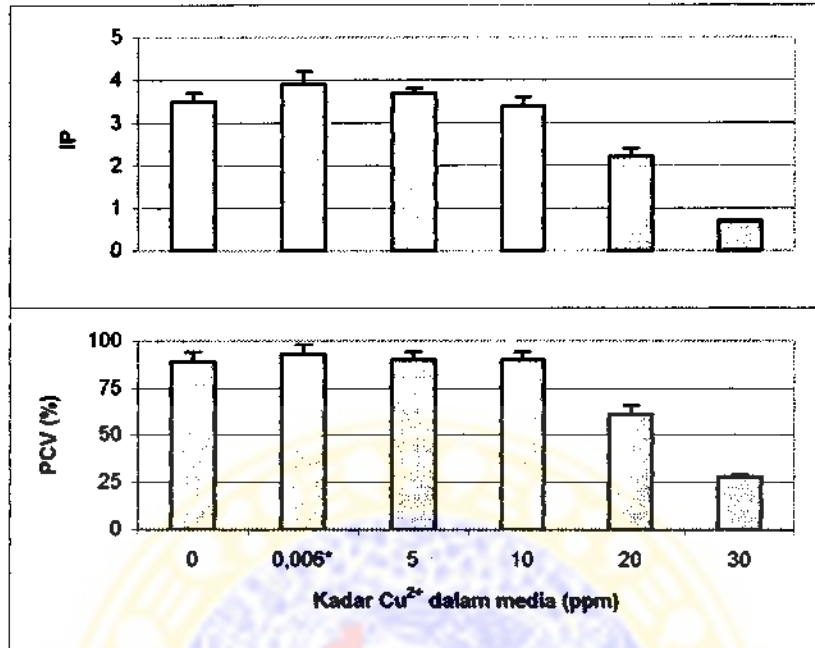
Hasil dinyatakan sebagai: rata-rata ± SD (^a n = 25; ^b n = 4). Sr^{2+} ditentukan menggunakan ICP-AES; solasodina menggunakan TLC-densitometer.



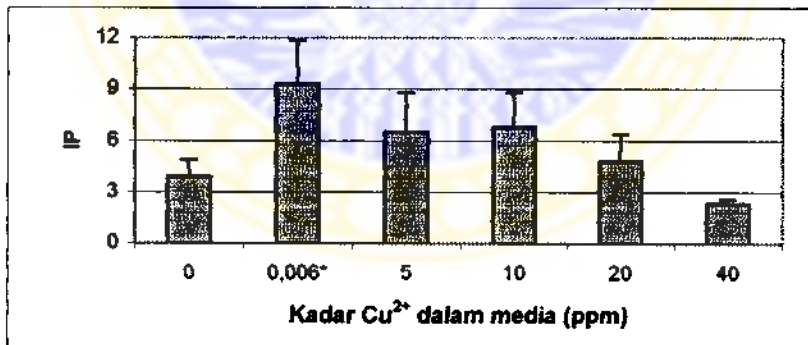
Gambar 5.1 Histogram IP dan % PCV kultur suspensi sel *Agave amaniensis* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cu²⁺. *Kadar orisinal Cu²⁺ dalam medium MS. Kultur mampu tumbuh dalam media mengandung Cu²⁺ 0-15 ppm.



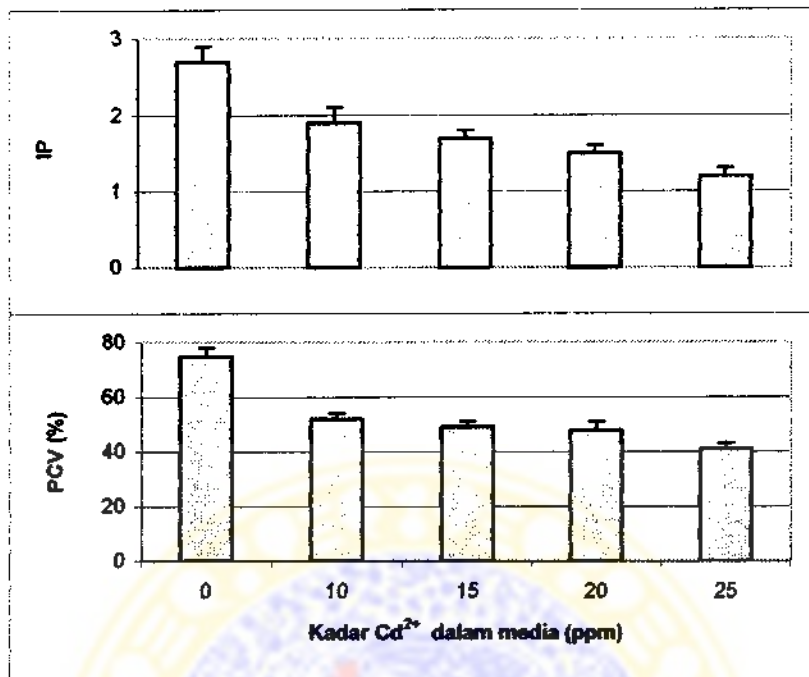
Gambar 5.2 Histogram IP kultur kalus *Costus speciosus* umur 3 minggu pada berbagai konsentrasi Cu²⁺. *Kadar orisinal Cu²⁺ dalam medium MS. Kultur mampu tumbuh dalam media mengandung Cu²⁺ 0-20 ppm.



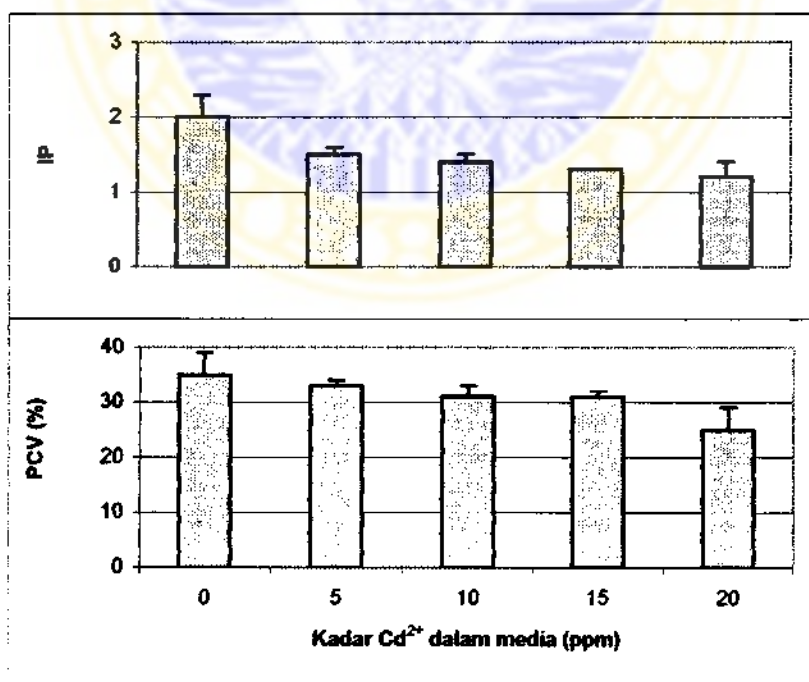
Gambar 5.3 Histogram IP dan % PCV kultur suspensi *Solanum mammosum* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cu^{2+} . *Kadar orisinal Cu^{2+} dalam medium MS. Kultur mampu tumbuh dalam media mengandung Cu^{2+} 0-20 ppm.



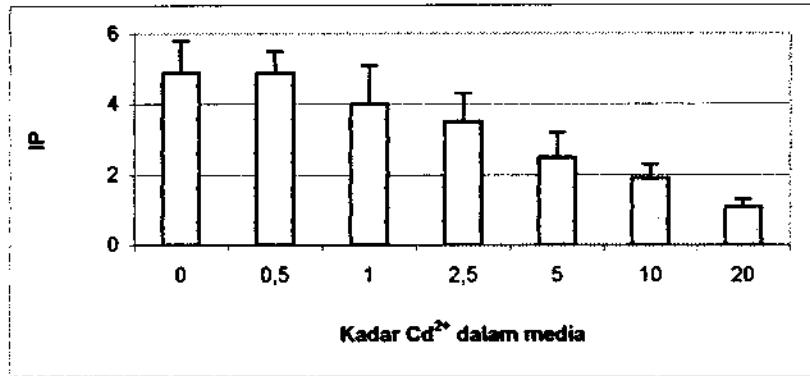
Gambar 5.4 Histogram IP kultur pucuk *Solanum mammosum* umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi Cu^{2+} . *Kadar orisinal Cu^{2+} dalam medium MS. Kultur mampu tumbuh dalam media mengandung Cu^{2+} 0-40 ppm.



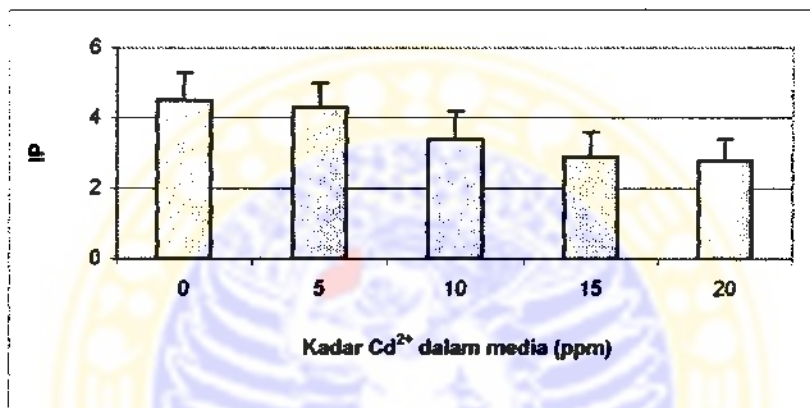
Gambar 5.5 Histogram IP dan % PCV kultur suspensi sel *Agave amaniensis* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cd²⁺. Kultur mampu tumbuh dalam media mengandung Cd²⁺ 0-25 ppm.



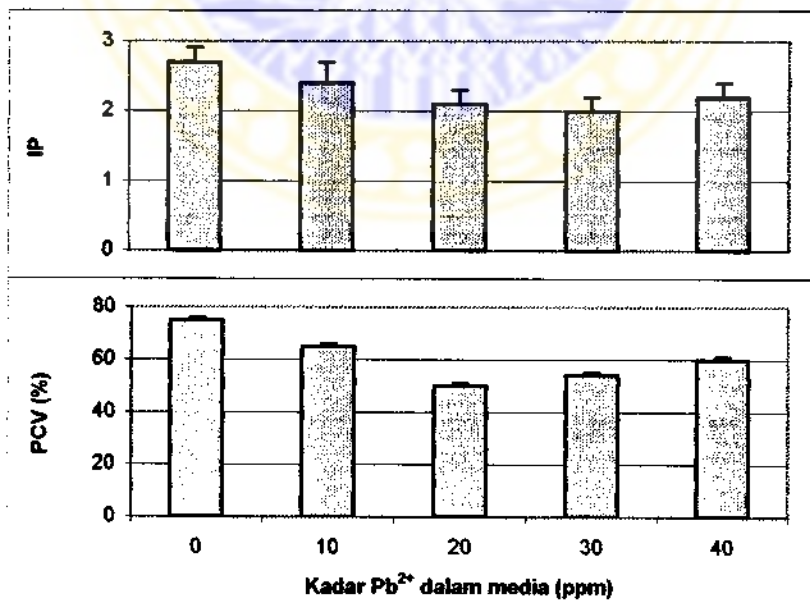
Gambar 5.6 Histogram IP dan % PCV kultur suspensi sel *Costus speciosus* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cd²⁺. Kultur mampu tumbuh dalam media mengandung Cd²⁺ 0-20 ppm.



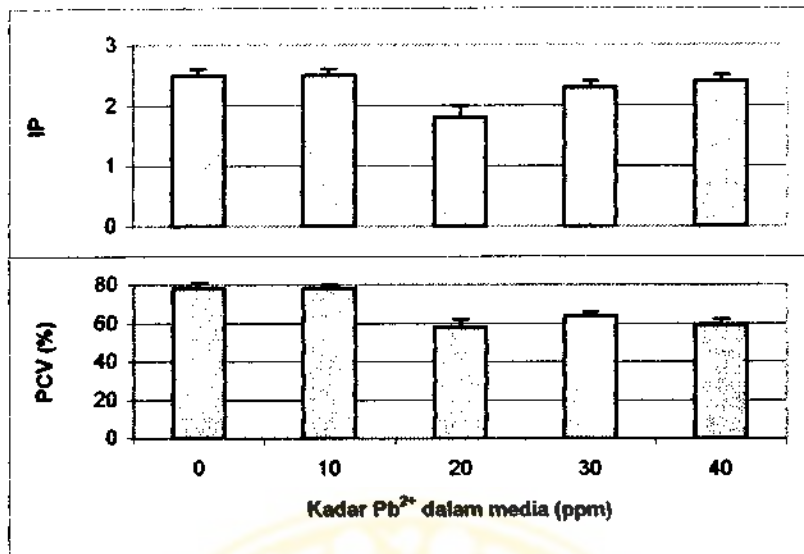
Gambar 5.7 Histogram IP kultur kalus *Costus speciosus* umur 3 minggu pada berbagai konsentrasi Cd²⁺. Kultur mampu tumbuh dalam media mengandung Cd²⁺ 0-20 ppm.



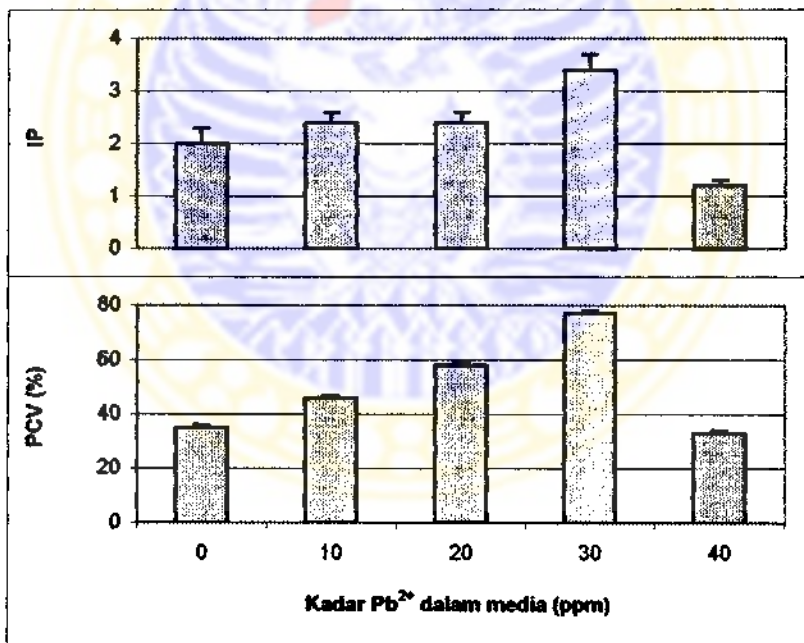
Gambar 5.8 Histogram IP kultur pucuk *Solanum laciniatum* umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi Cd²⁺. Kultur mampu tumbuh dalam media mengandung Cd²⁺ 0-20 ppm.



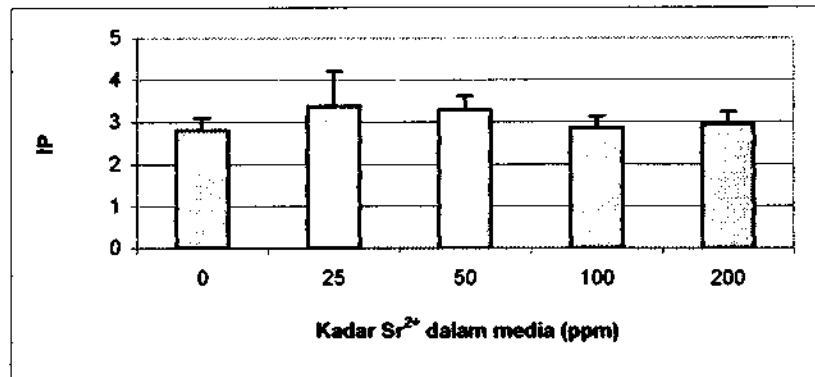
Gambar 5.9 Histogram IP dan % PCV kultur suspensi sel *Agave amaniensis* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Pb²⁺. Kultur mampu tumbuh dalam media mengandung Pb²⁺ 0-40 ppm.



