

TESIS

**PENGARUH KONSENTRASI RASIO
ION AMONIUM DAN ION NITRAT
TERHADAP PERTUMBUHAN DAN
KANDUNGAN FITOSTEROID
PADA KULTUR JARINGAN
COSTUS SPECIOSUS (KOEN) SMITH
(KODE F - 8)**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



RATNA KUSUMA

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2000

TESIS

**PENGARUH KONSENTRASI RASIO
ION AMONIUM DAN ION NITRAT
TERHADAP PERTUMBUHAN DAN
KANDUNGAN FITOSTEROID
PADA KULTUR JARINGAN
COSTUS SPECIOSUS (KOEN) SMITH
(KODE F – 8)**



PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

RATNA KUSUMA

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2000**

**PENGARUH KONSENTRASI RASIO
ION AMONIUM DAN ION NITRAT
TERHADAP PERTUMBUHAN DAN
KANDUNGAN FITOSTEROID
PADA KULTUR JARINGAN
COSTUS SPECIOSUS (KOEN) SMITH
(KODE F – 8)**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

Untuk Memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Farmasi
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh

RATNA KUSUMA

099813060 – M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

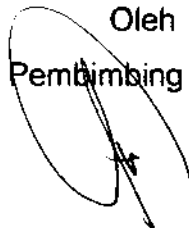
Tanggal 14 Desember 2000

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI

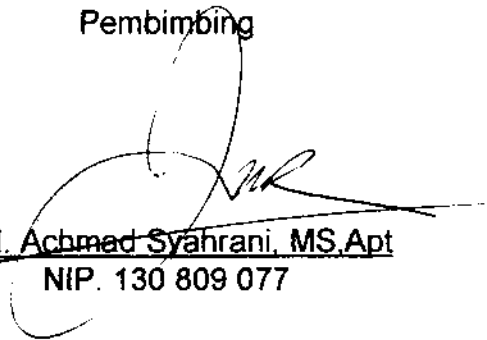
TANGGAL 14 Desember 2000.

Oleh
Pembimbing Ketua



Prof. Dr. rer. nat. Gunawan Indrayanto, Apt.
NIP. 130 541 814

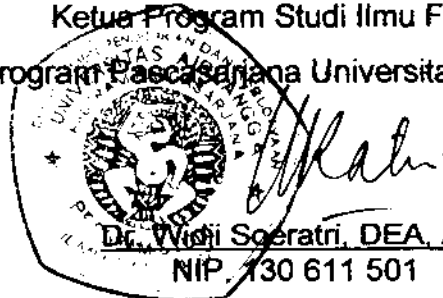
Pembimbing



Dr. H. Achmad Syahrani, MS, Apt
NIP. 130 809 077

Mengetahui,

Ketua Program Studi Ilmu Farmasi
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Dr. Widi Soeratri, DEA, Apt
NIP. 130 611 501

Telah diuji pada

Tanggal 14 Desember 2000

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof.Dr.H. Sutarjadi, Apt.

Anggota : 1. Prof.Dr.rer.nat. Gunawan Indrayanto, Apt.

2. Dr. H. Achmad Syahrani, Apt.

3. Dr. H. Noor Irfansyah, Apt.

4. Dr. Hj. Isnaeni, MS., Apt.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan syukur ke hadirat Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rakhmat dan karuniaNya sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Prof.Dr.rer.nat. Gunawan Indrayanto, Apt. Pembimbing ketua yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran selama dalam penelitian dan penyelesaian tesis ini.

Terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya juga saya ucapkan kepada Dr. H. Achmad Syahrani, Apt. Pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Ucapan terima kasih dan rasa penghargaan saya ucapkan kepada Pemerintah Republik Indonesia cq Menteri Pendidikan dan Kebudayaan melalui Tim Managemen Program Doktor yang telah memberikan bantuan finansial, sehingga sangat membantu saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankan pula saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

- Rektor Universitas Mulawarman dan Dekan FKIP P.BIO UN-MUL Samarinda yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti Program Pascasarjana di Universitas Airlangga Surabaya.
- Almamater Universitas Airlangga khususnya Fakultas Farmasi dan Fakultas Pascasarjana yang telah memberikan kesempatan, bantuan serta fasilitas kepada saya untuk mengikuti Program Pendidikan Pascasarjana.
- Jurusan Biologi Farmasi, khususnya Laboratorium Bioteknologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas bantuan dan fasilitas yang diberikan selama penelitian berlangsung.

- Dr.rer.nat. Mulyahadi Santosa, beserta staf Laboratorium Dasar Bersama Universitas Airlangga atas bantuan dan fasilitas selama pelaksanaan penelitian.
- Prof.Drs. Soemadi, Apt. beserta staf Laboratorium Instrumental Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas bantuan dan kesediaannya mengizinkan saya menggunakan fasilitas berupa instrumen densitometer.
- Bpk. Drs. Sugijanto, MS., Ibu Dra. Wahyu Utami, mbak Evie, mbak Santi, Ivy Wijaya, rekan-rekan S-2 (Bpk. Sadono, mbak Toeti, Oeke dan Lanny) serta rekan-rekan S-1 yang amat sangat membantu selama saya mengikuti Program Pascasarjana hingga menyelesaikan penelitian ini.
- Kedua orang tua, khususnya ayah saya, H. Rudjeham (Alm.) yang semasa hidupnya sering memberikan dorongan dan semangat dalam menyelesaikan studi ini.
- Suami tercinta Rizali Irawan, kedua putra-putri saya Angga Pradystya utama dan Farasaty Utami yang telah mendoakan, memberikan bantuan, dorongan, semangat pengertian dan harapan serta pengorbanannya sejak memasuki program Pascasarjana sampai terselesaikannya tesis ini.
- Akhirnya rasa terima kasih saya sampaikan kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, atas bantuan dan perhatian yang telah diberikan, semoga Allah memberikan balasan dengan limpahan Rakhmat dan Hidayah Nya kepada kita semua.

RINGKASAN

Kata kunci : *Costus speciosus*, Kultur Jaringan, Ion amonium, ionNitrat

Penelitian ini dilakukan untuk mempelajari pengaruh ion amonium-ion nitrat terhadap pertumbuhan dan kadar fitosteroid kultur jaringan *Costus speciosus*.

Jenis kultur yang menjadi obyek penelitian, terdiri atas kultur pucuk, kultur akar, kultur kalus dan kultur suspensi tanaman *Costus speciosus* (Koen) Smith kode F-8.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode rancangan acak lengkap yang hasilnya dianalisa secara statistik dan dilanjutkan dengan uji LSD serta uji regresi - korelasi dengan tujuan untuk membandingkan efek perlakuan yang berbeda pada kelompok yang pada awalnya sama.

Hasil penelitian indeks pertumbuhan kultur jaringan *Costus speciosus* menunjukkan bahwa pemberian ion amonium - ion nitrat memberikan indeks pertumbuhan tertinggi pada kultur pucuk diperoleh pada Amonium 30 mM dan Nitrat 30 mM rasio 1 : 1, indeks pertumbuhan tertinggi pada kultur akar dan kultur suspensi pada media dengankonsentrasi Amonium 20 mM dan Nitrat 40 mM rasio 1 : 2, indeks pertumbuhan tertinggi pada kultur kalus diperoleh pada media konsentrasi Nitrat 60 mM tanpa Amonium rasio 60 : 0.

Kadar diosgenin tertinggi dari kultur pucuk diperoleh dari media dengan konsentrasi nitrat 60mM tanpa Amonium rasio 0 : 60 Sedang pada kultur akar dihasilkan dari media dengan konsentrasi Amonium 30 mM dan Nitrat 30 mM rasio 1 : 1.

Kadar sterol tertinggi kultur pucuk dan kultur Kalus diperoleh dari media dengan ikonsentrasi Amonium 60 mM tanpa Nitrat rasio 60 : 0. Kadar sterol tertinggi kultur akar dihasilkan oleh media dengan konsentrasi Amonium 59,4 mM dan Nitrat 0,6mM rasio 99 :1 kadar sterol tertinggi kultur Suspensi dihasilkan oleh media dengan konsentrasi Amonium 58,8 mM dan Nitrat 1,2 mM rasio 49 : 1.

Pengaruh penambahan ion amonium - ion nitrat menunjukkan bahwa penambahan ion nitrat mampu merangsang pembentukan diosgenin, sedangkan penambahan ion amonium mampu merangsang pembentukan sterol pada kultur jaringan *Costus speciosus*.

ABSTRAK

Key words : *Costus speciosus* (Koen) Smith., in vitro cultures, ammonium ions, nitrate ions.

In this work, we tried to figure out the effect of ammonium ions - nitrate ions on growth and phytosteroid content in the in vitro culture of *Costus speciosus* (Koen) Smith. Four kind of cultures we used in this work was formed from shoot, root, callus and suspension cultures of *Costus speciosus* (Koen) Smith kode F - 8.

In this work, complete randomized design was applied and the results was analyzed by one way anava test followed by least significant different and correlation regression.

The highest on the growth was shown in the media with the ratio of ammonium ions : nitrate ions 1 : 1 for shoot cultures, 0 : 60 for callus cultures and 1 : 2 for root and suspension cultures.

The highest diosgenin content for shoot cultures found in the ammonium ions : nitrate ions ratio of 0 : 60 with the level of nitrate ions was 60,0 mM and for the root cultures was at ammonium ions : nitrate ions ratio 1 : 1.

The highest sterol content for shoot and callus cultures found in the ammonium ions : nitrate ions ratio of 60 : 0 with the level of ammonium ions was 60,0 mM, for the root cultures found in ratio 99 :1 and sterol for the suspension cultures with the ratio level 49 : 1.

DAFTAR ISI

SAMPUL DEPAN	ii
SAMPUL DALAM	iii
PRASYARAT GELAR	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
PENETAPAN PANITIA	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
RINGKASAN	viii
ABSTRAK	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah.....	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.3. Manfaat Penelitian.....	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Tinjauan tentang Tanaman <i>Costus speciosus</i>	5
2.1.1. Klasifikasi dan Deskripsi <i>Costus speciosus</i>	5
2.1.2. Kandungan dan Kegunaan Tanaman	6
2.2. Tinjauan tentang Kultur Jaringan Tanaman	7
2.3. Produksi Metabolit Sekunder pada Kultur Jaringan.....	10
2.4. Tinjauan tentang Sumber Nitrogen	12
2.5. Tinjauan tentang Fitosteroid	14
BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN ...	17
3.1. Kerangka Konseptual	17
3.2. Hipotesis Penelitian	19
BAB IV. BAHAN, ALAT DAN METODE PENELITIAN	20
4.1. Bahan	20
4.1.1. Bahan Tanaman	20
4.1.2. Bahan Kimia	20
4.1.3. Media Penelitian	20
4.2. Alat	21
4.3. Metode	22
4.3.1. Tahapan Penelitian	22
4.3.2. Penyiapan kultur pucuk <i>Costus speciosus</i>	23
4.3.2.1. Pembuatan media cair kultur pucuk.....	23
4.3.2.2. Sub kultur pucuk	23
4.3.3. Percobaan kultivasi pucuk <i>Costus speciosus</i>	24
4.3.3.1. Kultivasi pucuk	24
4.3.3.2. Pemanenan Kultur Pucuk.....	25

4.3.4.	Analisa pertumbuhan kultur pucuk.....	25
4.3.4.1.	Penentuan kecepatan pertumbuhan.....	25
4.3.4.2.	Penentuan pH, konduktivitas dan kadar gula filtrat.....	
4.3.5.	Penyiapan kultur akar.....	25
4.3.5.1.	Pembuatan media kultur akar.....	25
4.3.5.2.	Sub kultur akar.....	26
4.3.6.	Percobaan kultivasi kultur akar.....	27
4.3.6.1.	Kultivasi akar.....	27
4.3.6.2.	Pemanenan kultur akar.....	27
4.3.7.	Analisa pertumbuhan kultur akar.....	27
4.3.7.1.	Penentuan kecepatan pertumbuhan.....	27
4.3.7.2.	Penentuan pH, konduktivitas dan sisa gula pada media.....	
4.3.8.	Penyiapan kultur kalus <i>Costus speciosus</i>	28
4.3.8.1.	Pembuatan media padat.....	28
4.3.8.2.	Sub kultur kalus.....	28
4.3.9.	Percobaan kultivasi kultur kalus <i>Costus speciosus</i>	29
4.3.9.1.	Kultivasi kalus.....	29
4.3.9.2.	Pemanenan kultur kalus.....	30
4.3.10.	Analisa pertumbuhan kultur kalus.....	30
4.3.10.1.	Penentuan kecepatan pertumbuhan.....	30
4.3.10.2.	Penentuan pH, konduktivitas dan sisa kadar gula pada filtrat media.....	30
4.3.11.	Penyiapan kultur suspensi sel <i>Costus speciosus</i>	30
4.3.11.1.	Pembuatan media cair suspensi.....	30
4.3.11.2.	Sub kultur suspensi sel.....	31
4.3.12.	Percobaan kultivasi suspensi sel <i>Costus speciosus</i>	32
4.3.12.1.	Kultivasi suspensi sel.....	32
4.3.12.2.	Pemanenan kultur suspensi sel.....	33
4.3.13.	Analisa pertumbuhan kultur suspensi.....	33
4.3.13.1.	Penentuan % <i>Packed Cell Volume</i> (%PCV).....	33
4.3.13.2.	Penentuan indeks pertumbuhan.....	33
4.3.13.3.	Penentuan pH, konduktivitas dan sisa kadar gula filtrat media.....	34
4.3.14.	Pengeringan dan Penetapan susut kering.....	34
4.3.15.	Ekstraksi dan analisis zat kandungan.....	34
4.3.15.1.	Ekstraksi sapogenin steroid dan sterol.....	34
4.3.15.2.	Analisis Kuantitatif Sapogenin steroid secara Densitometri.....	35
4.3.15.3.	Analisis Kuantitatif Sterol secara Densitometri.....	36
4.3.15.4.	Perhitungan Kadar Sampel.....	37
4.3.16.	Analisis Data.....	37
BAB V.	HASIL PENELITIAN.....	38
5.1.	Pengamatan Parameter Pertumbuhan Kultur Jaringan Sel <i>Costus speciosus</i>	38
5.1.1.	Pengamatan Parameter Pertumbuhan Kultur Pucuk <i>Costus speciosus</i> Kode F – 8.....	39

5.1.2.	Pengamatan Parameter Pertumbuhan Kultur Akar <i>Costus speciosus</i> Kode F – 8.	41
5.1.3.	Pengamatan Kecepatan Pertumbuhan Kultur Kalus <i>Costus speciosus</i> Kode F – 8.	43
5.1.4.	Pengamatan Parameter Pertumbuhan Kultur Suspensi <i>Costus speciosus</i> Kode F – 8	44
5.2.	Analisis Kualitatif.	46
5.2.1.	Analisis Kualitatif Fitosteroid dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	46
5.2.2.	Identifikasi dengan densitometri	49
5.3.	Analisis kuantitatif fitosteroid secara densitometri	50
5.3.1.	Penentuan kadar diosgenin	50
5.3.2.	Penentuan kadar sterol total sebagai kolesterol....	53
BAB VI. PEMBAHASAN		70
6.1.	Analisis Pertumbuhan Kultur Jaringan Sel <i>Costus Speciosus</i> (Koen) Smith (kode F-8)	70
6.1.1.	Kultur Pucuk <i>Costus Speciosus</i> (Koen) Smith (kode F-8)	70
6.1.2.	Kultur Akar <i>Costus Speciosus</i> (Koen) Smith (kode F-8)	71
6.1.3.	Kultur Kalus <i>Costus Speciosus</i> (Koen) Smith (kode F-8)	72
6.1.4.	Kultur Suspensi <i>Costus Speciosus</i> (Koen) Smith (kode F-8)	73
6.2.	Hasil Analisis Kadar Diosgenin	74
6.2.1.	Kultur Pucuk <i>Costus Speciosus</i> (Koen) Smith (kode F-8)	74
6.2.2.	Kultur Akar <i>Costus Speciosus</i> (Koen) Smith (kode F-8)	75
6.3.	Hasil Analisis Kadar Sterol	75
6.3.1.	Kultur Pucuk <i>Costus Speciosus</i> (Koen) Smith	76
6.3.2.	Kultur Akar <i>Costus Speciosus</i> (Koen) Smith.....	76
6.3.3.	Kultur Kalus <i>Costus Speciosus</i> (Koen) Smith.....	77
6.3.4.	Kultur Suspensi <i>Costus Speciosus</i> (Koen) Smith (kode F-8).....	78
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN		80
7.1.	Kesimpulan.....	80
7.2.	Saran.....	81
DAFTAR PUSTAKA		82
LAMPIRAN		85

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Komposisi media percobaan dengan berbagai rasio kombinasi ion amonium-nitrat.....	21
Tabel 5.1. Rata-rata parameter pertumbuhan kultur pucuk <i>Costus speciosus</i> (IP, pH, % Brix) dari berbagai rasio ion Amonium, ion Nitrat pada media percobaan.....	39
Tabel 5.2. Rata-rata parameter pertumbuhan kultur akar <i>Costus speciosus</i> (IP, pH, % Brix) dari berbagai rasio ion Amonium, ion Nitrat pada media percobaan.....	41
Tabel 5.3. Rata-rata indeks pertumbuhan kultur kalus <i>Costus speciosus</i> (IP) dari berbagai rasio ion Amonium, ion Nitrat pada media percobaan.....	43
Tabel 5.4. Rata-rata parameter pertumbuhan kultur suspensi <i>Costus speciosus</i> (IP, pH, % Brix, %PCV) dari berbagai rasio ion Amonium, ion Nitrat pada media percobaan.....	44
Tabel 5.5. Kadar diosgenin dari fraksi hidrolisat kloroform serbuk kering kultur pucuk <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith (kode F-8) dari berbagai rasio ion amonium dan ion nitrat.....	51
Tabel 5.6. Kadar diosgenin dari fraksi hidrolisat kloroform serbuk kering kultur akar <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith (kode F-8) dari berbagai rasio ion amonium dan ion nitrat.....	52
Tabel 5.7. Kadar sterol total sebagai kolesterol dalam serbuk kering kultur pucuk <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith (kode F-8).....	54
Tabel 5.8. Kadar sterol total sebagai kolesterol dalam serbuk kering kultur akar <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith (kode F-8).....	55
Tabel 5.9. Kadar sterol total sebagai kolesterol dalam serbuk kering kultur kalus <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith (kode F-8).....	56
Tabel 5.10. Kadar sterol total sebagai kolesterol dalam serbuk kering kultur suspensi <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith (kode F-8)	57
Tabel 5.11. Kadar diosgenin dari fraksi hidrolisat kloroform serbuk kering kultur pucuk dan kultur akar <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith (kode F-8) dari berbagai rasio ion amonium dan ion nitrat	58
Tabel 5.12. Hasil uji regresi-korelasi antara konsentrasi ion amonium-ion nitrat terhadap indeks pertumbuhan kultur jaringan sel <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith kode F-8.....	59
Tabel 5.13. Hasil uji regresi-korelasi antara konsentrasi ion amonium dan ion nitrat terhadap kadar fitosteroid kultur jaringan sel <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith kode F-8	62
Tabel 5.14. Hasil uji regresi korelasi antara rasio ion amonium dan ion nitrat terhadap indeks pertumbuhan kultur jaringan <i>Costus speciosus</i>	66

Tabel 5.15. Hasil uji regresi-korelasi antar rasio ion amonium dan ion nitrat terhadap kadar fitosteroid kultur jaringan sel *Costus speciosus* (Koen) Smith kode F-8 68

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Tanaman <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith.....	6
Gambar 2.2.	Struktur inti steroid.....	14
Gambar 2.3	Struktur Diosgenin.....	15
Gambar 2.4.	Perubahan squalen menjadi diosgenin	16
Gambar 3.1.	Skema Kerangka Konseptual	18
Gambar 4.1	Kultur pucuk <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith (Kode ..	24
Gambar 4.2.	Kultur Akar <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith	26
Gambar 4.3.	Kultur kalus <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith - 8) ...	29
Gambar 4.4.	Kultur suspensi <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith (kode F - 8).....	32
Gambar 5.1.	Histogram parameter pertumbuhan kultur pucuk <i>Costus speciosus</i> (IP, pH, % Brix) dari berbagai rasio ion Amonium, ion Nitrat.	40
Gambar 5.2.	Histogram parameter pertumbuhan kultur akar <i>Costus speciosus</i> (IP, pH, % Brix) dari berbagai rasio ion Amonium, ion Nitrat	42
Gambar 5.3.	Histogram indeks pertumbuhan kultur kalus <i>Costus</i> <i>speciosus</i> (IP) dari berbagai rasio ion Amonium, ion Nitrat.	43
Gambar 5.4.	Histogram parameter pertumbuhan kultur suspensi <i>Costus speciosus</i> (IP, pH, % Brix dan % PCV) dari berbagai rasio ion Amonium dan ion Nitrat	45
Gambar 5.5.	Profil Kromatogram Fraksi Hidrolisat Kloroform pada Lempeng Kieselgel 60 F ₂₅₄ (fasa gerak kloroform : etil asetat (4 : 1) dengan Penampak noda Anisaldehyda – as.sulfat dan Pembanding Diosgenin)	47
Gambar 5.6.	Profil Kromatogram Fraksi Hidrolisat Kloroform dan Fraksi kloroform pada Lempeng Kieselgel 60 F ₂₅₄ (fasa gerak kloroform : etil asetat (4 : 1) dengan Penampak noda pereaksi Anisoldehyda – as.sulfat dan Pembanding kolesterol)	48
Gambar 5.7.	Contoh spektra absorban reflektan dari pembanding diosgenin dan fraksi hidrolisat, diukur pada panjang gelombang 370 - 700 nm.	49
Gambar 5.8.	Histogram kadar diosgenin dalam fraksi hidrolisat kloroform serbuk kering kultur pucuk <i>Costus</i> <i>speciosus</i> (Koen) Smith (kode F-8) dari berbagai rasio ion amonium dan ion nitrat	51
Gambar 5.9.	Histogram kadar diosgenin dalam fraksi hidrolisat kloroform serbuk kering kultur akar <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith (kode F-8) dari berbagai rasio ion amonium dan ion nitrat.	52

Gambar 5.10. Histogram kadar sterol total kultur pucuk <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith (kode F8)	54
Gambar 5.11. Histogram kadar sterol total kultur akar <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith (kode F-8)	55
Gambar 5.12. Histogram kadar sterol total kultur kalus <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith (kode F-8)	56
Gambar 5.13. Histogram kadar sterol total kultur suspensi <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith (kode F-8)	57
Gambar 5.14. Histogram kadar diosgenin pada kultur akar dan kultur pucuk <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith.....	58
Gambar 5.15. Kurva hubungan antara konsentrasi ion amonium – ion nitrat dengan indeks pertumbuhan kultur akar <i>Costus speciosus</i>	60
Gambar 5.16. Kurva hubungan antara konsentrasi ion amonium – ion nitrat dengan indeks pertumbuhan kultur suspensi <i>Costus speciosus</i>	60
sGambar 5.17. Kurva hubungan antara konsentrasi ion amonium – ion nitrat dengan indeks pertumbuhan kultur pucuk <i>Costus speciosus</i>	61
Gambar 5.18. Kurva hubungan antara konsentrasi ion amonium – ion nitrat dengan indeks pertumbuhan kultur kalus sel <i>Costus speciosus</i>	61
Gambar 5.19. Kurva hubungan antara variasi ion amonium dan ion nitrat dengan kadar sterol pucuk sel <i>Costus speciosus</i>	63
Gambar 5.20. Kurva hubungan antara variasi ion amonium – ion nitrat dengan sterol suspensi sel <i>Costus speciosus</i>	63
Gambar 5.21. Kurva hubungan antara variasi ion amonium – ion nitrat dengan indeks pertumbuhan kultur akar sel <i>Costus speciosus</i>	64
Gambar 5.22. Kurva hubungan antara variasi ion amonium – ion nitrat dengan Indeks pertumbuhan kultur pucuk <i>Costus speciosus</i>	64
Gambar 5.23. Kurva hubungan antara variasi ion amonium – ion nitrat dengan indeks pertumbuhan kultur suspensi <i>Costus speciosus</i>	65
Gambar 5.24. Kurva hubungan antara variasi ion amonium – ion nitrat dengan kadar sterol kultur suspensi <i>Costus speciosus</i>	

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi media Murashige dan Skoog yang dimodifikasi untuk pertumbuhan kultur pucuk, kultur akar, kultur kalus dan kultur suspensi sel <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith.....	85
Lampiran 2. Skema pembuatan media BA ₁ C ₂ kultur pucuk <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith kode F-8.....	86
Lampiran 3. Skema pembuatan media IBA ₃ kultur akar <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith kode F-8	87
Lampiran 4. Skema pembuatan media kultur kalus dan kultur suspensi <i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith	88
Lampiran 5. Skema ekstraksi sapogenin steroid dan sterol.	89
Lampiran 6. Hasil uji anava indeks pertumbuhan pada kultur kalus ...	90
Lampiran 7. Hasil uji anava indeks pertumbuhan pada kultur akar	90
Lampiran 8. Hasil uji anava indeks pertumbuhan pada kultur pucuk.	91
Lampiran 9. Hasil uji anava indeks pertumbuhan pada kultur akar.....	92
Lampiran 10. Hasil uji anava dan uji LSD kadar diosgenin pada kultur pucuk.....	93
Lampiran 11. Hasil uji anava dan uji LSD kadar diosgenin pada kultur akar.....	93
Lampiran 12. Hasil uji anava dan uji LSD kadar sterol pada kultur pucuk.....	94
Lampiran 13. Hasil uji anava dan uji LSD kadar sterol pada kultur Akar.....	94
Lampiran 14. Hasil uji anava dan uji LSD kadar sterol pada kultur Kalus.....	95
Lampiran 15. Hasil uji anava dan uji LSD kadar sterol pada kultur Suspensi.....	95
Lampiran 16. Model persamaan Regresi Indeks Pertumbuhan Kultur Jaringan <i>Costus speciosus</i>	98
Lampiran 17. Model Persamaan Regresi Kadar Fitosteroid Kultur Jaringan <i>Costus speciosus</i>	99
Lampiran 18 Kurva hubungan IP Kultur Pucuk, IP Kultur Akar	101
Lampiran 19. Kurva hubungan IP Kultur Kalus, IP Kultur Suspensi	102
Lampiran 20. Kurva hubungan diosgenin Kultur Pucuk, Kultur Akar	103
Lampiran 21. Kurva hubungan sterol Kultur Pucuk, Kultur Akar	104
Lampiran 22. Kurva hubungan sterol Kultur Kalus, Kultur Suspensi	105

BAB I

PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang Masalah

Pemanfaatan bahan-bahan alam terutama yang berkaitan dengan senyawa-senyawa aktif farmakologik sangat penting. Tanaman menyediakan berbagai bahan alam dengan berbagai struktur kimia dan sederet aktivitas biologi, beberapa di-antaranya dapat digunakan dalam bidang kesehatan. Tanaman mampu untuk mensintesa bahan organik alami dengan struktur yang sangat beragam yang secara umum disebut "metabolit sekunder", walaupun fungsi sebagian besar metabolit sekunder tersebut bagi tanaman sampai saat ini belum jelas, nampak beberapa di- antaranya sangat berguna bagi tumbuhan untuk mempertahankan diri dari serangan atau persaingan dengan organisme lain. Banyak di-antara metabolit sekunder tersebut dapat digunakan sebagai obat - obatan, bahan pemberi aroma alami, zat warna dan getah yang sangat berguna bagi kehidupan manusia (Shetty&Curtis, 1995). Masih banyak senyawa aktif yang diperlukan dengan cara mengekstraksinya dari tanam-tanaman, namun cara tersebut mempunyai beberapa keterbatasan antara lain (Kutney, 1993), senyawa aktif yang diperoleh dari ekstrak tanaman jumlahnya sangat kecil, pemisahan senyawa cukup sulit dan cenderung mahal, kandungan senyawa bervariasi tergantung musim dan waktu pemanenan, terkadang tanaman penghasil hanya tumbuh pada daerah geografi tertentu.

Untuk mengatasi keterbatasan tersebut di-atas penggunaan metode kultur jaringan dari sel tanaman merupakan salah satu alternatif yang sangat prospektif, keunggulan metode kultur sel tanaman (Kutney, 1993)antara lain,

kondisi pertumbuhan dapat dikontrol, sehingga keterulangan hasil lebih terjamin, parameter pertumbuhan seperti pH, nutrisi media, temperatur, cahaya dapat dioptimasi agar dihasilkan produk metabolit yang lebih tinggi dibanding tanamannya.

Pemisahan senyawa target lebih mudah karena berkurangnya kompleksitas ekstrak, dapat diusahakan memperoleh galur sel dengan tingkat produksi yang lebih tinggi.

Seperti diketahui banyak sekali faktor internal dan eksternal yang dapat mempengaruhi pembentukan atau akumulasi suatu metabolit sekunder tertentu pada sel tanaman. Salah satu kendala penyebab keadaan tersebut adalah kurangnya pengetahuan tentang proses biosintesis metabolit sekunder yang terjadi pada sel tanaman (Verpoorte, 1987). Dengan mengetahui aspek regulasi dan mekanisme biosintesis ini secara pasti, diharapkan akan dapat dilakukan manipulasi-manipulasi untuk optimalisasi pembentukan produk sebagaimana dikehendaki.

Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi biosintesis suatu metabolit sekunder pada tanaman antara lain faktor diferensiasi, adanya prekursor, lingkungan, elisitor dan sebagainya.

Diosgenin merupakan senyawa sapogenin steroid dari *Costus speciosus* yang merupakan bahan dasar untuk sintesis obat golongan hormon steroid. Sebagai kandungan utama dalam tanaman Diosgenin terdapat dalam jumlah yang bervariasi tergantung pada spesiesnya. Pada *Costus deistellii* didapat diosgenin 0,5%, *Costus igneus* 0,06%, *Costus lucanusianus* 0,61% dan *Costus speciosus* (Koen) Smith 0,43% (Lambert, 1988).

Bagi sistem kultur tanaman, pada umumnya ion nitrat dan ion amonium merupakan sumber nitrogen yang dibutuhkan. Jumlah maupun rasio kebutuhan sumber nitrogen tersebut berbeda-beda untuk tiap jenis tanaman. Beberapa peneliti melaporkan bahwa pengaruh tersebut lebih dominan terhadap produktivitas metabolit sekunder dibanding terhadap proses pertumbuhannya (Salisbury & Ross, 1992)

Hayashi, et al (1988) melaporkan bahwa produktivitas colchicin pada kultur suspensi *Colchicum autumnale* tertinggi pada posisi rasio ion amonium : nitrat 1:2, sedang pada kultur suspensi *Dioscorea deltoidea* dilaporkan Tal, et al (1982) bahwa rasio untuk pertumbuhan dan produksi diosgenin *Dioscorea deltoidea* masing-masing 1 : 1 dan 2 : 1.

Yamamoto dan Yamada, 1986 melaporkan bahwa rasio optimal ion amonium/nitrat untuk produktivitas reserpin pada kultur suspensi *Rauwolfia serpentina* adalah masing-masing 1 : 3 dan 1 : 11, dilaporkan juga bahwa berat basah kultur berkurang dengan peningkatan konsentrasi ion amonium sampai 100 % ion nitrat pada posisi rasio ion amonium/nitrat 1 : 1, namun pada rasio ion amonium/nitrat 1 : 1 tersebut berat kering mencapai maksimal.

Utami, 1999 melaporkan bahwa kultur pucuk *Solanum laciniatum* dan *Solanum mammosum* yang ditanam pada media yang diberi perlakuan amonium tinggi/amonium + asam amino menunjukkan adanya penurunan pertumbuhan, sedangkan kultur yang ditanam pada media dengan penambahan nitrat tinggi/nitrat + asam amino menunjukkan adanya peningkatan.

Pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* Ait, kadar solasodina tertinggi terdapat pada media tanpa ion nitrat dan kadar terendah pada media dengan rasio ion amonium-nitrat 1 : 2 (Melati, 1999)

Dari beberapa laporan penelitian di-atas, peneliti tertarik untuk mempelajari pengaruh rasio ion amonium-nitrat terhadap pertumbuhan dan kandungan fitosteroid beberapa kultur *Costus speciosus*. Dengan cara ini diharapkan dapat diketahui prekursor sumber nitrogen yang sesuai sehingga kadar fitosteroid yang dikehendaki dapat ditingkatkan secara bermakna.

