

**PENGARUH VARIASI KONSENTRASI
BEBERAPA MAKROELEMEN TERHADAP
KANDUNGAN SOLASODINA PADA KULTUR
PUCUK *SOLANUM LACINIATUM***



KK.
TF 42/95
Pur
P.

MILIK
PERPUSTAKAAN
"UNIVERSITAS AIRLANGGA"
SURABAYA

OLEH :
TUTIEK PURWANTI

NIM. 099110993/M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
1994**

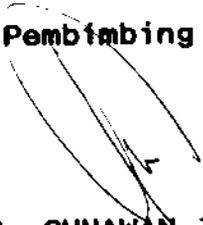
**PENGARUH VARIASI KONSENTRASI
BEBERAPA MAKROELEMEN TERHADAP
KANDUNGAN SOLASODINA PADA KULTUR
PUCUK *SOLANUM LACINIATUM***

TESIS
TELAH DISETUJUI OLEH PANITIA PENGUJI TESIS
PADA TANGGAL 21 OKTOBER 1994

MEMENUHI PERSYARATAN PENDIDIKAN
PASCASARJANA PROGRAM MAGISTER
PROGRAM STUDI ILMU FARMASI

Oleh :
TUTIEK PURWANTI
NIM. 099110993/M

Pembimbing Ketua :


DR. GUNAWAN INDRAYANTO
NIP. 130 541 814

Pembimbing :


PROF. DR. NOOR CHOLIES ZAINI
NIP. 130 355 372

Mengetahui :
Ketua Program Studi Ilmu Farmasi


DR. WIDJI SOERATRI
NIP. 130 611 501

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah s.w.t, atas berkah, rahmat serta karuniaNya, maka kami dapat menyelesaikan tesis, sebagai persyaratan pendidikan Pascasarjana Program Magister-Program Studi Ilmu Farmasi di Universitas Airlangga.

Pada kesempatan ini perkenankanlah kami menyampaikan rasa terimakasih yang tak terhingga kepada :

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah berkenan memberikan ijin kepada kami untuk mengikuti pendidikan Pascasarjana.

Tim Managemen Program Doktor, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia atas pemberian beasiswa selama kami mengikuti pendidikan Pascasarjana.

Dr. Gunawan Indrayanto dan Prof. Dr. Noor Cholies Zaini, sebagai pembimbing kami, yang telah banyak memberikan nasihat, saran, bimbingan dan dorongan moral sejak awal hingga terselesaikannya tesis ini.

Dr. Ika Mariska dari PUSLITBANGTRI, Bogor yang telah memberi bantuan kultur pucuk *Solanum laciniatum* sebagai bahan penelitian.

Dr. Fasich, selaku Asisten Direktur I Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang telah berkenan membantu dan memberikan dorongan moril dalam penyelesaian tesis ini.

Dr. Widji Soeratri, selaku Ketua Program Studi Ilmu Farmasi Program Pascasarjana Unair atas bantuan dan

dorongan moril yang telah diberikan dalam penyelesaian tesis ini.

Kepala laboratorium Bioteknologi Farmasi beserta staf, atas segala bantuan dan fasilitas yang diberikan selama penelitian kami.

Kepala laboratorium beserta staf laboratorium dasar bersama Universitas Airlangga, yang telah memberikan fasilitas dan bantuan dalam penyelesaian analisis kami.

Para sejawat di laboratorium Preskripsi Formulasi, yang telah banyak membantu dan memberikan dorongan moril serta memberikan fasilitas untuk terselesaikannya tesis ini.

Suami, ketiga putra-putri tercinta dan seluruh anggota keluarga, yang dengan tulus telah memberikan pengertian, dorongan moril maupun materiil serta doa selama kami mengikuti pendidikan ini.

Akhirnya kami sampaikan terima kasih kepada semua pihak yang tidak sempat kami sebutkan satu demi satu, yang telah membantu maupun memberikan dorongan dalam penyelesaian tesis ini.

Semoga Allah s.w.t. senantiasa memberikan rahmat dan hidayahNya. Amin.

Surabaya, Oktober 1994

Penyusun

RINGKASAN

Biosintesis metabolit sekunder dalam sistem KJT dipengaruhi oleh banyak faktor, diantaranya adalah jenis dan kadar komponen media. Faktor-faktor ini cukup penting untuk diketahui agar lebih mengerti dan memahami suatu tanaman dalam pembentukan metabolit sekunder dalam sistim KJT.

Diberikan perlakuan variasi konsentrasi sumber nitrogen, variasi konsentrasi ion kalsium dan variasi konsentrasi ion magnesium, untuk mengetahui pengaruh dari beberapa komponen makroelemen tersebut terhadap pembentukan metabolit sekunder solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*.

Kultur pucuk *Solanum laciniatum* ditanam pada berbagai macam media perlakuan, disimpan dalam ruangan dengan suhu sekitar 25 ° C dengan intensitas penyinaran sekitar 700 lux. Panen dilakukan setelah kultur berumur 4 minggu, ditentukan harga indeks pertumbuhan dan kadar relatif klorofilnya. Daun dipotong-potong dikeringkan di dibawah sinar lampu dengan temperatur 40-60°C, lalu diserbuk. Ditentukan susut penengringannya sampai diperoleh harga susut pengeringan tidak lebih dari 2 %.