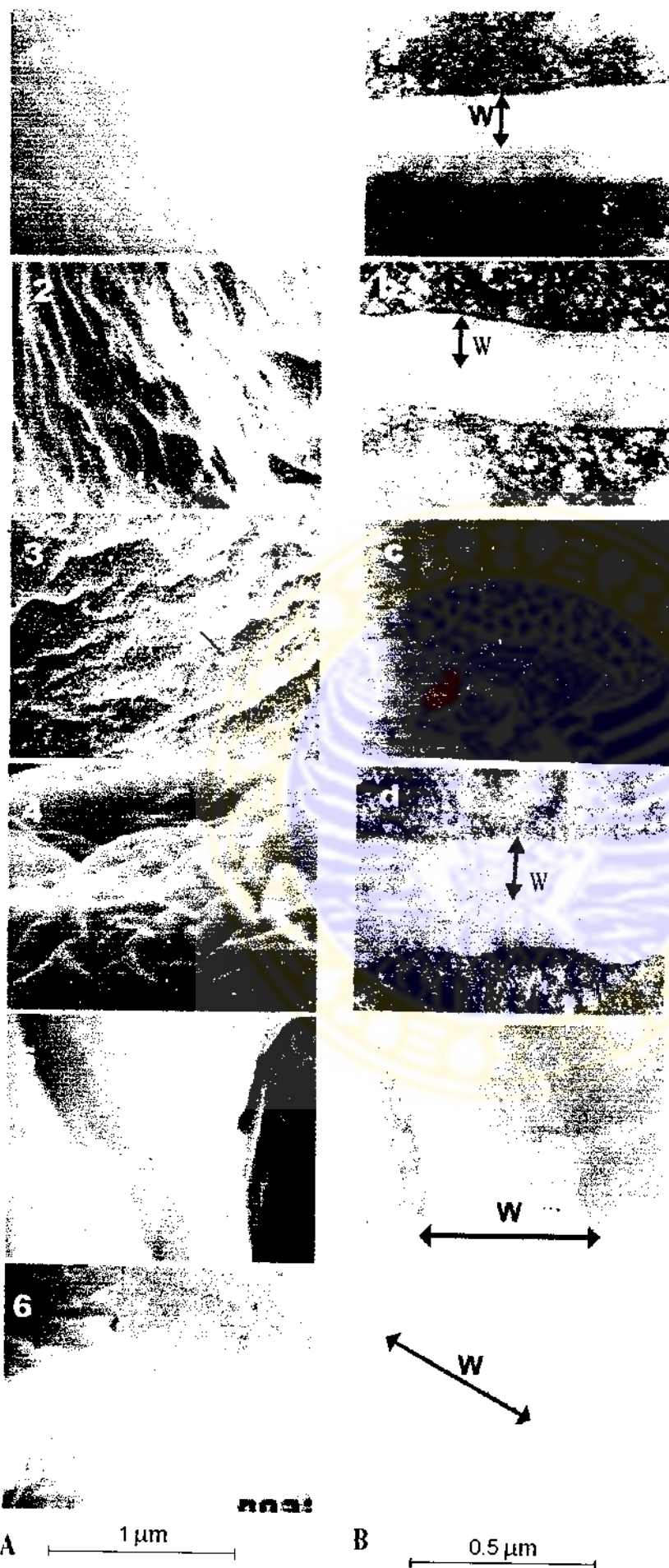
Gambar 5.10 Histogram IP dan % PCV kultur suspensi sel *Agave amaniensis* umur 14 hari pada berbagai konsentrasi Pb²⁺. Kultur mampu tumbuh dalam media mengandung Pb²⁺ 0-40 ppm.



Gambar 5.11 Histogram IP dan % PCV kultur suspensi sel *Costus speciosus* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Pb²⁺. Kultur mampu tumbuh dalam media mengandung Pb²⁺ 0-40 ppm.



Gambar 5.12 Histogram IP kultur pucuk *Solanum laciniatum* umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi Sr²⁺. Kultur mampu tumbuh dalam media mengandung Sr²⁺ 0-200 ppm.

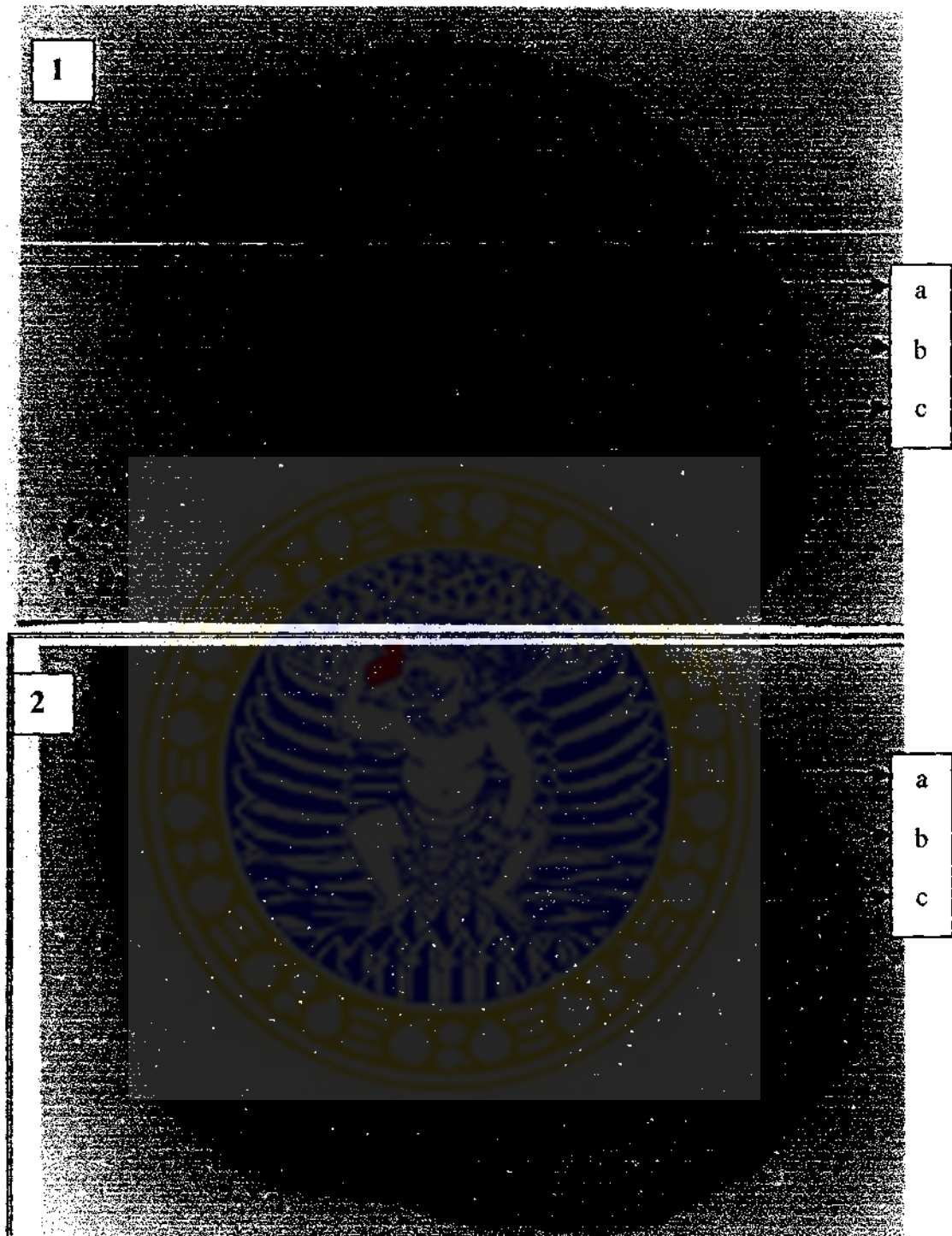


Gambar 5.13 Permukaan sel dan dinding sel dari kultur suspensi sel *A. amaniensis*. (A) Permukaan dinding sel kultur pada media dengan Cu (1) 0 ppm, (2) 0,006 ppm, (3) 1,25 ppm, (4) 5 ppm, (5) 10 ppm dan (6) 20 ppm (Pembesaran 10.000 x , SEM-JMS- T100).

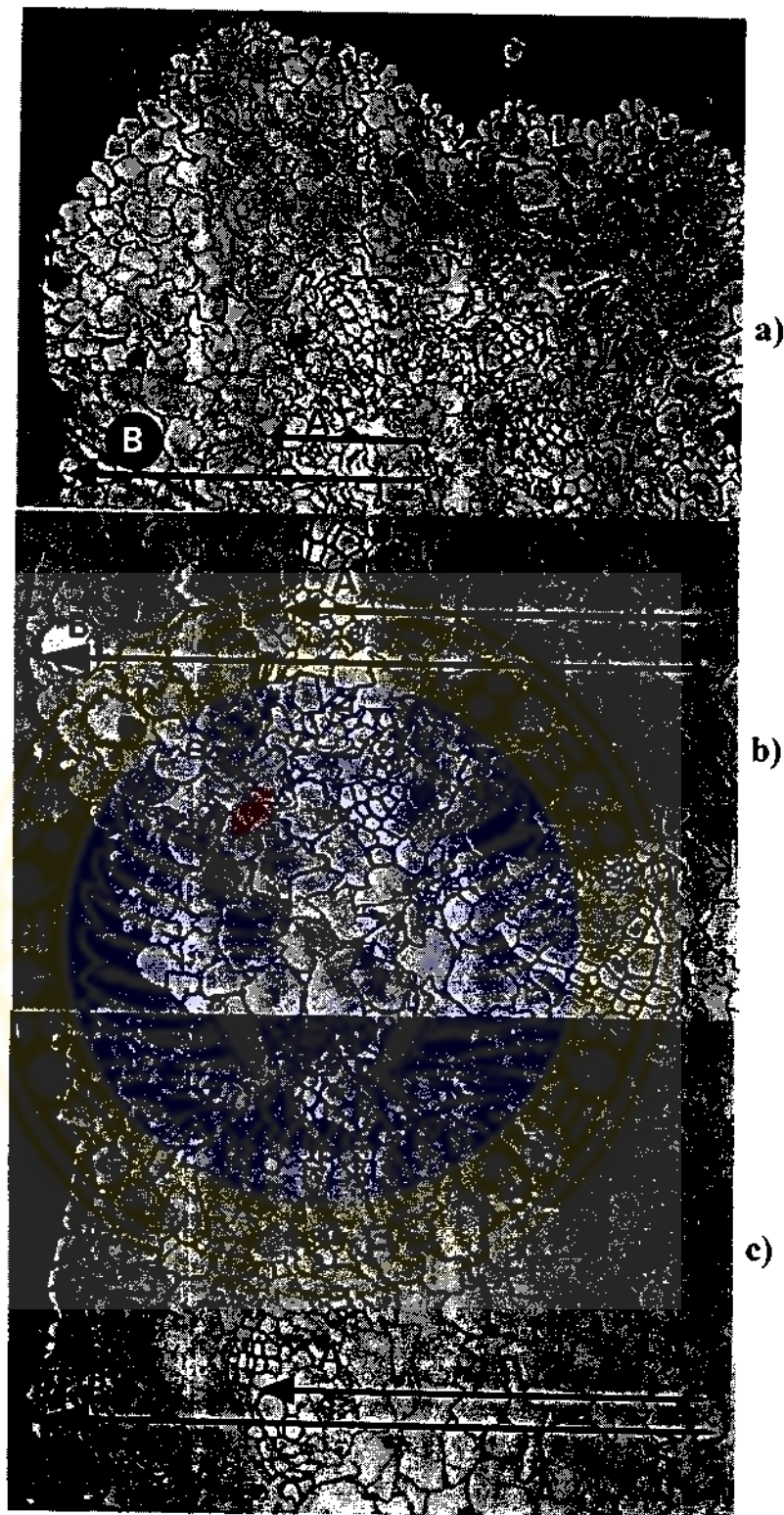
(B) Irisan dinding sel kultur pada media dengan Cu (a) 0 ppm, (b) 0,006 ppm, (c) 1,25 ppm, (d) 5 ppm, (e) 10 ppm dan (f) 20 ppm (Pembesaran 20.000 x , TEM-JEM - 1900S). W=lebar dinding sel.



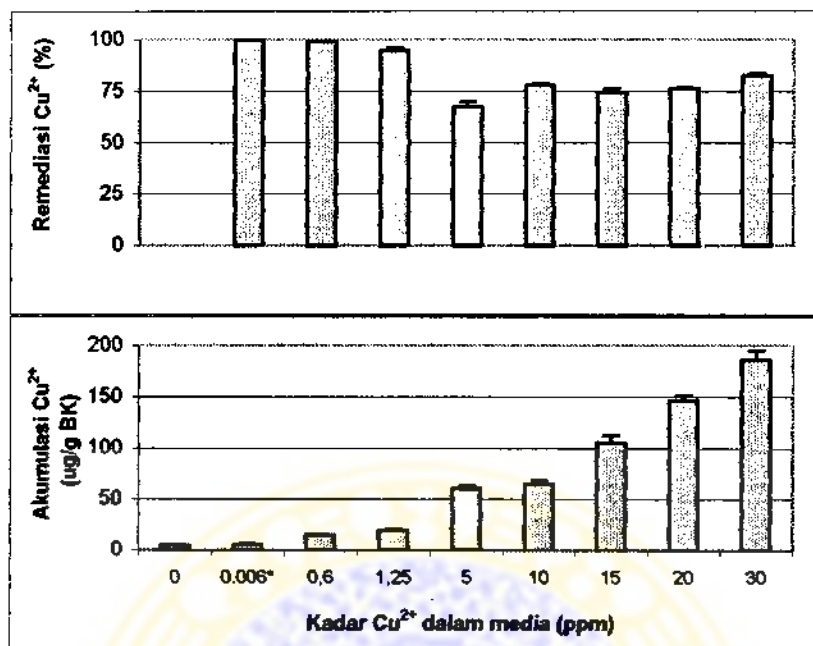
Gambar 5.14 Irisan melintang batang kultur pucuk *Solanum mammosum*. (pembesaran 50 kali), pada berbagai konsentrasi Cu^{2+} 0,006 ppm (1), 10 ppm (2), 20 ppm (3) dan 40 ppm (4). a. epidermis b. jaringan pembuluh c. empulur



Gambar 5.15 Irisan melintang batang kultur pucuk *Solanum laciniatum* pada berbagai konsentrasi Cd^{2+} . Pembesaran 50 kali. Perlakuan: (1) Cd^{2+} 0 ppm, dan (2) Cd^{2+} 20 ppm; a. epidermis, b. jaringan pembuluh c. empulur.

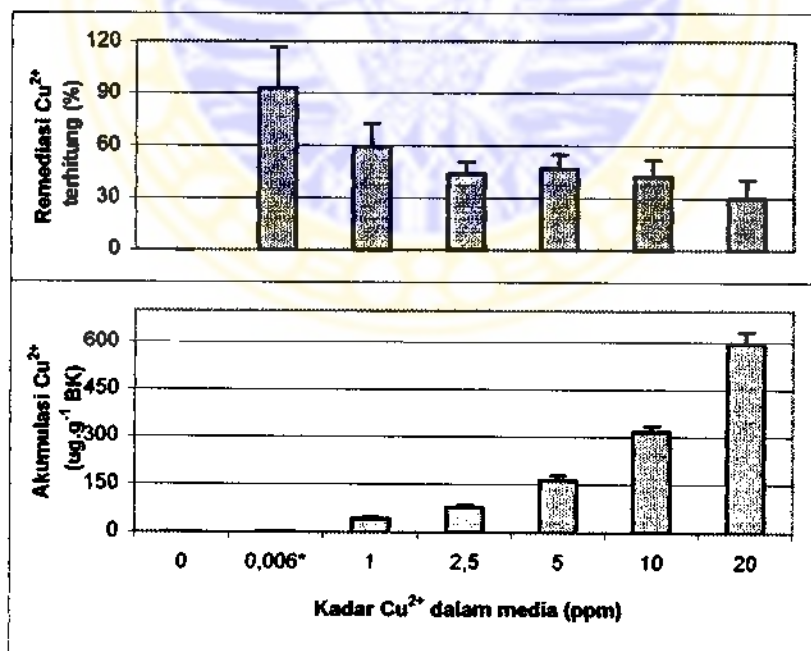


Gambar 5.16 Irisan melintang batang kultur pucuk *Solanum laciniatum* (X100), Yang dikultivasi dalam media yang mengandung Sr²⁺ 0 ppm (a), 50 ppm (b) dan 100 ppm (c). Rasio A/B besarnya $0,49 \pm 0,04$ (a), $0,73 \pm 0,03$ (b) dan $0,73 \pm 0,03$ (c); n=14. hasil dinyatakan dalam: rata-rata \pm SD.