1.2. Rumusan Masalah

Penelitian ini dirancang untuk menjawab permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah berbagai rasio ion amonium - ion nitrat mampu mempengaruhi pertumbuhan kultur sel jaringan *Costus speciosus*.
2. Apakah berbagai rasio ion amonium - ion nitrat mampu mempengaruhi kandungan steroid dari kultur sel jaringan *Costus speciosus*.

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ion amonium-ion nitrat dalam berbagai rasio terhadap pertumbuhan dan kandungan fitosteroid kultur jaringan *Costus speciosus*.

1.4. Manfaat Penelitian

Dengan mengetahui pengaruh rasio ion amonium-nitrat diharapkan dapat memberikan sumbangan dalam mempelajari faktor-faktor yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan kandungan fitosteroid kultur jaringan *Costus speciosus*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan tentang Tanaman *Costus speciosus*

2.1.1. Klasifikasi dan Deskripsi *Costus speciosus*

Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Monocotyledoneae
Ordo	: Zingiberales
Famili	: Zingiberaceae
Genus	: <i>Costus</i>
Species	: <i>Costus speciosus</i>

Tanaman *Costus speciosus* merupakan tanaman tahunan yang bercabang pada bagian tengah atas batangnya. Tumbuh di atas tanah lembab dan agak teduh, dengan ketinggian 1 – 1200 m dari permukaan laut.

Daun dengan panjang 12 – 34 cm, lebar 4 – 10,5 cm umumnya berbentuk lembing, melebar di bagian tengah, pada permukaan atas daun sering dijumpai bulu halus, tangkai daun pendek (Steenis, 1987)

Bunga terdiri atas serangkaian bunga berwarna putih, berbulu halus dengan daun pelindung bunga sekunder bercelah, runcing dan berwarna merah (Steenis, 1987)

Buah sedikit sampai banyak, panjang hampir sama dengan daun pelindung, letak terbuka, bentuk corong, warna merah serta kulit buah tebal (Steenis, 1987)



Gambar 2.1
Tanaman *Costus speciosus* (Koen) Smith

2.1.2. Kandungan dan Kegunaan Tanaman

Berbeda dengan suku Zingiberaceae lainnya yang umum mengandung minyak atsiri, *Costus speciosus* tidak mengandung minyak atsiri, tetapi mengandung senyawa steroid (Lubis, et al., 1997). Kandungan senyawa steroid diosgenin pada umbi *Costus deistellii* (0,5%), *Costus igneus* (0,66%), *Costus lucavinnus* (0,61%), *Costus speciosus* (0,43%) (Lambert et al., 1988).

Indrayanto *et al* , 1994 melaporkan bahwa pada kultur pucuk *Costus speciosus* ditemukan adanya senyawa sterol dan diosgenin, sedang pada kultur kaulis dan akar tidak dijumpai adanya diosgenin.

Pucuk tanaman *Costus speciosus* mempunyai kegunaan diantaranya untuk diare, obat mata, infus atau dekok daun digunakan untuk turun panas, anti demam terutama demam yang diakibatkan penyakit berat seperti malaria, tipus dan sebagainya (Burkill, 1959 dalam Perhipba, 1988).

Daging rimpang yang masih segar bersifat sebagai pencahar digunakan untuk urus, bahan baku hormon kontrasepsi, rimpangnya mempunyai efek sebagai anti fertilitas dan abortivum (Perhipba, 1988).

2.2. Tinjauan tentang Kultur Jaringan Tanaman

Menurut Heß, kultur jaringan tanaman didefinisikan sebagai kultivasi bagian/organ tanaman yang bebas dari mikroba pada media sintesis yang steril (Indrayanto, 1999) dalam sistem kultur jaringan tanaman, bagian/jaringan tanaman yang akan dikultivasi, dipisahkan dari tanaman asal, dan selanjutnya ditumbuhkan dalam keadaan steril pada suatu media sehingga sel tanaman tersebut mampu tumbuh dan mengadakan pembelahan-pembelahan (Allan, 1991). Bila sel/jaringan/organ ditanam dalam media padat atau statis sebagai eksplant steril akan membelah dan tumbuh menjadi massa sel yang meristematis dan belum terdiferensiasi disebut kultur kalus. Bila kultur kalus dipindahkan ke media cair dan diagitasi dengan kecepatan tertentu akan tumbuh sel-sel tunggal yang disebut kultur suspensi (Bhojwani dan Razdan, 1983).

Pada mulanya sistem kultur jaringan tanaman digunakan untuk menghasilkan tanaman yang bebas, tahan terhadap penyakit, untuk melestarikan

tanaman langka dan untuk memelihara persediaan bibit tanaman. Dalam perkembangan selanjutnya, yaitu sejak tahun 1930, teknik kultur jaringan tanaman mengalami perkembangan yang cukup pesat, yang ditandai dengan munculnya berbagai hasil penelitian yang dapat diaplikasikan pada bidang pertanian (agrobiotechnology) dan farmasi kimia (*Industrial plant cell biotechnology*) (Sardjoko, 1991; Indrayanto, 1999).

Dengan pesatnya kemajuan bioteknologi sel, maka makin dimungkinkan untuk memproduksi metabolit sekunder yang diinginkan dengan sistem kultur jaringan tanaman. Sistem ini dapat memproduksi metabolit sekunder yang secara kualitatif maupun kuantitatif sama, lebih kecil atau berbeda sama sekali dengan yang diproduksi oleh tanaman asalnya (Indrayanto, 1999).

Perkembangan aplikasi teknik kultur jaringan tanaman menurut Indrayanto, 1988; Smith, et.al, 1991; Macek, et.al, 2000; mempunyai beberapa keunggulan sebagai berikut :

- sistem kultur jaringan tanaman merupakan sistem yang terisolasi sehingga faktor-faktor eksternal yang dapat mempengaruhi tanaman dapat dikontrol untuk menghasilkan produk yang diinginkan.
- Kondisi tanaman dalam sistem kultur jaringan tanaman tidak dipengaruhi oleh iklim, hama, penyakit tanaman dan letak geografis.
- Pembudidayaan tanaman dengan sistem kultur jaringan tanaman dapat dilakukan dalam waktu yang relatif singkat dibandingkan dengan pembudidayaan dan mampu menghasilkan produk yang diinginkan dalam jumlah yang relatif besar.

Dalam bidang farmasi dan biokimia, sistem kultur jaringan tanaman dapat dipakai untuk (Heide, 1988; Stepan, 1991)

- Perkembangbiakan tanaman obat secara cepat dan seragam
- Studi jalur biosintesis senyawa kimia alami
- Mencari senyawa kimia baru dengan aktivitas tertentu
- Isolasi senyawa kimia tertentu yang sukar diperoleh dari tanaman yang ditanam secara konvensional
- Biotransformasi senyawa kimia tertentu

Nutrisi yang diperlukan oleh tanaman dalam kultur jaringan tanaman sama dengan yang dibutuhkan tanaman yang tumbuh di alam, namun tanaman pada sistem kultur jaringan tanaman biasanya mempunyai kemampuan yang kurang untuk mensintesis persediaan karbohidrat, vitamin maupun zat pengatur tumbuh, sehingga perlu adanya penambahan senyawa-senyawa tersebut dalam media (Akins, 1985). Komponen nutrisi media kultur jaringan tanaman, pada dasarnya terdiri dari senyawa kimia yang secara alami dibutuhkan bagi kelangsungan hidup tanaman. Kebutuhan tergantung pada jenis dan bagian tanaman yang digunakan (Indrayanto, 1988). Umumnya komposisi media terdiri dari nutrisi anorganik (makroelemen dan mikroelemen), nutrisi organik, fitohormon, vitamin dan air (Bhojwani dan Razdan, 1983; Indrayanto, 1988; Akin, 1985; Dixon, 1985; Gamborg, 1982).

A. Nutrien anorganik terdiri dari :

- makronutrien : K^+ , Na^+ , Cl^- , $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , NO_3^- , SO_4^{2-} , NH_4^+ ,
 Mg^{2+} , Ca^{2+}
- mikronutrien : Al^{3+} , BO_3^{3-} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , I^-

B. Nutrien organik terdiri dari :

- substansi yang merupakan sumber karbon, seperti sukrosa, glukosa, fruktosa dan laktosa

- substansi yang mengandung nitrogen, seperti vitamin, asam amino, kasein hidrolisat, air santan, ekstrak ragi.
- C. Zat pengatur tumbuh :
- golongan auksin
 - golongan sitokinin
 - golongan giberelin
 - golongan inhibitor
- D. Vitamin, digunakan :
- thiamin (B₁)
 - asam nikotinat (niasin)
 - Ca-pantotenat (vitamin B₅)
 - Piridoksin (vitamin B₆)
- E. Air, digunakan aquabidest atau aqua demineralisata

2.3. Produksi Metabolit Sekunder pada Kultur Jaringan

Metabolit sekunder merupakan senyawa yang diproduksi tanaman untuk melindungi dari serangan luar, seperti serangga, bakteri, jamur dan jenis patogen lainnya. Setiap spesies tanaman mempunyai metabolit sekunder spesifik tertentu (Manito, 1981).

Seperti diketahui bahwa tanaman mampu mensintesa senyawa kimia bahan alam yang lebih dikenal dengan istilah metabolit sekunder (Indrayanto, 1999).

Kemampuan suatu tanaman dalam memproduksi metabolit sekunder, dipengaruhi oleh beberapa faktor sebagai berikut : (Indrayanto, 1988)

- Komposisi dan konstituen pada media yang dipakai serta pH media.

- Cahaya dan temperatur ruang kultivasi
- Kecepatan agitasi dan volume kultur suspensi

menurut Shetty & Curtis, 1995 fungsi metabolit sekunder antara lain ;

- Mengatur pertumbuhan dan perkembangan
- Melindungi tanaman terhadap serangan jamur atau bakteri
- Membuat tanaman tidak disukai oleh hewan
- Bereaksi sebagai insektisida
- Membantu proses polinasi (penyerbukan) atau distribusi biji.

Berbagai macam metabolit sekunder dari tanaman pada umumnya digunakan untuk flavor, fragrance, obat-obatan pengawet, pemanis, pestisida dan obat-obatan (shetty & curtis, 1995).

Pada prinsipnya metabolit sekunder dihasilkan seluruh bagian tanaman, baik jaringan yang sudah mengalami diferensiasi maupun yang belum berdiferensiasi (Mantell *et al*, 1985).

Meskipun telah diketahui sel tanaman bersifat totipotensi tidak berarti sistem *in vitro*nya dapat melakukan biosintesis metabolit sekunder seidentik tanaman asalnya (Indrayanto, 1988).

Bila dari suatu eksplan tanaman (obat) tertentu kemudian diinisiasi untuk suatu sistem kultur jaringan tanaman tertentu maka berdasarkan kemampuan *de novo* produksi metabolit sekundernya, sistem kultur jaringan tanaman dapat dibedakan menjadi 3 golongan. Pertama yaitu sistem kultur jaringan tanaman yang mampu memproduksi metabolit sekunder dengan kandungan relatif jauh lebih besar dari kandungan tanaman *in vivo*nya. Kedua ialah sistem kultur jaringan tanaman yang tidak mampu membentuk metabolit sekunder spesifikasinya atau kalau mampu kandungannya relatif kecil dan ketiga sistem

kultur jaringan tanaman yang mampu memproduksi metabolit sekunder yang strukturnya berlainan sama sekali dengan produksi tanaman *in vivo*nya (Indrayanto, 1999)

Berbagai jenis stress bertindak sebagai elisitor pada kultur sel tanaman dalam rangka untuk memperoleh metabolit sekunder yang cukup besar pada sistem KJT tertentu yang dapat mempengaruhi proses akumulasi metabolit sekunder dengan melakukan optimasi pada faktor eksternal seperti komposisi media (sumber karbon, nitrogen, fosfat, fitohormon), stress fisik (cahaya, pH), stress kimia (logam berat, pestisida) dan stress infeksi/patogen (Indrayanto, 1999).

2.4. Tinjauan tentang Sumber Nitrogen

Dalam tanaman nitrogen mempunyai peranan penting, sebagai penyusun asam amino, amida, nukleotida dan nukleoprotein serta esensial dalam proses pembelahan sel untuk pertumbuhan (Gardner, *et al*, 1991).

Nitrogen dijumpai pada berbagai senyawa penyusun tumbuhan, unsur ini biasanya diserap dalam bentuk sangat teroksidasi dan harus direduksi oleh proses yang bergantung pada energi, sebelum bergabung menjadi protein dan senyawa lain dalam sel. Penerapan NO_3^- dan NH_4^+ oleh tumbuhan memungkinkan tumbuhan untuk membentuk senyawa nitrogen terutama protein. Bagi tumbuhan yang tidak dapat menambat N_2 , sumber nitrogen utamanya adalah NO_3^- dan NH_4^+ (Salisbury & Ross, 1992).

NO_3^- merupakan osmotikum yang penting bagi tumbuhan, NO_3^- merupakan sinyal yang merangsang ekspresi gen yang terlibat dalam

penyerapan Nitrogen, asimilasi Nitrogen, metabolisme asam organik dan sintesa amilum (Nicolaus, 2000).

Pemberian NO_3^- bagi tumbuhan akan menyebabkan (mark Stitt, 1999) :

- peningkatan kadar asam amino dan protein
- peningkatan pertumbuhan.
- perubahan pada metabolisme karbon termasuk peningkatan asam organik dan penurunan kadar amilum.
- perubahan kadar fitohormon.
- perubahan pada alokasi dan fenologi termasuk pada penurunan rasio akar-pucuk.
- perubahan pada perkembangan dan pertumbuhan akar.
- penundaan terbentuknya bunga dan inisiasi tuber.

Perubahan sumber Nitrogen dapat meubah keseimbangan hormon dalam cairan xilem, sehingga mempengaruhi pertumbuhan pucuk. Tumbuhan yang mengalami perubahan sumber Nitrogen dari campuran NH_4^+ dan NO_3^- menjadi NH_4^+ akan (Nicolaus, 2000) :

- membentuk daun yang lebih kecil
- mempunyai jumlah sel yang lebih sedikit dibandingkan sebelum perubahan sumber Nitrogen.

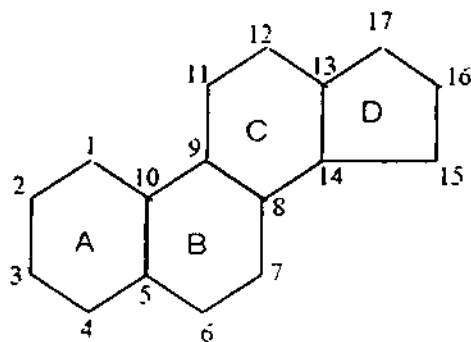
Suplai Nitrogen hanya dalam bentuk NH_4^+ berbahaya bagi sebagian besar tanaman, karena (Nicolaus, 2000) :

- dapat menyebabkan pertumbuhan akar dan pucuk yang jelek
- mengurangi kandungan mineral dibandingkan dengan tumbuhan yang menerima NH_4^+ dan NO_3^- .

2.5. Tinjauan tentang Fitosteroid

Senyawa steroid yang terkandung di dalam tumbuhan termasuk dalam golongan terpenoid, yang berasal dari triterpen sikloartenol (Manitto, 1981).

Steroid merupakan senyawa dengan kerangka dasar C_{17} memiliki kerangka inti siklopentanoperhidro fenantrena dengan 17 buah atom karbon. Pada kerangka inti seringkali terikat gugus metil pada atom C-10 (R1) dan C-13 (R2) serta berbagai rantai samping yang terikat pada atom C-17 (R3) seperti disajikan pada gambar 2.1.



Gambar 2.2. Struktur inti steroid

Dilihat dari asalnya senyawa steroid yang berasal dari tumbuh-tumbuhan dibedakan atas :

- steroid alkohol/sterol (sitosterol, stigmasterol, kampesterol, brassicasterol).
- Sapogenin steroid (diosgenin, sarsapogenin)
- Steroid alkaloid (solasodin, tamatidin). (Manitto, 1981)

Menurut Manito, 1981 senyawa steroid dapat pula dibedakan atas :

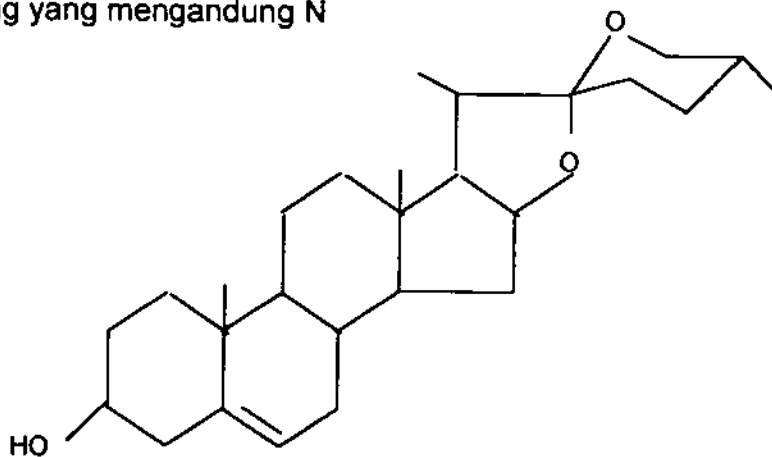
- sterol (ergosterol, stigmasterol, kampesterol, kolesterol)
- Adrenokortikoid (kortison, aldosteron)
- asam-asam empedu (asam kolat, asam litokolat)
- sapogenin (diosgenin, sarsapogenin)

- hormon seks (oesteron, progesteron)
- aglikon kardiak (digitoksigenin, strofantidin)

Sapogenin steroid

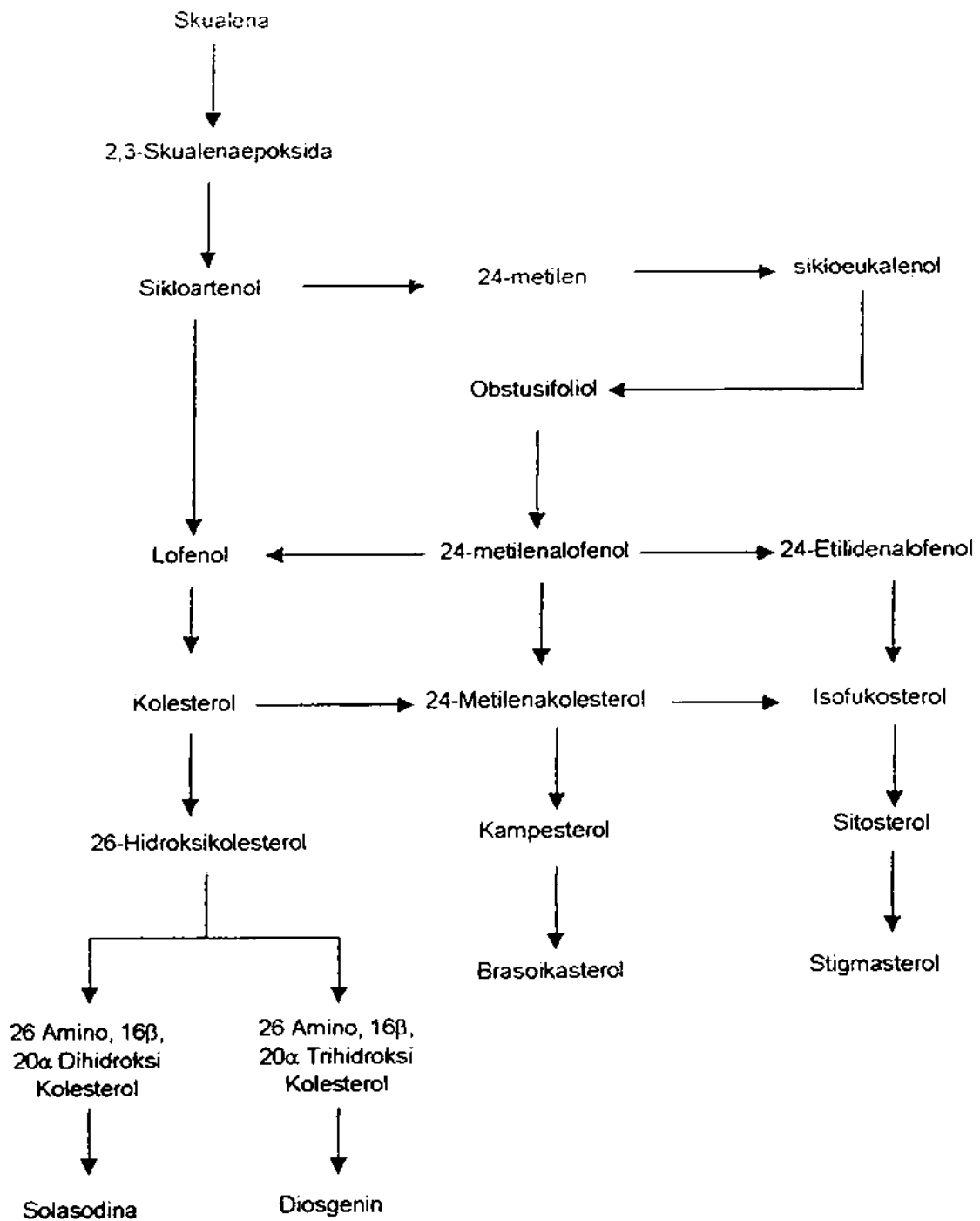
Dalam tanaman sapogenin steroid terdapat dalam bentuk glikosida. Glikosida saponin akan menghasilkan aglikon. Hidrolisis terhadap glikosida tersebut menghasilkan diosgenin sebagai aglikon dan gula bebas yang biasanya berupa ramnosa atau metil pentosa. Ikatan antara diosgenin dengan senyawa gula terletak pada cabang dari atom C – 3 melalui gugus hidroksil.

Secara umum sapogenin steroid dibagi berdasarkan ada tidaknya cabang yang mengandung N



Gambar 2.3 Struktur Diosgenin

Skema jalur biosintesa diosgenin yang dimulai dari bentuk skualene, membentuk kolesterol dan setelah melalui beberapa tahap kemudian terbentuk diosgenin dapat dilihat pada gambar 2.4.



Gambar 2.4. Perubahan Skualen menjadi Diosgenin

(Indrayanto, 1983)

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual

Penjagaan atau pemeliharaan dari kultur tanaman tergantung pada penyediaan nutrisi yang tepat, termasuk faktor pertumbuhan dan kontrol steril lingkungan. Walaupun sel tidak berhenti berdiferensiasi, mengandung semua informasi genetik yang terdapat pada tanaman utuh. Dengan memanipulasi yang sesuai dari hormon dalam medium adalah memungkinkan untuk permulaan perkembangan akar, tunas, pucuk dan tanaman lengkap dari kultur sel kalus dan untuk mendorong pembelahan sel dalam kultur suspensi (Trease, 1987).

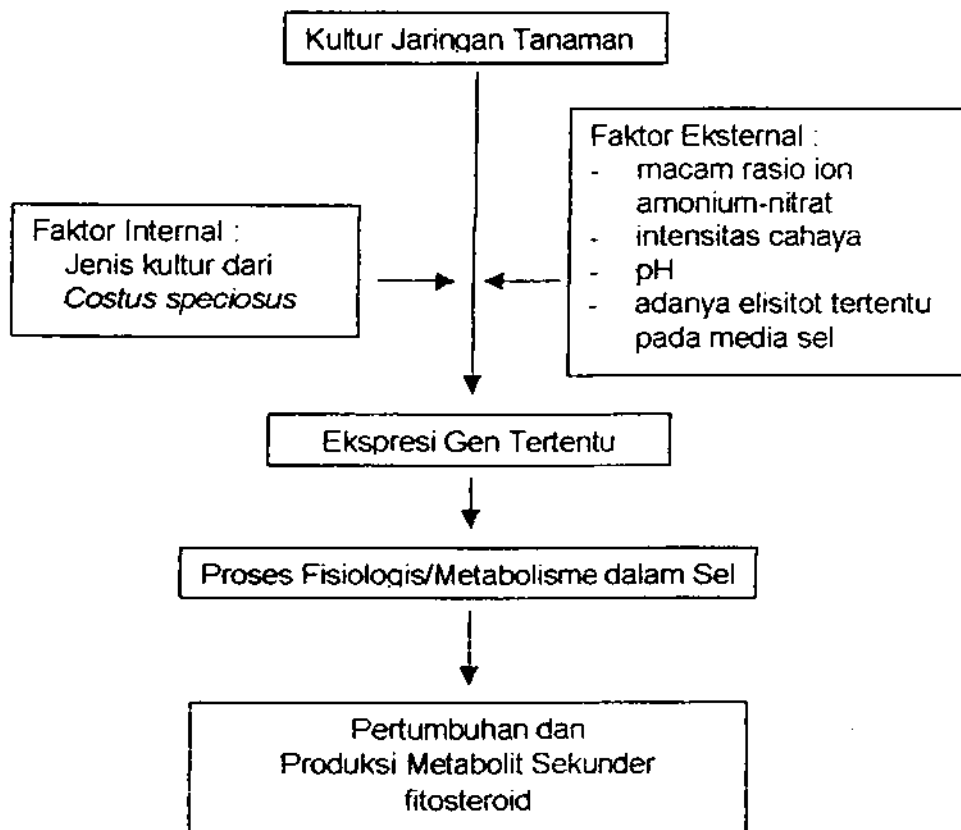
Produksi senyawa kimia berupa metabolit sekunder pada tanaman akan terbentuk jika sel tanaman mengalami gangguan yang disebut fitoaleksin (Herbert, 1989). Metabolit sekunder banyak dimanfaatkan manusia sebagai obat-obatan, insektisida, zat warna dan bahan lain yang sangat berguna bagi kehidupan manusia (Indrayanto, 1999).

Semakin besar kebutuhan manusia akan senyawa tersebut maka diperlukan jumlah yang memadai dengan cara produksi yang seefisien mungkin (Pezzuto, 1993).

Sebagai langkah awal untuk dapat memproduksi secara optimal metabolit sekunder yang bermanfaat dalam bidang farmasi diperlukan pengetahuan mengenai faktor-faktor yang mempengaruhi proses pertumbuhan secara rinci. Faktor-faktor tersebut dapat berupa faktor internal dan faktor eksternal. Faktor

internal meliputi jenis tanaman jenis sel dan jenis organ sedang faktor eksternal antara lain berupa komposisi media (sumber karbon, nitrogen, fosfat, dll), intensitas cahaya yang dipakai, penambahan elisitor tertentu pada media (Indrayanto, 1999).

Dalam pembentukan metabolit sekunder tanaman membutuhkan sumber nitrogen, disamping kebutuhan akan unsur-unsur makro yang lain, seperti oksigen, hidrogen dan karbon. Sumber nitrogen biasanya berupa ion amonium dan ion nitrat. Umumnya tanaman mengambil nitrogen dalam bentuk ion nitrat, sedang ion amonium harus mengalami oksidasi terlebih dahulu menjadi nitrat sebelum diambil oleh sel tanaman (Salisbury and Ross, 1992).



Gambar 3.1. Skema Kerangka Konseptual

3.2. Hipotesis Penelitian

Berbagai rasio ion amonium-nitrat akan mempengaruhi pertumbuhan dan kandungan fitosteroid dari kultur jaringan *Costus speciosus* (Koen) Smith kode F-8.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Bahan

4.1.1. Bahan Tanaman

Bahan penelitian berupa **kultur pucuk, kultur akar, kultur kalus dan kultur suspensi sel *Costus speciosus*** yang diinisiasi dari kultur *Costus speciosus* (Koen) Smith dengan kode F-8 yang diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

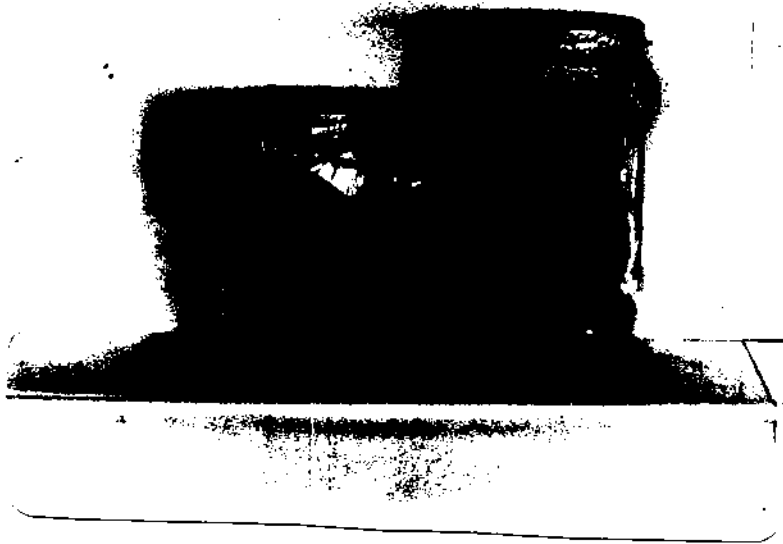
4.1.2. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan buatan E. Merck, Darmstadt dengan derajat kemurnian pro analisis, kecuali dinyatakan lain.

4.1.3. Media Penelitian

Media sub kultivasi yang digunakan adalah media Murashige dan Skoog (1962), terdiri dari makroelemen, mikroelemen, vitamin, asam amino dan hormon pertumbuhan yang dimodifikasi untuk masing-masing kultur *Costus speciosus* dengan penambahan :

- Benzyl adenin 1mg/l dan kasein hidrolisat 2g/l untuk **kultur pucuk *Costus speciosus***
- Indol asam butirat 3mg/l, untuk **kultur akar *Costus speciosus***
- Kinetin 2mg/l dan 2,4D 0,5mg/l untuk **kultur suspensi sel *Costus speciosus***



Gambar 4.1 Kultur pucuk *Costus speciosus* (Koen) Smith

4.3.3. Percobaan kultivasi pucuk *Costus speciosus*

4.3.3.1. Kultivasi pucuk

Kultur pucuk *Costus speciosus* yang diperoleh dari perbanyakan melalui sub kultur ditanam pada media perlakuan dengan berbagai kombinasi, masing-masing botol ditanam sebanyak lebih kurang 1 – 1,5 g, diinkubasi dalam ruang kultur dengan suhu 25°C selama 4 minggu.

4.3.3.2. Pemanenan Kultur Pucuk

Kultur pucuk yang telah ditanam selama 4 minggu pada media percobaan dipanen dan dibersihkan dari sisa media.

4.3.4. Analisa pertumbuhan kultur pucuk

4.3.4.1. Penentuan kecepatan pertumbuhan

Kultur pucuk yang telah dipanen dan dibersihkan, ditimbang berat basahnya dan kemudian dibagi dengan berat basah awal pada saat kultivasi.

$$IP = \frac{\text{Berat basah kultur (akhir)}}{\text{Berat basah kultur (awal)}}$$

4.3.4.2. Penentuan pH, konduktivitas dan sisa kadar gula pada filtrat

Penentuan pH, konduktivitas dan sisa kadar gula dilakukan untuk mengetahui perubahan parameter tersebut setelah kultur pucuk dikultivasi. Kadar gula diukur dengan menggunakan alat *hand refractometer* seri N-10E, pengukuran pH dengan pH meter Fieser accument model 230A dan konduktivitas diukur dengan alat Fieser conductivity Bridge model 31.

4.3.5. Penyiapan kultur akar

4.3.5.1. Pembuatan media kultur akar

Media yang digunakan untuk kultivasi akar *Costus speciosus*, dimodifikasi dengan penambahan indole butirat acid pada media dasar Murashige dan Skoog. pH larutan diatur pada pH 5,6 – 5,7 dengan penambahan HCl 0,1N atau NaOH 0,1N kemudian diberi penambahan air suling sampai volume yang ditentukan.

Larutan media dituang dalam botol bermulut lebar sebanyak 20 ml. Botol ditutup dengan aluminium foil dan disterilkan dengan *autoclave* 121°C selama 20 menit, kemudian diinkubasi pada ruang kultur yang bersuhu 25°C.

4.3.5.2. Sub kultur akar

Perbanyakan dan pemeliharaan kultur akar dilakukan dengan memindahkan akar dari satu botol ke beberapa botol yang lain yang berisi media segar yang lain, semua pekerjaan dilakukan secara aseptis. Kemudian kultur diletakkan pada *rotary shaker* selama 2 minggu dengan kecepatan 80 rpm dengan intensitas cahaya 1500 lux.



Gambar 4.2. Kultur Akar *Costus speciosus* (Koen) Smith (kode F - 6)

4.3.6. Percobaan kultivasi kultur akar

4.3.6.1. Kultivasi akar

Untuk memperoleh **kultur akar** *Costus speciosus* dalam jumlah yang cukup dilakukan perbanyakan melalui subkultur dengan memindahkan dari satu botol ke botol lain dengan berat 2 – 2,5 g/botol. Ditanam secara aseptis pada media perlakuan, kemudian diinkubasi pada *rotary shaker* dengan kecepatan 80 rpm. pada ruang kultur bersuhu 25°C dengan intensitas cahaya \pm 1500 lux.

4.3.6.2. Pemanenan kultur akar

Kultur yang ditanam pada media perlakuan selama 2 minggu dipanen dengan cara dikeluarkan dari botol, ditimbang dan dikeringkan.

4.3.7. Analisa pertumbuhan kultur akar

4.3.7.1. Penentuan kecepatan pertumbuhan

Parameter kecepatan pertumbuhan dari **kultur akar** *Costus speciosus* dinyatakan dengan menghitung indeks pertumbuhan melalui pembagian bobot akhir dari kultur saat panen dan bobot awal kultur saat penanaman

$$IP = \frac{\text{Berat kultur akhir}}{\text{Berat awal kultur}}$$

4.3.7.2. Penentuan pH, konduktivitas dan sisa kadar gula pada filtrat media

Penentuan pH, konduktivitas dan sisa kadar gula dilakukan untuk mengetahui perubahan parameter tersebut setelah kultur akar dikultivasi. Kadar gula diukur dengan menggunakan alat *hand refractometer* seri N-10E,

pengukuran pH dengan pH meter Fieser accument model 230A dan konduktivitas diukur dengan alat Fieser conductivity Bridge model 31.

4.3.8. Penyiapan kultur kalus *Costus speciosus*

4.3.8.1. Pembuatan media padat

Pada pembuatan media padat yang digunakan untuk kultivasi kalus *Costus speciosus*, diambil volume tertentu dari larutan stok media MS, kemudian ditambahkan 100 mg mioinositol, sukrosa 30g/l dan kasein hidrolisat 1g/l, lalu diencerkan dengan penambahan aquadest sampai volume mencapai \pm 900 ml, kemudian lakukan pengontrolan pH dengan penambahan HCl 0,1N atau NaOH 0,1N hingga pH mencapai 5,6 – 5,7. Setelah itu aquadest ditambahkan lagi hingga tepat 1 l, tambahkan 7 g agar, panaskan sampai larutan jernih, lalu tuangkan ke dalam botol bermulut lebar \pm 12,5 ml/botol, tutup dengan aluminium foil, sterilkan dengan *autoclave* selama 20 menit dengan temperatur 121°C.

4.3.8.2. Sub kultur kalus

Perbanyakan dan pemeliharaan kultur kalus *Costus speciosus* dilakukan secara aseptis dengan memindahkan kalus yang berumur 2 – 3 minggu ke botol lain dengan media yang masih segar, dari satu botol kalus dapat dipindahkan menjadi 2 atau 3 botol kalus. Kemudian kalus yang baru diinkubasi dalam ruang kultur bersuhu 25°C.



Gambar 4.3. Kultur kalus *Costus speciosus* (Koer) Smith (kode F - 3)

4.3.9. Percobaan kultivasi kultur kalus *Costus speciosus*

4.3.9.1. Kultivasi kalus

Kultivasi kalus *Costus speciosus* yang diperoleh dari perbanyakan melalui sub kultur, ditanam pada media perlakuan dengan berbagai kombinasi amonium-nitrat masing-masing botol ditanam sebanyak $\pm 1 - 1,5$ g, diinkubasi dalam ruang kultur suhu 25°C selama 3 minggu.

4.3.9.2. Pemanenan kultur kalus

Kultur kalus yang telah ditanam pada media perlakuan selama 3 minggu dipanen dengan cara dikeluarkan dari botol dan dibersihkan dari sisa media agar yang menempel, kemudian ditimbang dan dikeringkan.

4.3.10. Analisa pertumbuhan kultur kalus

4.3.10.1. Penentuan kecepatan pertumbuhan

Parameter kecepatan pertumbuhan dari kultur kalus *Costus speciosus* dinyatakan dengan menghitung indeks pertumbuhan kalus melalui pembagian bobot akhir dari kultur saat panen dengan bobot awal kultur kalus saat tanam.

$$IP = \frac{\text{Berat kultur akhir}}{\text{Berat awal kultur}}$$

4.3.10.2. Penentuan pH, konduktivitas dan sisa kadar gula pada filtrat media

Penentuan pH, konduktivitas dan sisa kadar gula dilakukan untuk mengetahui perubahan parameter tersebut setelah kultur kalus dikultivasi. Kadar gula diukur dengan menggunakan alat *hand refractometer* seri N-10E, pengukuran pH dengan pH meter Fieser accument model 230A dan konduktivitas diukur dengan alat Fieser conductivity Bridge model 31.

4.3.11. Penyiapan kultur suspensi sel *Costus speciosus*

4.3.11.1. Pembuatan media cair suspensi

Media yang digunakan untuk kultur suspensi sel *Costus speciosus* adalah media MS yang dimodifikasikan dengan penambahan mioinositol 100 mg, sukrosa 30 g dan kasein hidrolisat 1 g, selanjutnya ditambahkan aquadest

hingga volume mencapai \pm 900 ml pengukuran pH diatur agar mencapai 5,6 – 5,7 dengan penambahan HCl 0,1N atau NaOH 0,1N, lakukan pengukuran konduktivitas. Larutan aquadest ditambahkan hingga mencapai 1000 ml dan dilakukan pembagian ke dalam 20 erlenmeyer, tiap erlenmeyer berisi 50 ml media suspensi. Tutup rapat dengan aluminium foil dan disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 20 menit. Sebelum digunakan media steril disimpan dalam ruang kultur dengan suhu 25°C.

4.3.11.2. Sub kultur suspensi sel

Kultur suspensi sel yang digunakan untuk penelitian diperoleh dari hasil sub kultur yaitu suspensi sel dari satu erlenmeyer kultur dipindahkan ke dalam beberapa erlenmeyer berisi media baru, semua pekerjaan dilakukan secara aseptis. Kemudian erlenmeyer diletakkan pada rotary shaker dengan putaran \pm 100 rpm dalam ruang kultur, sub kultur suspensi sel dilakukan satu minggu sekali.



Gambar 4.4. Kultur suspensi *Costus speciosus* (Koen) Smith (kode F - 8)

4.3.12. Percobaan kultivasi suspensi sel *Costus speciosus*

4.3.12.1. Kultivasi suspensi sel

Kultivasi suspensi sel *Costus speciosus* yang diperoleh dari perbanyakan melalui sub kultur, ditanam pada media perlakuan dengan berbagai kombinasi ion amonium-nitrat. Pada masing-masing erlenmeyer ditanam ± 6 g suspensi sel *Costus speciosus*, dan dikultivasi pada rotary shaker ± 100 rpm, suhu 25°C dengan pencahayaan ± 1500 lux dalam ruang kultur selama 14 hari.

4.3.12.2. Pemanenan kultur suspensi sel

Pemanenan kultur suspensi sel *Costus speciosus* dilakukan setelah kultur berumur 14 hari dengan cara menyaring sel suspensi tersebut agar biomassa sel terpisah dari filtrat media kemudian sel dibilas dengan aquadest, hasil biomassa ditimbang dan dikeringkan dibawah lampu dengan suhu $\pm 40 - 50^{\circ}\text{C}$.

4.3.13. Analisa pertumbuhan kultur suspensi

4.3.13.1. Penentuan % *Packed Cell Volume* (%PCV)

- erlenmeyer berisi suspensi sel *Costus speciosus* dikocok hingga homogen, isi dituang kedalam gelas ukur 100 ml
- ditunggu selama 20 menit, dan dicatat volume endapan dan volume suspensi total
- PCV dapat dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ PCV} = \frac{\text{Volume endapan sel}}{\text{Volume suspensi total}} \times 100 \%$$

4.3.13.2. Penentuan indeks pertumbuhan

Indeks pertumbuhan dihitung dengan cara membagi berat basah sel dengan berat basah awal saat kultivasi

$$\text{IP} = \frac{\text{Berat kultur akhir}}{\text{Berat awal kultur}}$$

4.3.13.3. Penentuan pH, konduktivitas dan sisa kadar gula filtrat media.

Penentuan pH konduktivitas dan sisa kadar gula dilakukan untuk mengetahui perubahan parameter tersebut setelah kultur suspensi dikultivasi. Kadar gula diukur dengan menggunakan alat *hand refractometer* seri N-10E, pengukuran pH dengan pH meter Fieser accument model 230A dan konduktivitas diukur dengan alat Fieser conductivity Bridge model 31.

4.3.14. Pengeringan dan Penetapan susut kering

Masing-masing kultur setelah pemanenan dikumpulkan dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan atau dengan pemanasan pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$. Untuk keperluan ekstraksi, biomassa yang sudah kering diserbuk dengan cara digerus, sampai didapat biomassa kering yang homogen. Untuk penetapan susut kering, serbuk ditimbang 100 mg (berat awal) pada krus porselin, kemudian dikeringkan dalam oven pada temperaturus $103 - 105^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit. Setelah itu dimasukkan kedalam eksikator selama 20 menit dan ditimbang berat kering akhir.

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{Berat kering akhir} - \text{berat awal}}{\text{Berat awal}} \times 100\%$$

4.3.15. Ekstraksi dan analisis zat kandungan

4.3.15.1. Ekstraksi sapogenin steroid dan sterol

Ekstraksi sapogenin steroid dan sterol dilakukan sesuai prosedur dari Indrayanto (1994). 0,5 g serbuk kering ditimbang teliti, diekstraksi dengan 8 ml kloroform masing-masing selama 10 menit sebanyak 4 kali menggunakan

ultrasonik dan vorteks secara bergantian. Filtrat dikumpulkan, lalu diuapkan pada suhu kamar sampai kering, fraksi ini disebut fraksi kloroform.

Residu kemudian dihidrolisis dengan 10 ml HCl 2N dalam air pada suhu 100°C selama 2 jam. Setelah dingin ditambah dengan NaOH 10N sampai Ph 10 dan diekstraksi dengan 8 ml kloroform menggunakan vorteks selama 10 menit. Masing-masing dilakukan 4 kali. Selanjutnya lapisan kloroform dipisahkan, dikumpulkan dan diuapkan pada suhu kamar sampai kering. Fraksi ini disebut fraksi hidrolisat.

Filtrat dari fraksi kloroform maupun fraksi hidrolisat yang telah dikeringkan masing-masing diencerkan dengan 2 ml kloroform, larutan tersebut kemudian dibagi 4 bagian masing-masing 0,5 ml dan siap dianalisa.

4.3.15.2. Analisis Kuantitatif Sapogenin steroid secara Densitometri.

Analisis kuantitatif dilakukan sesuai prosedur yang telah dilakukan oleh Indrayanto et al (1994) dengan menggunakan :

Alat	: TLC – S Shimadzu CS – 930
Fasa diam	: Lempeng kieselgel 60 F ₂₅₄
Fasa gerak	: Kloroform : etilasetat (4:1)
Pembanding	: Diosgenin
Penampak noda	: Anisaldehida H ₂ SO ₄

Penetapan kadar sapogenin steroid / diosgenin dilakukan dengan cara densitometri, yaitu filtrat hasil ekstraksi dan zat pembanding (diosgenin) ditotolkan pada lempeng Kieselgel 60 F₂₅₄ sebagai fase diam dan dieluasi dengan campuran eluen kloroform :etilasetat (4 : 1) sebagai fase gerak. Setelah itu lempeng dikeringkan di udara terbuka, temperatur kamar, semprot dengan

penampak noda anisaldehyda sulfat. Selanjutnya dipanaskan dalam oven 100°C selama 5 menit dan kemurnian tiap noda diuji dengan menggunakan spektra refleksitansi absorbansi maksimum pada 430 nm.

Penetapan kadar sampel ditentukan dengan cara intrapolasi luas area noda sampel kedalam persamaan garis regresi kurva baku diosgenin sebagai standar eksternal yang dibuat pada lempeng yang sama.

4.3.15.3. Analisis Kuantitatif Sterol secara Densitometri

Filtrat hasil ekstraksi dari fraksi kloroform dan zat pembanding kolesterol ditotolkan pada lempeng kieselgel 60 F₂₅₄ untuk menganalisa sterol bebas, sedang filtrat hasil ekstraksi dari fraksi hidrolisat dan zat pembanding kolesterol ditotolkan pada lempeng Kieselgel 60 F₂₅₄ untuk menganalisa sterol terikat. Hasil totolan pada lempeng Kieselgel dari fraksi kloroform dan fraksi hidrolisat sebagai fase diam, dieluasi dengan campuran eluen kloroform : etil asetat dengan perbandingan 4 : 1, satu kali eluasi sebagai fasa gerak. Setelah itu lempeng dikeringkan di udara terbuka, temperatur kamar, semprot dengan penampak noda anisaldehyda sulfat. Selanjutnya dipanaskan dalam oven 100 °C selama 5 menit dan kemurnian tiap noda diuji dengan menggunakan spektra refleksitansi absorbansi 370 – 700 nm. Penetapan kadar sampel ditentukan dengan cara intrapolasi luas area noda sampel ke dalam persamaan garis regresi kurva baku sterol sebagai standar eksternal yang dibuat pada lempeng yang sama.

4.3.15.4. Perhitungan Kadar Sampel

Perhitungan kadar sampel dari sapogenin steroid (Diosgenin), kadar sampel sterol bebas dan kadar sampel sterol terikat mempergunakan rumus :

$$KS = \frac{\frac{V}{V_p} \times K_n}{B} \times \frac{100\%}{(100\% - KA)} \quad \mu\text{g / g BK}$$

Keterangan : KS = kadar sampel ($\mu\text{g/g BK}$)

V = volume chloroform untuk melarutkan ekstrak (ml)

V_p = volume penotolan (μl)

B = berat sampel yang diekstraksi (g)

K_n = konsentrasi noda sampel (μl)

KA = kadar air (%)

BK = berat kering

4.3.16. Analisis Data

Data hasil penelitian yang diperoleh, dianalisa dengan menggunakan "Fixed Effect Model" dengan rancangan rambang iugas (one way anava) dimana model ini bertujuan untuk membandingkan efek perlakuan yang berbeda pada kelompok yang pada awalnya sama.

Jika dalam perhitungan Anava diperoleh harga F hitung > F tabel, dengan $\alpha = 0,05$ maka H₀ ditolak dan H_a diterima, begitu juga sebaliknya. Jika H_a diterima berarti ada perbedaan bermakna antar perlakuan atau antar kelompok perlakuan.

Untuk mengetahui perlakuan atau kelompok perlakuan yang berbeda perlu dilakukan pengujian lebih lanjut dengan menggunakan satu dari uji LSD.

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Pengamatan Parameter Pertumbuhan Kultur Jaringan Sel *Costus speciosus*

Parameter pertumbuhan yang diamati pada penelitian ini, masing-masing meliputi :

1. Pengamatan Indeks Pertumbuhan, pH, % Brix pada **kultur pucuk dan kultur akar *Costus speciosus***.
2. Pengamatan Indeks Pertumbuhan **kultur Kalus**
3. Pengamatan Indeks Pertumbuhan, pH, % Brix, dan % PCV **kultur suspensi *Costus speciosus***.

Rata-rata hasil pengamatan parameter pertumbuhan pada kultur jaringan *Costus speciosus* akibat pemberian ion Amonium, ion Nitrat dalam berbagai variasi konsentrasi disajikan pada tabel 5.1., 5.2., 5.3., 5.4

5.1.1. Pengamatan Parameter Pertumbuhan Kultur Pucuk *Costus speciosus*

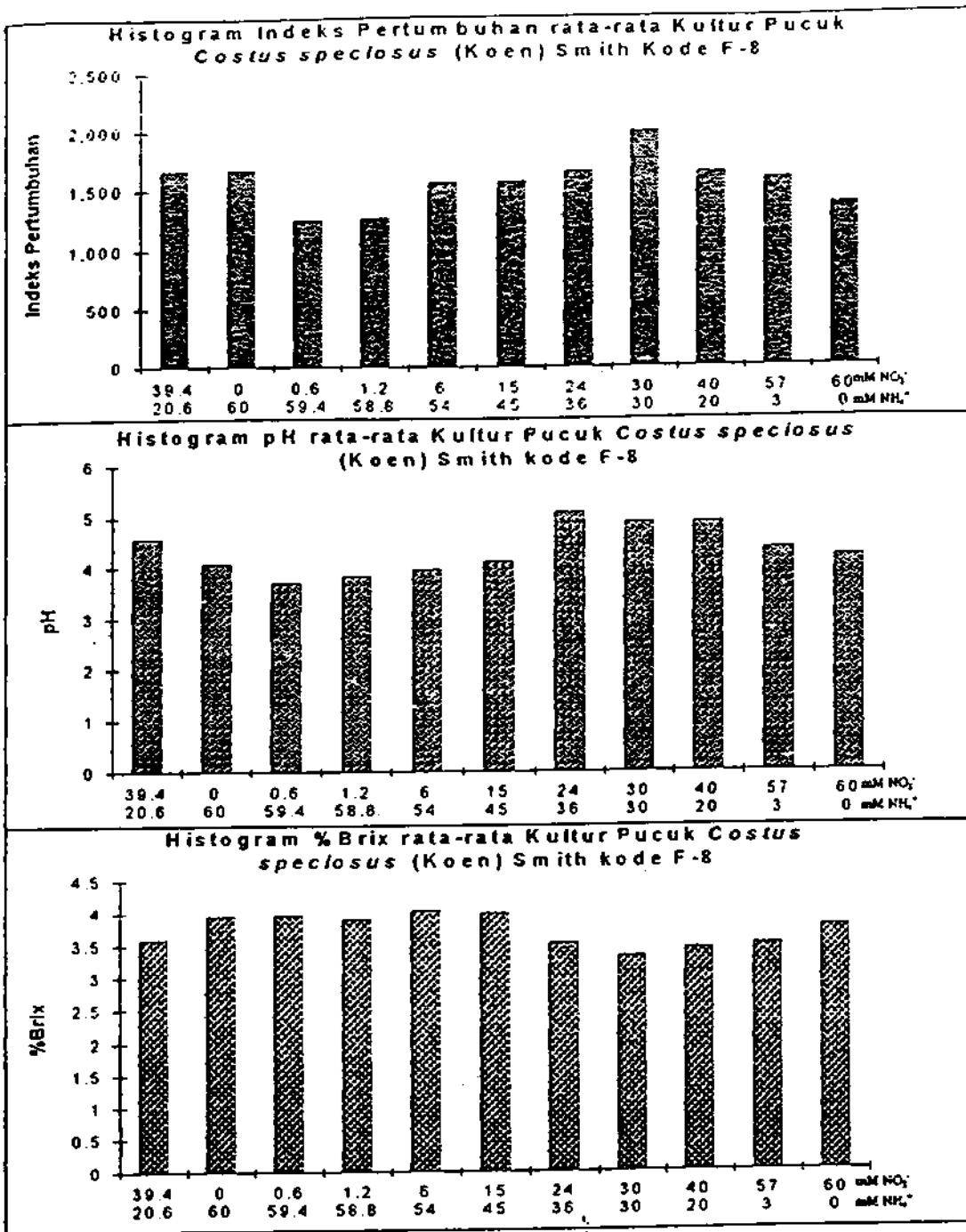
Kode F – 8.

Tabel 5.1. Rata-rata \pm SD parameter pertumbuhan kultur pucuk *Costus speciosus* (IP, pH, % Brix) dari berbagai rasio ion Amonium, ion Nitrat pada media percobaan.

Kode Media	Konsentrasi		Rasio $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$	IP ($x \pm \text{SD}$) n = 12	pH ($x \pm \text{SD}$) n = 12	%Brix ($x \pm \text{SD}$) n = 12
	NH_4^+ (mM)	NO_3^- (mM)				
MS	20,6	39,4	1 : 2	$1,669 \pm 0,24$	$4,58 \pm 0,09$	$3,58 \pm 0,21$
A	60,0	0	∞	$1,673 \pm 0,14$	$4,09 \pm 0,09$	$3,95 \pm 0,12$
AN-1	59,4	0,6	99 : 1	$1,250 \pm 0,13$	$3,71 \pm 0,05$	$3,97 \pm 0,08$
AN-2	58,8	1,2	49 : 1	$1,263 \pm 0,15$	$3,84 \pm 0,05$	$3,90 \pm 0,10$
AN-3	54,0	6,0	9 : 1	$1,554 \pm 0,14$	$3,98 \pm 0,04$	$4,04 \pm 0,08$
AN-4	45,0	15,0	3 : 1	$1,566 \pm 0,25$	$4,12 \pm 0,04$	$4,00 \pm 0,00$
AN-5	36,0	24,0	1,5 : 1	$1,647 \pm 0,19$	$5,08 \pm 0,09$	$3,52 \pm 0,04$
AN-6	30,0	30,0	1 : 1	$1,982 \pm 0,24$	$4,87 \pm 0,09$	$3,32 \pm 0,11$
AN-7	20,0	40,0	1 : 2	$1,636 \pm 0,19$	$4,87 \pm 0,07$	$3,44 \pm 0,10$
AN-8	3,0	57,0	1 : 19	$1,586 \pm 0,14$	$4,35 \pm 0,09$	$3,49 \pm 0,07$
N	0	60,0	0	$1,378 \pm 0,13$	$4,22 \pm 0,15$	$3,78 \pm 0,03$

Keterangan tabel 5.1. :

- IP = indeks pertumbuhan, perbandingan bobot akhir kultur pucuk *Costus speciosus* pada saat panen terhadap bobot awal kultur pada saat penanaman.
- x = rata - rata indeks pertumbuhan, %Briks dan pH.
- MS = Media kontrol Murashige - Skoog
- A = Amonium
- AN = Amonium dan Nitrat dalam berbagai rasio
- N = Nitrat



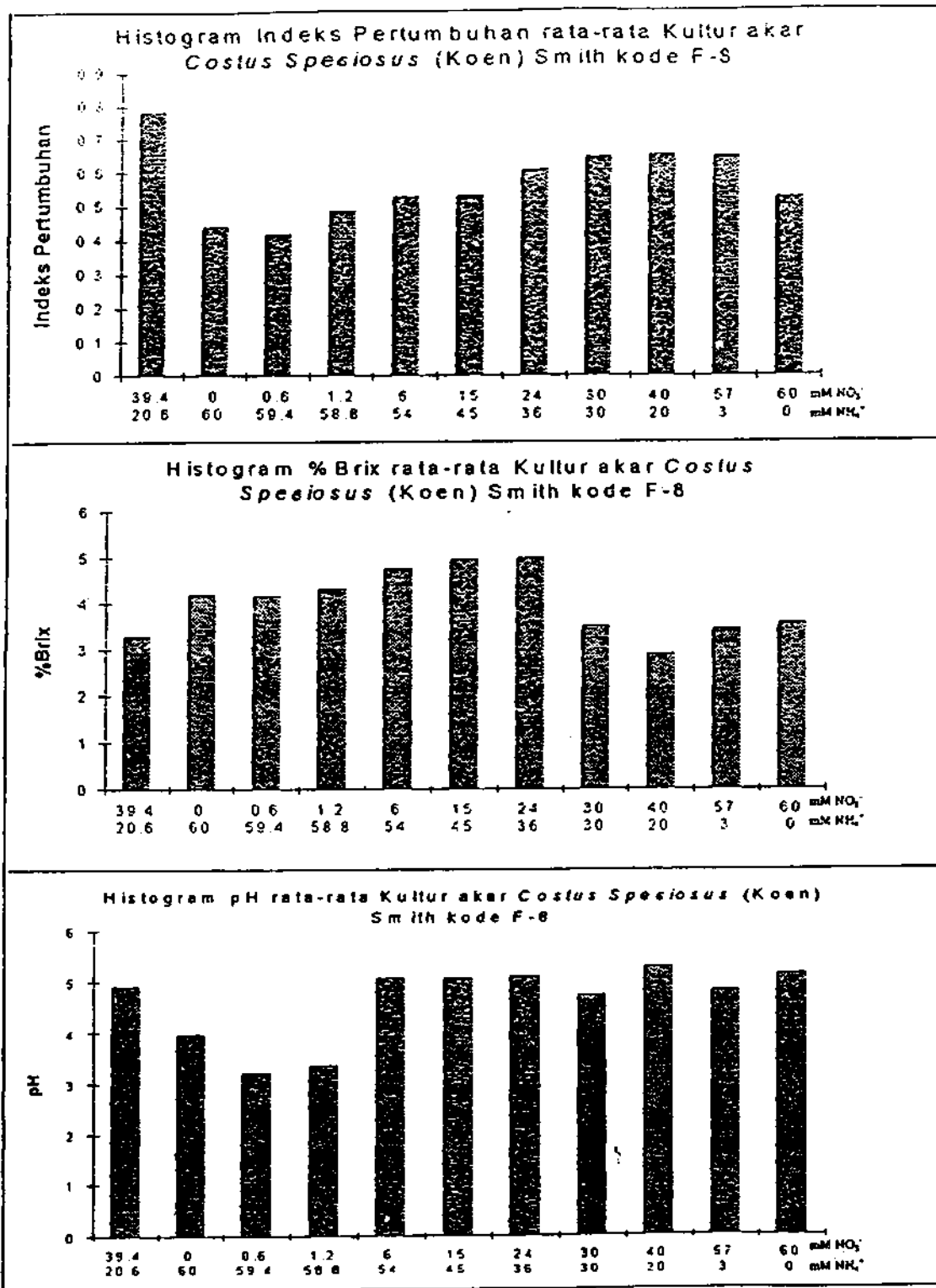
Gambar 5.1. Histogram parameter pertumbuhan kultur pucuk *Costus speciosus* (IP, pH, % Brix) dari berbagai rasio ion Amonium, ion Nitrat.

5.1.2. Pengamatan Parameter Pertumbuhan Kultur Akar *Costus speciosus*

Kode F – 8.

Tabel 5.2. Rata-rata \pm SD parameter pertumbuhan kultur akar *Costus speciosus* (IP, pH, % Brix) dari berbagai rasio ion Amonium, ion Nitrat pada media percobaan.

Kode Media	Konsentrasi		Rasio $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$	IP ($x \pm \text{SD}$) n = 12	pH ($x \pm \text{SD}$) n = 12	%Brix ($x \pm \text{SD}$) n = 12
	NH_4^+ (mM)	NO_3^- (mM)				
MS	20,6	39,4	1 : 2	0,785 \pm 0,03	4,90 \pm 0,31	3,30 \pm 0,23
A	60,0	0	∞	0,441 \pm 0,03	3,97 \pm 0,14	4,20 \pm 0,15
AN-1	59,4	0,6	99 : 1	0,418 \pm 0,04	3,21 \pm 0,13	4,19 \pm 0,13
AN-2	58,8	1,2	49 : 1	0,487 \pm 0,05	3,36 \pm 0,05	4,33 \pm 0,11
AN-3	54,0	6,0	9 : 1	0,527 \pm 0,04	5,07 \pm 0,10	4,77 \pm 0,37
AN-4	45,0	15,0	3 : 1	0,531 \pm 0,03	5,07 \pm 0,08	4,97 \pm 0,09
AN-5	36,0	24,0	1,5 : 1	0,605 \pm 0,02	5,11 \pm 0,09	4,99 \pm 0,11
AN-6	30,0	30,0	1 : 1	0,643 \pm 0,06	4,74 \pm 0,13	3,53 \pm 0,19
AN-7	20,0	40,0	1 : 2	0,652 \pm 0,13	5,29 \pm 0,19	2,91 \pm 0,11
AN-8	3,0	57,0	1 : 19	0,649 \pm 0,06	4,81 \pm 0,14	3,45 \pm 0,29
N	0	60,0	0	0,526 \pm 0,05	5,13 \pm 0,89	3,59 \pm 0,20



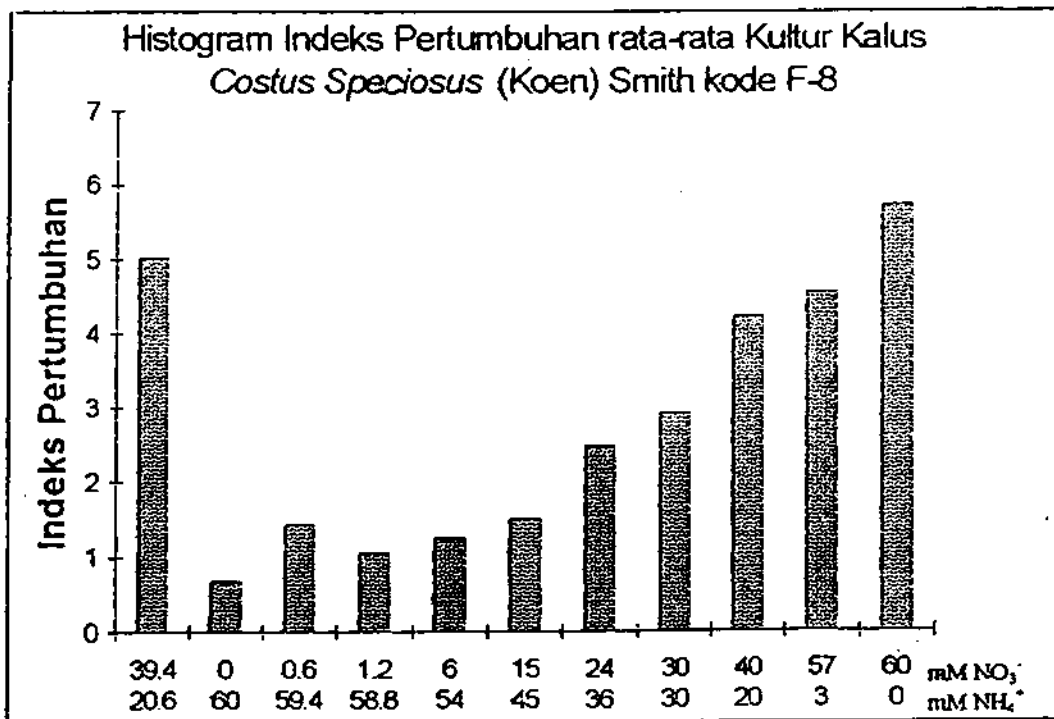
Gambar 5.2. Histogram parameter pertumbuhan kultur akar *Costus speciosus*(IP, pH, % Brix) dari berbagai rasio ion Amonium, ion Nitrat.

5.1.3. Pengamatan Kecepatan Pertumbuhan Kultur Kalus *Costus speciosus*

Kode F-8.

Tabel 5.3. Rata-rata \pm SD indeks pertumbuhan kultur kalus *Costus speciosus*(IP) dari berbagai rasio ion Amonium, ion Nitrat pada media percobaan.

Kode Media	Konsentrasi		Rasio $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$	IP ($\bar{x} \pm \text{SD}$) $n = 12$
	NH_4^+ (mM)	NO_3^- (mM)		
MS	20,6	39,4	1 : 2	5,028 \pm 1,74
A	60,0	0	∞	0,671 \pm 0,03
AN-1	59,4	0,6	99 : 1	1,430 \pm 0,14
AN-2	58,8	1,2	49 : 1	1,068 \pm 0,08
AN-3	54,0	6,0	9 : 1	1,242 \pm 0,13
AN-4	45,0	15,0	3 : 1	1,499 \pm 0,15
AN-5	36,0	24,0	1,5 : 1	2,487 \pm 0,25
AN-6	30,0	30,0	1 : 1	2,923 \pm 0,29
AN-7	20,0	40,0	1 : 2	4,229 \pm 0,58
AN-8	3,0	57,0	1 : 19	4,558 \pm 0,36
N	0	60,0	0	5,729 \pm 0,42

Gambar 5.3. Histogram indeks pertumbuhan kultur kalus *Costus speciosus*(IP) dari berbagai rasio ion Amonium, ion Nitrat.