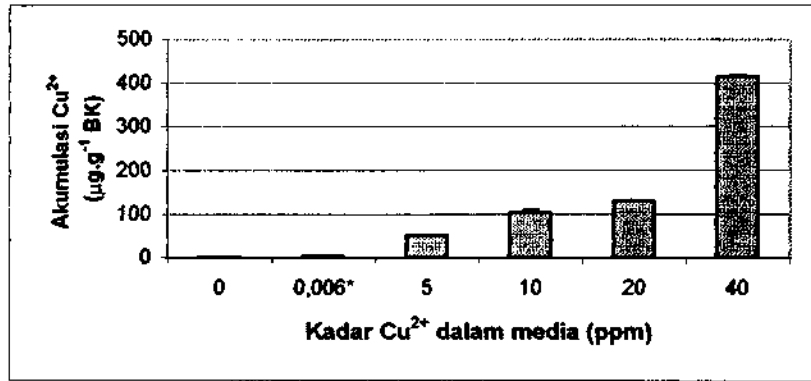
^ hiperakumulasi

Gambar 5.17 Histogram remediasi dan akumulasi Cu²⁺ kultur suspensi sel *A. amaniensis* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cu²⁺. *Kadar orisinal Cu²⁺ dalam medium MS. Terjadi hiperakumulasi pada media dengan Cu²⁺ ≥ 15 ppm



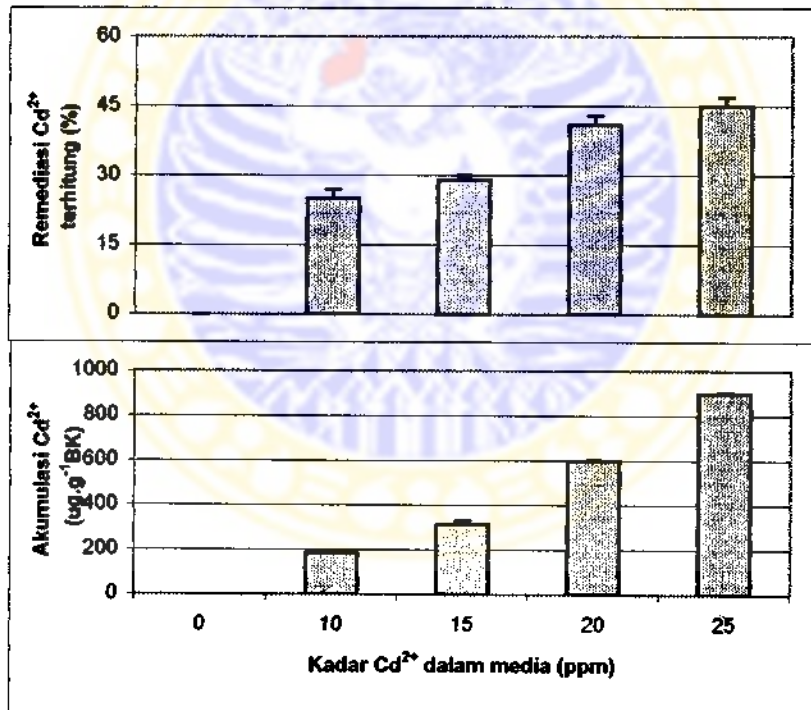
^ hiperakumulasi

Gambar 5.18 Histogram remediasi dan akumulasi Cu²⁺ kultur kalus *Costus speciosus* umur 3 minggu pada berbagai konsentrasi Cu²⁺. *Kadar orisinal Cu²⁺ dalam medium MS. Terjadi hiperakumulasi pada media dengan Cu²⁺ ≥ 5 ppm



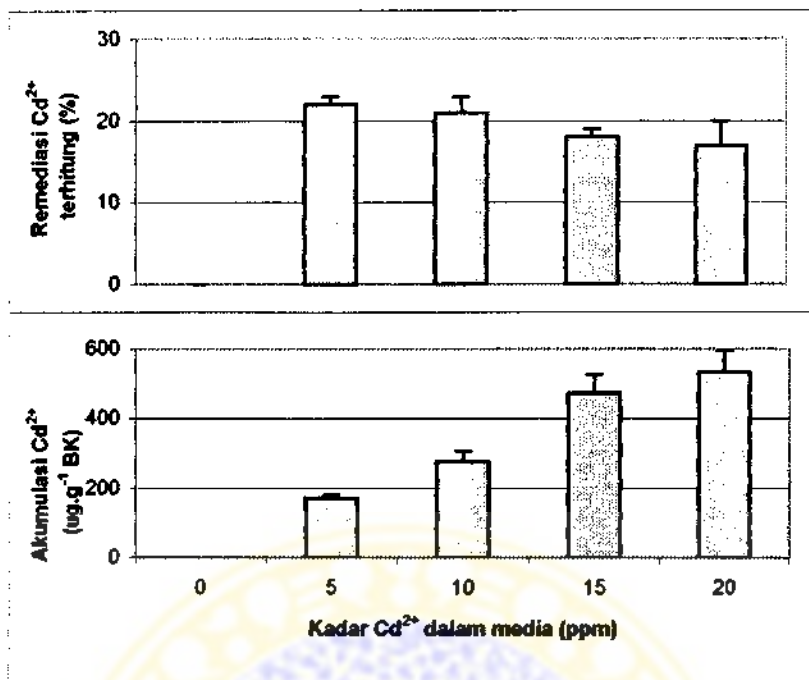
^ hiperakumulasi

Gambar 5.19 Histogram akumulasi Cu²⁺ kultur pucuk *Solanum mammosum* umur 3 minggu pada berbagai konsentrasi Cu²⁺. *Kadar orisinal Cu²⁺ dalam medium MS. Terjadi hiperakumulasi pada media dengan Cu²⁺ ≥10 ppm



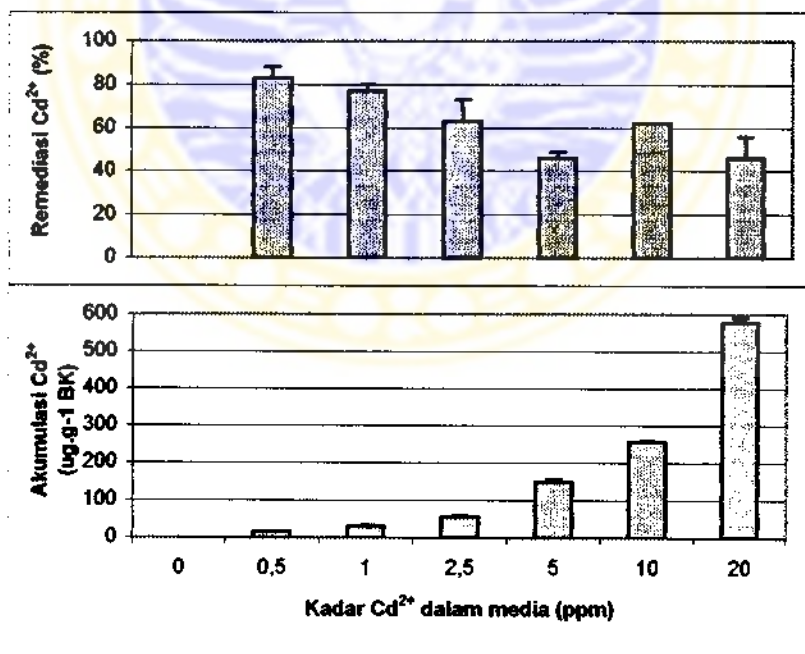
^ hiperakumulasi

Gambar 5.20 Histogram remediasi dan akumulasi Cd²⁺ kultur suspensi sel *A. amaniensis* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cd²⁺. Terjadi hiperakumulasi pada media dengan Cd²⁺ ≥10 ppm



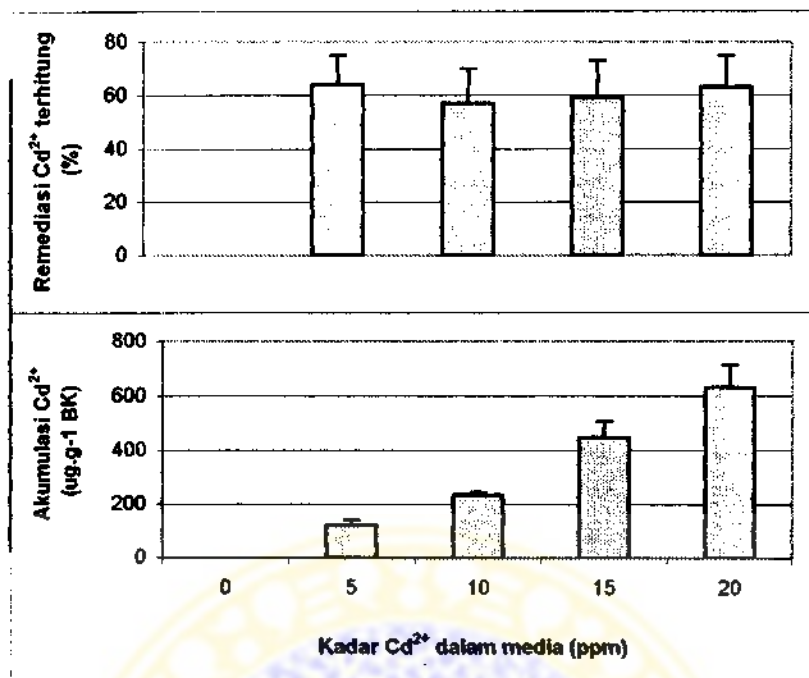
^ hiperakumulasi

Gambar 5.21 Histogram remediasi dan akumulasi Cd²⁺ kultur suspensi *Costus speciosus* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cd²⁺. Terjadi hiperakumulasi pada media dengan Cd²⁺ ≥ 5 ppm



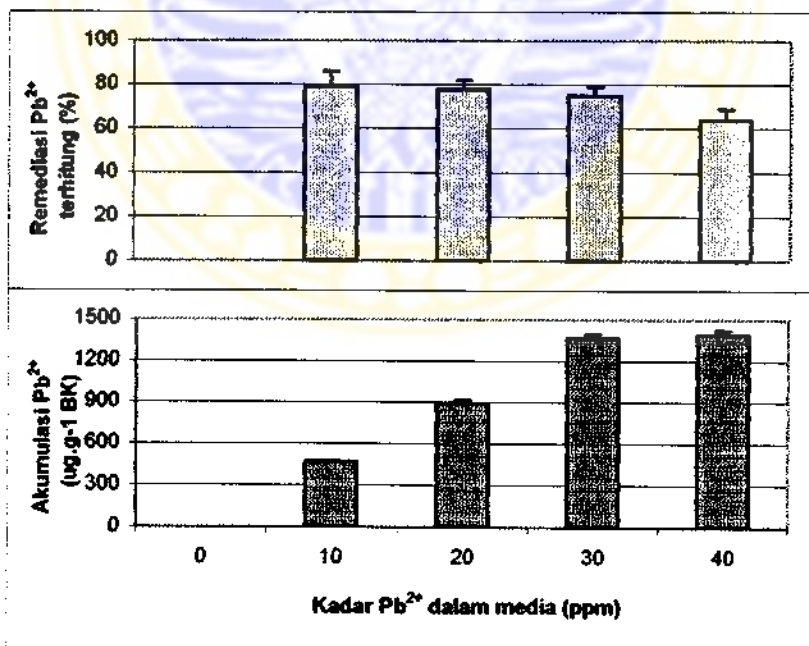
^ hiperakumulasi

Gambar 5.22 Histogram remediasi dan akumulasi Cd²⁺ kultur kalus *Costus speciosus* umur 3 minggu pada berbagai konsentrasi Cd²⁺. Terjadi hiperakumulasi pada media dengan Cd²⁺ ≥ 5 ppm



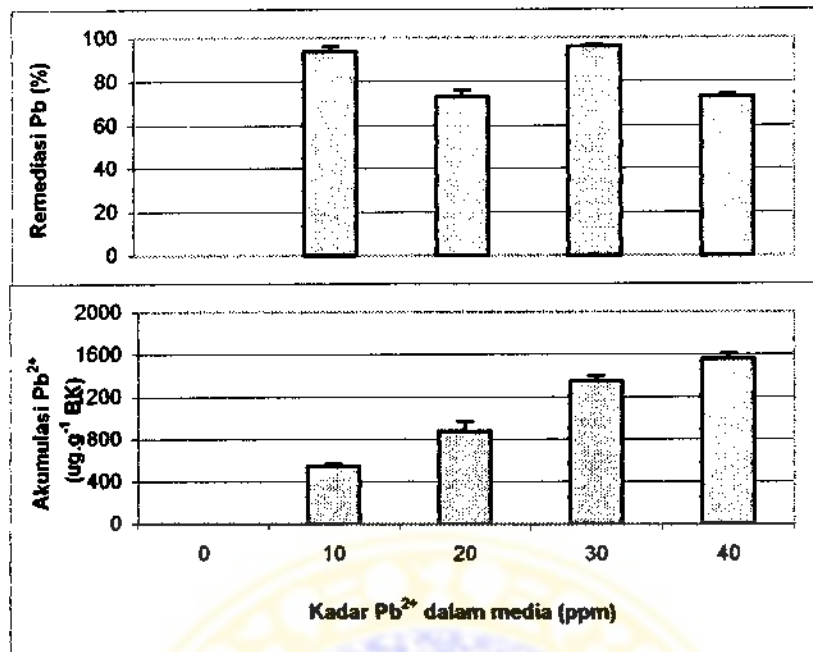
^ hiperakumulasi

Gambar 5.23 Histogram remediasi dan akumulasi Cd²⁺ kultur pucuk *Solanum laciniatum* umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi Cd²⁺. Terjadi hiperakumulasi pada media dengan Cd²⁺ ≥ 5 ppm



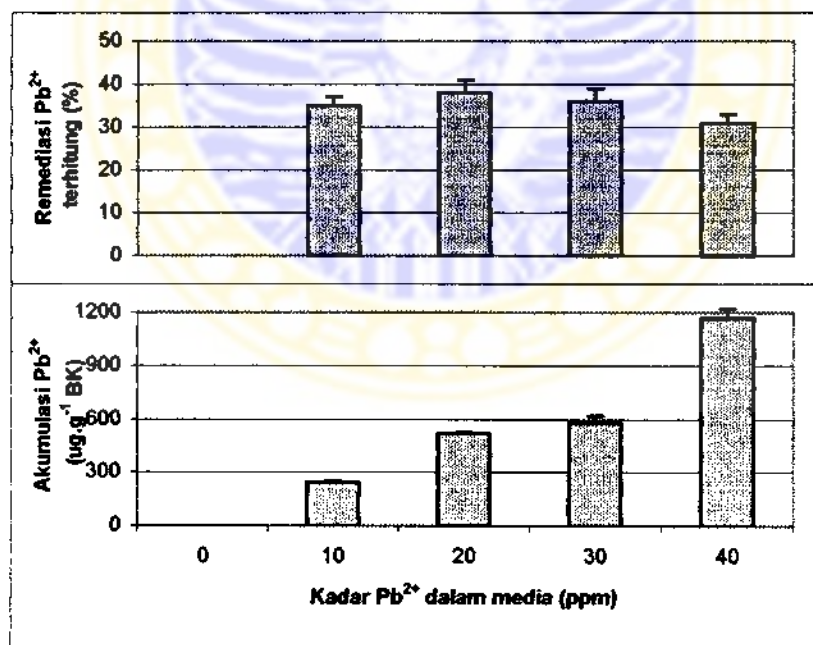
^ hiperakumulasi

Gambar 5.24 Histogram remediasi dan akumulasi Pb²⁺ kultur suspensi sel *A. amaniensis* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Pb²⁺. Terjadi hiperakumulasi pada media dengan Pb²⁺ ≥ 20 ppm



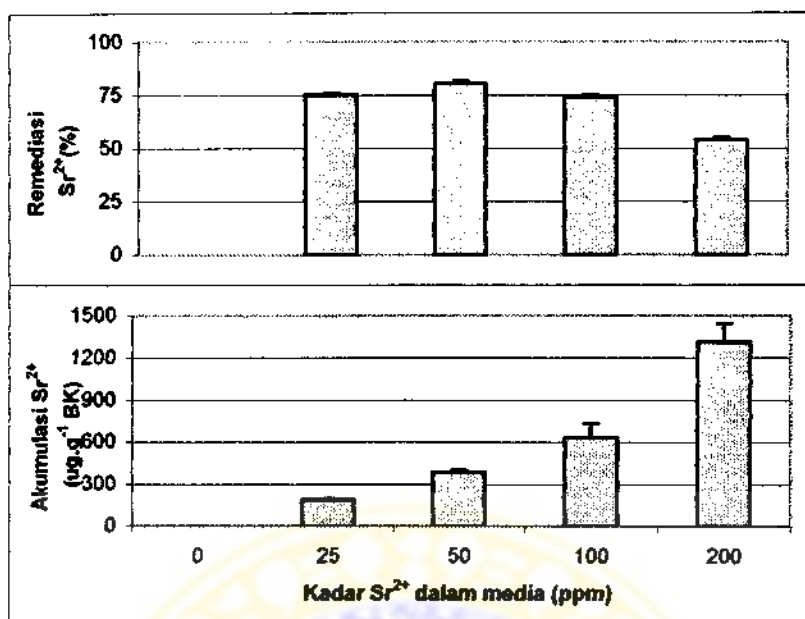
^ hiperakumulasi

Gambar 5.25 Histogram remediasi dan akumulasi Pb²⁺ kultur suspensi sel *A. amaniensis* umur 14 hari pada berbagai konsentrasi Pb²⁺. Terjadi hiperakumulasi pada media dengan Pb²⁺ ≥ 10 ppm



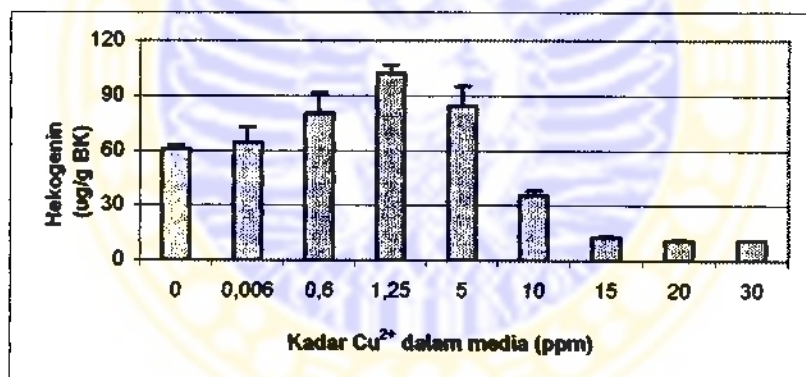
^ hiperakumulasi

Gambar 5.26 Histogram remediasi dan akumulasi Pb²⁺ kultur suspensi *Costus speciosus* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Pb²⁺. Terjadi hiperakumulasi pada media dengan Pb²⁺ ≥ 20 ppm

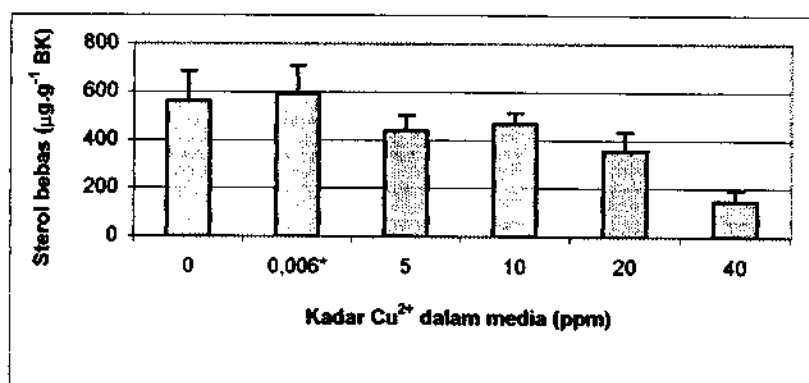


^ hiperakumulasi

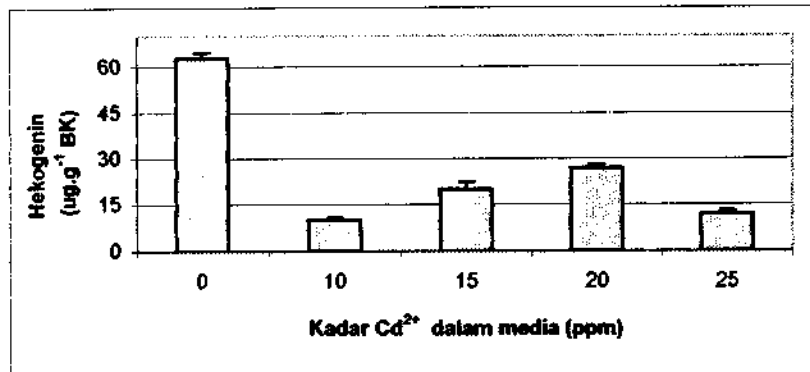
Gambar 5.27 Histogram remediasi dan akumulasi Sr²⁺ kultur pucuk *Solanum laciniatum* umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi Sr²⁺. Terjadi hiperakumulasi pada media dengan Sr²⁺ ≥ 200 ppm



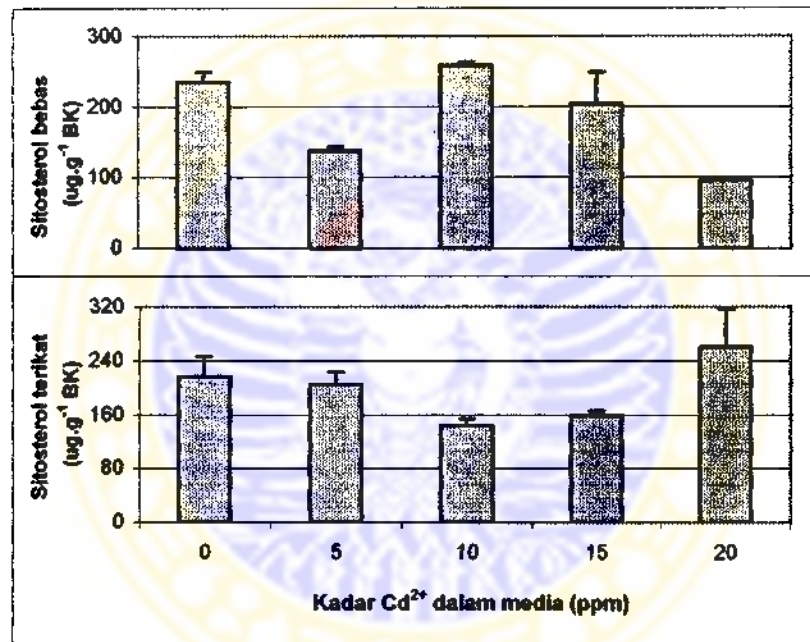
Gambar 5.28 Histogram kandungan hekogenin kultur suspensi sel *A. amaniensis* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cu²⁺. *Kadar orisinal Cu²⁺ dalam medium MS.



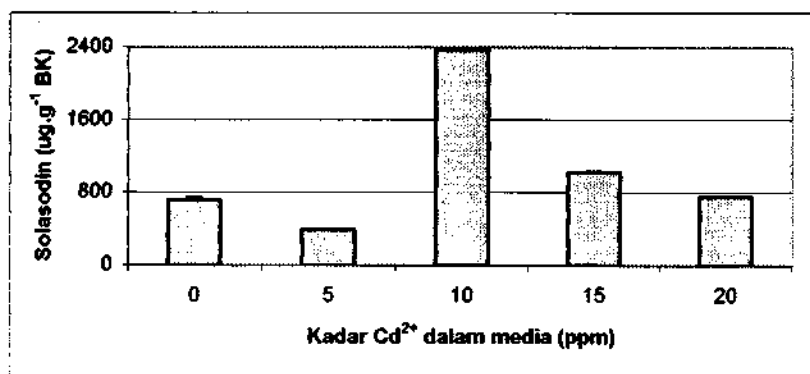
Gambar 5.29 Histogram kandungan sterol bebas kultur pucuk *S. mammosum* umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi Cu²⁺. *Kadar orisinal Cu²⁺ dalam medium MS.



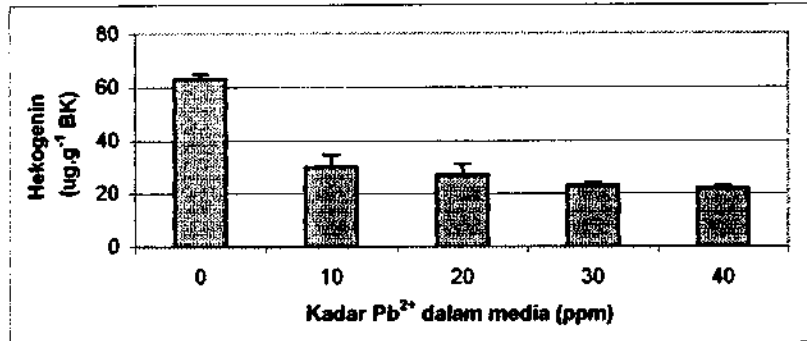
Gambar 5.30 Histogram kandungan hekogenin kultur suspensi sel *A. amaniensis* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cd^{2+} .



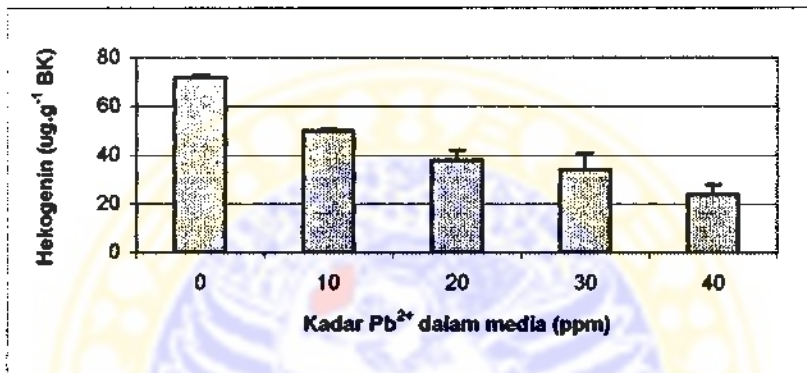
Gambar 5.31 Histogram kandungan sitosterol kultur suspensi sel *C. speciosus* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cd^{2+} .



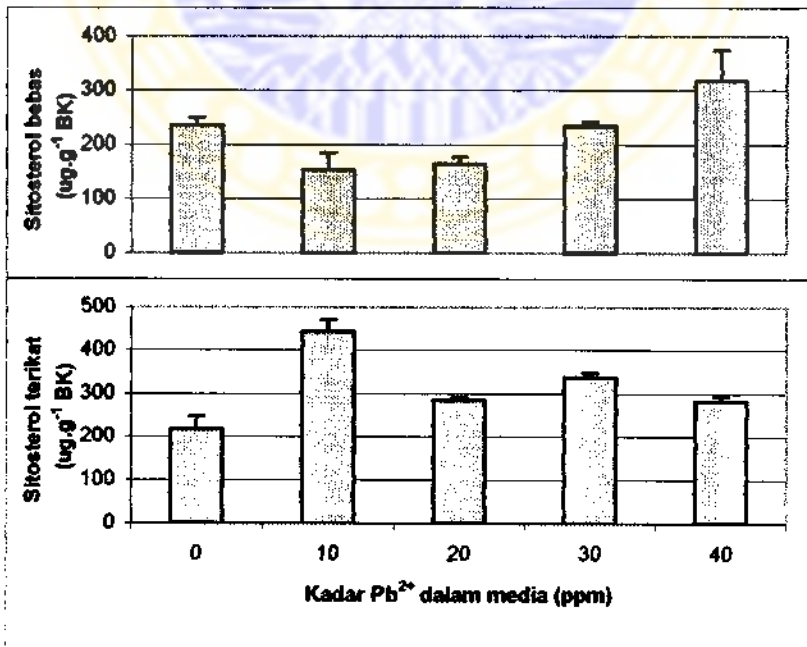
Gambar 5.32 Histogram kandungan solasodin kultur pucuk *Solanum laciniatum* umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi Cd^{2+} .



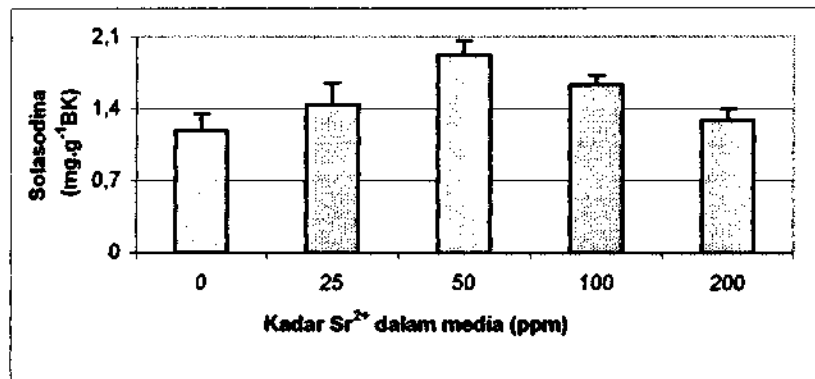
Gambar 5.33 Histogram kandungan hekogenin kultur suspensi sel *A. amaniensis* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Pb^{2+} .



Gambar 5.34 Histogram kandungan hekogenin kultur suspensi sel *A. amaniensis* umur 14 hari pada berbagai konsentrasi Pb^{2+} .



Gambar 5.35 Histogram kandungan sitosterol kultur suspensi sel *C. speciosus* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Pb^{2+} .



Gambar 5.36 Histogram kandungan solasodin kultur pucuk *Solanum laciniatum* umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi Sr^{2+} .



BAB 6

PEMBAHASAN

Adanya berbagai kadar Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} di dalam media, diduga berpengaruh terhadap KJT, mempengaruhi pertumbuhan dan morfologis histologis KJT, terjadi remediasi dan akumulasi Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} dan berpengaruh terhadap pembentukan metabolit KJT. Sesuai dengan tahapan penelitian, dilakukan pembahasan berurutan mulai dari pengaruh pertumbuhan dan morfologis-histologis KJT, akumulasi dan remediasi Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} , hingga pengaruh terhadap kandungan metabolit KJT.

6.1 Pengaruh Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} terhadap pertumbuhan dan morfologis histologis KJT

Pengaruh Cu^{2+} terhadap pertumbuhan

Kultur jaringan tanaman atau kultur *in vitro* dinyatakan tahan terhadap ion logam dan mampu hidup apabila menunjukkan $\text{IP} > 1$. Kultur suspensi sel *A. amaniensis* tahan terhadap Cu^{2+} hingga 15 ppm. Adanya Cu^{2+} 15 ppm menyebabkan penurunan IP dan PCV 61 dan 53 % dibanding kultur suspensi yang tumbuh di dalam media dengan kadar orisinal Cu^{2+} dalam media MS sebagai media kontrol (lihat tabel 5.1 hlm 48 dan gambar 5.1 hlm 61). Kultur kalus *Costus speciosus* (F8) tahan terhadap Cu^{2+} hingga 20 ppm, dengan IP rata-rata 3,7 (lihat tabel 5.4 hlm 51 dan gambar 5.2 hlm 61), bahkan pada media dengan Cu^{2+} 1 dan 2,5 ppm terjadi peningkatan relatif kecil indeks pertumbuhannya menjadi 112% dibanding pada media kontrol. Untuk kultur suspensi sel *S. mammosum* tahan

terhadap Cu^{2+} hingga 20 ppm dan kultur pucuknya tahan hingga Cu^{2+} 40 ppm, dengan demikian kultur pucuk lebih toleran dibanding kultur kalusnya (lihat tabel 5.5 hlm 52 dan gambar 5.3 dan 5.4 hlm 62). Berbagai konsentrasi Cu^{2+} ternyata berpengaruh secara nyata ($\alpha = 0,05$) terhadap IP rata-rata; berdasarkan analisis regresi menggunakan SPSS 10.0 for Windows, diperoleh persamaan regresi kubik, pada kultur suspensi *A. amaniensis* : $\text{IP} = 2,29 + 0,02 (\text{Cu}^{2+}) - 0,01 (\text{Cu}^{2+})^2 + 0,03 \cdot 10^{-2} (\text{Cu}^{2+})^3$ dengan $r^2 = 0,814$ dan $F_{\text{signif}} = 0,0000$; dan pada kultur kalus *C. speciosus*: $\text{IP} = 5,81 + 0,31 (\text{Cu}^{2+}) - 0,05 (\text{Cu}^{2+})^2 + 0,02 \cdot 10^{-1} (\text{Cu}^{2+})^3$ dengan $r^2 = 0,966$ dan $F_{\text{signif}} = 0,0105$. Untuk kultur pucuk *S. mammosum* : $\text{IP} = 3,72 + 0,03 (\text{Cu}^{2+}) - 0,01 (\text{Cu}^{2+})^2 + 0,06 \cdot 10^{-3} (\text{Cu}^{2+})^3$ dengan $r^2 = 0,953$ dan $F_{\text{signif}} = 0,0000$.

Kultur *A. amaniensis*, *C. speciosus* dan *S. mammosum* tersebut menunjukkan sifat yang lebih toleran dibanding kultur kalus *Nicotiana tabacum* yang resistan terhadap Cu^{2+} hingga 100 μM (= 6,4 ppm) yang dilaporkan Gori *et al.* (1998); bahkan kultur kalus *C. speciosus* dan pucuk *S. mammosum* lebih toleran dibanding kultur kalus *Acer pseudoplatanus* yang tidak tahan terhadap $\text{Cu}^{2+} \geq 20$ ppm (Turner dan Dickinson, 1993). Pada kadar ini juga toksis terhadap kultur suspensi sel *A. amaniensis*. Kultur pucuk *S. mammosum* (IP = 4,8 pada Cu^{2+} 20 ppm; IP=2,3 pada Cu^{2+} 40 ppm) lebih toleran dibanding kultur kalusnya (IP=2,2 pada Cu^{2+} 20 ppm), kultur kalus *C. speciosus* (IP=3,7 pada Cu^{2+} 20 ppm) maupun kultur suspensi *A. amaniensis* (IP = 1,2 pada Cu^{2+} 15 ppm).

Pengaruh ion logam terhadap pertumbuhan terkait dengan morfologis-histologis KJT. Kultur *A. amaniensis* mampu tumbuh dengan $\text{IP} > 1$, dalam media yang mengandung berbagai kadar Cu^{2+} hingga mencapai 15 ppm, nampak adanya gambaran permukaan sel yang lebih berkerut dan dinding sel yang

menebal; demikian pula kultur *S. mammosum* yang tahan Cu^{2+} hingga 40 ppm nampak adanya penebalan pada sistem pembuluhnya. Hal ini kemungkinan karena adanya mekanisme toleransi pengikatan ion logam pada permukaan dinding sel kultur. Uraian yang terkait dengan dinding sel ini diuraikan lebih rinci dalam pembahasan yang terkait dengan morfologis-histologis. Menurut Krämer *et al* 2000, pada tanaman jenis *Thlaspi* yang bersifat hiperakumulator terhadap Ni^{2+} terkait dengan adanya ikatan Ni-komponen dinding sel; serta fenomena terjadinya penebalan dinding sekunder elemen xylem tanaman tembakau yang toleran terhadap Cu^{2+} (Gori *et al.*, 1998). Apakah hal ini merupakan fenomena respon akibat adanya stress terhadap ion Cu^{2+} , dan dapat terjadi pada sel-sel tanaman yang lain, masih diperlukan pembuktian lebih lanjut.

Pengaruh Cd^{2+} terhadap pertumbuhan

Kultur suspensi *A. amaniensis*, kultur suspensi dan kalus *C. speciosus* maupun kultur pucuk *Solanum laciniatum* mampu tumbuh dan tahan terhadap Cd^{2+} hingga 20 ppm (periksa tabel 5.5 s.d. 5.8 hlm 52-55 dan gambar 5.5 s.d. 5.8 hlm 63-64), bahkan *A. amaniensis* tahan terhadap Cd^{2+} sampai 25 ppm. Pada kadar yang sama (Cd^{2+} 20 ppm), kultur pucuk *S. laciniatum* menunjukkan $\text{IP}=2,8$; kultur suspensi *A. amaniensis* dengan $\text{IP}=2,3$; kultur kalus *C. speciosus* dengan $\text{IP} = 1,4$ dan kultur suspensi *C. speciosus* dengan $\text{IP}=1,1$. Hal ini menunjukkan bahwa kultur suspensi *A. amaniensis* lebih tahan Cd^{2+} dibanding kultur suspensi *C. speciosus*. Kultur kalus *C. speciosus* lebih tahan Cd^{2+} dibanding kultur suspensinya. Semua kultur tersebut lebih toleran terhadap Cd^{2+}

dibandingkan dengan kultur pucuk *Bacopa moniera* (dengan Cd^{2+} 5,6 ppm) seperti yang telah dilaporkan Ali *et al.* (1998).