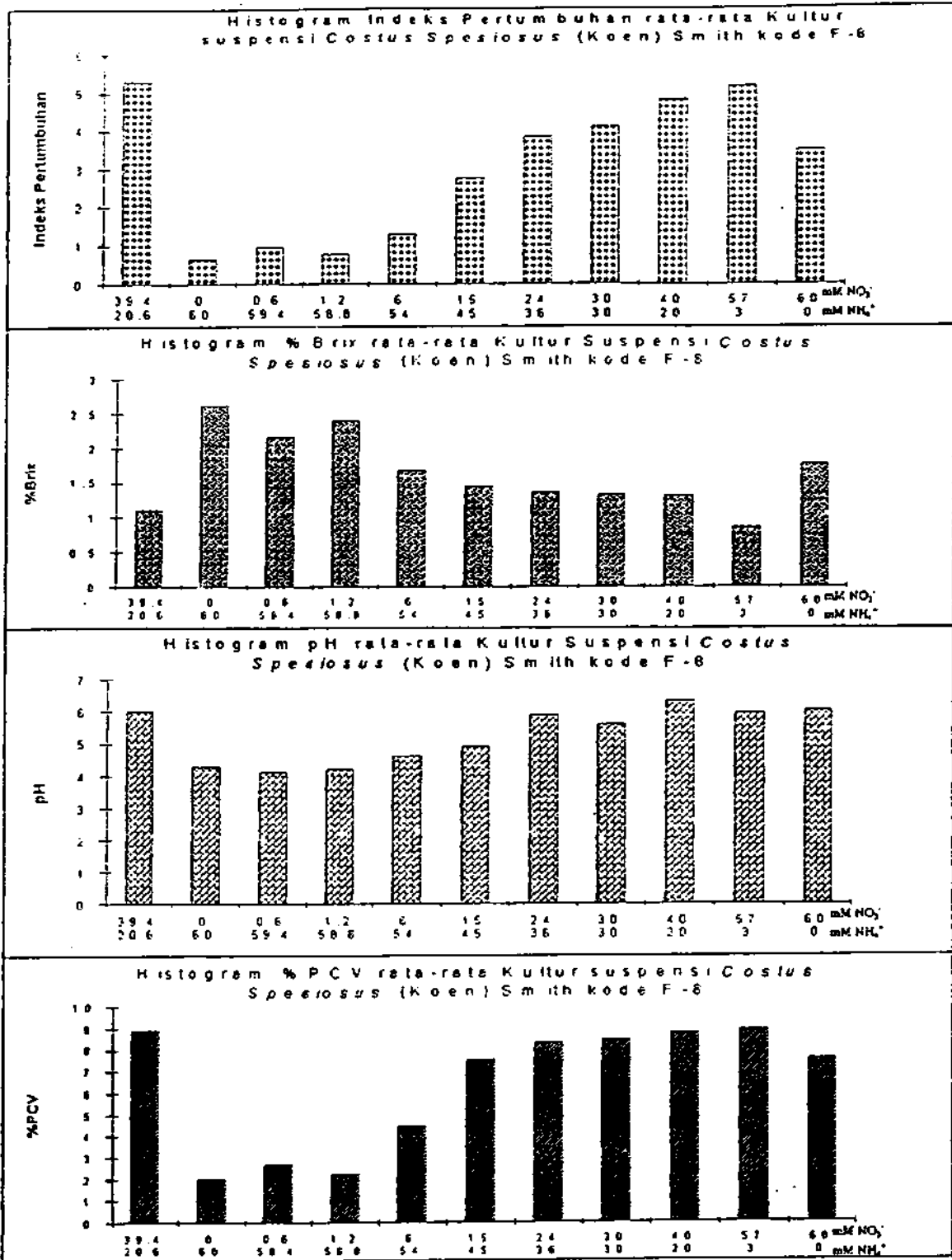
5.1.4. Pengamatan Parameter Pertumbuhan Kultur Suspensi *Costus speciosus* F-8.

Tabel 5.4. Rata-rata \pm SD parameter pertumbuhan kultur suspensi *Costus speciosus* (IP, pH, % Brix, %PCV) dari berbagai rasio ion Amonium, ion Nitrat pada media percobaan.

Kode	Konsentrasi		Rasio NH ₄ ⁺ : NO ₃ ⁻	IP (x \pm SD) n = 12	pH (x \pm SD) n = 12	%Brix (x \pm SD) n = 12	%PCV (x \pm SD) n = 12
	NH ₄ ⁺ (mM)	NO ₃ ⁻ (mM)					
MS	20,6	39,4	1 : 2	5,313 \pm 0,49	6,01 \pm 0,22	1,10 \pm 0,10	8,909 \pm 3,48
A	60,0	0	∞	0,653 \pm 0,07	4,29 \pm 0,07	2,61 \pm 0,09	1,972 \pm 1,11
AN-1	59,4	0,6	99 : 1	0,955 \pm 0,04	4,14 \pm 0,05	2,16 \pm 0,05	2,674 \pm 0,86
AN-2	58,8	1,2	49 : 1	0,779 \pm 0,10	4,23 \pm 0,05	2,40 \pm 0,10	2,211 \pm 0,88
AN-3	54,0	6,0	9 : 1	1,296 \pm 0,11	4,62 \pm 0,08	1,67 \pm 0,13	4,455 \pm 0,83
AN-4	45,0	15,0	3 : 1	2,764 \pm 0,15	4,93 \pm 0,15	1,44 \pm 0,09	7,523 \pm 2,59
AN-5	36,0	24,0	1,5 : 1	3,848 \pm 0,29	5,90 \pm 0,09	1,36 \pm 0,15	8,340 \pm 2,45
AN-6	30,0	30,0	1 : 1	4,117 \pm 0,22	5,61 \pm 0,15	1,32 \pm 0,13	8,455 \pm 3,96
AN-7	20,0	40,0	1 : 2	4,823 \pm 0,49	6,33 \pm 0,11	1,31 \pm 0,11	8,796 \pm 4,39
AN-8	3,0	57,0	1 : 19	5,182 \pm 0,39	5,95 \pm 0,07	0,85 \pm 0,13	8,935 \pm 2,21
N	0	60,0	0	3,490 \pm 0,22	6,02 \pm 0,09	1,76 \pm 0,12	7,579 \pm 8,83

Keterangan tabel 5.4. :

- %PCV = volume endapan biomassa / volume suspensi total kali 100%



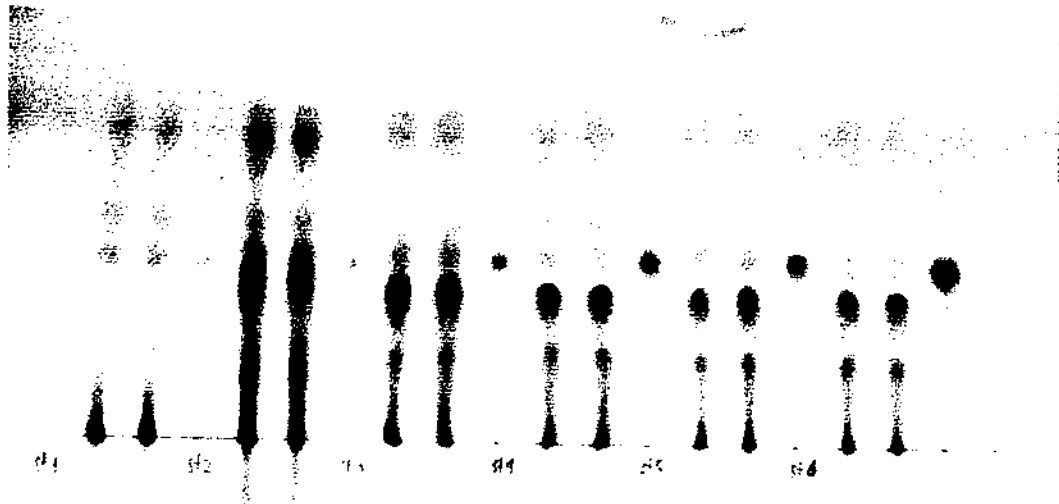
Gambar 5.4. Histogram parameter pertumbuhan kultur suspensi *Costus speciosus* (IP, pH, % Brix dan % PCV) dari berbagai rasio ion Amonium dan ion Nitrat.

5.2. Analisis Kualitatif.

5.2.1. Analisis Kualitatif Fitosteroid dengan Kromatografi Lapis Tipis.

Dari ekstraksi serbuk kering kultur jaringan sel *Costus speciosus* (Koen) Smith kode F – 8 didapat fraksi kloroform dan fraksi hidrolisat kloroform. Dari fraksi hidrolisat kloroform dilakukan analisis kualitatif dengan KLT untuk melihat adanya diosgenin dan sterol terikat, sedangkan dari fraksi kloroform dilakukan analisis kualitatif untuk melihat adanya sterol bebas.

Contoh profil kromatogram KLT dari masing-masing fraksi dapat dilihat pada gambar 5.5. dan 5.6.

Fraksi hidrolisat kloroform.

Gambar 5.5. Profil Kromatogram Fraksi Hidrolisat Kloroform pada Lempeng Kieselgel 60 F₂₅₄ dengan fasa gerak kloroform : etil asetat (4 : 1) Penampak noda = pereaksi Anisaldehyda – as.sulfat
Pembanding = Diosgenin

Keterangan gambar 5.5

D = Standar Diosgenin

A = Sampel **Kultur Pucuk** dengan penambahan ion Amonium tanpa nitrat konsentrasi NH_4^+ 60 mM ,rasio 60 : 0

AN1 = Sampel **Kultur Pucuk** dengan penambahan ion Amonium : ion Nitrat Konsentrasi NH_4^+ 59,4 mM dan NO_3^- 0,6 mM rasio 99 : 1

AN2 = Sampel **Kultur Pucuk** dengan penambahan ion Amonium : ion Nitrat Konsentrasi NH_4^+ 58,8 mM dan NO_3^- 1,2 mM rasio 49 : 1

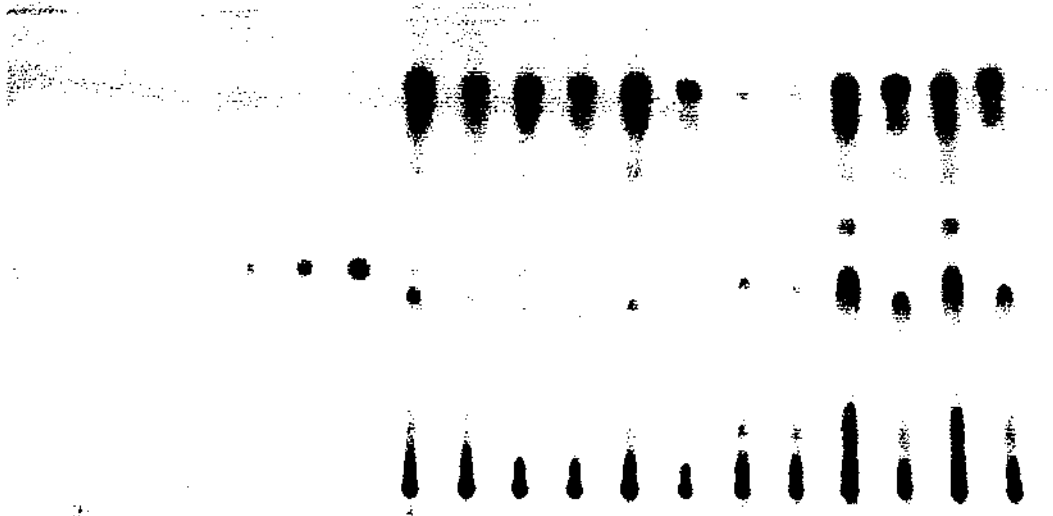
AN3 = Sampel **Kultur Pucuk** dengan penambahan ion Amonium : ion Nitrat Konsentrasi NH_4^+ 54,0 mM dan NO_3^- 6,0 mM rasio 9 : 1

AN4 = Sampel **Kultur Pucuk** dengan penambahan ion Amonium : ion Nitrat Konsentrasi NH_4^+ 45,0 mM dan NO_3^- 15,0 mM rasio 3 : 1

AN5 = Sampel **Kultur Pucuk** dengan penambahan ion Amonium : ion Nitrat Konsentrasi NH_4^+ 36,0 mM dan NO_3^- 24,0 mM rasio 1,5 : 1

AN6 = Sampel **Kultur Pucuk** dengan penambahan ion Amonium : ion Nitrat

Fraksi Hidrolisat Kloroform dan Fraksi Kloroform



Gambar 5.6. Profil Kromatogram Fraksi Hidrolisat Kloroform dan Fraksi kloroform pada Lempeng Kiesegel 60 F₂₅₄ dengan fasa gerak kloroform : etil asetat (4 : 1)
 Penampak noda = pereaksi Anisaldehyda – as.sulfat
 Perbandingan = Sterol (Kholesterol)

Keterangan gambar 5.6.

S = Standar Sterol

AN – 7_p = Sampel kultur pucuk, sterol terikat

AN – 7_A = Sampel kultur akar, sterol terikat

AN – 7_K = Sampel kultur kalus, sterol terikat

AN – 7_S = Sampel kultur suspensi, sterol terikat

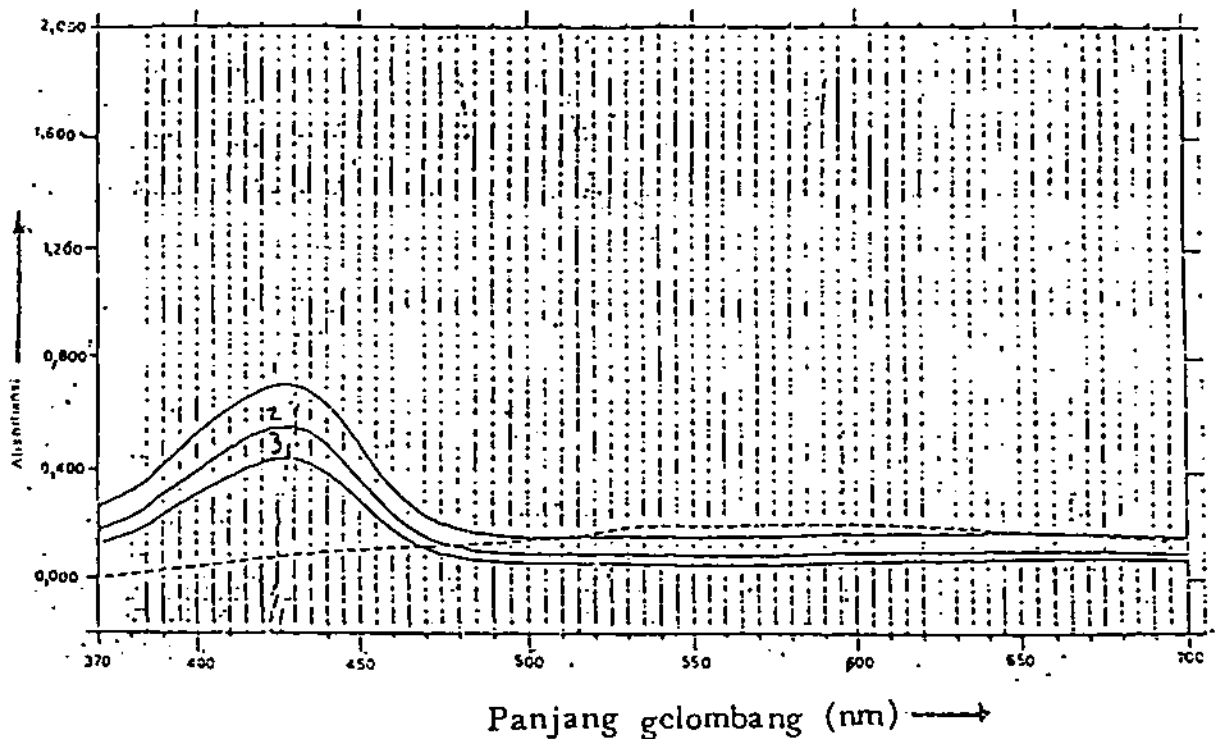
AN – 7 = Sampel kultur pucuk, sterol bebas

AN – 7 = Sampel kultur pucuk, sterol bebas

AN – 7 = Sampel kultur pucuk, sterol bebas

5.2.2. Identifikasi dengan densitometri

Contoh spektra dari perbandingan diosgenin dan sampel fraksi hidrolisat serbuk kering kultur pucuk *Costus speciosus*(Koen) Smith kode F-8 dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 5.7. Contoh spektra absorban reflektan dari perbandingan diosgenin dan fraksi hidrolisat, diukur pada panjang gelombang 370 - 700 nm.

Keterangan :

1. Diosgenin standar
2. Sampel Media ms
3. Sampel perlakuan

5.3. Analisis kuantitatif fitosteroid secara densitometri

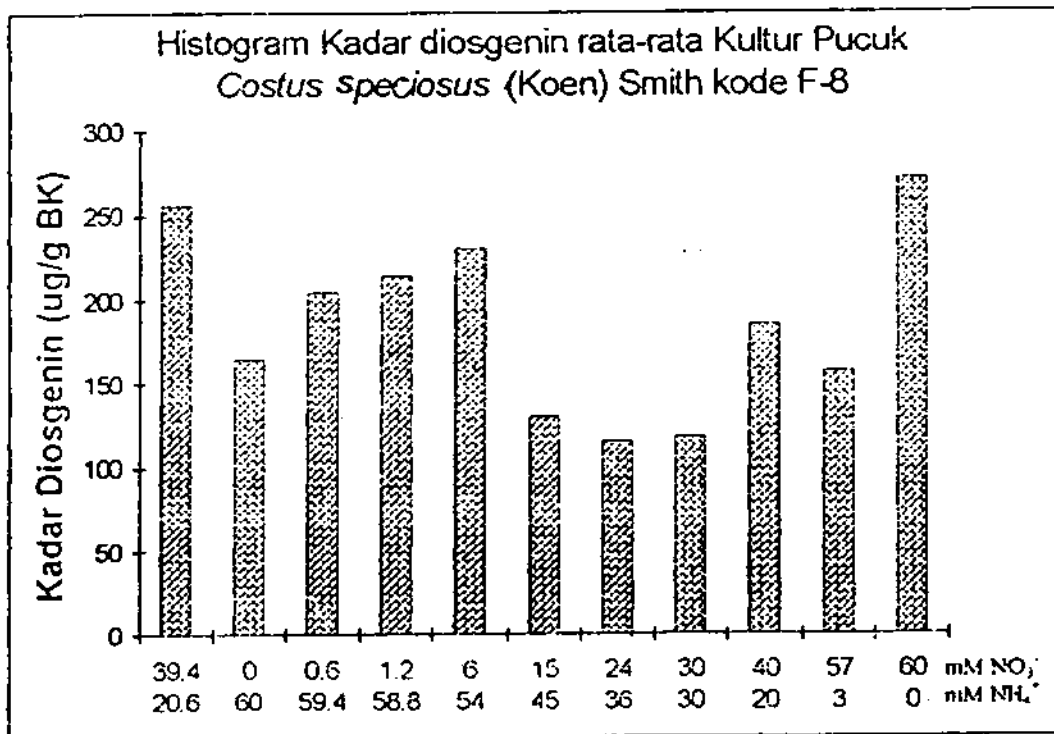
5.3.1. Penentuan kadar diosgenin

Diosgenin dalam fraksi hidrolisat kloroform serbuk kering kultur pucuk dan kultur akar *Costus speciosus*(Koen) Smith (kode F-8) ditentukan kadarnya secara densitometri dengan menggunakan larutan pembanding diosgenin.

Hasil penetapan kadar diosgenin masing - masing perlakuan dapat dilihat pada tabel 5.5. dan tabel 5.6. serta gambar 5.8. dan gambar 5.9.

Tabel 5.5. Kadar diosgenin dari fraksi hidrolisat kloroform serbuk kering kultur pucuk *Costus speciosus*(Koen) Smith (kode F-8) dari berbagai rasio ion amonium dan ion nitrat.

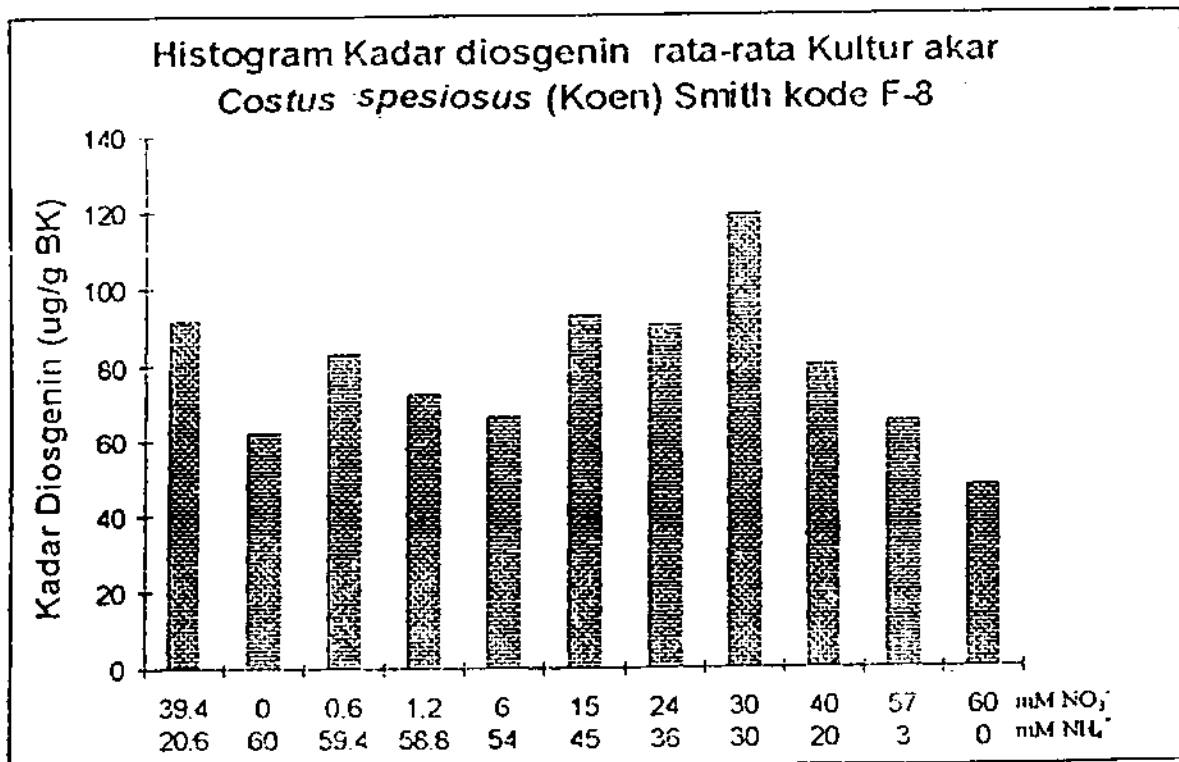
Kode Media	Konsentrasi		Rasio $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$	Kadar diosgenin ($\mu\text{g} / \text{g BK}$) ($\bar{x} \pm \text{SD}$) $n = 2 - 6$
	NH_4^+ (mM)	NO_3^- (mM)		
MS	20,6	39,4	1 : 2	256,14 \pm 1,16
A	60,0	0	∞	164,52 \pm 11,60
AN-1	59,4	0,6	99 : 1	204,11 \pm 4,10
AN-2	58,8	1,2	49 : 1	214,47 \pm 5,81
AN-3	54,0	6,0	9 : 1	230,39 \pm 7,17
AN-4	45,0	15,0	3 : 1	130,28 \pm 1,54
AN-5	36,0	24,0	1,5 : 1	115,57 \pm 2,83
AN-6	30,0	30,0	1 : 1	118,02 \pm 5,37
AN-7	20,0	40,0	1 : 2	184,81 \pm 12,41
AN-8	3,0	57,0	1 : 19	156,77 \pm 8,51
N	0	60,0	0	271,76 \pm 13,54



Gambar 5.8. Histogram kadar diosgenin dalam fraksi hidrolisat kloroform serbuk kering kultur pucuk *Costus speciosus*(Koen) Smith (kode F-8) dari berbagai rasio ion amonium dan ion nitrat.

Tabel 5.6 Kadar diosgenin dari fraksi hidrolisat kloroform serbuk kering kultur akar *Costus speciosus*(Koen) Smith (kode F-8) dari berbagai rasio ion amonium dan ion nitrat

Kode Media	Konsentrasi		Rasio $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$	Kadar diosgenin ($\mu\text{g} / \text{g BK}$) ($\bar{x} \pm \text{SD}$) $n = 2 - 6$
	NH_4^+ (mM)	NO_3^- (mM)		
MS	20,6	39,4	1 : 2	91,50 \pm 4,90
A	60,0	0	∞	62,16 \pm 0,48
AN-1	59,4	0,6	99 : 1	82,85 \pm 2,69
AN-2	58,8	1,2	49 : 1	72,25 \pm 1,69
AN-3	54,0	6,0	9 : 1	66,66 \pm 2,01
AN-4	45,0	15,0	3 : 1	93,05 \pm 2,33
AN-5	36,0	24,0	1,5 : 1	90,32 \pm 1,89
AN-6	30,0	30,0	1 : 1	119,19 \pm 9,16
AN-7	20,0	40,0	1 : 2	79,14 \pm 4,89
AN-8	3,0	57,0	1 : 19	64,80 \pm 0,53
N	0	60,0	0	47,54 \pm 2,78



Gambar 5.9. Histogram kadar diosgenin dalam fraksi hidrolisat kloroform serbuk kering kultur akar *Costus speciosus*(Koen) Smith (kode F-8) dari berbagai rasio ion amonium dan ion nitrat.

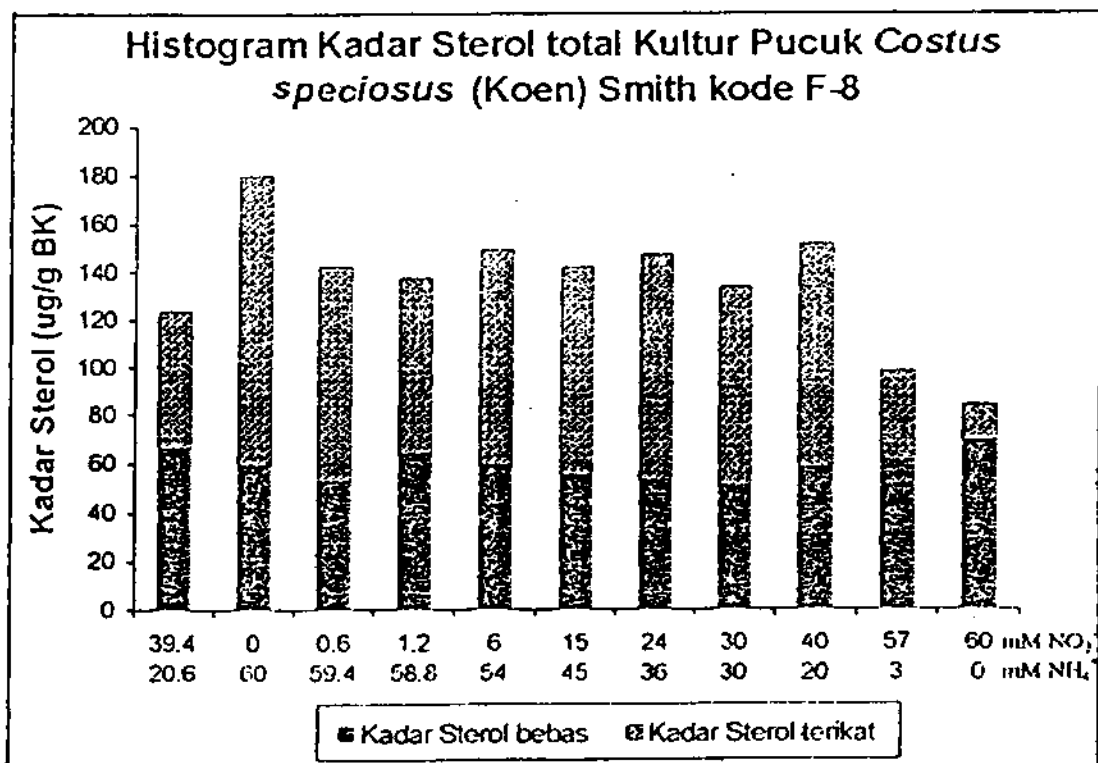
5.3.2. Penentuan kadar sterol total sebagai kolesterol

Senyawa sterol bebas dalam fraksi kloroform dan senyawa sterol terikat dalam fraksi hidrolisat dari serbuk kering kultur akar *Costus speciosus* (Koen) Smith (kode F-8) ditentukan kadarnya secara densitometri dengan menggunakan larutan pembanding kolesterol.

Hasil penetapan kadar sterol total sebagai kolesterol pada masing-masing perlakuan dapat dilihat pada tabel 5.7., 5.8., 5.9., 5.10. dan gambar 5.10., 5.11., 5.12., 5.13.