Adanya peningkatan konsentrasi Cd^{2+} di dalam media KJT, menyebabkan penurunan IP semua kultur yang diteliti. Berbagai konsentrasi Cd^{2+} berpengaruh secara nyata ($\alpha = 0,05$) terhadap IP rata-rata; berdasarkan analisis regresi menggunakan SPSS 10.0 for Windows, diperoleh persamaan regresi kubik, pada kultur suspensi *A. amaniensis* : $\text{IP} = 2,69 - 0,13 (\text{Cd}^{2+}) + 0,01 (\text{Cd}^{2+})^2 - 0,15 \cdot 10^{-3} (\text{Cd}^{2+})^3$ dengan $r^2 = 0,957$ dan $F_{\text{signif}} = 0,0000$; pada kultur suspensi *C. speciosus*: $\text{IP} = 1,97 - 0,12 (\text{Cd}^{2+}) + 0,01 (\text{Cd}^{2+})^2 - 0,2 \cdot 10^{-3} (\text{Cd}^{2+})^3$ dengan $r^2 = 0,793$ dan $F_{\text{signif}} = 0,0000$; pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* : $\text{IP} = 4,55 + 0,04 (\text{Cd}^{2+}) - 0,02 (\text{Cd}^{2+})^2 + 0,8 \cdot 10^{-3} (\text{Cd}^{2+})^3$ dengan $r^2 = 0,998$ dan $F_{\text{signif}} = 0,0802$. Pada kultur suspensi *A. amaniensis*, terjadi penurunan IP menjadi 78% dan penurunan PCV menjadi 55% pada konsentrasi Cd^{2+} 25 ppm. Pada kultur suspensi *C. speciosus*, terjadi penurunan IP menjadi 70% dan penurunan PCV menjadi 71% pada konsentrasi Cd^{2+} 20 ppm; sedangkan pada kultur kalus *C. speciosus*, terjadi penurunan IP menjadi 22% pada konsentrasi Cd^{2+} 20 ppm. Untuk kultur pucuk *Solanum laciniatum*, terjadi penurunan IP menjadi 62% pada konsentrasi Cd^{2+} 20 ppm.

Pengaruh Pb^{2+} terhadap pertumbuhan

Kultur suspensi *A. amaniensis* mampu tumbuh ($\text{IP} \geq 1,8$) dan tahan terhadap Pb^{2+} hingga 40 ppm (periksa tabel 5.10 dan 5.11 hlm 57-58, serta gambar 5.9-5.10 hlm 64-65); kultur suspensi *C. speciosus* juga tahan terhadap Pb^{2+} hingga 40 ppm (periksa tabel 5.12 hlm 59 dan gambar 5.11 hlm 65).

Berbagai konsentrasi Pb^{2+} berpengaruh secara nyata ($\alpha = 0,05$) terhadap IP rata-rata; berdasarkan analisis regresi menggunakan SPSS 10.0 for Windows, diperoleh persamaan regresi kubik, pada kultur suspensi *A. amaniensis*: $IP = 2,69 - 0,03 (Pb^{2+}) - 0,6 \cdot 10^{-3} (Pb^{2+})^2 + 0,25 \cdot 10^{-6} (Pb^{2+})^3$ dengan $r^2 = 0,778$ dan $F_{signif} = 0,0000$; pada kultur suspensi *C. speciosus*: $IP = 2,06 - 0,09 (Pb^{2+}) + 0,01 (Pb^{2+})^2 - 0,2 \cdot 10^{-3} (Pb^{2+})^3$ dengan $r^2 = 0,759$ dan $F_{signif} = 0,0000$. Pb^{2+} 10 hingga 30 ppm meningkatkan IP kultur suspensi *C. speciosus* hingga 1,8 kali dibandingkan kultur yang dikultivasi di dalam medium orisinal MS yang dimodifikasi. Hal ini berbeda dan tidak terjadi pada kultur *A. amaniensis*. Demikian pula nampak nyata peningkatan PCV pada kultur suspensi *C. speciosus* dan peningkatan terbesar pada konsentrasi Pb^{2+} 30 ppm, yaitu menjadi 2,2 kali lebih besar dibanding tanpa Pb^{2+} . Pengaruh Pb^{2+} yang dapat meningkatkan IP tersebut perlu dikaji pada kultur yang lain. Kemampuan kultur yang diteliti untuk tahan hidup terhadap kadar Pb^{2+} hingga 40 ppm, jauh lebih besar daripada yang diteliti pada kultur suspensi sel *Silene vulgaris* hingga kadar Pb^{2+} 20 ppm (Leopold *et al.*, 1999).

Pengaruh Sr^{2+} terhadap pertumbuhan

Kultur pucuk *Solanum laciniatum* (SL-7) mampu tumbuh dengan baik (semua IP > 2,8) di dalam media yang mengandung Sr^{2+} 25 – 200 ppm (periksa tabel 5.13 hlm 60 dan gambar 5.12 hlm 66). Berbagai konsentrasi Sr^{2+} berpengaruh secara nyata terhadap IP (pada $\alpha = 0,05$); berdasarkan analisis regresi menggunakan SPSS 10.0 for Windows, diperoleh persamaan regresi kubik, pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*: $IP = 2,85 + 0,03 (Sr^{2+}) - 0,4 \cdot 10^{-3} (Sr^{2+})^2 + 1,44 \cdot 10^{-6} (Sr^{2+})^3$ dengan $r^2 = 0,954$ dan $F_{signif} = 0,271$. Pada konsentrasi Sr^{2+} 25

dan 50 ppm, terjadi peningkatan IP 1,2 kali dibanding kultur yang ditumbuhkan di dalam media tanpa Sr^{2+} . Kultur pucuk *S. laciniatum* ini tahan terhadap Sr^{2+} hingga 200 ppm, seperti halnya kultur kalus *A. amaniensis* dan kultur pucuk *C. speciosus* yang pernah diteliti Indrayanto *et al.* (1993 dan 1999).

Pengaruh Cu^{2+} terhadap morfologis-histologis KJT

Berdasarkan pengamatan makroskopis terhadap kultur suspensi *A. amaniensis* setelah 7 hari perlakuan, menunjukkan bahwa pada perlakuan Cu^{2+} 0-10 ppm, semua kultur suspensi berwarna putih agak kekuningan; sedangkan untuk perlakuan 15 ppm warnanya agak kuning kecoklatan dan untuk 20 ppm ke atas warnanya agak kecoklatan. Sedangkan untuk kultur kalus *Costus speciosus* umur 3 minggu, baik pada media kontrol maupun perlakuan tanpa dan dengan Cu^{2+} hingga 10 ppm, semua tumbuh dan warnanya putih. Sedangkan pada media Cu^{2+} 20 ppm nampak jumlah kalusnya paling sedikit (sesuai hasil IP menurun menjadi 65 % dibanding kontrol) dan warnanya agak kecoklatan. Secara mikroskopis masih sulit terdeteksi adanya perbedaan gambaran sel-selnya. Namun demikian pada pewarnaan Giemsa pada kultur suspensi sel *A. amaniensis* menunjukkan bahwa perlakuan Cu^{2+} di atas kadar orisinalnya kurang kuat menyerap warna; sel-sel pembanding/kontrol lebih berwarna biru gelap.

Berdasarkan pengamatan menggunakan SEM dan TEM sel-sel *A. amaniensis* dari kultur suspensi menunjukkan bahwa dinding selnya lebih nampak berkerut dan lebih tebal dari pada kontrol. Ketebalan dinding sel *A. amaniensis* rata-rata $0,13 \pm 0,03$ sampai $0,50 \pm 0,09$ μm berbeda secara bermakna dibanding kultur kontrol rata-rata $0,10 \pm 0,04$ μm ($F_{\text{calculated}} = 44,92$, $p = 0,000$, $n = 10$).

Dinding sel primer diketahui mengandung mikrofibril yang terdiri atas untaian selulosa, membentuk matriks bersama hemiselulosa dan senyawa pectin, dan mengandung glikoprotein yang kaya dengan hidroksi prolin (yang disebut ekstensin), maupun protein dinding sel lainnya yang kaya prolin, glisina atau threonina. Demikian pula dinding sel sekunder, seperti dinding sel primer, mengandung zat-zat tersebut ditambah komponen lignin. Di bawah dinding sel ada membran sel yang mengandung fosfolipida dan protein (Hopkins, 1999). Adanya matriks dan senyawa pada dinding sel maupun membran sel tersebut kemungkinan terjadi adsorpsi ion-ion logam diikat menjadi senyawa kompleks atau khelat yang terjebak dalam matriks dinding sel, sehingga nampak adanya penebalan dinding sel dengan permukaan yang lebih berkerut pada penelitian ini. Hal ini diperkuat dengan apa yang terjadi pada permukaan akar *Brassica juncea* yang mampu mengadsorpsi Cd^{2+} , Pb^{2+} , Sr^{2+} , dan Ni^{2+} (Meagher, 2000).

Untuk kultur pucuk *S. mammosum* menunjukkan bahwa tanpa Cu^{2+} terjadi pemucatan warna daun bahkan agak menguning dan pada pemberian Cu^{2+} 40 ppm warnanya agak kehitaman dibanding pada kadar orisinal Cu^{2+} dalam medium MS sebagai kontrol. Hal ini kemungkinan disebabkan karena peran Cu^{2+} antara lain diperlukan dalam proses fotosintesis dan terkait dengan kegiatan kloroplast. Adanya Cu^{2+} berlebih, dapat menghambat pertumbuhan dan meningkatkan kandungan pigmen (Macksymiec, 1997). Berdasarkan pengamatan morfologis-histologis, gambaran mikroskopis irisan penampang melintang batang kultur pucuk *S. mammosum* (lihat gambar 5.14 hlm 69), nampak adanya penebalan pada sistem pembuluhnya, tetapi tidak terjadi pelebaran silinder pusatnya.

Pengaruh Cd²⁺ terhadap morfologis-histologis KJT

Berdasarkan pengamatan makroskopis terhadap kultur suspensi *A. amaniensis* serta kultur suspensi dan kalus *Costus speciosus*, baik pada media kontrol tanpa Cd²⁺ maupun dengan Cd²⁺ hingga 10 ppm, nampak tumbuh dan warnanya putih kekuningan. Sedangkan pada media Cd²⁺ 15 ppm ke atas tampak warnanya menjadi kuning kecoklatan. Di dalam studi histokimiawi menggunakan pereaksi asam nitrat dan natrium sulfida, Cd²⁺ tidak terdeteksi di dalam bagian sel-sel kultur suspensi. Peneliti lain menjelaskan adanya kemampuan detoksifikasi ataupun toleransi terhadap ion logam, yaitu pemberian Cu²⁺ dan Cd²⁺ pada kultur suspensi sel dan tanaman utuh *Silene vulgaris* dan tomat, menginduksi terbentuknya kompleks Cu²⁺ dan Cd²⁺- fitokhelatin. Senyawa kompleks tersebut berperan dalam detoksifikasi logam berat (Leopold *et al.*, 1999). Kemampuan kultur kami untuk membentuk kompleks fitokhelatin masih memerlukan penelitian lebih lanjut.

Sistem pembuluh dari *S. laciniatum* yang tumbuh di dalam media yang mengandung Cd²⁺ nampak lebih berkembang daripada yang tumbuh di dalam media tanpa Cd²⁺. Rasio lebar antara sistem pembuluh dan titik pusat empulur terhadap epidermis dari batang *S. laciniatum* yang mendapat perlakuan Cd²⁺ 20 ppm, besarnya 1,3-1,4 kali dibanding kultur pucuk yang tumbuh tanpa Cd²⁺. Kultur ini toleran, mampu tumbuh dalam media dengan kadar Cd²⁺ hingga 20 ppm dengan IP = 2,8 dengan mekanisme pelebaran sistem pembuluh, seperti yang pernah dilaporkan oleh Gori *et al.* (1998), pada tanaman tembakau yang toleran terhadap Cu²⁺.

Pengaruh Pb²⁺ terhadap morfologis-histologis KJT

Berdasarkan pengamatan makroskopis terhadap kultur suspensi *A. amaniensis* serta kultur suspensi dan kalus *Costus speciosus*, semua menunjukkan adanya pertumbuhan, baik pada media kontrol (tanpa Pb²⁺) maupun dengan perlakuan Pb²⁺ hingga 40 ppm, dan semua warnanya putih kekuningan. Di dalam studi histokimiawi menggunakan pereaksi asam nitrat dan natrium sulfida, Pb²⁺ tidak terdeteksi di dalam bagian sel-sel kultur suspensi tersebut.

Pengaruh Sr²⁺ terhadap morfologis-histologis KJT

Sistem pembuluh dari *S. laciniatum* yang tumbuh di dalam media yang mengandung Sr²⁺ nampak lebih berkembang daripada yang tumbuh di dalam media tanpa Sr²⁺. Adanya sistem pembuluh tanaman yang lebih berkembang, juga pernah dilaporkan oleh Gori *et al.* (1998), pada tanaman tembakau yang toleran terhadap Cu²⁺. Rasio lebar antara sistem pembuluh dan titik pusat empulur terhadap epidermis dari batang *S. laciniatum* yang mendapat perlakuan Sr²⁺ 50 dan 100 mg.l⁻¹ adalah 0,68 ± 0,04 dan 0,73 ± 0,03 (rata-rata ± SD, n = 14). Rasio ini sebesar 1,4 dan 1,5 kali lebih besar dibanding kultur pucuk yang tumbuh tanpa Sr²⁺ (0,49 ± 0,04)

6.2 Remediasi dan akumulasi Cu²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ dan Sr²⁺

Remediasi dan akumulasi Cu²⁺

Kultur suspensi sel *Agave amaniensis* mampu menyerap Cu²⁺ di atas 67 % dari media perlakuan; sedangkan kultur kalus *C. speciosus* mampu menyerap Cu²⁺ > 42 % pada kadar Cu²⁺ ≤ 10 ppm dalam media tumbuhnya. Kemampuan

remediasi kultur suspensi *A. amaniensis* lebih besar dari kultur akar berambut *Armoracia rusticana* (62,4 %) (Zikmundova, 1995). Sesuai dengan studi yang pernah dilakukan peneliti sebelumnya (Zikmundova, 1995), sistem kultur sel tanaman ini dapat digunakan untuk studi bioremediasi ion logam di dalam media tempat tumbuhnya.

Kultur suspensis sel *A. amaniensis* mampu mengakumulasi dan terjadi hiperakumulasi Cu^{2+} ($106 \mu\text{g.g}^{-1}$ BK) dari medium yang mengandung Cu^{2+} 15 ppm; hiperakumulasi Cu^{2+} kultur kalus *C. speciosus* pada Cu^{2+} 5-20 ppm dan hiperakumulasi Cu^{2+} kultur pucuk *S. mammosum* pada Cu^{2+} 10-40 ppm. Kemampuan akumulasinya jauh lebih besar dari kemampuan tanaman polong-polongan dan padi-padian yang hanya mencapai 32 dan $10 \mu\text{g.g}^{-1}$ BK (Filov *et al.* 1993), dan semuanya merupakan hiperakumulator karena kemampuannya mengakumulasi Cu^{2+} lebih besar dari $100 \mu\text{g.g}^{-1}$ BK (Brooks *et al.*, 1998).

Remediasi dan akumulasi Cd^{2+}

Kultur suspensi sel *Agave amaniensis* mampu meremediasi Cd^{2+} 25-45% dari media perlakuan; sedangkan kultur suspensi *C. speciosus* mampu meremediasi Cd^{2+} 17-22% dari media tumbuhnya. Kemampuan remediasi kultur suspensi *A. amaniensis* lebih besar dari kultur suspensi *C. speciosus*. Sedangkan untuk kultur kalus *C. speciosus* dan kultur pucuk *S. laciniatum*, masing-masing mampu meremediasi Cd^{2+} sebesar 46-83% dan 57-63%. Akumulasi Cd^{2+} di dalam biomassa *A. amaniensis* tertinggi mencapai $900 \mu\text{g.g}^{-1}$ BK dari medium yang mengandung Cd^{2+} 25 ppm.; kultur suspensi dan kalus *C. speciosus* serta kultur pucuk *S. lacinitaum* berurutan, akumulasi Cd^{2+} tertingginya mencapai 533,

578 dan 633 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ BK pada media dengan kadar Cd^{2+} sebesar 20 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa kultur tersebut mampu mengakumulasi Cd^{2+} jauh lebih besar daripada tanaman *Helianthus annuus* yang mengakumulasi Cd^{2+} di dalam daunnya 34 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ BK tanpa pemberian EDTA, dan sebesar 115 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ BK adanya penambahan EDTA ke dalam media untuk meningkatkan akumulasi Cd^{2+} (Chen & Cutright 2001). Namun demikian kemampuan akumulasinya masih lebih rendah dari tanaman *Thlaspi caerulescens* yang mampu mengakumulasi Cd^{2+} hingga 3000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ BK (Brooks *et al.* 1998). Kultur *in vitro* *A. amaniensis*, *C. speciosus* dan *S. laciniatum* merupakan hiperakumulator terhadap Cd^{2+} , karena kemampuannya mengakumulasi Cd^{2+} lebih besar dari 100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ BK (Brooks *et al.*, 1998). Sesuai dengan studi yang pernah dilakukan peneliti sebelumnya (Herman, 1995; Zikmundova, 1995), sistem kultur sel tanaman ini dapat digunakan untuk studi bioremediasi ion logam di dalam media tempat tumbuhnya, dan Gori *et al.* (1998) membuktikan bahwa dari kalus yang toleran terhadap ion logam dapat ditumbuhkan menjadi tanaman yang toleran terhadap ion logam.

Remediasi dan akumulasi Pb^{2+}

Kultur suspensi sel *Agave amaniensis* umur 7 hari dan 14 hari, serta kultur suspensi *C. speciosus* berurutan mampu melakukan remediasi Pb^{2+} rata-rata 64-79%, 73-96% dan 31-38%; sedangkan kemampuan mengakumulasi Pb^{2+} di dalam biomasnya rata-rata berurutan 468-1395, 548-1558 dan 244-1167 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ BK. *A. amaniensis* yang tumbuh di dalam media perlakuan Pb^{2+} 10 – 30 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, mengakumulasi Pb^{2+} di dalam biomasnya sekitar 2 kali lebih besar dibanding yang *C. speciosus* yang tumbuh dalam media perlakuan dengan kadar Pb^{2+} yang

sama. *A. amaniensis* mampu menyerap dan mengakumulasi Cd^{2+} dan Pb^{2+} di dalam biomasnya lebih besar dibanding *C. speciosus*, mungkin karena berat awal biomassa yang ditanam lebih besar. Akumulasi Pb^{2+} dalam biomassa *C. speciosus* tersebut 15 kali lebih besar dibandingkan tanaman *turnip* (semacam lobak) ($16 \mu\text{g.g}^{-1}$ BK) yang tumbuh di atas tanah yang mengandung Pb^{2+} sekitar 8 mg.kg^{-1} (Filov *et al.*, 1993). Berdasar penelitian yang dilakukan, kultur suspensi *A. amaniensis* dan *C. speciosus* merupakan hiperakumulator, karena kemampuannya mengakumulasi Pb^{2+} ($> 500 \mu\text{g.g}^{-1}$) (Brooks *et al.*, 1998).

Akumulasi dan remediasi Sr^{2+}

Kultur pucuk *S. laciniatum* ini mampu meremediasi lebih dari 50 % Sr^{2+} dari media tumbuhnya dan mengakumulasi Sr^{2+} di dalam biomasnya hingga 0,13 % BK. Hal ini menunjukkan bahwa kultur pucuk *S. laciniatum* mampu melakukan hiperakumulasi Sr^{2+} karena akumulasinya melebihi 0,1% (Brooks *et al.*, 1998; Baker, 1999). Berdasarkan hasil penelitian ini, juga menunjukkan bahwa akumulasi Sr^{2+} tertinggi tersebut 14 kali lebih besar dibandingkan tanaman *Solanum* yang pernah dilaporkan Filov *et al.* (1993). Dengan demikian *Solanum laciniatum* melakukan fitoremediasi Sr^{2+} dari media tempat tumbuhnya.

Kemampuan KJT untuk melakukan remediasi dan mengakumulasi Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} pada biomasnya, terkait dengan adanya adsorpsi, absorpsi, transpor dan translokasi ke dalam organ atau jaringan tanaman (KJT) (Meagher, 2000). Untuk masuk ke dalam jaringan tanaman/KJT, ion-ion logam tersebut kemungkinan diikat oleh fitosiderofor yang disekresikan oleh KJT ke

dalam media, yang mengandung berbagai macam asam pembentuk kompleks atau khelat (Meagher, 2000), dapat juga diikat dengan fitokhelatin ataupun metallothionein (Cobbett and Goldsbrough, 2002), sehingga tidak beracun terhadap sitoplasma, kemudian terjadi translokasi dan diakumulasikan dalam organ tanaman (Das *et al.*, 1997), seperti disimpan di dalam vakuola dalam bentuk khelat maupun diubah ikatannya menjadi sulfida ataupun lainnya (Meagher, 2002). Hal ini perlu dibuktikan lebih lanjut senyawa fitokhelatin yang terjadi serta keberadaan senyawa metal tersebut di dalam organel tanaman atau KJT.

6.3 Pengaruh Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} terhadap kandungan metabolit

Pengaruh Cu^{2+} terhadap kandungan metabolit KJT

Di dalam media yang mengandung Cu^{2+} 5-10 ppm, beberapa asam amino: Pro, Asp, Ser, Glu, Gly, Ala, Val, Ile, Hyls dan Lys meningkat rata-rata di atas 200 % lebih besar dibanding kontrol (Lihat tabel 5.3. hlm 50). Kadar asam amino di dalam biomassa tidak berbeda secara nyata, kecuali pada konsentrasi Cu^{2+} 10 ppm, Pro meningkat 183,9 % (lihat tabel 5.2 hlm 49). Peningkatan kandungan asam amino kemungkinan dimaksudkan untuk mengantisipasi adanya stress akibat Cu^{2+} , yang mana Cu^{2+} diikat asam-asam amino atau protein membentuk metallothionein atau fitokhelatin kompleks dan selanjutnya dapat ditransfer menuju ke berbagai bagian dari sel. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya (Ali *et al.*, 1998; Krämer *et al.*, 2000) bahwa penambahan ion logam berat di dalam media dapat meningkatkan produksi asam amino, seperti prolin. Menurut Maksymiec 1997, Cu^{2+} mempunyai reaktifitas yang tinggi terhadap

kebanyakan asam amino, dan secara langsung berpengaruh terhadap pembentukan kompleks dengan protein komponen dinding sel, yang kaya hidroksi prolin.

Kandungan hekogenin di dalam biomassa kultur suspensi sel *A. amaniensis* meningkat menjadi 125, 158 dan 131 % dengan adanya Cu^{2+} 0,6, 1,25 dan 5 ppm. Indrayanto *et al.* (1996) melaporkan bahwa $10 \mu\text{M Cu}^{2+}$ (= 0,6 ppm) di dalam media, dapat meningkatkan kandungan hekogenin di dalam kultur kalus *A. amaniensis* sampai 270 %. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat dinyatakan bahwa Cu^{2+} (0,6–5 ppm) dapat menginduksi terbentuknya hekogenin.

Adanya Cu^{2+} 5–40 ppm menurunkan kandungan sterol bebas dalam kultur pucuk *S. mammosum*, terendah terjadi pada Cu^{2+} 40 ppm dengan kandungan sterol bebasnya menjadi 25 % dibanding kontrol pada kadar orisinal Cu^{2+} dalam medium MS. Yang menarik pada kultur ini adalah pada ekstrak fraksi hidrolisatnya, setelah ditotolkan pada lempeng silica gel F₂₅₄ bersama pembanding solasodina, kemudian diekstraksi dengan kloroform: metanol: dietilamin (20:2:0,5) menggunakan penampak noda anisaldehyd sulfat terbentuk warna biru dengan R_f yang sama dengan pembanding solasodina; demikian pula dengan penampak noda dragendorf memberikan warna oranye seperti pembanding dan warnanya semakin nampak intensif pada kadar Cu yang lebih tinggi (40 ppm). Hal ini menarik untuk diteliti lebih lanjut, kemungkinan terbentuknya fitoaleksin senyawa yang mirip solasodina yang sebelumnya tidak terjadi pada kultur pucuk *S. mammosum*.

Pengaruh Cd^{2+} terhadap kandungan metabolit KJT

Berbagai kadar Cd^{2+} (10–25 ppm) di dalam media kultur suspensi *A. amaniensis* menyebabkan terjadinya penurunan kandungan hekogenin di dalam

biomassanya menjadi 43-16 %. Sedangkan terhadap kultur suspensi *C. speciosus* menyebabkan penurunan sitosterol total di dalam biomassanya, terendah menjadi 79 % pada Cd^{2+} 20 ppm. Pada kultur pucuk *S. laciniatum*, adanya Cd^{2+} 10 dan 15 ppm dapat bertindak sebagai elisitor abiotik, karena dapat meningkatkan kandungan solasodina menjadi 3,3 dan 1,4 kali dibanding tanpa pemberian Cd^{2+} . Menurut Trelfall dan Whitehead (1988), ion-ion logam berat (antara lain Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+}) yang ditambahkan ke dalam kultur suspensi sel *Datura stramonium* dapat bertindak sebagai elisitor abiotik untuk terbentuknya fitoaleksin sesquiterpenoid.

Pengaruh Pb^{2+} terhadap kandungan metabolit KJT

Peningkatan konsentrasi Pb^{2+} di dalam media juga menyebabkan penurunan kandungan hekogenin di dalam biomassa *A. amaniensis* dan penurunan terbesar terjadi pada perlakuan Pb^{2+} 40 ppm, yakni menjadi < 35% dibanding tanpa Pb^{2+} . Pb^{2+} dapat menyebabkan peningkatan sitosterol total dalam biomassa *C. speciosus*. Pada kadar Pb^{2+} 30 ppm menyebabkan peningkatan sitosterol total menjadi 1,3 kali dibanding kontrol. Memperhatikan hal ini, perlu diteliti lebih lanjut apakah ada korelasi antara peningkatan IP dengan peningkatan sitosterol.

Pengaruh Sr^{2+} terhadap kandungan metabolit KJT

Pada media yang mengandung Sr^{2+} 50 dan 100 ppm, kandungan solasodin kultur pucuk *Solanum laciniatum* meningkat menjadi 1,6 dan 1,4 kali dibanding tanpa pemberian Sr^{2+} . Adanya Sr^{2+} kadar tinggi 197 ppm juga menginduksi pembentukan hekogenin pada kultur kalus *A. amaniensis* menjadi 1,6 kali

(Indrayanto *et al.*, 1993) dan menginduksi pembentukan diosgenin pada kultur pucuk *C. speciosus* menjadi 1,3 kali dibanding kontrol (Indrayanto *et al.*, 1999).

Ion-ion logam berpengaruh terhadap produksi enzim dan metabolisme. Cu^{2+} dapat menghambat aktifitas ATP-ase dalam membran plasma akar jagung, juga dapat menghambat aktifitas enzim fosfatase, berpengaruh pada metabolisme nitrogen, asam-asam amino dan protein dalam pucuk tanaman (Reichman, 2002). Cu^{2+} berperan dalam proses metabolisme sel tanaman, berpengaruh pada electron transpor dalam proses fotosintesis. Ion logam juga berpengaruh terhadap aktifitas lipoxigenase, mempengaruhi membran sel dan Ca^{2+} dalam sitosol, sehingga berpengaruh pada metabolisme dan hasil metabolitnya, serta pertumbuhan sel tanaman (Maksymiec, 1997). Demikian pula ion-ion logam lain, seperti Sr^{2+} , Cd^{2+} dan Pb^{2+} dapat berkompetisi dan menggantikan kedudukan ion logam dalam metalloenzim, seperti Ca^{2+} (Kaim dan Schwederski, 1994).

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, menunjukkan bahwa kultur *Agave amaniensis*, *Costus speciosus*, *Solanum laciniatum*, *Solanum mammosum* mampu melakukan hiperakumulasi Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dan Sr^{2+} . Hal ini menarik untuk dilakukan regenerasi lebih lanjut dan diuji di lapang untuk kemungkinan penerapan fitoremediasi atau aplikasi bioteknologi lingkungan di masa mendatang, mengingat penelitian Gori *et al.*, 1998 yang telah terbukti bahwa dari seleksi kalus yang toleran terhadap Cu^{2+} 3,2 ppm dapat ditumbuhkan menjadi tanaman yang lebih toleran terhadap kadar yang lebih besar (Cu^{2+} 6,4 ppm).

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Kultur *Agave amaniensis* dan kultur *Costus speciosus* mampu tumbuh pada media dengan berbagai konsentrasi Cu^{2+} 0,6-15 ppm, Cd^{2+} 0,5-20 ppm dan Pb^{2+} 10-40 ppm. Kultur *Solanum mammosum* mampu tumbuh pada media dengan berbagai konsentrasi Cu^{2+} 5-40 ppm. Kultur *Solanum laciniatum* mampu tumbuh pada media dengan berbagai konsentrasi Cd^{2+} 5-20 ppm dan Sr^{2+} 25-200 ppm.
2. a. Peningkatan konsentrasi hingga Cu^{2+} 15 ppm, Cd^{2+} 20 ppm dan Pb^{2+} 40 ppm berpengaruh terhadap penurunan indeks pertumbuhan kultur yang diteliti, kecuali pada Pb^{2+} 10-30 ppm terjadi peningkatan IP kultur suspensi *C. speciosus* menjadi 1,8 kali dan pada Sr^{2+} 25-50 ppm terjadi peningkatan IP kultur *S. laciniatum* menjadi 1,2 kali dibanding kontrol.
2. b. Peningkatan konsentrasi Cu^{2+} 1,25-20 ppm berpengaruh terhadap permukaan kultur suspensi sel *A. amaniensis*, menjadi lebih berkerut dengan dinding sel yang lebih tebal (1,3-5 kali) dibanding kontrol. Pada Cd^{2+} 20 ppm dan Sr^{2+} 50-100 ppm menyebabkan rasio lebar antara sistem pembuluh dan titik pusat empulur terhadap epidermis dari batang *S. laciniatum* menjadi lebih besar 1,4 kali dibanding rasio pada kontrol.
3. Kultur *Agave amaniensis*, *Costus speciosus*, *Solanum laciniatum* dan *Solanum mammosum*, melakukan remediasi serta mampu mengakumulasi

Cu^{2+} ($> 100 \mu\text{g.g}^{-1}$ BK), Cd^{2+} ($> 100 \mu\text{g.g}^{-1}$ BK), Pb^{2+} ($> 500 \mu\text{g.g}^{-1}$ BK) dan Sr^{2+} ($> 1000 \mu\text{g.g}^{-1}$ BK). Semua kultur tersebut bertindak sebagai hiperakumulator.

4. a. Cu^{2+} 0,6-5 ppm dapat meningkatkan kandungan hekogenin kultur suspensi *A. amaniensis*, dan peningkatan tertinggi pada Cu^{2+} 1,25 ppm mencapai 1,7 kali dibanding kontrol. Pada berbagai konsentrasi Cd^{2+} 10-25 ppm dan Pb^{2+} 10-40 ppm, menyebabkan kandungan hekogenin kultur *A. amaniensis* menurun menjadi 0,5-0,2 kali dibanding kontrol. Cu^{2+} 5-30 ppm menyebabkan kandungan sterol bebas *S. mammosum* menurun menjadi 0,7 – 0,2 kali dibanding kontrol dan terbentuk metabolit dengan Rf kromatogramnya identik solasodina. Adanya Cd^{2+} 10 ppm dan Sr^{2+} 50-100 ppm menyebabkan kandungan solasodin kultur pucuk *S. laciniatum* meningkat menjadi 3,3 dan 1,6-1,4 kali dibanding kontrol..
4. b. Cu^{2+} 5-10 ppm menyebabkan terjadinya peningkatan kadar asam amino Pro, Asp, Ser, Glu, Gly, Ala, Val, Ile, Hyls dan Lys di dalam medianya rata-rata lebih dari 2 kali dibanding kontrol dan pada Cu^{2+} 10 ppm terjadi peningkatan Pro di dalam biomassa kultur suspensi *Agave amaniensis* menjadi 1,8 kali dibanding kontrol.

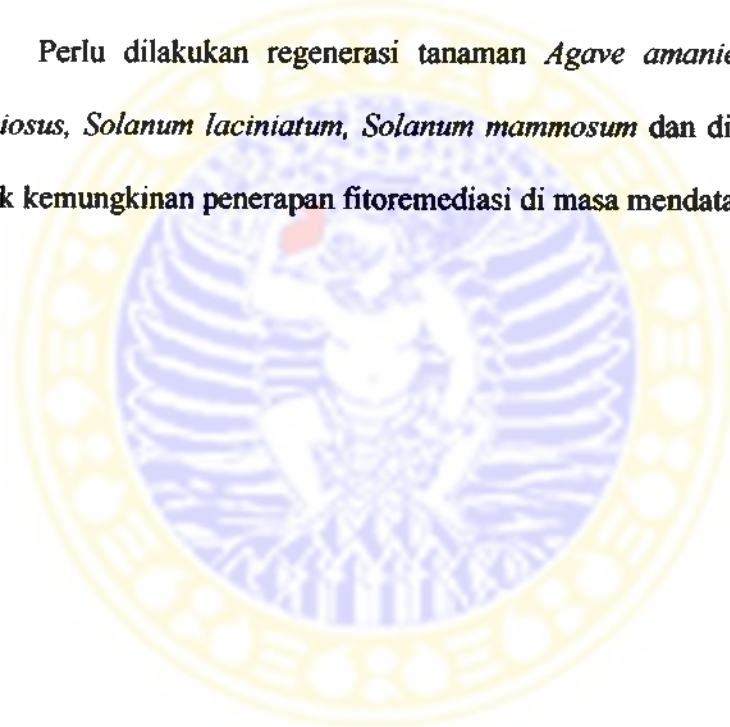
7.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut penelitian pembentukan fitokhelatin pada kultur jaringan tanaman *Agave amaniensis*, *Costus speciosus*, *Solanum laciniatum*, *Solanum mammosum*, maupun lainnya yang bersifat hiperakumulator.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh Pb^{2+} pada kultur suspensi *Costus speciosus* dan lainnya agar diperoleh informasi yang lebih lengkap mengenai mekanisme yang dapat meningkatkan indeks pertumbuhan dan kandungan sitosterol.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh Cu^{2+} pada pembentukan metabolit kultur pucuk *S. mammosum*, senyawa yang mempunyai Rf kromatogram identik dengan solasodina.