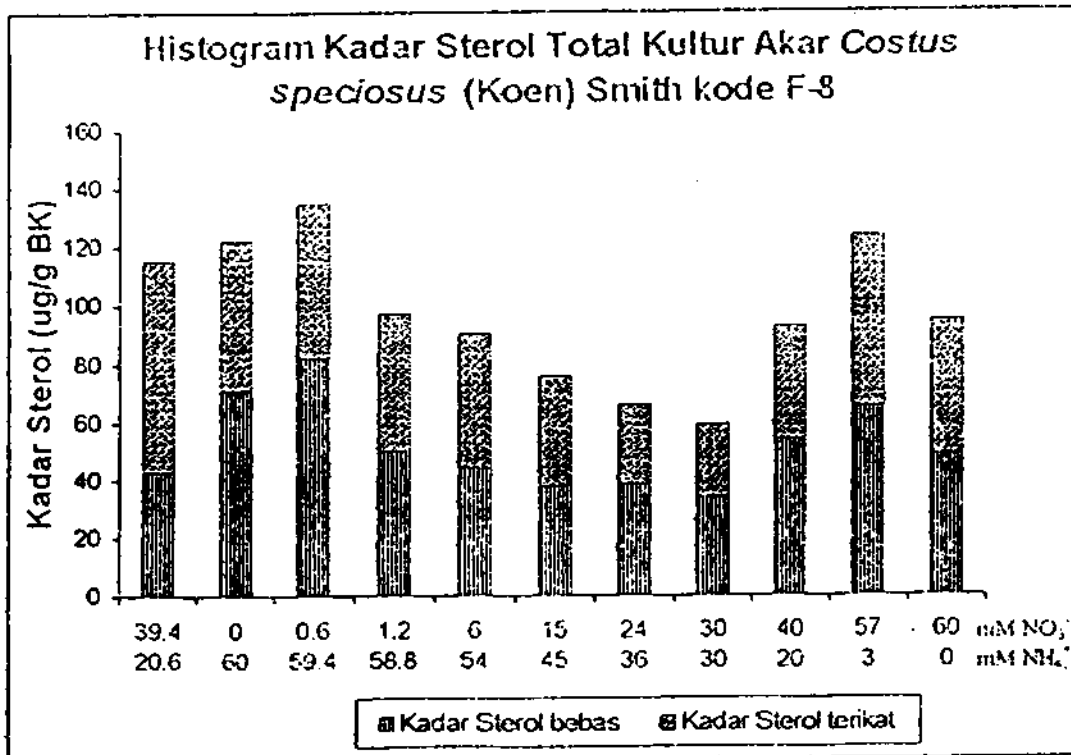
Tabel 5.7. Kadar sterol total sebagai kolesterol dalam serbuk kering kultur pucuk *Costus speciosus*(Koen) Smith (kode F-8)

Kode Media	Konsentrasi		Rasio $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$	Kadar Steroi bebas ($\mu\text{g} / \text{g BK}$) ($x \pm \text{SD}$) $n = 4 - 6$	Kadar Steroi terikat ($\mu\text{g} / \text{g BK}$) ($x \pm \text{SD}$) $n = 4 - 6$	Steroi total
	NH_4^+ (mM)	NO_3^- (mM)				
MS	20,6	39,4	1 : 2	66,82 \pm 0,19	56,62 \pm 4,36	123,44
A	60,0	0	∞	59,57 \pm 8,44	120,27 \pm 1,83	179,84
AN-1	59,4	0,6	99 : 1	52,72 \pm 10,45	89,42 \pm 7,94	142,14
AN-2	58,8	1,2	49 : 1	64,45 \pm 2,24	73,04 \pm 5,23	137,49
AN-3	54,0	6,0	9 : 1	59,66 \pm 1,69	89,19 \pm 5,89	148,85
AN-4	45,0	15,0	3 : 1	55,16 \pm 2,72	86,81 \pm 2,61	141,97
AN-5	36,0	24,0	1,5 : 1	52,92 \pm 5,77	94,14 \pm 1,01	147,06
AN-6	30,0	30,0	1 : 1	50,82 \pm 0,20	82,68 \pm 7,69	133,50
AN-7	20,0	40,0	1 : 2	57,98 \pm 0,83	93,36 \pm 8,54	151,34
AN-8	3,0	57,0	1 : 19	61,43 \pm 6,53	36,89 \pm 3,40	98,32
N	0	60,0	0	69,29 \pm 4,60	14,64 \pm 0,94	83,93

Gambar 5.10. Histogram kadar sterol total kultur pucuk *Costus speciosus*(Koen) Smith (kode F-8) dari berbagai rasio ion Amonium, ion Nitrat

Tabel 5.8. Kadar sterol total sebagai kolesterol dalam serbuk kering kultur akar *Costus speciosus*(Koen) Smith (kode F-8)

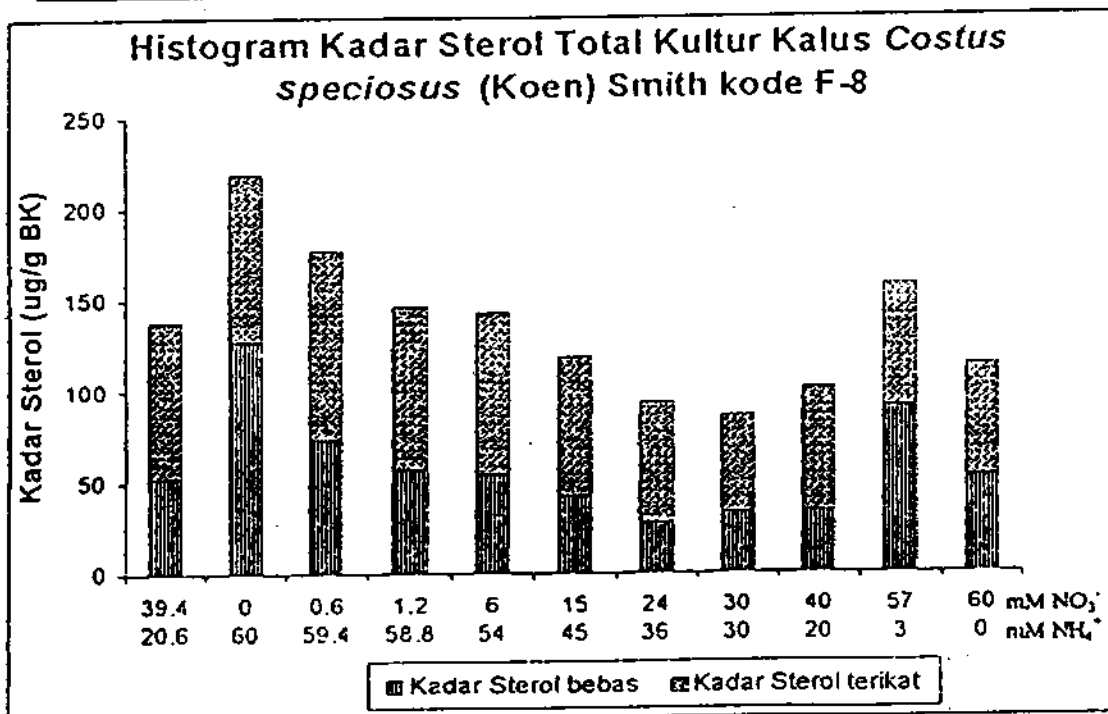
Kode Media	Konsentrasi		Rasio $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$	Kadar Sterol bebas ($\mu\text{g} / \text{g BK}$) ($x \pm \text{SD}$) n = 4	Kadar Sterol terikat ($\mu\text{g} / \text{g BK}$) ($x \pm \text{SD}$) n = 4	Sterol total
	NH_4^+ (mM)	NO_3^- (mM)				
MS	20,6	39,4	1 : 2	43,35 \pm 0,08	72,02 \pm 5,54	115,37
A	60,0	0	∞	70,86 \pm 2,11	51,08 \pm 0,88	121,94
AN-1	59,4	0,6	99 : 1	82,28 \pm 0,71	52,56 \pm 4,37	134,84
AN-2	58,8	1,2	49 : 1	50,32 \pm 5,37	47,08 \pm 0,24	97,40
AN-3	54,0	6,0	9 : 1	44,81 \pm 0,71	45,70 \pm 1,44	80,51
AN-4	45,0	15,0	3 : 1	38,01 \pm 0,46	38,08 \pm 0,01	76,09
AN-5	36,0	24,0	1,5 : 1	38,70 \pm 0,78	27,28 \pm 0,58	65,98
AN-6	30,0	30,0	1 : 1	33,40 \pm 0,83	25,39 \pm 3,55	59,39
AN-7	20,0	40,0	1 : 2	54,24 \pm 1,74	38,39 \pm 1,49	92,63
AN-8	3,0	57,0	1 : 19	65,26 \pm 2,51	58,09 \pm 2,24	123,35
N	0	60,0	0	49,04 \pm 1,79	45,72 \pm 4,36	94,76



Gambar 5.11. Histogram kadar sterol total kultur akar *Costus speciosus*(Koen) Smith (kode F-8) dari berbagai rasio ion Amonium dan ion Nitrat.

Tabel 5.9. Kadar sterol total sebagai kolesterol dalam serbuk kering kultur kalus *Costus speciosus*(Koen) Smith (kode F-8)

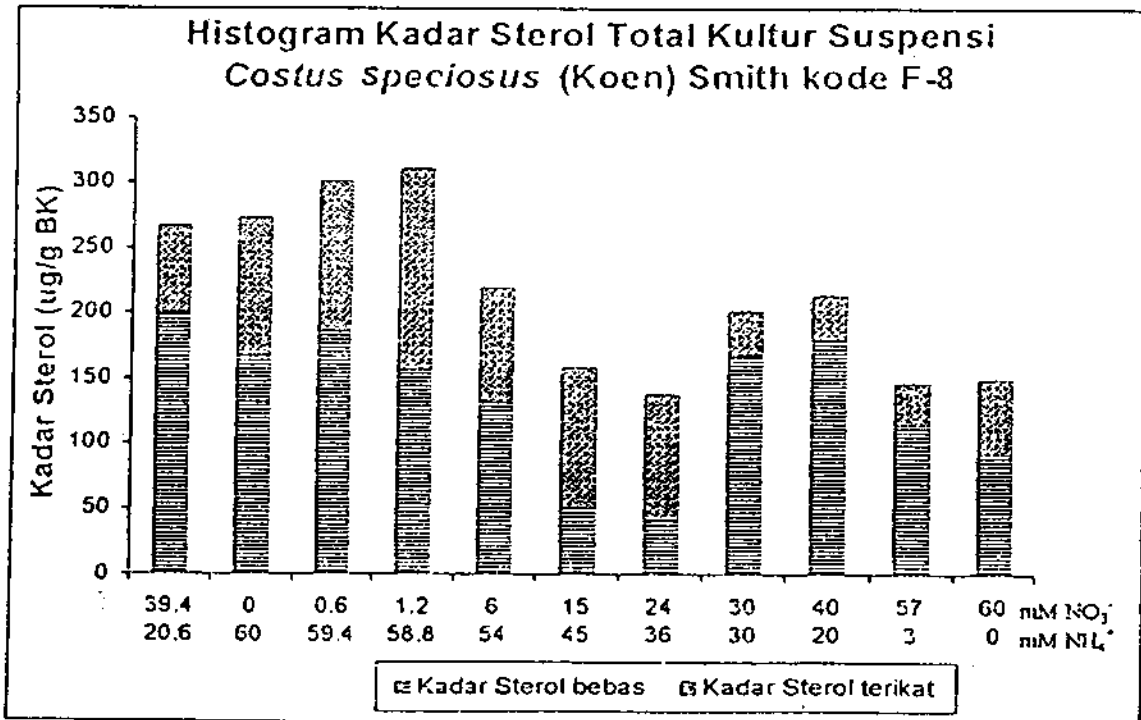
Kode Media	Konsentrasi		Rasio $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$	Kadar Sterol bebas ($\mu\text{g} / \text{g BK}$) ($x \pm \text{SD}$) $n = 4 - 8$	Kadar Sterol terikat ($\mu\text{g} / \text{g BK}$) ($x \pm \text{SD}$) $n = 4 - 8$	Sterol total
	NH_4^+ (mM)	NO_3^- (mM)				
MS	20,6	39,4	1 : 2	52,94 \pm 3,67	84,92 \pm 4,10	137,86
A	60,0	0	∞	126,91 \pm 8,13	103,09 \pm 4,50	230,00
AN-1	59,4	0,6	99 : 1	73,48 \pm 3,50	92,23 \pm 3,47	165,71
AN-2	58,8	1,2	49 : 1	57,57 \pm 0,75	88,53 \pm 2,99	146,10
AN-3	54,0	6,0	9 : 1	54,69 \pm 1,99	88,60 \pm 3,28	143,29
AN-4	45,0	15,0	3 : 1	42,64 \pm 3,91	75,94 \pm 4,43	118,58
AN-5	36,0	24,0	1,5 : 1	27,59 \pm 7,65	65,47 \pm 2,94	93,06
AN-6	30,0	30,0	1 : 1	33,12 \pm 5,98	52,82 \pm 0,70	85,94
AN-7	20,0	40,0	1 : 2	34,14 \pm 5,97	66,92 \pm 4,14	101,06
AN-8	3,0	57,0	1 : 19	91,02 \pm 1,38	66,80 \pm 3,97	157,82
N	0	60,0	0	52,58 \pm 5,59	61,33 \pm 2,66	113,91



Gambar 5.12. Histogram kadar sterol total kultur kalus *Costus speciosus*(Koen) Smith (kode F-8) dari berbagai rasio ion Amonium, ion Nitrat.

Tabel 5.10. Kadar sterol total sebagai kolesterol dalam serbuk kering kultur suspensi *Costus speciosus* Koen) Smith (kode F-8)

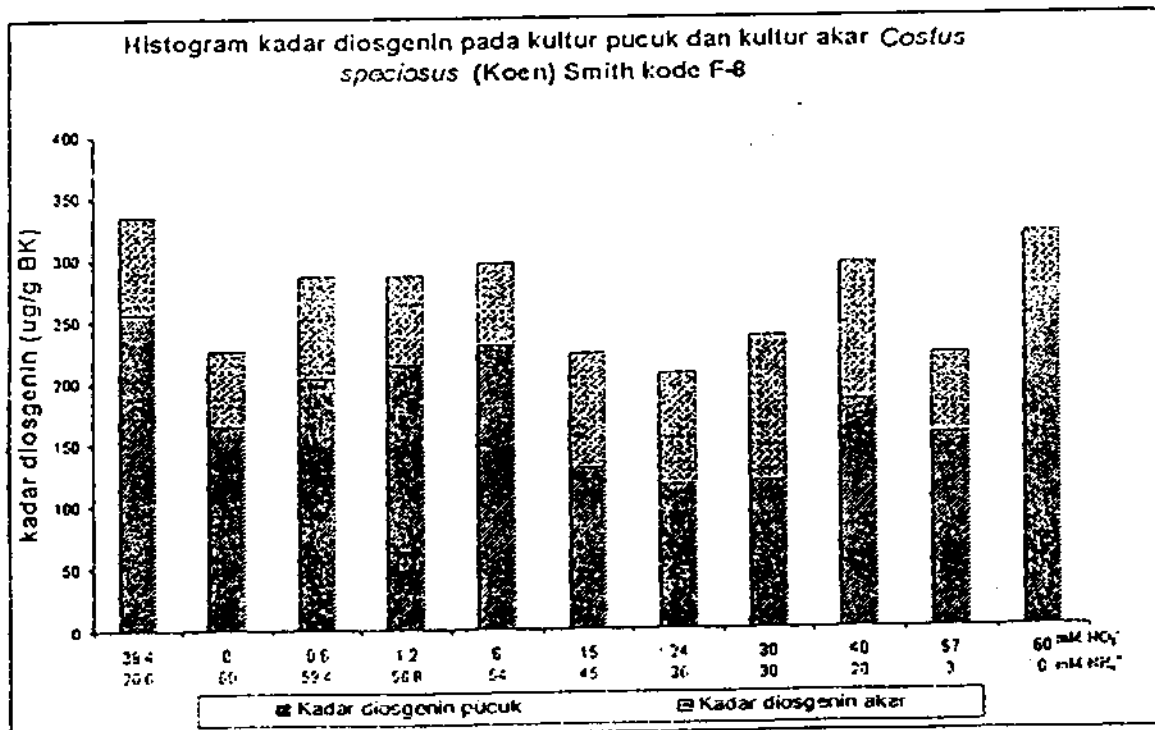
Kode Media	Konsentrasi		Rasio $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$		Kadar Sterol bebas ($\mu\text{g} / \text{g BK}$) ($x \pm \text{SD}$) $n = 4 - 8$	Kadar Sterol terikat ($\mu\text{g} / \text{g BK}$) ($x \pm \text{SD}$) $n = 4 - 8$	Sterol total
	NH_4^+ (mM)	NO_3^- (mM)					
MS	20,6	39,4	1	2	200,71 \pm 7,40	66,65 \pm 3,30	267,36
A	60,0	0	∞		167,10 \pm 5,17	105,15 \pm 3,55	272,25
AN-1	59,4	0,6	99	1	185,23 \pm 7,77	115,16 \pm 10,52	300,39
AN-2	58,8	1,2	49	1	155,54 \pm 1,01	154,90 \pm 2,41	310,44
AN-3	54,0	6,0	9	1	132,64 \pm 7,53	87,12 \pm 1,32	219,76
AN-4	45,0	15,0	3	1	50,50 \pm 8,39	108,27 \pm 2,37	158,77
AN-5	36,0	24,0	1,5	1	42,46 \pm 1,71	95,45 \pm 2,35	137,91
AN-6	30,0	30,0	1	1	168,06 \pm 0,96	34,14 \pm 3,71	202,22
AN-7	20,0	40,0	1	2	180,03 \pm 2,66	33,97 \pm 1,01	214,00
AN-8	3,0	57,0	1	19	114,10 \pm 3,47	32,10 \pm 6,56	146,20
N	0	60,0	0		92,02 \pm 1,67	57,58 \pm 4,26	149,60



Gambar 5.13. Histogram kadar sterol total kultur suspensi *Costus speciosus* (Koen) Smith (kode F-8) dari berbagai rasio ion Amonium, ion Nitrat

Tabel 5.11. Kadar diosgenin dari fraksi hidrolisat kloroform serbuk kering kultur pucuk dan kultur akar *Costus speciosus* (Koen) Smith (kode F-8) dari berbagai rasio ion amonium dan ion nitrat.

Kode Media	Konsentrasi		Rasio $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$	Kadar diosgenin Pada kultur akar ($\mu\text{g} / \text{g BK}$) ($x \pm \text{SD}$) $n = 2 - 6$	Kadar diosgenin pada kultur pucuk ($\mu\text{g} / \text{g BK}$) ($x \pm \text{SD}$) $n = 2 - 6$
	NH_4^+ (mM)	NO_3^- (mM)			
MS	20,6	39,4	1 : 2	91,50 \pm 4,90	256,13 \pm 1,16
A	60,0	0	∞	62,16 \pm 0,48	164,52 \pm 11,60
AN-1	59,4	0,6	99 : 1	82,85 \pm 2,69	204,10 \pm 4,10
AN-2	58,8	1,2	49 : 1	72,25 \pm 1,69	214,47 \pm 5,81
AN-3	54,0	6,0	9 : 1	66,65 \pm 2,01	230,38 \pm 7,17
AN-4	45,0	15,0	3 : 1	93,05 \pm 2,33	130,28 \pm 1,54
AN-5	36,0	24,0	1,5 : 1	90,31 \pm 1,89	115,57 \pm 2,83
AN-6	30,0	30,0	1 : 1	119,19 \pm 9,16	118,02 \pm 5,37
AN-7	20,0	40,0	1 : 2	79,13 \pm 4,89	184,81 \pm 12,41
AN-8	3,0	57,0	1 : 19	64,79 \pm 0,53	156,76 \pm 8,51
N	0	60,0	0	47,53 \pm 2,78	271,76 \pm 13,54



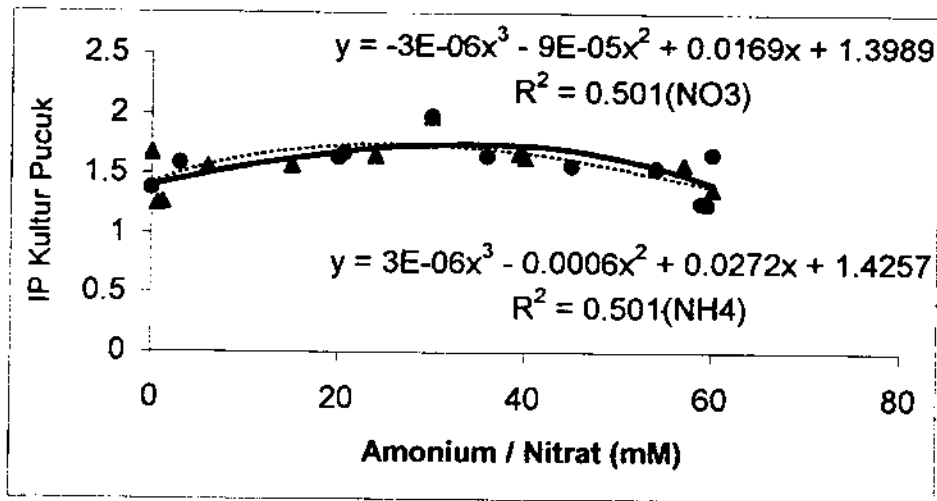
Gambar 5.14. Histogram kadar diosgenin pada kultur akar dan kultur pucuk *Costus speciosus* (Koen) Smith (kode F-8) dari berbagai rasio ion Amonium dan ion nitrat.

Sementara itu untuk mengetahui adanya pengaruh rasio ion amonium-ion nitrat dalam berbagai variasi konsentrasi terhadap indeks pertumbuhan kultur sel *Costus speciosus* dilakukan uji regresi korelasi dengan hasil persamaan disajikan pada tabel 5.12 dan kurva regresinya akan ditampilkan pada gambar 5.15 sampai gambar 5.18

Tabel 5.12. Hasil uji regresi-korelasi antara konsentrasi ion amonium-ion nitrat terhadap indeks pertumbuhan kultur jaringan sel *Costus speciosus* (Koen) Smith kode F-8

Y	X	Model Persamaan Cubic	Koefisien Determinasi
IP Kultur Pucuk	NH ⁴	Y= 3E-06X ³ -0,0006X ² +0,0272X+1,426 R =0,7078 F _{hitung} =2,343	R ² =0,501 P =0,1594
	NO ³	Y=-3E-06X ³ -9E-05X ² +0,0169X+1,3989 R= 0,70784 F _{hitung} = 2,343	R ² = 0,501 P=0,1594
IP Kultur Akar	NH ⁴	Y=6E-06X ³ -0,0007X ² +0,0197X+0,5583 R=0,9226 F _{hitung} =13,351	R ² =0,851 P=0,0028
	NO ³	Y= -6E-06X ³ +0,0004X ² +0,0013X+0,4571 R=0,9226 F _{hitung} =13,351	R ² = 0,851 P=0,0028
IP Kultur Kalus	NH ⁴	Y=6E-05X ³ +0,0054X ² -0,0445X+5,2055 R=0,9723 F _{hitung} =40,3168	R ² =0,9453 P=0,0001
	NO ³	Y=-6E-05X ³ +0,0052X ² -0,0317X+1,0884 R=0,9723 F _{hitung} =40,3168	R ² =0,9453 P=0,0001
IP Kultur Suspensi	NH ⁴	Y=5E-05X ³ -0,007X ² +0,174X+4,0249 R=0,9833 F _{hitung} =67,9209	R ² =0,9668 P=0,000
	NO ³	Y=-5E-05X ³ +0,0025X ² +0,0948X+0,742 R=0,9833 F _{hitung} =67,9209	R ² =0,9668 P=0,000

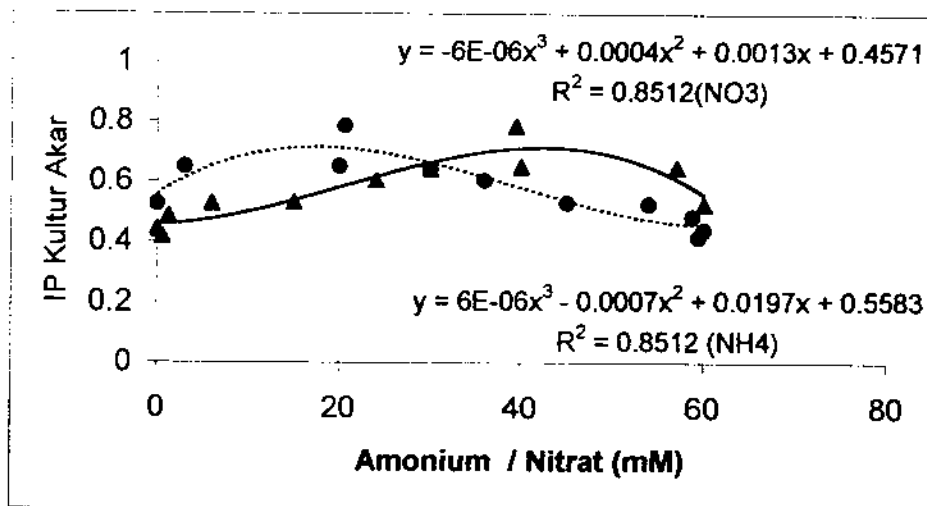
* F_{hit} lebih besar dari F tabel pada α 0,05



Gambar 5.15. Kurva hubungan antara konsentrasi ion amonium - Ion nitrat dengan indeks pertumbuhan kultur Pucuk *Costus speciosus*

Ket : • Amonium

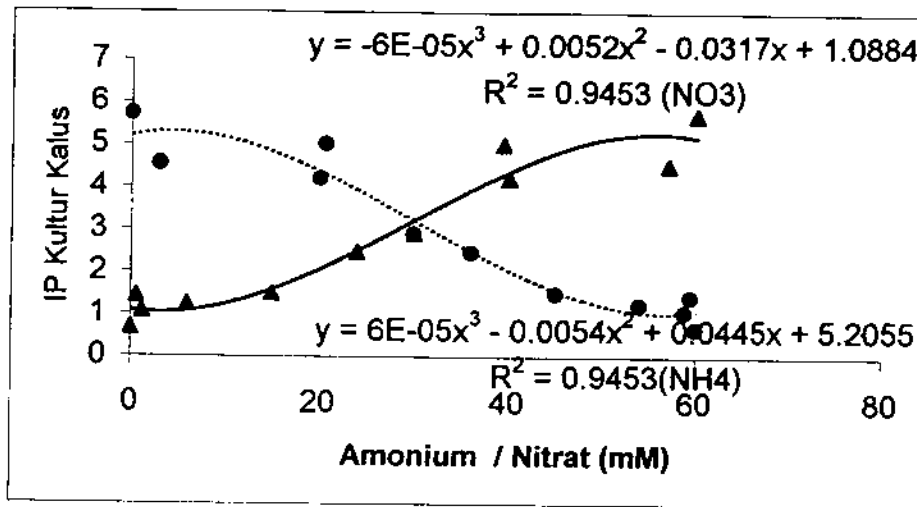
▲ Nitrat



Gambar 5.16. Kurva hubungan antara konsentrasi ion amonium - Ion nitrat dengan indeks pertumbuhan kultur akar *Costus speciosus*

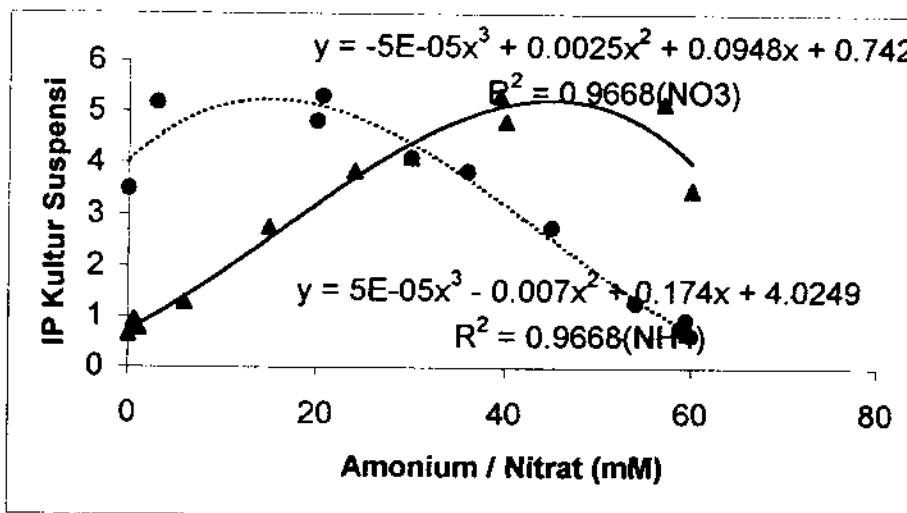
Ket : • Amonium

▲ Nitrat



Gambar 5.17. Kurva hubungan antara konsentrasi ion amonium - ion nitrat dengan indeks pertumbuhan kultur kalus *Costus speciosus*

Ket : ● Amonium
▲ Nitrat



Gambar 5.18. Kurva hubungan antara konsentrasi ion amonium - ion nitrat dengan indeks pertumbuhan kultur suspensi *Costus speciosus*

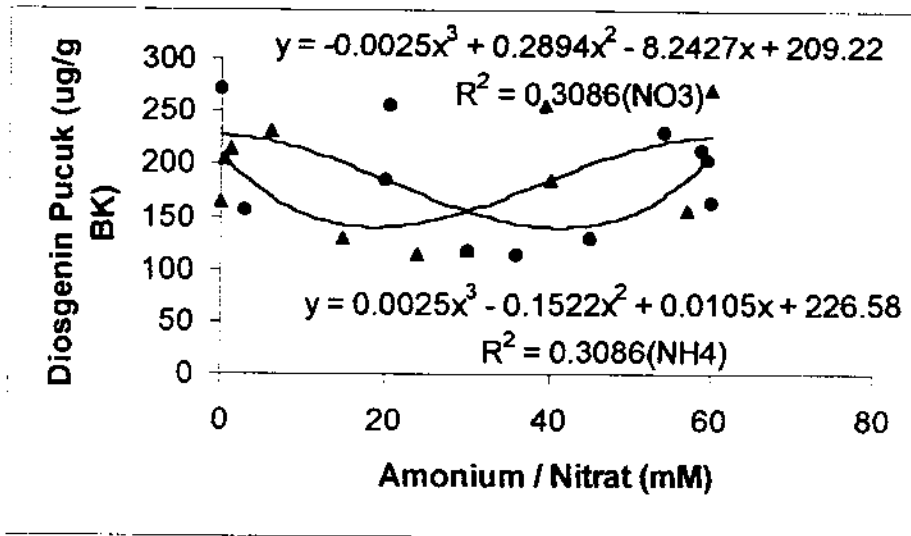
Ket : ● Amonium
▲ Nitrat

Sementara itu untuk mengetahui adanya pengaruh rasio ion amonium-ion nitrat dalam berbagai variasi konsentrasi terhadap kandungan fitosteroid kultur sel *Costus speciosus* dilakukan uji regresi korelasi dengan hasil persamaan disajikan pada tabel 5.13 dan kurva regresinya akan ditampilkan pada gambar 5.19 sampai gambar 5.24

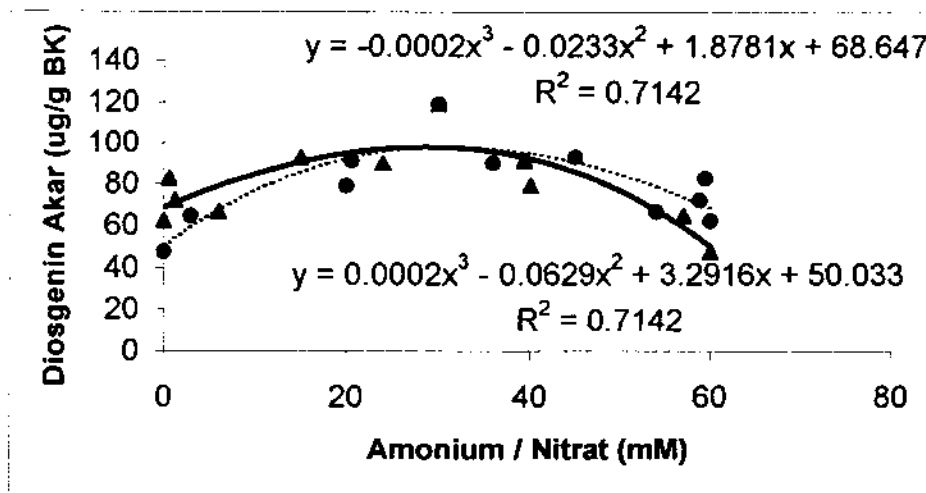
Tabel 5.13. Hasil uji regresi-korelasi antara kadar fitosteroid kultur jaringan sel *Costus speciosus* (Koen) Smith kode F-8

Y	X	Model Persamaan (Cubic)	Koef.Determinasi
Diosgenin Pucuk	Amonium	$Y = 0,0025X^3 - 0,1522X^2 + 0,0105X + 226,58$ $R = 0,5555 \quad F_{hit} = 1,0416$	$R^2 = 0,3086$ $P = 0,4314$
	Nitrat	$Y = -0,0025X^3 + 0,2894X^2 - 8,2427X + 209,22$ $R = 0,5555 \quad F_{hit} = 1,0416$	$R^2 = 0,3086$ $P = 0,4314$
Diosgenin Akar	Amonium	$Y = 0,0002X^3 - 0,0629X^2 + 3,2916X + 50,033$ $R = 0,845 \quad F_{hit} = 5,82995$	$R^2 = 0,7142$ $P = 0,0256$
	Nitrat	$Y = -0,0002X^3 - 0,0233X^2 + 1,8781X + 68,647$ $R = 0,845 \quad F_{hit} = 5,82995$	$R^2 = 0,7142$ $P = 0,0256$
Sterol Pucuk	Amonium	$Y = 0,0012X^3 - 0,134X^2 + 0,47831X + 84,54$ $R = 0,8834 \quad F_{hit} = 8,29563$	$R^2 = 0,7805$ $P = 0,0105$
	Nitrat	$Y = -0,0012X^3 + 0,0881X^2 - 2,0306X + 155,67$ $R = 0,8834 \quad F_{hit} = 8,29563$	$R^2 = 0,7805$ $P = 0,0105$
Sterol Akar	Amonium	$Y = 0,0029X^3 - 0,2225X^2 + 3,1302X + 104,41$ $R = 0,858 \quad F_{hit} = 6,5035$	$R^2 = 0,736$ $P = 0,0196$
	Nitrat	$Y = -0,0029X^3 + 0,3042X^2 - 8,0314X + 123,19$ $R = 0,858 \quad F_{hit} = 6,5035$	$R^2 = 0,736$ $P = 0,0196$
Sterol Kalus	Amonium	$Y = 0,0028X^3 - 0,184X^2 + 1,9842X + 131,29$ $R = 0,8374 \quad F_{hit} = 5,4744$	$R^2 = 0,7012$ $P = 0,0297$
	Nitrat	$Y = -0,0028X^3 + 0,3174X^2 - 9,9875X + 189,6$ $R = 0,8374 \quad F_{hit} = 5,4744$	$R^2 = 0,7012$ $P = 0,0297$
Sterol Suspensi	Amonium	$Y = 0,0085X^3 - 0,7346X^2 + 16,444X + 130,34$ $R = 0,9280 \quad F_{hit} = 14,4758$	$R^2 = 0,8612$ $P = 0,0022$
	Nitrat	$Y = -0,0085X^3 + 0,7934X^2 - 19,969X + 305,94$ $R = 0,9280 \quad F_{hit} = 14,4758$	$R^2 = 0,8612$ $P = 0,0022$