Perlu dilakukan regenerasi tanaman *Agave amaniensis*, *Costus speciosus*, *Solanum laciniatum*, *Solanum mammosum* dan diuji di lapang untuk kemungkinan penerapan fitoremediasi di masa mendatang.



DAFTAR PUSTAKA

- Ali G, Iqbal M, Srivastava PS, 1998. Interactive Effect of Cd and Zn on the Morphogenic Potential of *Bacopa monniera* (L.) Wettst. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* Vol 4 No. 3-4 : 159-164.
- Andrijany VS, Indrayanto G, Soehono LA, 1999. Simultaneous effect of calcium, magnesium, copper and cobalt ions on sapogenin steroids content in callus cultures of *Agave amaniensis*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 55: 103-108.
- Baker AJ, 1999. Metal hyperaccumulator plants: a review of biological resource for possible exploitation in the phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry N, Bañuelos GS, eds. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Boca Raton, Florida: CRC Press LLC, pp 85-107.
- BAPEDAL (Badan Pengendalian Dampak Lingkungan), 2001. Keputusan Kepala Badan Pengendalian Dampak Lingkungan No: KEP-03/BAPEDAL/09/1995 tentang Persyaratan Teknis Pengolahan Limbah Bahan Berbahaya dan Beracun. Di dalam: *Himpunan Peraturan Tentang Pengelolaan Limbah B3 I*, BAPEDAL, hlm 71-96.
- Bhojwani SS, Razdan MK, 1983. *Developments in Crop Science (5). Plant Tissue Culture . Theory and Practice*, Elsevier, Amsterdam.
- Blunden G, Yi Yi, Jewers K, 1978. Steroidal sapogenins from leaves of *Agave* species. *Phytochemistry* 17 : 1923-1925.
- Brodelius P, 1988. Stress Induces Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures. In (Pais MSS, Mavituna F, Novais JM, eds). *Plant Cell Biotechnology*, NATO ASI Ser. Vol. H 18, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp 195-209.
- Brooks RR, Chambers MF, Nicks LJ, Robinson BH, 1998. *Phytomining. Perspectives* 3: 359-362.
- Chaney RL, Malik C, Li YM, Brown SL, Angle JS, Baker AJM, 1997. *Phytoremediation of Soil Metals. Current Opinions in Biotechnology* 8: 279-284.
- Chen H, Cutright T, 2001. EDTA and HEDTA effects on Cd, Cr, and Ni uptake by *Helianthus Annuus*. *Chemosphere* 45, Issue 1: 21-28.
- Chen F, 1993. *Nitric/Peroxide Digestion of Biological Tissues, ASL trace Metals Methodology*.
- Cobbett C, Goldsbrough P, 2002. Phytochelatin and Metallothionein: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 159-182.

- Conner AJ, 1987. Differential solasodine accumulation in photoautotrophic and heterotrophic tissue cultures of *Solanum laciniatum*. *Phytochemistry* 26 : 2749-2750.
- Das P, Samantaray S, Rout GR, 1997. Studies on Cadmium Toxicity in Plants: A Riview. *Environmental Pollution* 98 (1): 29-36.
- Dasgupta B, Pandey VB, 1970. A New Indian Sources of Diosgenin (*Costus speciosus* Koen). *Experientia* 26: 475-476.
- Farmakope Indonesia, 1995. Edisi keempat, Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hlm 1036
- Filov VA, Bandman AL, Ivin BA, 1993. "Lead and Its Compounds" in : Harmful chemical substances, Vol. 1, Elements in groups I – IV of the periodic table and their inorganic compounds, Chichester, England : Ellis Horwood Ltd, pp.159-169.
- Förstner U, Wittmann GTW, 1981. Metal pollution in the aquatic environment, 2nd revised edn. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag, pp 87-93.
- Funk W, Damann V, Donnevert G, 1992. Qualitätssicherung in der Analytische Chemie, Weinheim : VCH, pp 5-39.
- Gori P, Schiff S, Santandrea G, Bennici A, 1998. Response of in vitro cultures of *Nicotiana tabacum* L. to copper stress and selection of plants from Cu tolerant callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53 : 161-169
- Grill E, Winnacker EL, Zenk MH, 1987. Phytochelatins. The principal heavy metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci US* 84 : 439-443.
- Herman EB, 1995. Recent Advances in Plant Tissue Culture III. Regeneration and Micropropagation . Techniques, Systems and Media. *Agricell Report* 1991-1995: 142-143.
- Hitachi, 1988. Instruction Manual for Model 835 High Speed Amino Acid Analyzer.
- Hopkins WG, 1999. Introduction to Plant Physiology, 2nd edn. New York Chichester Weinheim Brisbane Singapore Toronto: John Wiley & Sons Inc., pp.269-272.
- Hugdahl M, 1993. Hotplate Preparation of Water Samples for Total Metals, ASL trace Metals Methodology.

- Indrayanto G, Rahayu L, Rahman A, Noeraeni PE, 1993. Effect of Calcium, Stronsium, and Magnesium Ions on the Formation of Phytosteroids in Callus Cultures of *Agave amaniensis*. *Planta Med.* 59: 97-98.
- Indrayanto G, Erawati T, Santoso MH, 1995. Effect of L-arginine, casein hydrolysate, banana powder and sucrose on growth and solasodine production in shoot cultures of *Solanum laciniatum*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 43: 237-240.
- Indrayanto G, Utami W, Syahrani A, 1996. *Agave amaniensis* Trel & Nowell . In *Vitro Cultures and the Production of Phytosteroids*. In (YPS Bajaj, ed) *Medicals & Aromatic Plants IX*, Press IV Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 37: 1-15.
- Indrayanto G, 1997. Aplikasi Teknik Kultur Jaringan Tanaman untuk Produksi Metabolit Sekunder. Temu Ilmiah Regional Hasil Penelitian Biologi dan Pendidikan Biologi/IPA, UNTAG Surabaya.
- Indrayanto G, Sondakh R, Syahrani A, Utami W, 1998. *Solanum mammosum* L (Terong Susu): *in vitro* cultures and the production of secondary metabolites. In: Bajaj YPS (ed), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 41. *Medicinal and Aromatic Plants X*. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, pp 394-414.
- Indrayanto G, Utami W, Syahrani A, 1999. *Costus speciosus* (Koenig) J.E.Smith: *In vitro* cultures, micropropagation, and the production of diosgenin and other phytosteroids. In: Bajaj YPS (ed), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 43. *Medicinal and Aromatic Plants XI*. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, pp 57-77.
- Isnaeni, 1986. Optimasi Pembentukan Kalus *Solanum mammosum* L. dan Identifikasi Senyawa Steroidnya. *Tesis*. FPS - Universitas Airlangga.
- Kaim W, Schwederski B, 1994. *Bioinorganic Chemistry . Inorganic Elements in the Chemistry of Life, An Introduction and Guide*. Chichester-New York-Brisbane-Toronto-Singapore: John Wiley & Sins, pp 335-338.
- Kolodziej H, 1989. Phytoalexine chemisches Abwehrstoffe hoehere Pflanzen, *Deutcher Apotheker Zeitung*, 129: 1385-1389.
- Krämer U, Cotter-Howells JD, Charnock JM, Baker AJM, Smith JAC, 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379: 635-638.
- Leopold I, Gunther D, Schmidt J, Neumann D, 1999. Phytochelatin and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 50: 1323-1328.

- Macek TE, 1989. *Solanum aviculare* Forst, *Solanum laciniatum* Ait. (Poroporo): *In vitro* culture and the production of solasodine. In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol 7 (pp 443-463), Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Macek T, Macková M, Kás J, 2000. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances*. 18 : 23-34.
- Maksymiec W, 1997. Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica* 34 (3): 321-342.
- Manahan SE, 1979. *Environmental Chemistry*, 3rd Edition. Boston-Massachusetts: Willard Grant Press, pp 146 - 151.
- Meagher RB, 2000. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 153-162.
- Mercer EH & Birbeck MSC, 1966. *Electron microscopy, a Handbook for biologists*, 2nd edition, Oxford: Blackwell Scientific Publications, pp 3-51, 71-85.
- Meuwley P, Thibault P, Schwan AL, Rauser WE, 1995. Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. *Plant J.* 7: 391-400.
- Murashige T & Skoog F, 1962. A Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.
- Ochial El I, 1995. Toxicity of Heavy Metals and Biological Defence, Principle and Applications in Bioinorganic Chemistry-VII. *Journal of Chemical Education* 72 (6): 479-483.
- Overnell J, 1975. The effect of some heavy metal ions on photosynthesis in a freshwater alga. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 5: 19-26.
- Raskin I, Nanda Kumar PBA, Dushenkov S, Salt DE, 1994. Bioconcentration of Heavy Metals by Plants. Review Article. *Current Opinion in Biotechnology* 5: 285-290.
- Rauser WE, 1995, Phytochelatins and Related Peptides, Structure, Biosynthesis and Function. *Plant Physiol.* 109: 1141-1149.
- Reichman SM, 2002. *The Responses of Plants to Metal Toxicity: A Review Focusing on Copper, Manganese and Zinc*. Melbourne, Victoria: Australian Minerals & Energy Environment Foundation.
- Roses I, Carbajal ME, Gomez-Arroyo S, Belmont R, Villalagos-Pietrini R, 1984. Cytogenetic effects on Cadmium accumulation on water hyacinth (*Eichornia crassipes*). *Environmental Research* 33, 386-395.

- Salt DE, Smith RD, Raskin I, 1998. Phytoremediation. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol Biol.*, 49: 643-668.
- Sekretariat Menteri Negara Kependudukan dan Lingkungan Hidup, 1990. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 20 Tahun 1990 tentang Pengendalian Pencemaran Air.
- Setiawan B, 1993. Inisiasi kultur *Costus sp.* dan analisis kandungan Steroidnya. *Tesis*, Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Steel RGD, Torrie JH, 1995. Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik. Jakarta: Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama.
- Strassburger E, 1971. *Lehrbuch der Botanik fur Hochshulen*. 30 Auflage. Gustav Fisher verlag Stuttgart, pp.584, 626, 726, 729.
- Sugijanto, Puspitasari F, Herlina, Indrayanto G, 1998. The Influence of Copper and cobalt Ions on The Growth Index and Solasodine Accumulation in Shoot Cultures of *Solanum laciniatum* Ait. *Majalah Farmasi Indonesia* 9 (3): 123-129.
- Telek L, Delpin H, Cabanillas E, 1977. *Solanum mammosum* as source of Solasodine in The Rowland Tropics. *Economic Botany*, 31: 120-128.
- Threlfall DR, Whitehead IM, 1989. The Use of Metal Ions to Induce The Formation of Secondary Products in Plant Tissue Culture. In (Robins RJ and Rhodes MJC, eds) *Manipulating Secondary Metabolism in Culture*. Cambridge: Cambridge University Press, pp 51-56.
- Tjitrosoepomo G, 1988. *Taxonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press, hlm 364-365.
- Turner AP, Dickinson NM, 1993. Copper tolerance of *Acer pseudoplatanus* L.(sycamore) in tissue culture. *New Phytol.* 123 : 523-530.
- van Steenis CGGJ, 1988. *Flora untuk Sekolah di Indonesia*. Jakarta : PT. Pradnya Paramita, hlm 160-161.
- Zikmundová M, Maléterová Y, Vanek T, 1995. Utilization of Plant Cell Cultures for Bioremediation. In: 43rd Annual Congress on Medicinal Plant Research, Secondary Products-Physiologically Active Compounds. Abstracts of Lectures and Poster Presentations, (p. 43). The Martin-Luther - Universitat Halle, Wittenberg.

LAMPIRAN

Lampiran I : Komposisi Media Murashige dan Skoog

No	Komponen	Jumlah (mg.l ⁻¹)
1	(NH ₄) ₂ NO ₃	1.650
2	KNO ₃	1.900
3	CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
4	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
5	KH ₂ PO ₄	170
6	KI	0,83
7	H ₃ BO ₃	6,20
8	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30
9	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
10	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
11	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
12	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
13	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80
14	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,30
15	Myo-inositol	100
16	Asam nikotinat	0,5
17	Piridoksin HCl	0,5
18	Thiamin HCl	0,1
19	Glisin	2
20	Sukrosa	30.000
21	Kinetin	0,04-10
22	IAA	1,0-30
23	Agar	7.000
	pH	5,6-5,7

Lampiran 2 Komposisi Media Murashige dan Skoog yang dimodifikasi
untuk pertumbuhan kultur suspensi *Agave amaniensis*

No	Komponen	Jumlah (mg.l ⁻¹)
1	(NH ₄) ₂ NO ₃	1.650
2	KNO ₃	1.900
3	CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
4	MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
5	KH ₂ PO ₄	340
6	KI	0,83
7	H ₃ BO ₃	6,20
8	MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,30
9	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,6
10	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25
11	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025
12	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,025
13	FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,80
14	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	37,30
15	Myo-inositol	100
16	Asam nikotinat	0,5
17	Piridoksin HCl	0,5
18	Thiamin HCl	0,1
19	Glisin	2
20	Sukrosa	30.000
21	Kinetin	5
22	2,4 D	0,5
23	Agar	-

pH

5,6-5,7

Lampiran 3 Komposisi Media Murashige dan Skoog yang dimodifikasi
untuk pertumbuhan kultur kalus & suspensi *Costus speciosus*

No	Komponen	Jumlah (mg.l ⁻¹)
1	(NH ₄) ₂ NO ₃	1.650
2	KNO ₃	1.900
3	CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
4	MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
5	KH ₂ PO ₄	170
6	KI	0,83
7	H ₃ BO ₃	6,20
8	MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,30
9	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,6
10	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25
11	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025
12	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,025
13	FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,80
14	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	37,30
15	Myo-inositol	100
16	Asam nikotinat	0,5
17	Piridoksin HCl	0,5
18	Thiamin HCl	0,1
19	Glisin	2
20	Sukrosa	30.000
21	Kinetin	2
22	2,4 D	0,5
23	Casein hidrolisat	1.000
24	Agar*	7.000
	pH	5,6-5,7

* Untuk suspensi tanpa menggunakan agar

Lampiran 5 Komposisi Media Murashige dan Skoog yang dimodifikasi untuk pertumbuhan kultur suspensi *Solanum mammosum*

No	Komponen	Jumlah (mg.l ⁻¹)
1	(NH ₄) ₂ NO ₃	1.650
2	KNO ₃	1.900
3	CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
4	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
5	KH ₂ PO ₄	170
6	KI	0,83
7	H ₃ BO ₃	6,20
8	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30
9	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
10	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
11	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
12	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
13	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80
14	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,30
15	Myo-inositol	100
16	Asam nikotinat	0,5
17	Piridoksin HCl	0,5
18	Thiamin HCl	0,1
19	Glisin	2
20	Sukrosa	30.000
21	Kinetin	2
22	2,4 D	0,5
23	Casein hidrolisat	100

pH

5,6-5,7

Lampiran 6 Komposisi Media Murashige dan Skoog yang dimodifikasi untuk pertumbuhan kultur pucuk *Solanum mammosum*

No	Komponen	Jumlah (mg.l ⁻¹)
1	(NH ₄) ₂ NO ₃	1.650
2	KNO ₃	1.900
3	CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
4	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
5	KH ₂ PO ₄	170
6	KI	0,83
7	H ₃ BO ₃	6,20
8	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30
9	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
10	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
11	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
12	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
13	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80
14	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,30
15	Myo-inositol	100
16	Asam nikotinat	0,5
17	Piridoksin HCl	0,5
18	Thiamin HCl	0,1
19	Glisin	2
20	Sukrosa	30.000
21	Benzyl adenin	2
22	Casein hydrolisate	1000

pH

5,6-5,7

Lampiran 7 Contoh hasil analisis Varian (ANOVA) terhadap IP kultur *A. amaniensis* umur 7 hari pada berbagai konsentrasi Cu^{2+}

Oneway

ANOVA

IPAA7H

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	35.027	8	4.378	91.962	.000
Within Groups	3.856	81	4.761E-02		
Total	38.884	89			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: IPAA7H

LSD

(I) PPMCU	(J) PPMCU	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
.00	.01	-.5600*	9.758E-02	.000	-.7542	-.3658
	.60	-8.9000E-02	9.758E-02	.364	-.2832	.1052
	1.25	1.100E-02	9.758E-02	.911	-.1832	.2052
	5.00	7.000E-02	9.758E-02	.475	-.1242	.2642
	10.00	9.500E-02	9.758E-02	.333	-9.9157E-02	.2892
	15.00	1.0490*	9.758E-02	.000	.8548	1.2432
	20.00	1.3140*	9.758E-02	.000	1.1198	1.5082
	30.00	1.1770*	9.758E-02	.000	.9828	1.3712
.01	.00	.5600*	9.758E-02	.000	.3658	.7542
	.60	.4710*	9.758E-02	.000	.2768	.6652
	1.25	.5710*	9.758E-02	.000	.3768	.7652
	5.00	.6300*	9.758E-02	.000	.4358	.8242
	10.00	.6550*	9.758E-02	.000	.4608	.8492
	15.00	1.6090*	9.758E-02	.000	1.4148	1.8032
	20.00	1.8740*	9.758E-02	.000	1.6798	2.0682
	30.00	1.7370*	9.758E-02	.000	1.5428	1.9312
.60	.00	8.900E-02	9.758E-02	.364	-.1052	.2832
	.01	-.4710*	9.758E-02	.000	-.6652	-.2768
	1.25	.1000	9.758E-02	.309	-9.4157E-02	.2942
	5.00	.1590	9.758E-02	.107	-3.5157E-02	.3532
	10.00	.1840	9.758E-02	.063	-1.0157E-02	.3782
	15.00	1.1380*	9.758E-02	.000	.9438	1.3322
	20.00	1.4030*	9.758E-02	.000	1.2088	1.5972
	30.00	1.2660*	9.758E-02	.000	1.0718	1.4602
1.25	.00	-1.1000E-02	9.758E-02	.911	-.2052	.1832
	.01	-.5710*	9.758E-02	.000	-.7652	-.3768
	.60	-.1000	9.758E-02	.309	-.2942	9.416E-02
	5.00	5.900E-02	9.758E-02	.547	-.1352	.2532
	10.00	8.400E-02	9.758E-02	.392	-.1102	.2782
	15.00	1.0380*	9.758E-02	.000	.8438	1.2322
	20.00	1.3030*	9.758E-02	.000	1.1088	1.4972
	30.00	1.1660*	9.758E-02	.000	.9718	1.3602