* F hit lebih besar dari F tabel pada $\alpha 0,05$



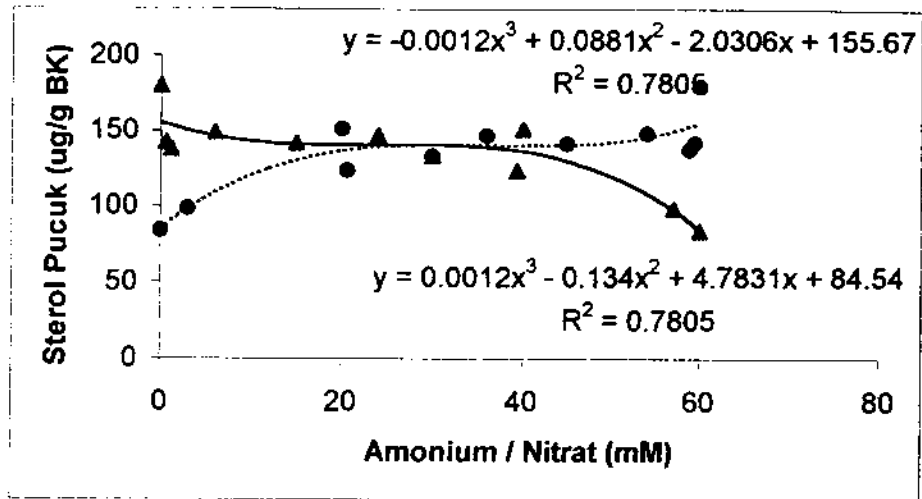
Gambar 5.19. Kurva hubungan antara variasi ion amonium - ion nitrat dengan kadar diosgenin kultur Pucuk *Costus speciosus*



Gambar 5.20. Kurva hubungan antara variasi ion amonium - ion nitrat dengan kadar diosgenin kultur Akar *Costus speciosus*

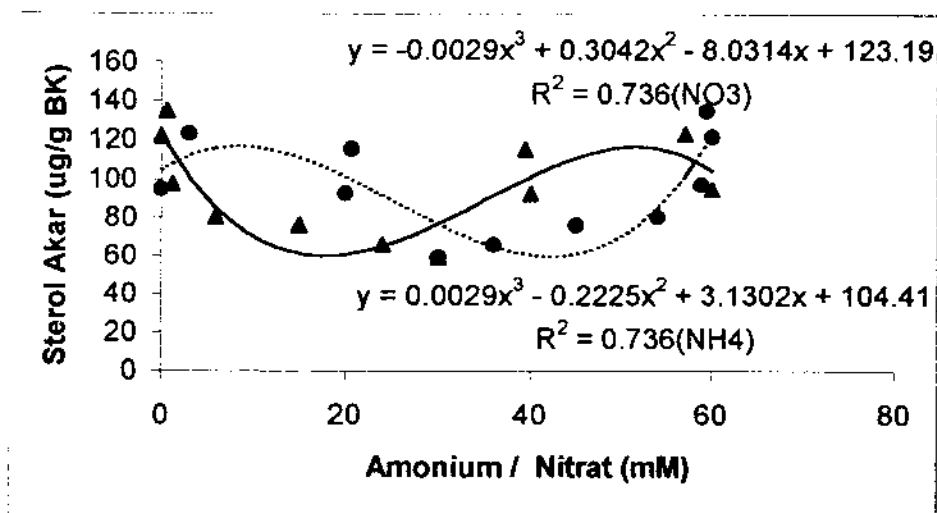
Ket : • Amonium

▲ Nitrat



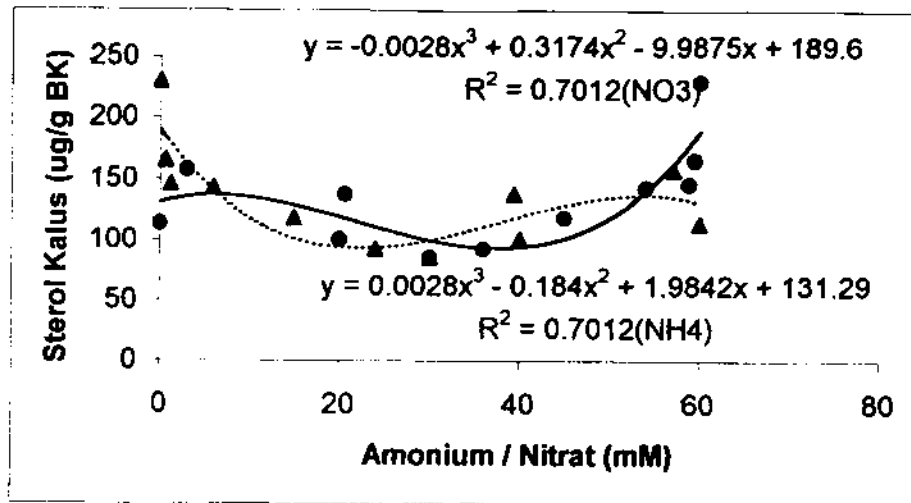
Gambar 5.21. Kurva hubungan antara variasi ion amonium - ion nitrat dengan kadar sterol kultur pucuk *Costus speciosus*

Ket : • Amonium
▲ Nitrat



Gambar 5.22. Kurva hubungan antara variasi ion amonium - ion nitrat dengan kadar sterol kultur akar *Costus speciosus*

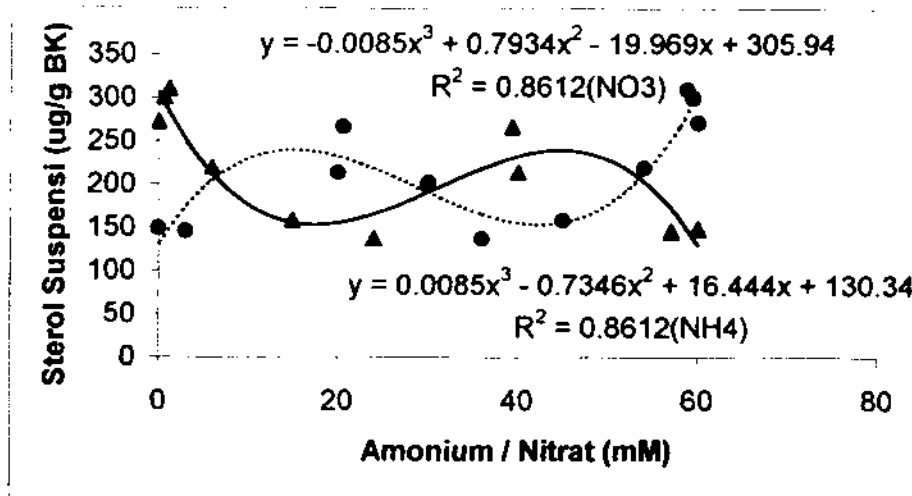
Ket : • Amonium
▲ nitrat



Gambar 5.23. Kurva hubungan antara variasi ion amonium - ion nitrat dengan kadar sterol kultur kalus *Costus speciosus*

Ket : • Amonium

▲Nitrat



Gambar 5.24. Kurva hubungan antara variasi ion amonium - ion nitrat dengan kadar sterol kultur suspensi *Costus speciosus*

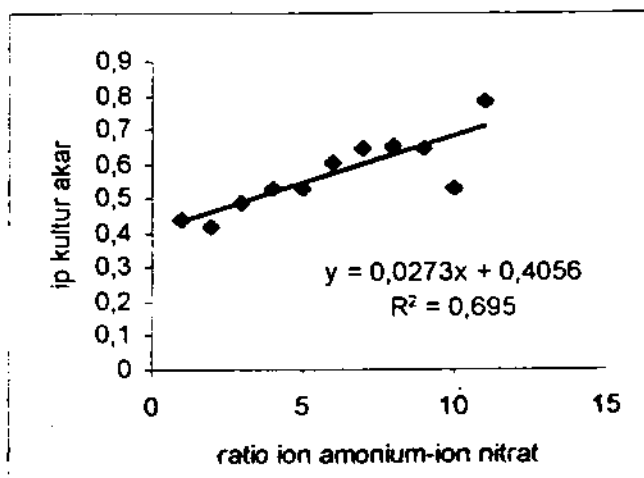
Ket : • Amonium

▲Nitrat

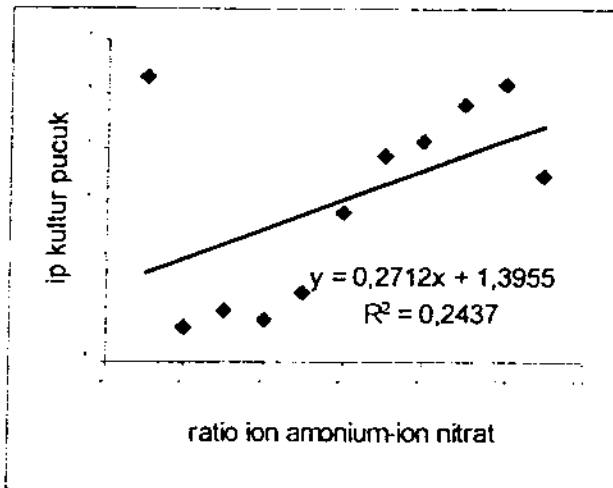
Tabel. 5.14 Hasil Uji Regresi Korelasi antara Rasio Ion Amonium dan ion Nitrat terhadap Indeks Pertumbuhan Kultur Jaringan Sel *Costus speciosus*

X	Y	Model Persamaan	Koefisien Determinasi
Rasio (ion amonium : ion nitrat)	Indeks Pertumbuhan Kultur Akar	$Y = 0,619 + 0,0022 X$ $r = 0,689 F_{ht} = 7,235^*$	$r^2 = 0,475$ $P = 0,028$
Rasio (ion amonium : ion nitrat)	Indeks Pertumbuhan Kultur Pucuk	$Y = 3,342 + 0,0335 X$ $r = 0,628 F_{ht} = 5,201^*$	$r^2 = 0,394$ $P = 0,052$
Rasio (ion amonium : ion nitrat)	Indeks Pertumbuhan Kultur Kalus	$Y = 3,483 + 0,028 X$ $r = 0,532 F_{ht} = 3,160$	$r^2 = 0,283$ $P = 0,113$
Rasio (ion amonium : ion nitrat)	Indeks Pertumbuhan Kultur Suspensi	$Y = 3,877 + 0,0379 X$ $r = 0,715 F_{ht} = 8,362^*$	$r^2 = 0,511$ $P = 0,020$

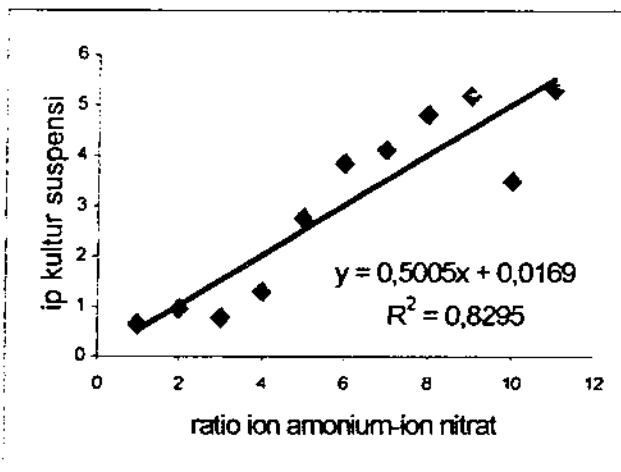
*) F hitung lebih besar dari F tabel pada $\alpha 0,05$



Gambar 5.21. Kurva hubungan antara konsentrasi ion amonium, ion nitrat dengan indeks pertumbuhan kultur akar Sel *Costus speciosus*



Gambar 5.22. Kurva hubungan antara rasio ion amonium, ion nitrat dengan indeks pertumbuhan kultur pucuk Sel *Costus speciosus*

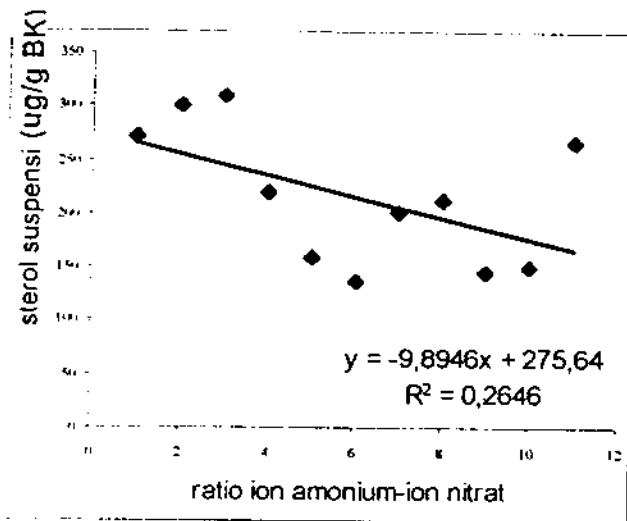


Gambar 5.23. Kurva hubungan antara rasio ion amonium, ion nitrat dengan indeks pertumbuhan kultur suspensi Sel *Costus speciosus*

Tabel. 5.15 Hasil Uji Regresi Korelasi antara Rasio Ion Amonium dan Ion Nitrat terhadap Kadar Fitosteroid Kultur Jaringan Sel *Costus speciosus*

X	Y	Model Persamaan	Koefisien Determinasi
Rasio Ion Amonium & nitrat	Sterol Akar	$Y = 87,285 + 0,412 X$ $r = 0,546$ $F_{hit} = 3,392$	$r^2 = 0,298$ $P = 0,103$
Rasio Ion Amonium & nitrat	Sterol Pucuk	$Y = 127,955 - 0,0174 X$ $r = 0,252$ $F_{hit} = 0,540$	$r^2 = 0,063$ $P = 0,483$
Rasio Ion Amonium & nitrat	Sterol Kalus	$Y = 119,282 - 0,493 X$ $r = 0,598$ $F_{hit} = 4,460$	$r^2 = 0,358$ $P = 0,068$
Rasio Ion Amonium & nitrat	Sterol Suspensi	$Y = 187,543 - 1,414 X$ $r = 0,719$ $F_{hit} = 8,548^*$	$r^2 = 0,517$ $P = 0,019$
Rasio Ion Amonium & nitrat	Diosgenin Akar	$Y = 81,135 + 0,0248 X$ $r = 0,041$ $F_{hit} = 0,014$	$r^2 = 0,002$ $P = 0,910$
Rasio Ion Amonium & nitrat	Diosgenin Pucuk	$Y = 183,278 - 0,461 X$ $r = 0,175$ $F_{hit} = 0,252$	$r^2 = 0,031$ $P = 0,629$

*) F hitung lebih besar dari F tabel pada α 0,05



Gambar 5.24. Kurva hubungan antara rasio ion amonium, ion nitrat dengan sterol suspensi Sel *Costus speciosus*

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1. Analisis Pertumbuhan Kultur Jaringan Sel *Costus speciosus* (Koen) Smith (kode F-8)

6.1.1. Kultur Pucuk *Costus speciosus* (Koen) Smith (kode F-8)

Dari hasil pengamatan yang dilakukan terhadap indeks pertumbuhan i kultur pucuk *Costus speciosus* (Koen) Smith kode F-8, tabel 5.1. menunjukkan bahwa penambahan ion amonium (tanpa nitrat) konsentrasi ion amonium 60 mM rasio 60 : 0 dan kombinasi ion amonium - ion nitrat 1 : 1 dengan konsentrasi ion amonium : ion nitrat masing masing 30 mM dapat meningkatkan indeks pertumbuhan masing-masing sebesar A (0,23%) dan AN-6 (18,75%), walaupun kenaikan yang dihasilkan tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dibandingkan dengan pertumbuhan pada media kontrol kombinasi ion amonium - ion nitrat 20 mM : 40 mM dengan rasio 1 : 2. Penurunan indeks pertumbuhan kultur pucuk dibandingkan dengan kultur yang ditanam pada media kontrol dapat dilihat pada kombinasi ion amonium-ion nitrat rasio 99 : 1, 49 : 1, 9 : 1, 3 : 1, 1.5 : 1, 1 : 2, 1 : 19 dan penambahan ion nitrat (tanpa penambahan ion amonium) rasio 0 : 60 berturut turut sebesar AN-1 (25,10%), AN-2 (24,33%), AN-3 (6,89%), AN-4 (6,17%) dan AN-5 (1,32%), AN-7 (1,98%), AN-8 (4,97%) dan N (17,44%).

Hasil uji regresi antara ion amonium dan ion nitrat terhadap indeks pertumbuhan pada kultur pucuk tidak menunjukkan adanya hubungan baik pada model persamaan cubic, quadratic maupun linear

Pada rasio ion amonium dan ion nitrat dengan indeks pertumbuhan kultur pucuk tidak menunjukkan adanya hubungan yang bermakna. Dari hasil analisis yang didapat terlihat bahwa untuk pertumbuhan tanaman membutuhkan kedua unsur sumber nitrogen

Sumber nitrogen yang diperoleh sendiri sendiri tidak memberikan pertumbuhan yang sempurna selain sumber nitrogen pertumbuhan masih memerlukan banyak faktor baik eksternal maupun internal bagi keperluan sumber nitrogen. Amonium dan nitrat merupakan sumber nitrogen utama bagi tumbuhan dan pertumbuhan tanaman akan optimal bila kebutuhan nitrogen ini disuplai dalam bentuk ion NH_4^+ dan NO_3^- (Nicolaus, 2000)

6.1.2. Kultur Akar *Costus speciosus* (Koen) Smith (kode F-8)

Dari hasil pengamatan yang dilakukan terhadap indeks pertumbuhan kultur akar sel *Costus speciosus* menunjukkan adanya penurunan indeks pertumbuhan. Pada media dengan penambahan ion amonium (tanpa penambahan ion nitrat) terjadi penurunan sebesar 43,89%.

Pada kombinasi dengan penambahan ion amonium - ion nitrat dalam berbagai rasio menunjukkan penurunan indeks pertumbuhan masing-masing sebesar AN-1 (46,82%), AN-2 (38,04%), AN-3 (32,95%), AN-4 (32,44%), AN-5 (23,03%), AN-6 (18,19%), AN-7 (17,05%) dan AN-8 (17,43%) yang diperlihatkan pada tabel 5.2 dan gambar 5.2. Sedangkan pada media N yang hanya ditambah nitrat sebagai sumber nitrogennya (tanpa amonium) menunjukkan penurunan Indeks Pertumbuhan sebesar 33,08%.

Dari pemberian ion amonium, ion nitrat maupun ion amonium-nitrat dalam berbagai rasio semuanya menunjukkan penurunan indeks pertumbuhan dibandingkan dengan kontrol. Walaupun indeks pertumbuhan menunjukkan kenaikan seiring dengan penambahan jumlah ion nitrat.

Suplai nitrogen hanya dalam bentuk NH_4^+ berbahaya bagi sebagian besar tumbuhan karena dapat menyebabkan pertumbuhan akar yang jelek (Nicolaus, 2000). Dan telah diketahui pula bahwa pertumbuhan dan perkembangan akar dipengaruhi oleh penambahan nitrogen. Kadar NO_3^- yang tinggi akan menghambat pertumbuhan akar (Mark Sitt, 1999)

Hasil uji regresi - korelasi menunjukkan adanya hubungan yang bermakna antara rasio ion amonium - ion nitrat dengan indeks pertumbuhan kultur akar. Hal ini ditunjukkan oleh nilai derajat keeratan hubungan ($r = 0,923$) dan koefisien determinasi ($r^2 = 0,851$) pada $P = 0,003$, demikian pula pada model persamaan quadratic dan linear menunjukkan adanya hubungan (Lampiran 16)

Dari hasil uji regresi korelasi yang didapat dari rasio berbagai ion amonium dan ion nitrat terhadap indeks pertumbuhan kultur akar juga memperlihatkan adanya hubungan yang ditunjukkan oleh nilai derajat keeratan hubungan ($r = 0,689$) , koefisien determinasi ($r^2 = 0,475$) pada $P = 0,028$

Dari hasil persamaan regresi , terlihat akar dapat langsung memanfaatkan sumber nitrogen yang terserap .

6.1.3. Kultur Kalus *Costus speciosus* (Koen) Smith (kode F-8)

Dari hasil analisis yang dilakukan terhadap indeks pertumbuhan dari kultur kalus sel *Costus speciosus* menunjukkan adanya penurunan indeks pertumbuhan. Pada media dengan penambahan ion amonium (tanpa

penambahan ion nitrat) terjadi penurunan sebesar 86,65%, sehingga sel kalus nampak tidak tumbuh.

Pada kombinasi dengan penambahan ion amonium - ion nitrat dalam berbagai rasio menunjukkan penurunan indeks pertumbuhan masing-masing sebesar AN-1 (71,56%), AN-2 (78,76%), AN-3 (75,30%), AN-4 (70,19%), AN-5 (50,54%), AN-6 (41,87%), AN-7 (15,89%) dan AN-8 (9,35%). Sementara itu terjadi kenaikan indeks pertumbuhan sebesar 13,94% pada media yang hanya ditambah nitrat sebagai sumber nitrogennya (tanpa amonium), tabel 5.3 . Perlakuan ini memberikan parameter indeks pertumbuhan terbesar pada kultur kalus sedangkan indeks pertumbuhan terkecil ditunjukkan oleh media tanpa penambahan ion nitrat.

Hasil uji regresi - korelasi model linear menunjukkan adanya hubungan yang bermakna antara berbagai konsentrasi ion amonium dan pada berbagai konsentrasi ion nitrat dengan indeks pertumbuhan kultur kalus. Hal ini ditunjukkan oleh nilai derajat keeratan hubungan ($r = 0,9723$) dan koefisien determinasi ($r^2 = 0,945$) pada $P = 0,000$. Hubungan yang signifikan juga ditunjukkan oleh model persamaan linear dan quadratic (Lampiran 16). Hubungan yang signifikan ini tidak diikuti oleh hubungan dari rasio ion amonium dan ion nitrat, yang memperlihatkan tidak adanya hubungan antar rasio dengan indeks pertumbuhan pada kultur pucuk.

6.1.4. Kultur Suspensi *Costus speciosus* (Koen) Smith (kode F-8)

Hasil analisis yang ditunjukkan oleh indeks pertumbuhan kultur suspensi sel *Costus speciosus* menunjukkan adanya kenaikan indeks pertumbuhan seiring dengan meningkatnya jumlah ion nitrat dalam media, (Lampiran 16). Jika dibandingkan dengan kondisi kontrol terlihat penurunan indeks pertumbuhan

berturut-turut sebesar A (87,71 %), AN-1 (82,03%), AN-2 (85,34%), AN-3 (75,61%), AN-4 (47,41%), AN-5 (27,57%), AN-6 (22,51%), AN-7 (9,22%) dan AN-8 (2,47%). Penurunan indeks pertumbuhan juga terjadi pada media yang hanya ditambah nitrat (tanpa amonium) sebesar 34,31%.

Indeks pertumbuhan terbesar diperoleh dari media AN-8 dengan rasio amonium : nitrat sebesar 1 : 19, sedangkan indeks pertumbuhan terendah ditunjukkan oleh kondisi media tanpa nitrat.

Hasil uji regresi - korelasi menunjukkan adanya hubungan yang bermakna antara rasio ion amonium - ion nitrat dengan indeks pertumbuhan kultur suspensi. Hal ini ditunjukkan oleh nilai derajat keeratan hubungan ($r = 0.9833$) dan koefisien determinasi ($r^2 = 0.967$) pada $P = 0,001$. Hasil uji regresi korelasi pada model persamaan linear dan quadratic juga menunjukkan adanya hubungan yang bermakna.

Pada hasil uji regresi korelasi yang ditunjukkan oleh rasio dari ion amonium dan ion nitrat pada kultur suspensi juga menunjukkan adanya hubungan yang bermakna yang ditunjukkan dengan derajat keeratan hubungan $r = 0,715$, Koefisien determinasi $r^2 = 0,511$ pada $P = 0,020$

6.2 . Hasil Analisis Kadar Diosgenin

6.2.1. Kultur Pucuk *Costus speciosus* (Koen) Smith (kode F-8)

Berdasarkan hasil analisis kuantitatif yang dilakukan, kadar diosgenin yang diperoleh dari fraksi hidrolisat pada tabel 5.5 gambar 5.8 menunjukkan penurunan kadar diosgenin dalam berbagai variasi konsentrasi berturut-turut sebesar A (55,69%) yaitu pada media dengan penambahan ion amonium (tanpa

nitrat), sedangkan dari media kombinasi ion amonium-nitrat dengan berbagai rasio terjadi penurunan berturut-turut sebesar AN-1 (20,31%), AN-2 (16,27%), AN-3 (10,05%), AN-4 (49,14%), AN-5 (54,88%), AN-6 (53,92%), AN-7 (27,85%), AN-8 (38,80%).

Kenaikan kadar diosgenin sebesar 6,10% terjadi pada penambahan ion nitrat tanpa penambahan amonium. Sedangkan kadar diosgenin terendah pada media dengan rasio ion amonium-nitrat 1,5 : 1. Sementara itu kadar diosgenin tertinggi ditemukan pada media yang hanya menggunakan ion nitrat sebagai sumber nitrogen tanpa penambahan ion amonium.

Hasil uji regresi – korelasi tidak menunjukkan adanya hubungan yang bermakna antara rasio ion amonium – ion nitrat dengan kadar diosgenin kultur pucuk, baik pada model persamaan linear maupun persamaan quadratic (Lampiran 16)

6.2.2. Kultur Akar *Costus speciosus* (Koen) Smith (kode F-8)

Berdasarkan hasil analisis kuantitatif yang dilakukan, kadar diosgenin yang diperoleh dari fraksi hidrolisat menunjukkan penurunan kadar diosgenin pada A (32,07%) yaitu pada media dengan penambahan ion amonium (tanpa nitrat). Sementara itu penurunan kadar diosgenin juga terjadi pada kombinasi ion amonium-nitrat dengan berbagai rasio, dimana AN-1 (9,45%), AN-2 (21,03%), AN-3 (27,15%), AN-5 (1,29%), AN-7 (13,51%), AN-8 (48,04%), yang ditunjukkan pada tabel 5.6 gambar 5.9

Sementara itu kenaikan kadar diosgenin pada kultur akar terjadi pada AN-4 (1,70%) dengan rasio 1 : 3 dan AN-6 (30,26%) dengan rasio 1 : 1.

Sedangkan pada media yang menggunakan ion nitrat (tanpa amonium), kadar diosgenin yang diperoleh sama dengan kadar diosgenin media kontrol.

Kadar diosgenin tertinggi pada kultur akar diperoleh dari media dengan rasio amonium-nitrat 1 : 1, sedangkan kadar diosgenin terendah diperoleh pada media dengan rasio ion amonium-nitrat 1 : 19.

Hasil uji regresi - korelasi menunjukkan adanya hubungan yang bermakna antara rasio ion amonium - ion nitrat dengan kadar diosgenin kultur akar.

6.3. Hasil Analisis Kadar Sterol

6.3.1. Kultur Pucuk *Costus speciosus* (Koen) Smith (kode F-8)

Analisis dilakukan dengan menggunakan KLT-densitometri dan hasil analisis kuantitatif kadar sterol total merupakan gabungan kadar sterol terikat fraksi hidrolisat dan kadar sterol bebas fraksi khloroform.

Hasil analisis menunjukkan bahwa kadar sterol total tertinggi diperoleh dari media A dengan penambahan ion amonium tanpa penambahan ion nitrat sebesar 45,70%. Pada kombinasi media yang menggunakan ion amonium-nitrat, kenaikan kadar sterol berturut-turut sebesar AN-1 (15,15%), AN-2 (11,39%), AN-3 (20,59%), AN-4 (15,01%), AN-5 (19,14%), AN-6 (8,16%), AN-7 (22,61%), AN-8 (20,35%), tabel 5.7 dan gambar 5.10

Kadar sterol terendah diperoleh dari media N yang menggunakan ion nitrat tanpa penambahan ion amonium.

Hasil uji regresi - korelasi menunjukkan adanya hubungan yang bermakna antara berbagai konsentrasi ion amonium dan berbagai konsentrasi

ion nitrat dengan kadar sterol kultur pucuk. Hal ini ditunjukkan oleh nilai derajat keeratan hubungan pada model persamaan linear ($r = 0,790$) dan koefisien determinasi ($r^2 = 0,624$) pada $P = 0,004$, demikian pula pada model persamaan quadratic dan cubic terlihat adanya hubungan korelasi. Pada berbagai rasio ion amonium dan ion nitrat tidak menunjukkan adanya hubungan, dari penelitian ini terlihat bahwa sumber nitrogen diperlukan oleh tanaman dalam pembentukan kadar fitosteroid namun rasio kombinasi ion amonium dan ion nitrat masih belum menunjukkan hubungannya.

6.3.2. Kultur Akar *Costus speciosus* (Koen) Smith (kode F-8)

Hasil analisis kadar sterol total kultur akar ditunjukkan dengan kenaikan kadar sterol pada media A dengan penambahan ion amonium tanpa penambahan ion nitrat sebesar 5,70%. Pada kombinasi media AN-1 (16,88%) dan AN-8 (6,42%).

Penurunan kadar sterol pada media kombinasi ion amonium-nitrat sebesar AN-2 (15,57%), AN-3 (30,21%), AN-4 (34,04%), AN-5 (42,81%), AN-6 (48,52%), AN-7 (19,71%) dan pada media yang menggunakan nitrat tanpa amonium sebesar 17,86%. Tabel 5.8 gambar 5.11

Hasil uji regresi - korelasi Pada model persamaan cubic menunjukkan adanya hubungan yang bermakna antara rasio ion amonium - ion nitrat dengan kadar sterol kultur akar. Hal ini ditunjukkan oleh nilai derajat keeratan hubungan ($r = 0,858$) dan koefisien determinasi ($r^2 = 0,736$) pada $P = 0,0196$.

Dari hasil uji regresi korelasi, menunjukkan adanya hubungan yang bermakna antara kadar diosgenin dengan kadar sterol total kultur akar.

6.3.3. Kultur Kalus *Costus speciosus* (Koen) Smith (kode F-8)

Hasil analisis terhadap kadar sterol total kultur kalus ditentukan oleh gabungan kadar sterol terikat fraksi hidrolisat dengan kadar sterol bebas fraksi khloroform. Peningkatan kadar sterol ditunjukkan oleh media A dengan penambahan ion amonium tanpa penambahan ion nitrat sebesar 66,83%. Pada media AN-1 (20,20%), AN-2 (5,98%) AN-3 (3,94%) dan AN-8 (14,48%), yang ditunjukkan oleh tabel 5.9 gambar 5.12

Penurunan kadar sterol pada media kombinasi ion amonium-nitrat ditunjukkan AN-4 (13,98%), AN-5 (32,50%), AN-6 (37,66%), AN-7 (26,69%) dan pada media yang hanya menggunakan nitrat sebagai sumber nitrogen tanpa amonium sebesar 17,37%.

Kadar sterol terendah terdapat pada AN-6 dengan rasio 1 : 1 dan kadar sterol total tertinggi terdapat pada media A yang hanya menggunakan ion amonium sebagai sumber nitrogen.

Hasil uji regresi - korelasi menunjukkan adanya hubungan yang bermakna antara rasio ion amonium - ion nitrat dengan kadar sterol kultur kalus. Hal ini ditunjukkan oleh nilai derajat keeratan hubungan pada model persamaan cubic sebesar ($r = 0,837$) dan koefisien determinasi ($r^2 = 0,7012$) pada $P = 0,0297$

Hasil uji regresi korelasi, pada model persamaan cubic dan quadratic juga memperlihatkan adanya keeratan hubungan (Lampiran 16).

6.3.4 Kultur Suspensi *Costus speciosus* (Koen) Smith (kode F-8)

Hasil analisis kuantitatif yang diperoleh dari sterol bebas fraksi kloroform dan sterol terikat fraksi hidrolisat menunjukkan peningkatan pada media A dengan penambahan ion amonium sebagai sumber nitrogen tanpa penambahan ion nitrat sebesar 1,83%.

Sedangkan pada media yang mengandung kombinasi ion amonium-nitrat peningkatan kadar sterol terdapat pada AN-1 (12,35%) dan AN-2 (16,11%). Penurunan kadar ditunjukkan oleh AN-3 (17,80%), AN-4 (40,62%), AN-5 (48,41%), AN-6 (24,36%), AN-7 (19,96%), AN-8 (45,32%) dan pada media yang menggunakan nitrat tanpa amonium sebesar 44,04%.

Kadar sterol terendah ditunjukkan oleh AN-5 dengan rasio amonium-nitrat 1,5 : 1. Sedangkan kadar sterol tertinggi ditunjukkan oleh AN-2 dengan rasio amonium-nitrat 49 : 1.