Multiple Comparisons

Dependent Variable: IPAA7H

LSD

(I) PPMCU	(J) PPMCU	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
5.00	.00	-7.0000E-02	9.758E-02	.475	-.2642	.1242
	.01	-.6300*	9.758E-02	.000	-.8242	-.4358
	.60	-.1590	9.758E-02	.107	-.3532	3.516E-02
	1.25	-5.9000E-02	9.758E-02	.547	-.2532	.1352
	10.00	2.500E-02	9.758E-02	.798	-.1692	.2192
	15.00	.9790*	9.758E-02	.000	.7848	1.1732
	20.00	1.2440*	9.758E-02	.000	1.0498	1.4382
	30.00	1.1070*	9.758E-02	.000	.9128	1.3012
10.00	.00	-9.5000E-02	9.758E-02	.333	-.2892	9.916E-02
	.01	-.6550*	9.758E-02	.000	-.8492	-.4608
	.60	-.1840	9.758E-02	.063	-.3782	1.016E-02
	1.25	-8.4000E-02	9.758E-02	.392	-.2782	.1102
	5.00	-2.5000E-02	9.758E-02	.798	-.2192	.1692
	15.00	.9540*	9.758E-02	.000	.7598	1.1482
	20.00	1.2190*	9.758E-02	.000	1.0248	1.4132
	30.00	1.0820*	9.758E-02	.000	.8878	1.2762
15.00	.00	-1.0490*	9.758E-02	.000	-1.2432	-.8548
	.01	-1.6090*	9.758E-02	.000	-1.8032	-1.4148
	.60	-1.1380*	9.758E-02	.000	-1.3322	-.9438
	1.25	-1.0380*	9.758E-02	.000	-1.2322	-.8438
	5.00	-.9790*	9.758E-02	.000	-1.1732	-.7848
	10.00	-.9540*	9.758E-02	.000	-1.1482	-.7598
	20.00	.2650*	9.758E-02	.008	7.084E-02	.4592
	30.00	.1280	9.758E-02	.193	-6.6157E-02	.3222
20.00	.00	-1.3140*	9.758E-02	.000	-1.5082	-1.1198
	.01	-1.8740*	9.758E-02	.000	-2.0682	-1.6798
	.60	-1.4030*	9.758E-02	.000	-1.5972	-1.2088
	1.25	-1.3030*	9.758E-02	.000	-1.4972	-1.1088
	5.00	-1.2440*	9.758E-02	.000	-1.4382	-1.0498
	10.00	-1.2190*	9.758E-02	.000	-1.4132	-1.0248
	15.00	-.2650*	9.758E-02	.008	-.4592	-7.0843E-02
	30.00	-.1370	9.758E-02	.164	-.3312	5.716E-02
30.00	.00	-1.1770*	9.758E-02	.000	-1.3712	-.9828
	.01	-1.7370*	9.758E-02	.000	-1.9312	-1.5428
	.60	-1.2660*	9.758E-02	.000	-1.4602	-1.0718
	1.25	-1.1660*	9.758E-02	.000	-1.3602	-.9718
	5.00	-1.1070*	9.758E-02	.000	-1.3012	-.9128
	10.00	-1.0820*	9.758E-02	.000	-1.2762	-.8878
	15.00	-.1280	9.758E-02	.193	-.3222	6.616E-02
	20.00	.1370	9.758E-02	.164	-5.7157E-02	.3312

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

Lampiran 8 Contoh Hasil Uji Regresi korelasi antara variasi konsentrasi Cu^{2+} dalam media dengan IP kultur *A. amaniensis*

Dependent variable.. IPAA7H Method.. LINEAR

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R ,85331
R Square ,72814
Adjusted R Square ,72505
Standard Error ,34659

Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	28,312839	28,312839
Residuals	88	10,570917	,120124

F = 235,69667 Signif F = ,0000

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
PPMCU	-,055858	,003638	-,853312	-15,352	,0000
(Constant)	2,300256	,049293		46,665	,0000

-

Dependent variable.. IPAA7H Method.. QUADRATI

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R ,87443
R Square ,76463
Adjusted R Square ,75922
Standard Error ,32434

Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	2	29,731596	14,865798
Residuals	87	9,152160	,105197

F = 141,31358 Signif F = ,0000

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
PPMCU	-,094888	,011160	-1,449557	-8,502	,0000
PPMCU**2	,001447	,000394	,626096	3,672	,0004
(Constant)	2,389663	,052159		45,815	,0000

Dependent variable.. IPAA7H

Method.. CUBIC

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R ,90214
 R Square ,81386
 Adjusted R Square ,80737
 Standard Error ,29010

Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	3	31,646023	10,548674
Residuals	86	7,237732	,084160

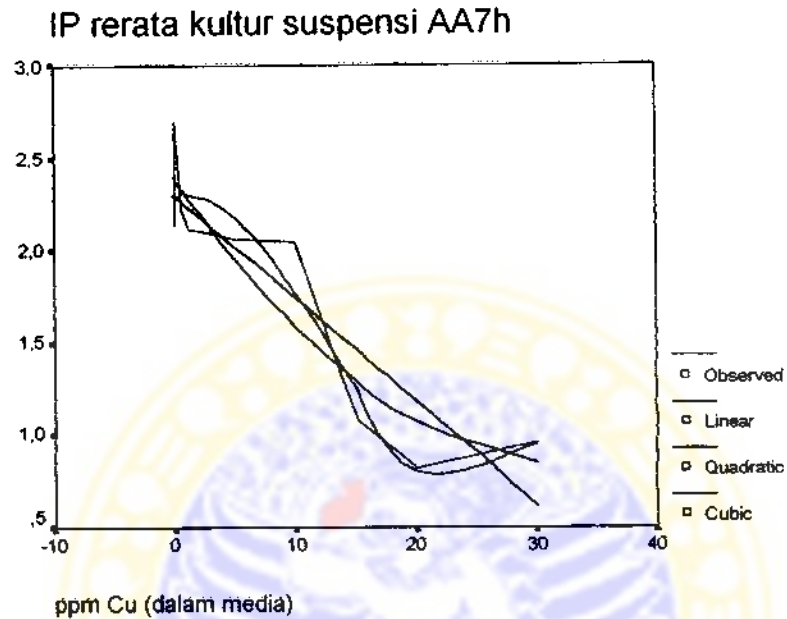
F = 125,34119 Signif F = ,0000

----- Variables in the Equation -----

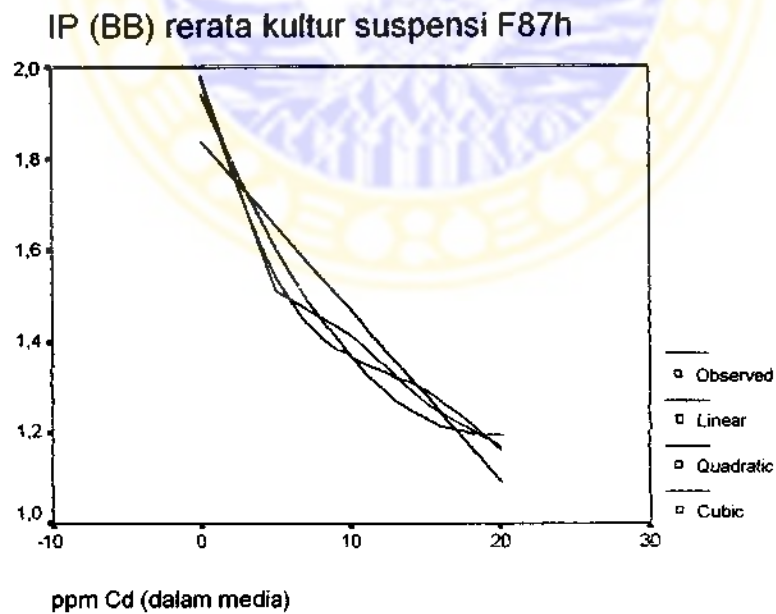
Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
PPMCU	,020757	,026221	,317095	,792	,4308
PPMCU**2	-,009928	,002411	-4,295978	-4,118	,0001
PPMCU**3	,000258	5,4133E-05	3,291667	4,769	,0000
(Constant)	2,292496	,050907		45,033	,0000

Lampiran 9

Gambar estimasi kurva regresi hubungan antara variasi konsentrasi ion logam dalam media dengan IP kultur

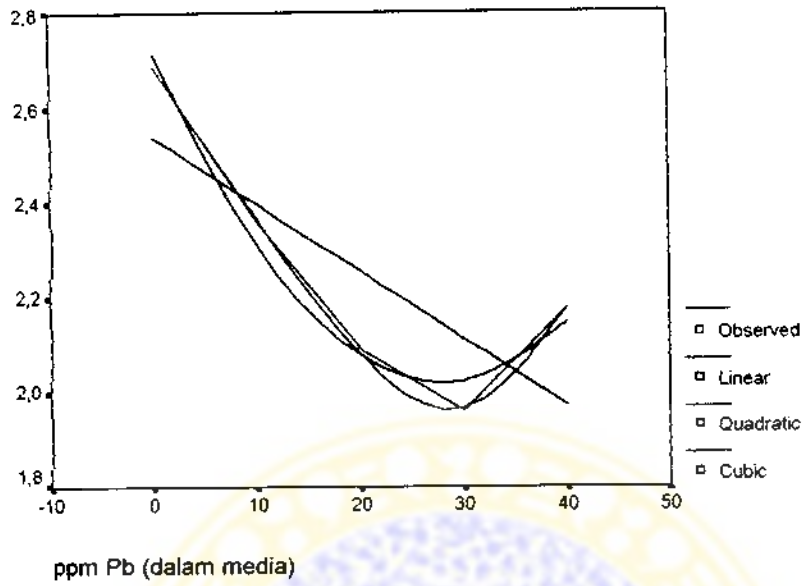


(Hubungan antara IP kultur *A. amaniensis* dengan kadar Cu^{2+} dalam media)



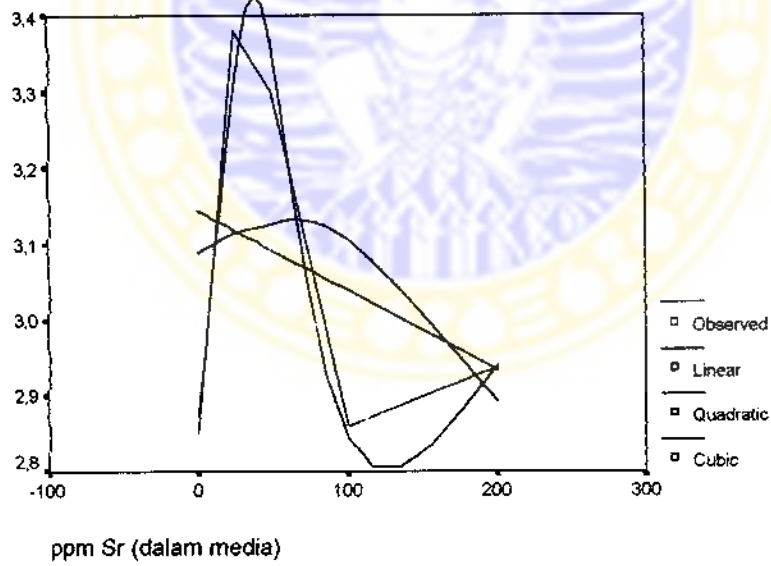
(Hubungan antara IP kultur *C. speciosus* dengan kadar Cd^{2+} dalam media)

IP (BB) rerata kultur suspensi AA7h



(Hubungan antara IP kultur *A. amaniensis* dengan kadar Pb^{2+} dalam media)

IP rerata kultur pucuk SL7



(Hubungan antara IP kultur *S. laciniatum* dengan kadar Sr^{2+} dalam media)

Lampiran 10

BIODATA

Nama : Sugijanto, Drs., Apt., MS.
Pekerjaan : Staf Pengajar Fakultas Farmasi UNAIR (1980 - sekarang)
 Sekretaris Lembaga Pengabdian Kepada Masyarakat UNAIR
 (Periode 2000-2003)
 Staf Pusat Penelitian Lingkungan Hidup Lembaga Penelitian
 Unair (1983-sekarang)
NIP. : 130809078
Jabatan/gol. : Lektor Kepala /(IV/b)
Alamat rumah : Jl. Semolowaru Selatan XI/2, Surabaya.
Tempat/tanggal lahir : Madiun, 21 Juni 1954
Pendidikan : 1. Sarjana Farmasi UNAIR, 1979
 2. Apoteker, Fak. Farmasi UNAIR, 1980
 3. S-2, Fak. Pasca Sarjana UNAIR, 1987
Kursus/Training : 1. Penataran Penggunaan Peralatan Baru, Bayer's Credit-PIU
 UGM Yogyakarta, 1981.
 2. Kursus Dasar-Dasar ANDAL di Universitas Padjadjaran,
 Bandung, 1983.
 3. Kursus ANDAL Tipe B, di Unpad, 1987.
 4. Kursus Penanganan Limbah Industri, PAU- Bioteknologi
 Univ. Gajah Mada, Yogyakarta, 1990.
 5. ICETT Invitation Program for Researcher, Mie University-
 Tsu, Japan 1995.

Pengalaman Penelitian, karya tulis dan publikasi : (1995-2002)

1. Sugijanto, 1995. Supercritical water Oxidation of Methanol by Hydrogen Peroxide, *unpublished report*, Mie University, Tsu, Japan.
2. Tim PPLH -UNAIR, 1996. Analisis Dampak Lingkungan, Rencana Pengelolaan dan Rencana Pemantauan Lingkungan Pabrik Peleburan Tembaga Gresik, Laporan Penelitian AMDAL, PT. Smelting Company, Jakarta.
3. Sugijanto, Gunawan Indrayanto, 1997. Limbah Bahan Berbahaya dan Beracun, *Majalah Semesta*.
4. Sugijanto, Fenty Puspitasari, Herlina, Gunawan Indrayanto, 1998. The Influence of Copper and cobalt Ions on The Growth Index and Solasodine Accumulation in Shoot Cultures of *Solanum laciniatum* Ait. *Majalah Farmasi Indonesia* 9 (3): 123-129.
5. Sugijanto, Gunawan Indrayanto, Noor Cholies Zaini, 1999. Mekanisme bioremediasi logam berat tembaga pada kultur jaringan tanaman *Agave amaniensis*, Lembaga Penelitian Universitas Airlangga (Dana IPD, 1998).
6. Sugijanto, Gunawan Indrayanto, Noor Cholies Zaini, 1999. Pengembangan Pemanfaatan Kultur Jaringan Tanaman Untuk Bioremediasi Logam Berat Cu, Cd dan Hg. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga (Dana RUT V, 1998/1999)
7. Sugijanto Kartosentono, Ana Nuraida, Gunawan Indrayanto, Noor Cholies Zaini, 2001. Phytoremediation of Sr^{2+} and its influence on the growth, Ca^{2+} and solasodine content of shoot cultures of *Solanum laciniatum*. *Biotechnol. Lett.* 23: 153-155.

8. Sugijanto Kartosentono, Gunawan Indrayanto, Noor Cholies Zaini, 2002. The uptake of copper ions by cell suspension cultures of *Agave amaniensis*, and its effect on the growth, amino acids and hecogenin content. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 68: 287-292.
9. Sugijanto Kartosentono, Sinar Suryawati, Gunawan Indrayanto, Noor Cholies Zaini, 2002. Accumulation of Cd^{2+} and Pb^{2+} in the suspension cultures of *Agave amaniensis* and *Costus speciosus* and the determination of the culture's growth and phytosteroid content. *Biotechnol. Lett.* 24: 687-690.
10. Sugijanto Kartosentono, Sinar Suryawati, Achmad Syahrani, Gunawan Indrayanto, Noor Cholies Zaini, 2002. Fitoremediasi Pb^{2+} serta pengaruhnya terhadap pertumbuhan dan kandungan hekogenin kultur suspensi sel *Agave amaniensis*, *Bull. Soc. Nat. Prod. Chem.*, 2 (1): 20-25.
11. Sugijanto Kartosentono, Gunawan Indrayanto, Noor Cholies Zaini, 2002. Fitoremediasi dan respon kultur jaringan tanaman *Costus speciosus* terhadap Cu^{2+} dan Pb^{2+} . Lembaga Penelitian Universitas Airlangga (Dana Hibah Bersaing X, 2002).