Hasil uji regresi - korelasi menunjukkan adanya hubungan yang bermakna antara berbagai konsentrasi ion amonium dan berbagai konsentrasi ion nitrat dengan kadar sterol kultur suspensi. Hal ini ditunjukkan oleh nilai derajat keeratan hubungan ($r = 0,637$) dan koefisien determinasi ($r^2 = 0,406$) pada $P = 0,035$. Hasil yang sama juga ditunjukkan oleh rasio dari ion amonium dan ion nitrat yang memperlihatkan adanya hubungan yang bermakna pada $r = 0,715$ koefisien determinasi $r^2 = 0,511$ dan pada $P = 0,020$.

Dari hasil uji regresi korelasi antara kadar diosgenin dengan kadar sterol total kultur suspensi, tidak menunjukkan adanya hubungan yang bermakna.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Pertumbuhan kultur pucuk dan kultur akar sel *Costus speciosus* (Koen) Smith F-8, mencapai optimal dengan penambahan ion amonium-ion nitrat masing masing konsentrasi Amonium 30,0 mM ,Nitrat 30 mM dan Amonium 20 mM,Nitrat 40 mM rasio 1 : 1 dan 1 : 2. Sedangkan pada kultur suspensi dan kultur kalus, pertumbuhan mencapai optimal masing masing pada konsentrasi amonium 3,0 mM dan nitrat 57,0 mM dengan rasio ion amonium-ion nitrat 1 : 19 dan rasio 0 : 60 (media ion nitrat 60 mM tanpa penambahan ion amonium).
2. Konsentrasi dan rasio ion amonium dan ion nitrat berpengaruh terhadap kadar fitosteroid kultur jaringan *Costus speciosus* (Koen) Smith F-8.
 - Pada kultur pucuk dan kultur kalus
Kadar diosgenin tertinggi tercapai pada konsentrasi nitrat 60 mM rasio 0 : 60 (media dengan penambahan ion nitrat tanpa ion amonium). Sedangkan kadar sterol tertinggi tercapai pada konsentrasi amonium rasio 60 : 0 (media dengan penambahan ion amonium tanpa ion nitrat).
 - Pada Kultur akar
Kadar diosgenin tertinggi tercapai pada konsentrasi amonium 30 mM dan nitrat 30 mM dengan rasio media ion amonium-ion nitrat 1 : 1. Sedangkan kadar sterol tertinggi tercapai pada media dengan konsentrasi amonium 59,4 mM dan nitrat 0,6 mM rasio ion amonium-ion nitrat 99 : 1.

- Pada kultur suspensi
Kadar sterol tertinggi tercapai pada media dengan konsentrasi amonium 5, mM dan nitrat 1,2 mM rasio ion amonium-ion nitrat rasio 49 : 1.
- 3. Hasil uji regresi korelasi pada berbagai konsentrasi ion amonium dan ion nitrat menunjukkan adanya hubungan yang bermakna dengan indeks pertumbuhan kultur akar, pucuk, kalus dan suspensi
- 4. Hasil uji regresi - korelasi menunjukkan adanya hubungan yang bermakna pada variasi rasio ion amonium - ion nitrat dengan indeks pertumbuhan i kultur akar, kultur kalus dan kultur suspensi. Adanya hubungan yang bermakna juga ditunjukkan oleh rasio ion amonium - ion nitrat dengan kadar sterol kultur pucuk dan kultur suspensi.

7.2. Saran

Dari Penelitian ini disarankan untuk :

1. Dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai konsentrasi ion nitrat pada kultur pucuk dan kultur akar agar diperoleh informasi yang lengkap dalam meningkatkan produksi diosgenin dan konsentrasi ion amonium dalam meningkatkan produksi sterol kultur jaringan *Costus speciosus*.
2. Perlunya diadakan penelitian mengenai pengaruh sumber nitrogen lain terhadap produksi metabolit sekunder pada kultur jaringan *Costus speciosus* (Koen) Smith F-8.

DAFTAR PUSTAKA

- Akins, P.O., Vasil, L.K. , 1985. Nutrition of Plant Cultures, invasil, I.K., Cell Culture and Somatic Cell. Genetics of Plants. Vol. 11, Academic Press, Inc. Orlando. Pp. 129 –139.
- Allan, E, 1991. Plant Cell Culture, in : Stafford, A., Warren, G., (eds) Plant Cell and Tissue Culture, John Wiley and sons, Chichester, 1 – 23.
- Bhojwani, S.S., Razdan, M.K. 1983. Plant Tissue Culture Theory and Practice. Elsevier, Amsterdam, Oxford- New York- Tokyo. pp. 23 – 28.
- Gamborg, O.L., 1982. Callus and Cell Culture, in Wetter, L.R. Constabel, F., (Eds) Plant Tissue Culture Method, 2 nd Ed. National Research Council of Canada Saskatoon. Saskatchewan. Pp. 1 –9.
- Gardner, F.P., Fearce, R.B. and Mitchell, R.L. 1991. Fisiologi Tanaman Budidaya. Penerjemah : Herawati Susilo dan Subiyanto. UI Press, Jakarta
- Hayashi, T., Yoshida, K., Sano, K. 1988. Formation of Alkaloids in Suspension Cultured *Colchicum autumnale*. Phytochemistry 27, pp. 1371-1374.
- Indrayanto, G., 1986. Prospek Kultur Jaringan Tanaman pada Bidang Farmasi. Buletin ISFI Jatim, vol. 17 no. 1.
- Indrayanto, G., 1987. Produksi Metabolit Sekunder dengan Teknik Kultur Jaringan Tanaman dalam Seminar Nasional Metabolit Sekunder PAU Bioteknologi, Univ. Gajah Mada, Yogyakarta.
- Indrayanto, G., 1988. Kultur Jaringan Tanaman, suatu petunjuk praktis untuk bidang farmasi, PAU Bioteknologi Univ. Gajah Mada, Yogyakarta.
- Indrayanto, G., Setiawan, B., and Cholies. N., 1994. Differential Diosgenin Accumulation in *Costus speciosus* Koen (Sm) and its Tissue Cultures. Planta Medica 60 pp. 483 –484.
- Indrayanto, G., Emiliawati, S., Nurijati, N., Chairunnisa, Santosa, M.H., and Utami, W., 1996. Influence of Sucrose, Calcium Ions and Casein

- Hydrolysate on Growth and Diosgenin Content in Shoot Cultures of *Costus speciosus* Koen (sm), *Annales Bogoriensis* vol. 4, pp. 35 –40.
- Indrayanto, G., 1999. Prospek Teknik Kultur Jaringan untuk Produksi Bahan Kimia Alami. Pidato penerimaan jabatan guru besar, Fakultas farmasi Univ. Airlangga, Surabaya.
- Kutney, J.P. 1993. Plant Cell Culture and Synthetic Chemistry Route to Clinically Important Compounds, in : Downum, et al (eds) : *Phytochemical Potential of Tropical Plants*, Plenum Press, New York, 235 – 236.
- Lambert, N., Baccou, J.c., Sauvaire, Y.,1988. Screening for Diosgenin in Rhizomes from 3 *Costus* species (*C. deistellii*, *C. igneus*, *C. lucanusianus*) *Planta Medica* 54, pp. 336 –367.
- Lubis, I dan Sastrapraja, S., 1980. Penelitian Kandungan Diosgenin pada *Costus*. Dalam *Perkembangan Penelitian Tanaman rempah dan Obat*. Edisi Khusus no. 1 Balai Penelitian Rempah dan Obat, Bogor.
- Lubis, I., Lubis, A.S.H., Sastrapraja, S., 1997. *Costus* Sumber Nabati baru untuk Bahan Kontrasepsi. *Simposium Penelitian Tanaman Obat II*, Bogor pp. 20. –22.
- Mantel, S.H., Matthews, R.A and Mc Kee, R.A., 1985. *Principle of Plant Biotechnology, A Introduction to Genetic Engineering in Plants*. Blackwell Scientific Publication, Oxford-London-Edinberg. Pp. 186.
- Mark Stitt, 1999. Nitrate regulation of metabolism and growth, *Current opinion in Plant Biology* 2 : 178 - 186
- Manito, P., 1981. *Biosintesis Produk Alam (terjemahan)* IKIP Semarang Press. Semarang, hal. 339 – 394.
- Melati, F. 1999. Pengaruh Rasio Ion Amonium dan Ion Nitrat Terhadap Produksi Solasodina pada Kultur Pucuk *Solanum laciniatum* Ait (SL-B). Skripsi. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Nicolaus, V.W., Sonia, G., Alain, G., Wolf, B.F., 2000. The molecular Physiology of amonium uptake and retrieval, *Current opinion in Plant Biology* 3 : 254 - 261

- Peterson, M and Alfermann, A.w., 1993. Plant Cell Cultures, In. rehm H.J. and Reed, G (ed) Biotechnology. VCH. Weinheim-New York Basel Cambridge-tokyo. pp. 593 –595.
- Perhipba., 1988. Seri Tanaman Obat. Komisariat Yogyakarta.
- Pezzuto, John, M., 1993. Biotechnology and Pharmacy, Chapman and Hall Inc., new York pp. 302 – 304.
- Salisbury, F.B., Ross. C.W., 1992. Plant Physiology. Wadsworth Publishing Company, Belmont, california pp. 96 – 113.
- Sardjoko, 1991. Bioteknologi, Latar belakang dan Beberapa penerapannya, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta 196 – 197.
- Shetty, K and Curtis, O.F., 1995. Biotechnology of Plants Secondary Metabolites and Their Application in Food. Prosiding Widyakarya Nasional Khasiat Makanan Tradisional. Kantor Mentri negara Urusan Pangan Republik Indonesia.
- Steenis, C.G.G.J., 1987. Flora untuk Sekolah di Indonesia. Pradnya Paramita, hal. 160-161.
- Sudiarto, 1984. Kemungkinan Pembudidayaan Tanaman Penghasil Diosgenin dan Solasodin di Indonesia, Makalah seminar Nasional II Bahan Baku Kontrasepsi Pil. Badan Penelitian Tanaman Industri. Bogor.
- Suryawati, S., 1999. Pengaruh ion Hg^{2+} , Cd^{2+} atau Pb^{2+} Terhadap Akumulasi Fitosteroid dan Pertumbuhan Kultur Suspensi Sel *Agave amaniensis* Trell & Nowel dan *Costus speciosus* (Koen) Smith. Tesis, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Tal, B., Gressel, J., Goldberg, I., 1982. The Effect of Medium Constituens on Growth and Diosgenin Production by *Dioscorea deltoidea* cell Grown in Batch Cultures. *Planta media* 44, pp. 111 –115.
- Trease, G.E and Evans, W.C., 1987. Pharmacognosy. Alden Press. Great Britain, pp. 74 – 597.

Utami, W., 1997. Pengaruh Elisitor Biotik dan abiotik terhadap Pembentukan Diosgenin pada Kultur Jaringan *Costus speciosus*. Laporan Penelitian Program Penelitian Dasar. Lembaga Penelitian, Univ. Airlangga, Surabaya.

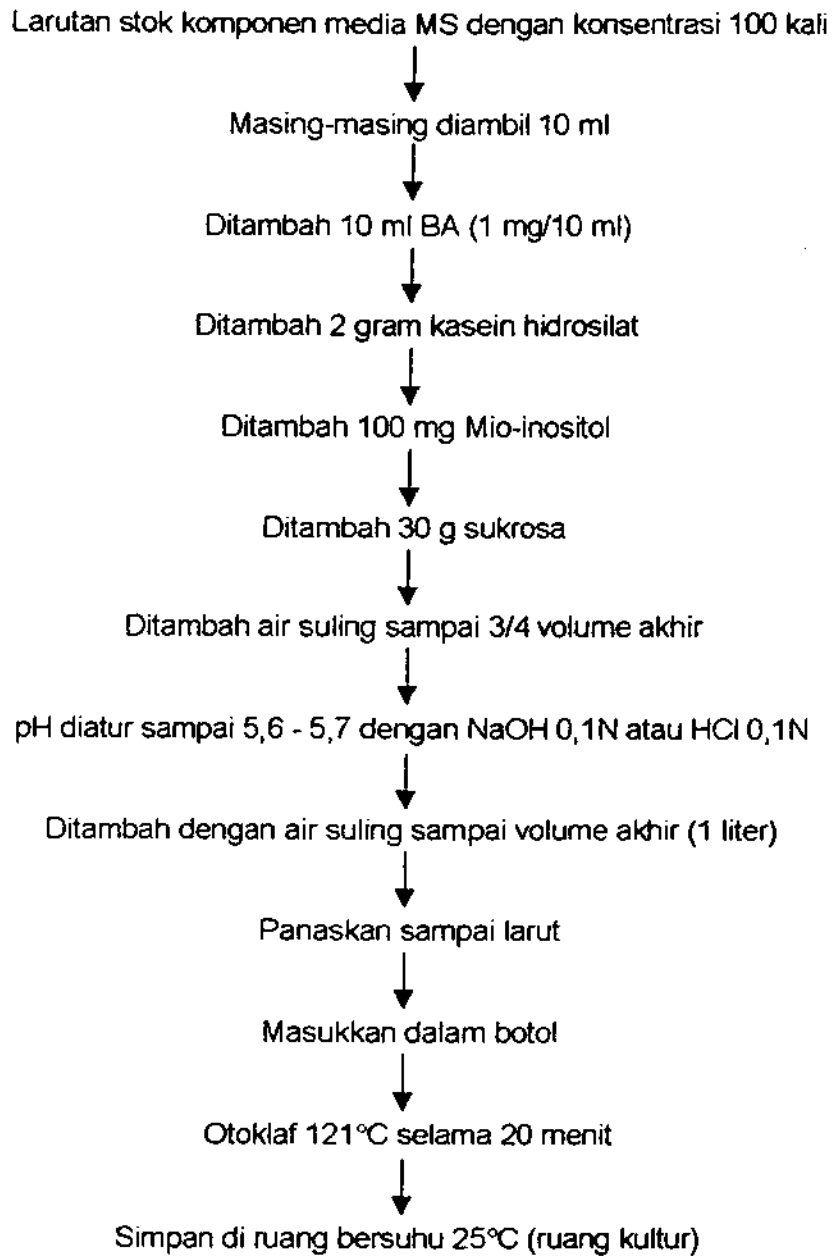
Verpoorte, R., *et al.* 1993. *Journal of Natural Product* 48. pp. 186-207.

Yamamoto, O., Yamada, Y. 1986. Production of Reserpine and its Optimization in Cultured *Rauwolfia serpentina* Benth Cells. *Plant Cell Rep* 5. Pp 50-53.

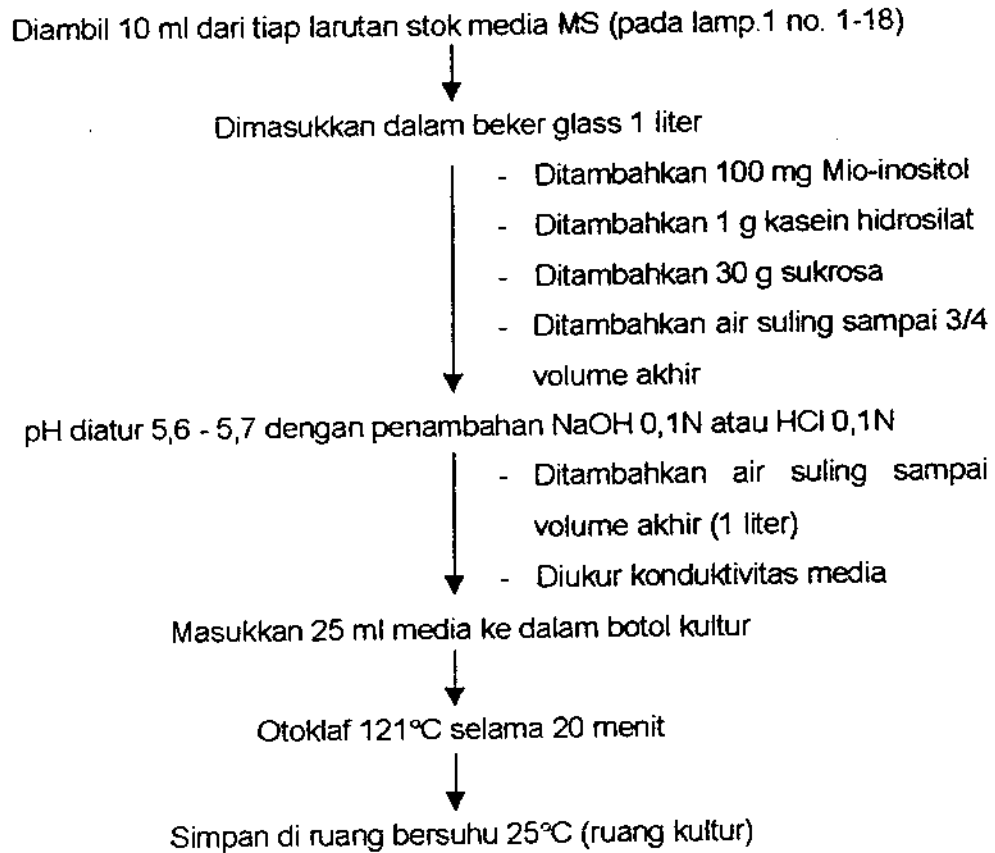
Lampiran 1. Komposisi media Murashige dan Skoog yang dimodifikasi untuk pertumbuhan kultur pucuk, kultur akar, kultur kalus dan kultur suspensi sel *Costus speciosus* (Koen) Smith kode F-8.

Komponen	Jumlah (mg / l)			
	Kultur Pucuk	Kultur Akar	Kultur Kalus	Kultur Suspensi
NH ₄ NO ₃	1650	1650	1650	1650
KNO ₃	1900	1900	1900	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	440	440	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170	170	170
H ₃ BO ₃	6,200	6,200	6,200	6,200
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,300	22,300	22,300	22,300
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,600	8,600	8,600	8,600
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250	0,250	0,250	0,250
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,800	27,800	27,800	27,800
Na ₂ EDTA	37,300	37,300	37,300	37,300
KI	0,830	0,830	0,830	0,830
As. Nikotinat	0,500	0,500	0,500	0,500
Piridoxin HCl	0,500	0,500	0,500	0,500
Glisin	2,000	2,000	2,000	2,000
Thiamin HCl	0,100	0,100	0,100	0,100
Benzyl Adenin	1,000	-	-	-
IBA ₃	-	3,000	-	-
Kinetin	-	-	2,000	2,000
2,4 D	-	-	0,500	0,500
Sukrosa	30000	30000	30000	30000
Mio-inositol	100	100	100	100
Casein Hidrosilat	2000	1000	1000	1000
Agar	-	-	7	-
pH	5,6 - 5,7	5,6 - 5,7	5,6 - 5,7	5,6 - 5,7

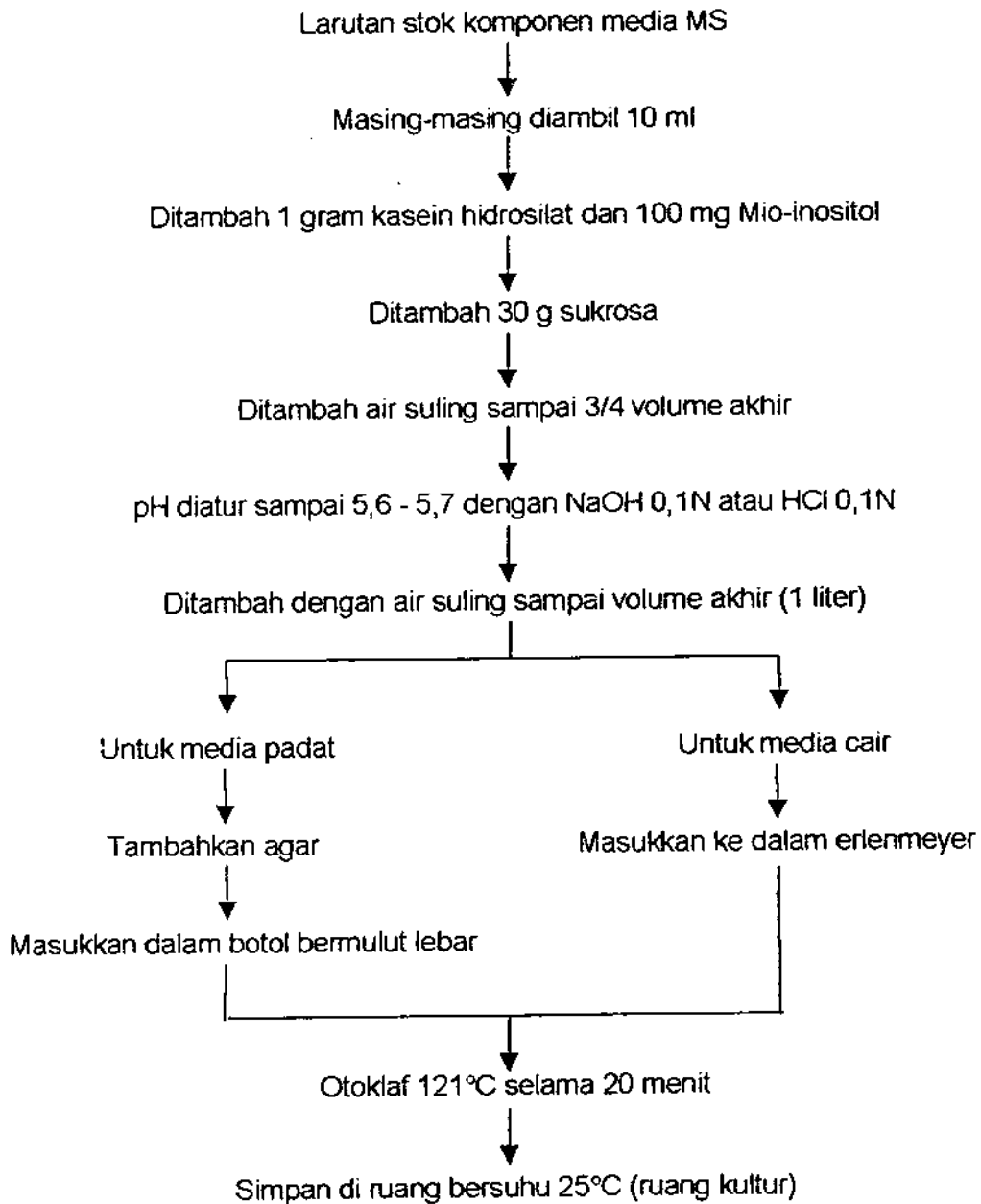
Lampiran 2. Skema pembuatan media BA₁C₂ kultur pucuk *Costus speciosus* (Koen) Smith kode F-8.



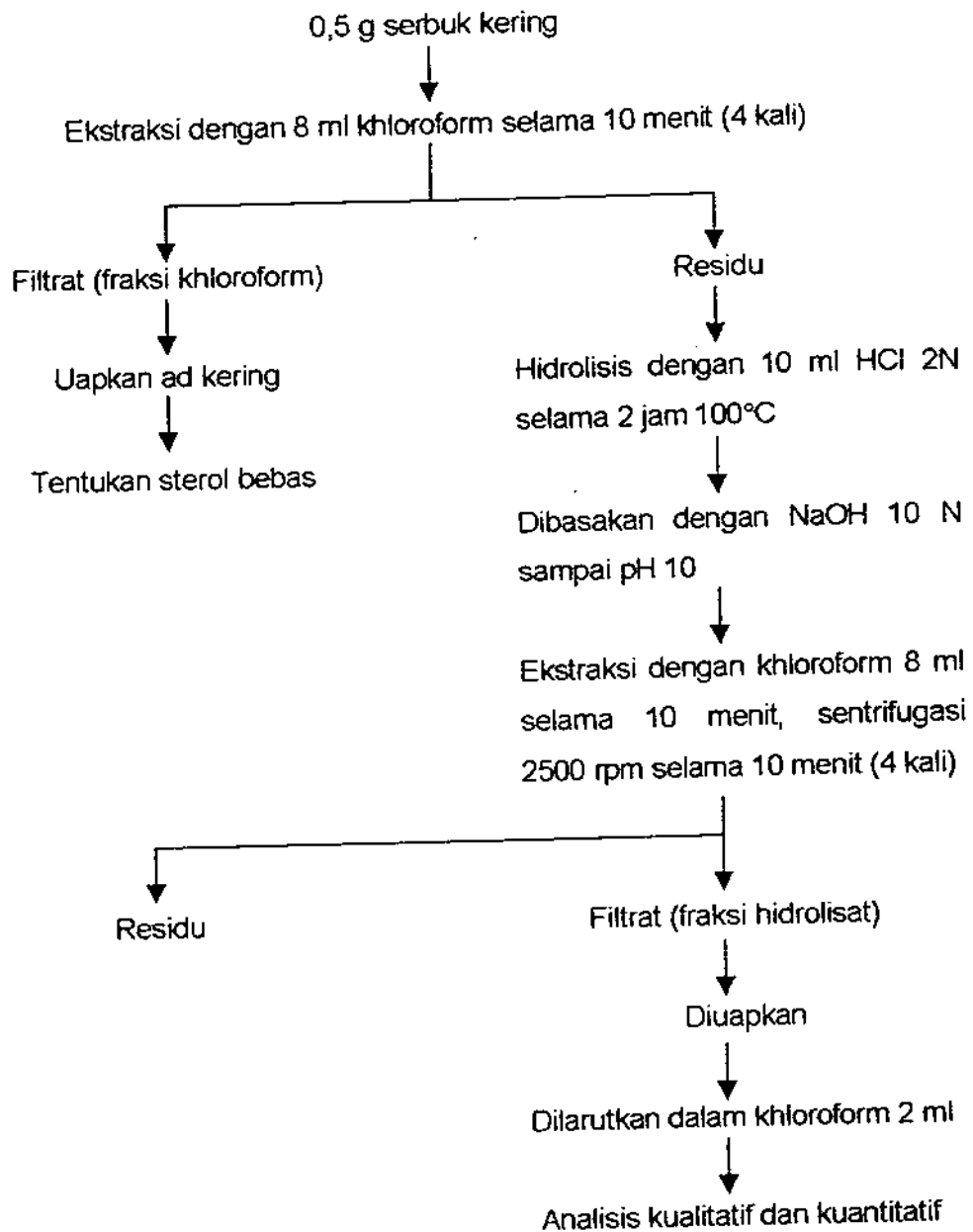
Lampiran 3. Skema pembuatan media IBA₃ kultur akar *Costus speciosus* (Koen) Smith kode F-8.



Lampiran 4. Skema pembuatan media kultur kalus dan kultur suspensi *Costus speciosus* (Koen) Smith kode F-8.



Lampiran 5. Skema ekstraksi sapogenin steroid dan sterol.



Analisis of Variance Indeks Pertumbuhan (IP) Pada Kultur Kalus**Descriptives**

IP Pada Kultur Kalus

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
A	30	.67147	3.1812E-02	.583	.728
AN-1	30	1.43050	.13865	1.193	1.835
AN-2	29	1.06769	7.8717E-02	.959	1.331
AN-3	29	1.20741	.17312	.548	1.367
AN-4	30	1.50820	.24014	1.101	1.942
AN-5	30	2.48620	.24575	2.148	2.852
AN-6	30	2.92253	.29079	2.462	3.464
AN-7	17	4.22906	.57776	3.346	5.625
AN-8	30	4.55797	.35849	4.036	5.221
N	30	5.72877	.42238	4.938	6.476
Kontrol	18	5.63767	.42482	4.723	6.261
Total	303	2.70138	1.78085	.548	6.476

ANOVA

IP Pada Kultur Kalus

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	932.989	10	93.299	1099.165	.000
Within Groups	24.785	292	8.488E-02		
Total	957.774	302			

Lampiran 7

Analisis of Variance Indeks Pertumbuhan (IP) Pada Kultur Pucuk**Descriptives**

IP Pada Kultur Pucuk

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
A	12	1.67250	.13844	1.498	1.985
AN-1	12	1.25008	.13088	1.038	1.511
AN-2	12	1.26283	.15425	1.054	1.629
AN-3	10	1.55430	.13633	1.368	1.764
AN-4	10	1.56600	.23039	1.157	1.975
AN-5	10	1.64740	.19922	1.343	1.931
AN-6	12	1.98250	.24074	1.611	2.345
AN-7	12	1.63558	.19866	1.351	1.976
AN-8	12	1.58608	.14349	1.371	1.826
N	13	1.37785	.13538	1.216	1.690
Kontrol	12	1.66900	.24505	1.381	2.171
Total	127	1.56135	.26838	1.038	2.345

ANOVA

IP Pada Kultur Pucuk

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.234	10	.523	15.803	.000
Within Groups	3.842	116	3.312E-02		
Total	9.075	126			

Lampiran 8

Analisis of Variance Indeks Pertumbuhan (IP) Pada Kultur Akar

Descriptives

IP Pada Kultur Akar

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
A	10	.44060	3.0178E-02	.376	.477
AN-1	10	.41840	4.3321E-02	.359	.466
AN-2	10	.48720	4.7539E-02	.374	.563
AN-3	9	.52667	4.4576E-02	.463	.594
AN-4	10	.53080	2.5965E-02	.463	.550
AN-5	10	.60700	1.9391E-02	.581	.645
AN-6	10	.64280	6.5243E-02	.509	.736
AN-7	7	.65214	.12916	.406	.814
AN-8	8	.64925	5.5792E-02	.591	.737
N	8	.52538	4.9173E-02	.460	.604
Kontrol	10	.78600	2.5267E-02	.746	.824
Total	102	.56696	.11763	.359	.824

ANOVA

IP Pada Kultur Akar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.144	10	.114	41.037	.000
Within Groups	.254	91	2.787E-03		
Total	1.397	101			

Analysis of Variance Indeks Pertumbuhan (IP) Pada Kultur Suspensi**Descriptives**

IP Pada Kultur Suspensi

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
A	10	.65290	7.2095E-02	.545	.762
AN-1	10	.95550	4.3697E-02	.869	1.023
AN-2	9	.77889	.10156	.618	.899
AN-3	10	1.29560	.11434	1.179	1.596
AN-4	8	2.79363	.15363	2.638	3.023
AN-5	9	3.84822	.28684	3.440	4.261
AN-6	10	4.11740	.21826	3.765	4.464
AN-7	10	4.82340	.48598	4.119	5.564
AN-8	10	5.18160	.38733	4.644	5.809
N	9	3.51033	.24025	3.132	3.934
Kontrol	10	5.41300	.36241	4.747	5.745
Total	105	3.04743	1.80131	.545	5.809

ANOVA

IP Pada Kultur Suspensi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	330.815	10	33.082	468.612	.000
Within Groups	6.636	94	7.059E-02		
Total	337.451	104			

Lampiran 10
Oneway - Kadar Diosgenin Pada Kultur Pucuk

ANOVA

Kadar Diosgenin

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	85360.600	10	8536.060	108.305	.000
Within Groups	1891.566	24	78.815		
Total	87252.167	34			

Kode	N	Subset for alpha = .05					
		1	2	3	4	5	6
AN-5	2	115.56950					
AN-6	6	118.02000					
AN-4	2	130.27950					
AN-8	6		156.76933				
A	2		164.51950				
AN-7	6			184.81117			
AN-1	2				204.10800		
AN-2	2				214.47000	214.47000	
AN-3	2					230.38850	
Kontrol	2						256.13750
N	3						271.76433

Lampiran 11

Oneway - Diosgenin Kultur Akar

ANOVA

Kadar Diosgenin

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8572.976	10	857.298	10.420	.000
Within Groups	1234.077	15	82.272		
Total	9807.053	25			

Kode	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
N	2	47.53800			
AN-2	4	60.96375	60.96375		
A	2	62.15650	62.15650		
AN-8	2	64.79850	64.79850		
AN-3	2	66.65900	66.65900		
AN-1	4		73.78125	73.78125	
AN-7	2		79.13700	79.13700	
AN-5	2			90.31600	
Kontrol	2			91.50000	
AN-4	2			93.05150	
					119.19200

Lampiran 12

Oneway - Kadar Sterol Pada Kultur Pucuk

ANOVA

Kadar Sterol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5825.653	10	582.565	1.249	.292
Within Groups	18196.968	39	466.589		
Total	24022.621	49			

Kode	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
N	4	41.96900	
AN-8	4	49.16125	49.16125
Kontrol	4	61.71825	61.71825
AN-1	6	61.89288	61.89288
AN-6	4	66.75325	66.75325
AN-2	4	67.19400	67.19400
AN-4	4	71.94575	71.94575
AN-5	4	73.45925	73.45925
AN-3	4	74.42675	74.42675
AN-7	4	75.67050	75.67050
A	6		79.80450

Lampiran 13

Oneway - Sterol Kultur Akar

ANOVA

Kadar Sterol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5994.953	10	599.495	7.764	.000
Within Groups	2548.118	33	77.216		
Total	8543.071	43			

K	N	Subset for alpha = .05						
		1	2	3	4	5	6	7
AN-6	4	29.69575						
AN-5	4	32.99025	32.99025					
AN-4	4	38.04875	38.04875	38.04875				
AN-3	4		45.25650	45.25650	45.25650			
N	4			47.38225	47.38225	47.38225		
AN-2	4			48.70150	48.70150	48.70150	48.70150	
AN-7	4				52.81125	52.81125	52.81125	
Kontrol	4				57.68600	57.68600	57.68600	57.68600
A	4					60.97100	60.97100	60.97100
AN-8	4						61.67725	61.67725
AN-1	4							67.44875

Lampiran 14

Oneway - Kadar Sterol Pada Kultur Kalus

ANOVA

Kadar Sterol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	32769.779	10	3276.978	13.333	.000
Within Groups	14501.430	59	245.787		
Total	47271.209	69			

Kode	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
AN-6	8	38.80688			
AN-5	9	40.21711			
AN-7	8	42.16150			
AN-4	6	53.77967	53.77967		
N	7	56.33400	56.33400		
Kontrol	4		68.93550	68.93550	
AN-3	6			77.30150	
AN-2	6			78.21450	
AN-8	6			82.95217	
AN-1	6			85.98583	
A	4				114.97375

Lampiran 15

Oneway - Kadar Sterol Pada Kultur Suspensi

ANOVA

Kadar Sterol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	65553.174	10	6555.317	2.857	.006
Within Groups	123902.63	54	2294.493		
Total	189455.80	64			

Kode	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
AN-5	8	68.96113	
AN-4	6	69.76033	
N	4	74.80500	
AN-8	7	78.29814	
AN-6	6	78.80083	
AN-3	6	102.29950	102.29950
AN-7	8	107.00237	107.00237
A	5	129.93380	129.93380
Kontrol	4	134.18500	134.18500
AN-2	6		155.22417
AN-1	5		157.20780

Lampiran 16, Model Persamaan Regresi Indeks Pertumbuhan Kultur Jaringan *Costus speciosus*

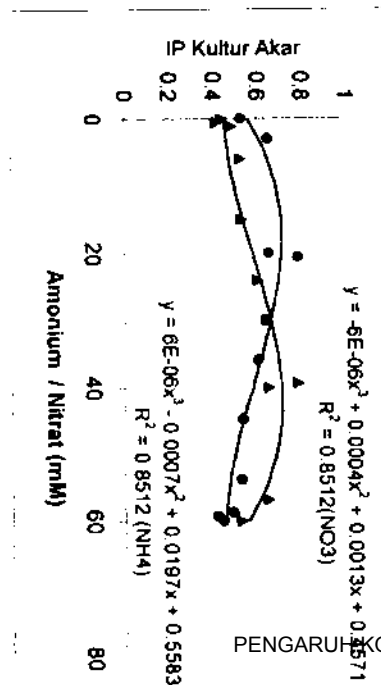
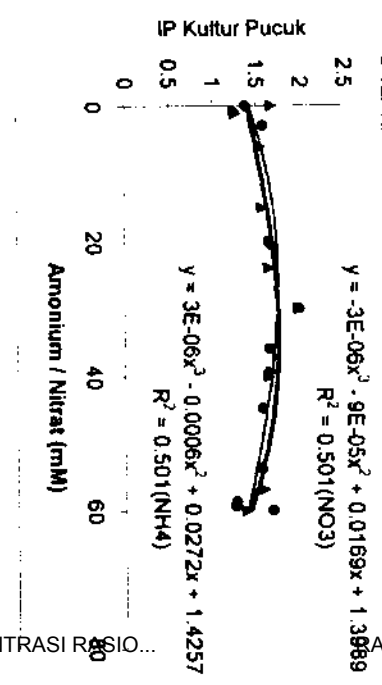
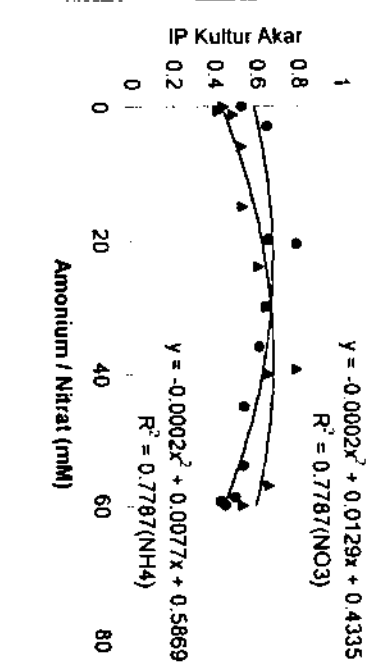
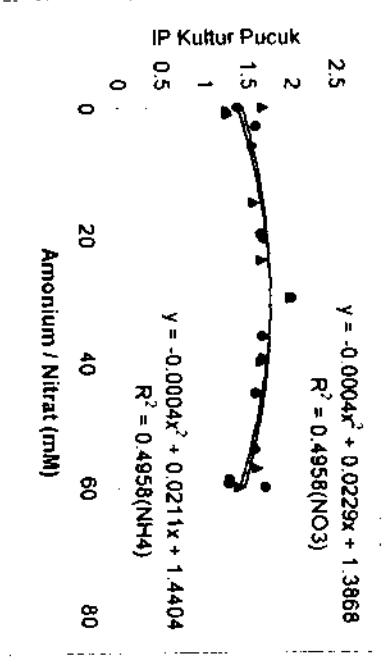
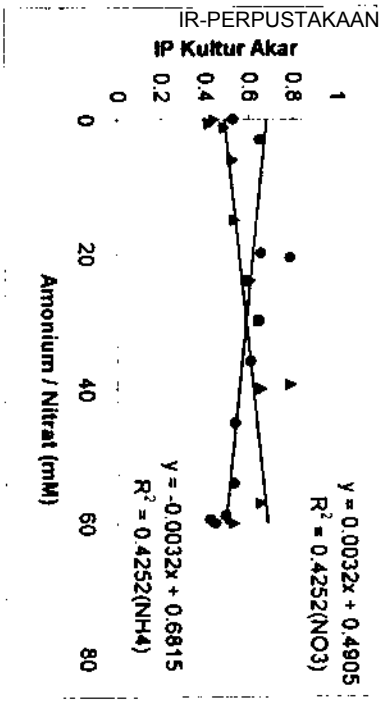
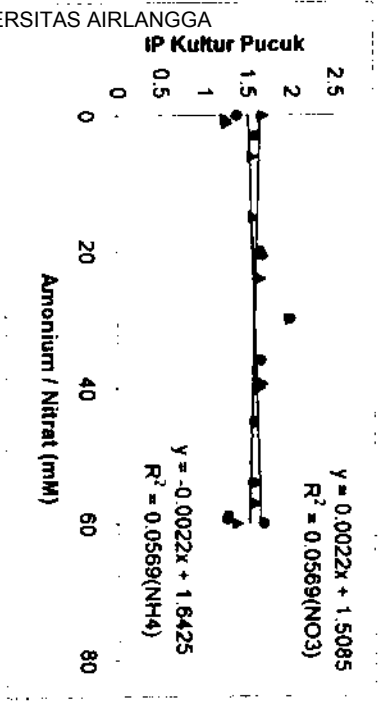
Y	X	Model Persamaan Linier / Koefisien Determinasi		
		Linear	Quadratic	Cubic
IP Kultur Pucuk	Amonium	Y=-0,0022X+1,6425 R=0,2386 Fhit=0,5431 P=0,4799	Y=-0,0004X ² +0,0229X+1,3868 R=0,7041 Fhit=3,933 P=0,646	Y=3E-06X ³ -0,0006X ² +0,0272+1,4257 R=0,7078 Fhit=2,343 P=0,159
	Nitrat	Y=0,0022X+1,5085 R=0,2386 Fhit=0,5431 P=0,4799	Y=-0,0004X ² +0,0211X+1,4404 R=0,7041 Fhit=3,933 P=0,646	Y=-3E-06X ³ -9E-05X ² +0,0169X+1,3989 R=0,7078 Fhit=2,343 P=1,59
IP Kultur Akar	Amonium	Y=-0,0032X+0,6815 R=0,6520 Fhit=6,656*	Y=-0,0002X ² +0,0077X+0,5869 R=0,8824 Fhit=14,071*	Y=6E-06X ³ -0,0007X ² +0,0197X+0,5583 R=0,9226 Fhit=13,351*
	Nitrat	Y=-0,0032X+0,4905 R=0,6520 Fhit=6,656*	Y=-0,0002X ² +0,0129X+0,4335 R=0,8824 Fhit=14,071*	Y=-6E-06X ³ +0,0004X ² +0,0013X+0,4571 R=0,9226 Fhit=13,351*
IP Kultur Kalus	Amonium	Y=-0,0774X+5,529 R=0,9589 Fhit=102,778*	Y=-8E-05X ² -0,0725X+5,4864 R=0,9590 Fhit=45,841*	Y=6E-05X ³ +0,0054X ² -0,0445X+5,2055 R=0,9723 Fhit=40,3168*
	Nitrat	Y=0,0774X+0,882 R=0,9589 Fhit=102,778*	Y=-8E-05X ² +0,0818X+0,8568 R=0,9590 Fhit=45,841*	Y=-6E-05X ³ +0,0052X ² -0,0317X+1,0884 R=0,9723 Fhit=40,3168*
IP Kultur Suspensi	Amonium	Y=-0,0703X+1,2728 R=0,8592 Fhit=25,372*	Y=-0,0022X ² +0,0706X+4,273 R=0,9733 Fhit=72,0244*	Y=5E-05X ³ -0,007X ² +0,174X+4,0249 R=0,9833 Fhit=67,9207*
	Nitrat	Y=0,0703X+1,2728 R=0,8592 Fhit=25,372*	Y=-0,0022X ² +0,1951X+0,5374 R=0,9733 Fhit=72,0244*	Y=-5E-05X ³ +0,0025X ² +0,0948X+0,742 R=0,9833 Fhit=67,9209*

Lampiran 17, Model Persamaan Regresi Kadar Fitosteroid Kultur Jaringan *Costus speciosus*

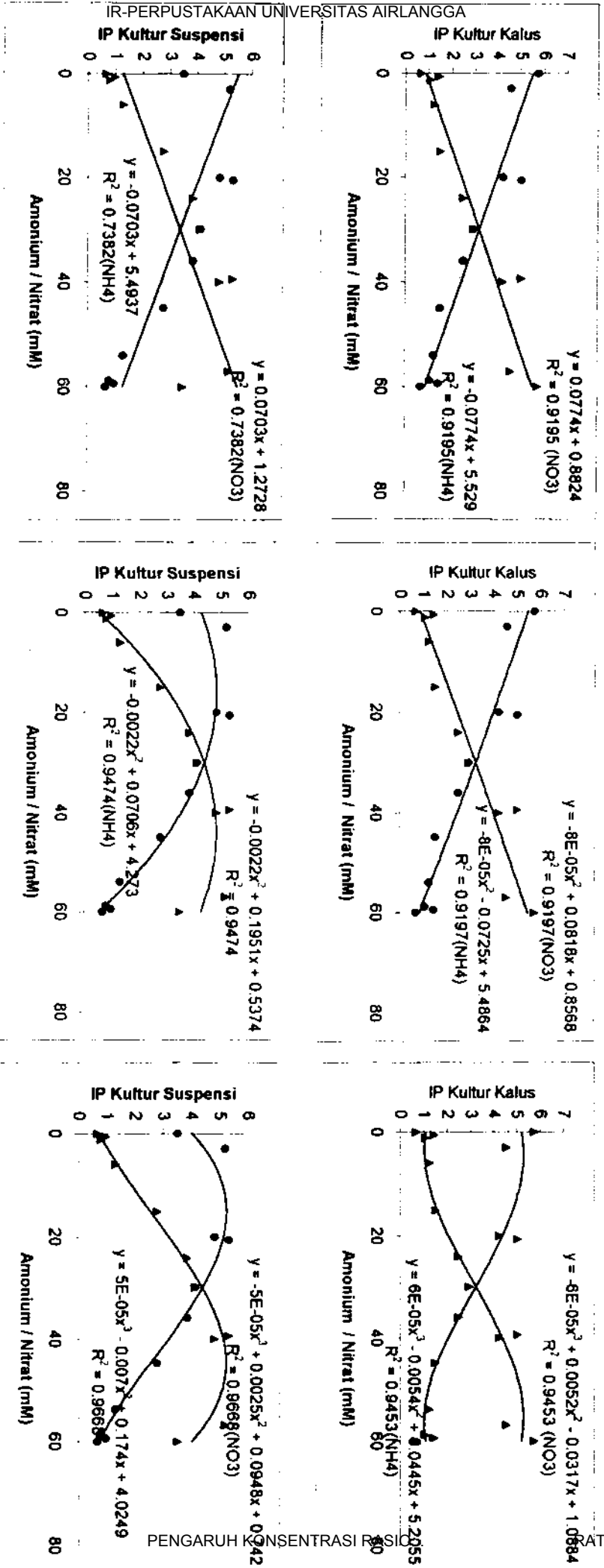
Y	X	Model Persamaan / Koefisien Determinasi		
		Linear	Quadratic	Cubic
Diosgenin Pucuk	Amonium	Y=-0,3876X+199,70 R=0,1592 R ² =0,0253 F _{nit} =0,23387 P=0,6402	Y=0,0698X ² -4,8318X+238,2 R=0,51043 R ² =0,26054 F _{nit} =1,4093P=0,2990	Y=0,0025X ³ -0,1522X ² +0,0105X+226,58 R=0,5555 R ² =0,3086 F _{nit} =1,0416 P=0,4314
	Nitrat	Y=0,3876X+176,45 R=0,1592 R ² =0,0253 F _{nit} =0,23387 P=0,6402	Y=0,0698X ² -3,5465X+199,64 R=0,51043 R ² =0,26054 F _{nit} =1,4093 P=0,2990	Y=0,0025X ³ +0,2894X ² -8,2427X+209 R=0,5555 R ² =0,3086 F _{nit} =1,0416 P=0,4314
Diosgenin Akar	Amonium	Y=-0,1215X+82,059 R=0,13902 R ² =0,0193 F _{nit} =0,17737 P=0,6835	Y=-0,043X ² +2,8568X+51,077 R=0,8433 R ² =0,71116 F _{nit} =9,8483*P=0,007	Y=0,0002X ³ -0,0629X ² +3,2916X+50,033 R=0,8451 R ² =0,7142 F _{nit} =5,82995P=0,0256
	Nitrat	Y=0,1215X+74,769 R=0,13902 R ² =0,0193 F _{nit} =0,17737 P=0,6835	Y=-0,043X ² -2,2998X+67,786 R=0,8433 R ² =0,71116 F _{nit} =9,8483 P=0,007	Y=-0,0002X ³ -0,0233X ² +1,8781X+68,647 R=0,8451 R ² =0,7142 F _{nit} =5,8299 P=0,0256
Sterol	Amonium	Y=0,9262X+102,69 R=0,79002 R ² =0,6242 F _{nit} =14,9465* P=0,0038	Y=-0,0223X ² +2,3472X+90,386 R=0,8532 R ² =0,7279 F _{nit} =10,7033 * P=0,0055	Y=0,0012X ³ -0,134X ² +0,47831X+84,54 R=0,8834 R ² =0,7805 F _{nit} =8,2956* P=0,0105
	Pucuk	Y=-0,9262X+158,26 R=0,79002 R ² =0,6242 F _{nit} =14,9465* P=0,0038	Y=-0,0223X ² +0,3318X+150,85 R=0,8532 R ² =0,7279 F _{nit} =10,7033* P=0,0055	Y=-0,0012X ³ +0,0881X ² -2,0306X+155,67 R=0,8834 R ² =0,7805 F _{nit} =8,2956* P=0,0105
Nitrat				

Sterol Akar	Amonium	$Y=0,046X+94,951$ $R=0,04114$ $F_{nit}=0,01526$	$R^2=0,0017$ $P=0,9044$	$Y=0,0423X^2-2,6462X+118,27$ $R=0,6413$ $F_{nit}=2,7938$	$R^2=0,41123$ $P=0,1202$	$Y=0,0029X^2-0,2225X^2+3,1302X+104,41$ $R=0,858$ $F_{nit}=6,505 *$	$R^2=0,736$ $P=0,0196$
	Nitrat	$Y=-0,046X+97,712$ $R=0,04114$ $F_{nit}=0,01526$	$R^2=0,0017$ $P=0,9044$	$Y=0,0423X^2-2,4292X+111,76$ $R=0,6413$ $F_{nit}=2,7938$	$R^2=0,41123$ $P=0,1202$	$Y=-0,0029X^2+0,3042X^2-8,0314X+123,19$ $R=0,858$ $F_{nit}=6,5035 *$	$R^2=0,736$ $P=0,0196$
Sterol Kalus	Amonium	$Y=0,8193X+156,11$ $R=0,44609$ $F_{nit}=2,2359 *$	$R=0,199$ $P=0,1691$	$Y=0,0681X^2-3,5139X+144,48$ $R=0,7695$ $F_{nit}=5,8073 *$	$R^2=0,5921$ $P=0,0277$	$Y=0,0028X^2+0,3174^2-4,9875X+1,896$ $R=0,8374$ $F_{nit}=5,4744 *$	$R^2=0,7012$ $P=0,0297$
	Nitrat	$Y=0,8193X+156,11$ $R=0,44609$ $F_{nit}=2,2359 *$	$R^2=0,199$ $P=0,1691$	$Y=0,0681X^2-4,6552X+178,72$ $R=0,7695$ $F_{nit}=5,8073 *$	$R^2=0,5921$ $P=0,0277$	$Y=0,0085X^2-0,7346X^2+16,444+130,34$ $R=0,9280$ $F_{nit}=14,4758 *$	$R^2=0,8612$ $P=0,0022$
Sterol Suspensi	Amonium	$Y=1,8266X+152,03$ $R=0,6373$ $F_{nit}=6,1551 *$	$R^2=0,4061$ $P=0,0349$	$Y=0,0336X^2-0,3113X+170,55$ $R=0,6674$ $F_{nit}=3,2129$	$R^2=0,4454$ $P=0,0946$	$Y=-0,0085X^2+0,7934X^2-19,969+305,94$ $R=0,9280$ $F_{nit}=14,4758 *$	$R^2=0,8612$ $P=0,0022$
	Nitrat	$Y=-1,8266X+261,63$ $R=0,6373$ $F_{nit}=6,1551 *$	$R^2=0,4061$ $P=0,0349$	$Y=0,0336X^2-3,719X+272,79$ $R=0,6674$ $F_{nit}=3,2129$	$R^2=0,4454$ $P=0,0946$	$Y=-0,0085X^2+0,7934X^2-19,969+305,94$ $R=0,9280$ $F_{nit}=14,4758 *$	$R^2=0,8612$ $P=0,0022$

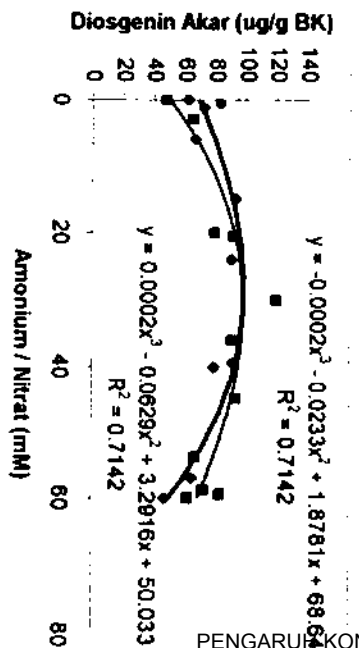
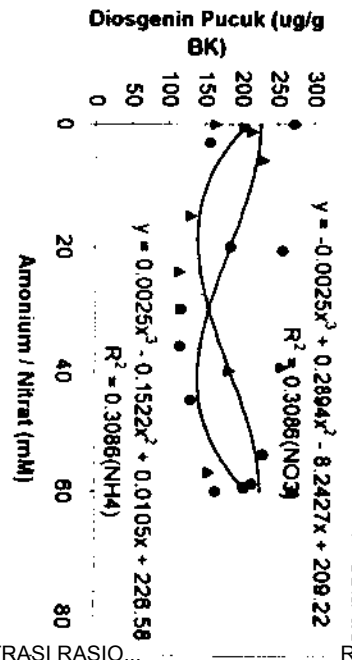
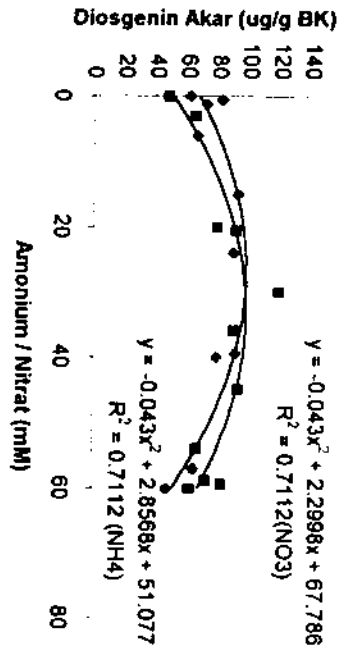
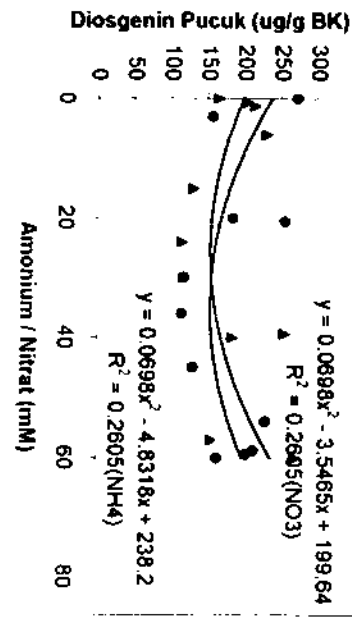
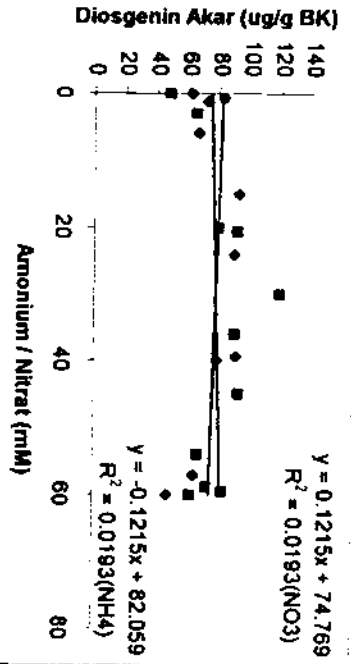
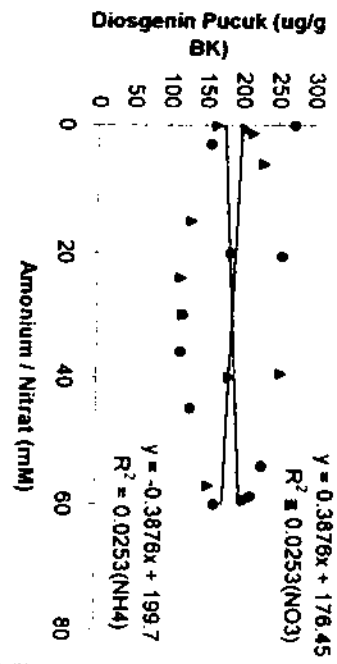
Lampiran 18. Kurva hubungan Indeks Pertumbuhan Kultur Pucuk, Kultur Akar



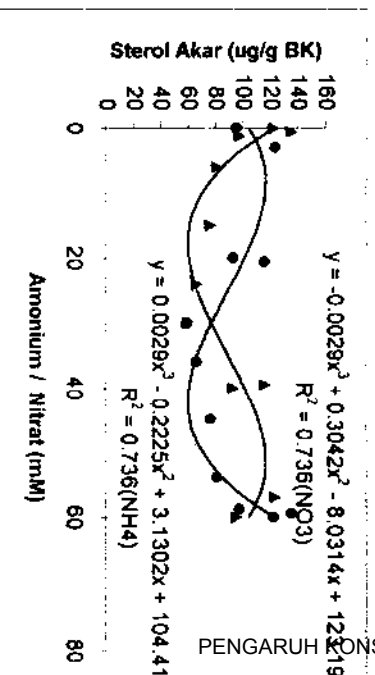
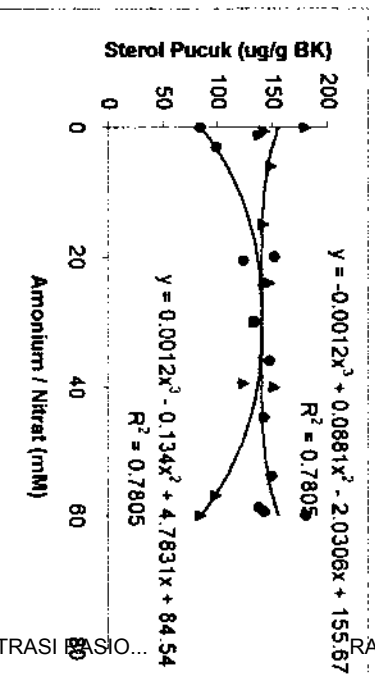
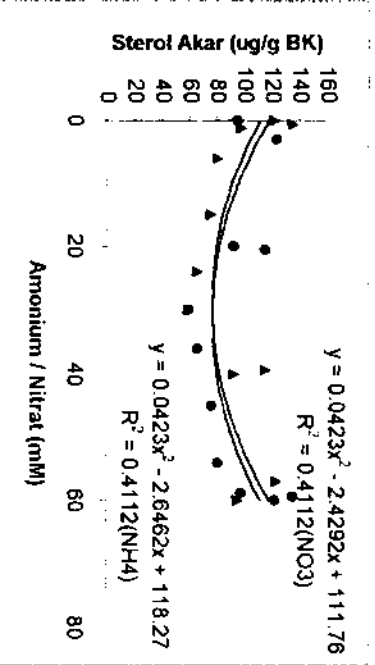
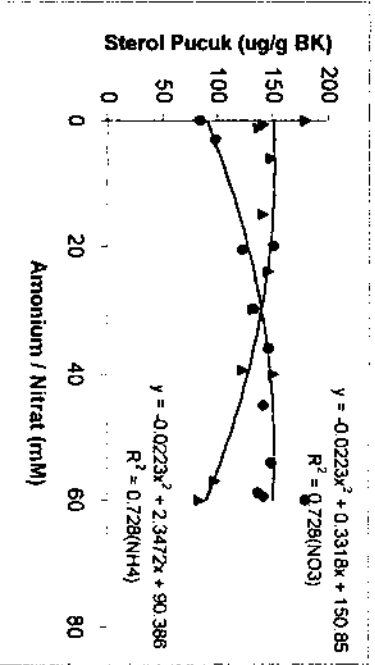
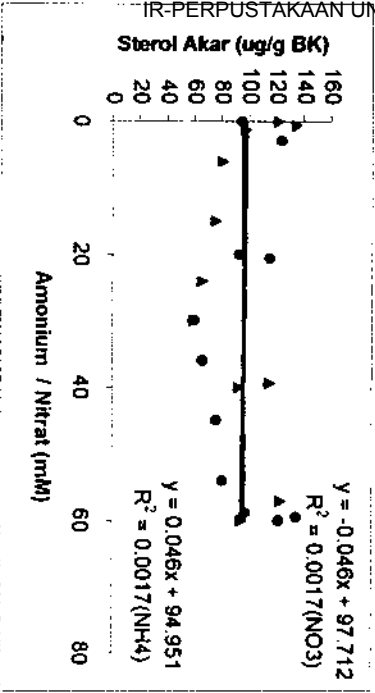
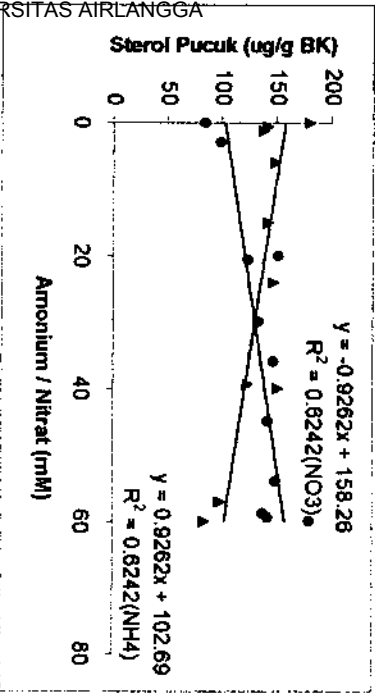
Lampiran 19. Kurva hubungan Indeks Pertumbuhan Kultur Kalus, Kultur Suspensi



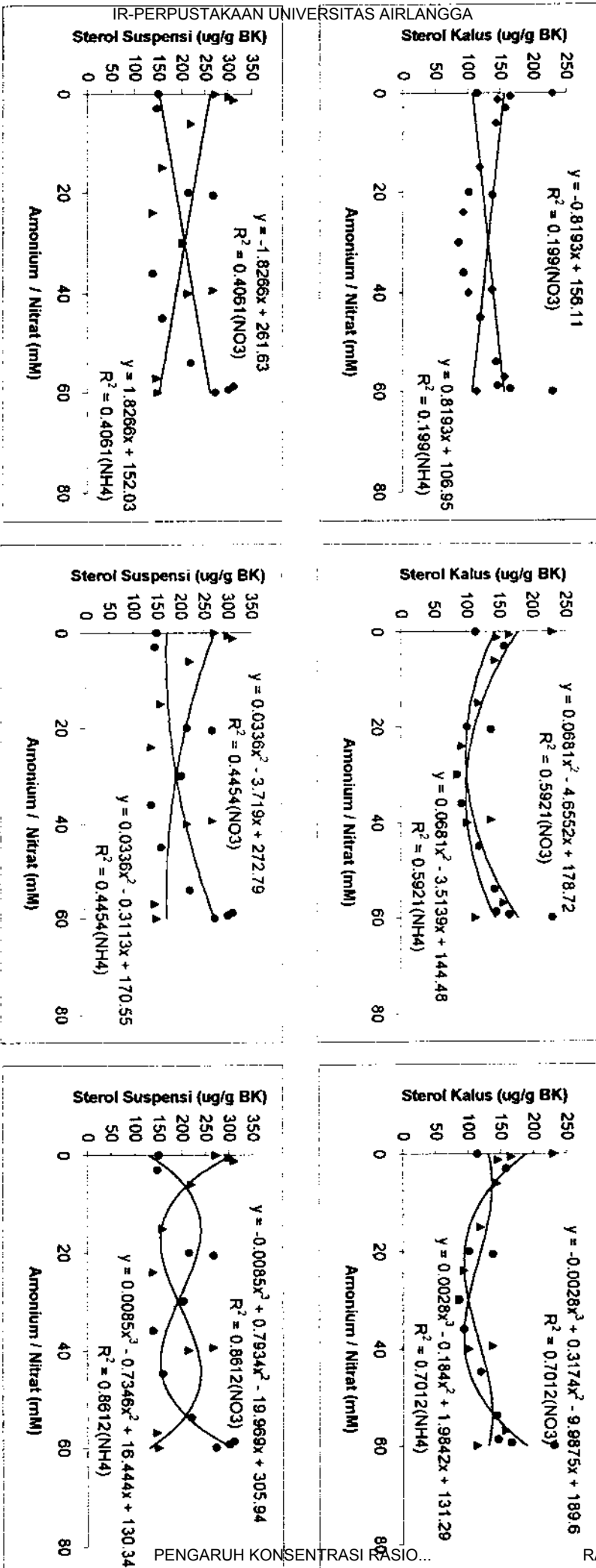
Lampiran 20. Kurva hubungan Diosgenin Kultur Pucuk, Kultur Akar



Lampiran 21. Kurva hubungan Sterol Kultur Pucuk, Kultur Akar



Lampiran 22. Kurva hubungan Sterol Kultur Kalus, Kultur Suspensi



V V B V R U S
 UNIVERSITAS SEBELAS MARIYAT
 SURABAYA
 K I T I M