Dilakukan optimalisasi fase gerak dan metode hidrolisa untuk mendapatkan hasil pemisahan dan metode hidrolisa terbaik. Digunakan fase gerak terpilih kloroform-metanol-dietilamin (20:2:0,5), sedang

kan metode hidrolisa yang digunakan adalah metode Carle (hidrolisa dengan HCL 2N dalam metanol pada temperatur 70-75°C selama 2 jam di dalam oven).

Serbuk kering kultur pucuk *Solanum laciniatum* diekstraksi dengan kloroform, filtrat diuapkan dan disisihkan untuk dianalisis tersendiri. Residu dihidrolisa dengan HCL 2N dalam metanol selama 2 jam, pada suhu 70-75°C di dalam oven. Setelah dingin dibasakan sampai pH nya 10 lalu diencerkan dengan 5 ml air. Diekstraksi dengan kloroform dengan cara divorteks, lalu fase kloroform dipisahkan dengan cara sentrifugasi. Ekstrak kloroform dipisahkan dan diuapkan sampai kering.

Dilakukan analisis identifikasi dengan KLT digunakan fase gerak kloroform-metanol-dietilamin (20:2:0,5), dilanjutkan dengan uji kemurnian bercak dengan pemeriksaan spektra panjang gelombang dengan TLC-Scanner (densitometri). Untuk identifikasi juga dilakukan pemeriksaan spektra dengan FT-IR dan Spektrometri masa isolat yang diperoleh dari ekstrak fraksi hidrolisat sampel dan dibandingkan dengan spektra dari standar solasodina.

Hasil analisis KLT dari fraksi hidrolisat dengan fase gerak kloroform : metanol : dietilamin = 20 : 2 : 0,5 didapatkan 4 bercak yang relatif sama untuk semua perlakuan media. Di antara keempat bercak, terdapat satu bercak berwarna biru yang sangat dominan mempunyai harga R_f yang sama dengan R_f stan-

dar solasodina (SIGMA). Hasil identifikasi dengan FT-IR dan spektrometri masa menunjukkan profil spektra yang identik dengan standar.

Dilakukan validasi metoda analisis meliputi linieritas, presisi, akurasi, batas deteksi dan batas kuantitasi.

Penetapan kadar solasodina dilakukan menggunakan TLC-Scanner. Terhadap hasil analisa dihitung kadar dan produktivitas solasodina pada berbagai media perlakuan.

Sumber nitrogen memberikan pengaruh terhadap peningkatan kandungan dan produktivitas solasodina kultur pucuk *Solanum laciniatum* dalam bentuk kombinasi dengan komposisi $\text{NH}_4^+ - \text{NO}_3^- = 1:2$, dengan jumlah total nitrogen 130 mM. Memberikan produktivitas tertinggi $0,14 \text{ mg.fl}^{-1}.\text{w}^{-1}$ (± 2 kali produktifitas media MK).

Penambahan konsentrasi ion kalsium 6,0 mM memberikan peningkatan produktivitas solasodina $0,23 \text{ mg.fl}^{-1}.\text{w}^{-1}$ ($\pm 3,3$ kali produktivitas media MK). Sedangkan penghilangan ion kalsium dari media (konsentrasi ion kalsium 0,0 mM), memberikan peningkatan produktivitas solasodina $0,14 \text{ mg.fl}^{-1}.\text{w}^{-1}$ (± 2 kali produktivitas media MK).

Peningkatan konsentrasi ion magnesium sebesar 10,0 mM meningkatkan produktivitas solasodina $0,15 \text{ mg.fl}^{-1}.\text{w}^{-1}$ ($\pm 2,2$ kali produktivitas media MK).

Secara keseluruhan, diketahui ada korelasi

antara produktivitas solasodina dengan kadar relatif klorofil pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*, r hitung 0,657 dan r tabel ($P < 0,01; n = 14$) = 0,623. Sedangkan kadar atau kandungan solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* tidak dipengaruhi oleh kadar relatif klorofil. Juga diketahui bahwa kandungan maupun produktivitas solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* tidak berhubungan dengan indeks pertumbuhan.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	i
UCAPAN TERIMA KASIH	ii
RINGKASAN	iv
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
BAB I : PENDAHULUAN	1
BAB II : TINJAUAN PUSTAKA	9
1. Tinjauan Tentang <i>Solanum laciniatum</i>	9
1.1. Tanaman <i>Solanum Laciniatum</i>	9
1.2. Kultur Pucuk <i>Solanum laciniatum</i>	10
2. Tinjauan Kultur Jaringan Tanaman	10
2.1. Tinjauan Umum	10
2.2. Media Kultur Jaringan Tanaman	12
2.3. Pembentukan Metabolit Sekunder Dalam Kultur Jaringan Tanaman	16
3. Tinjauan Tentang Steroid	18
3.1. Tinjauan Umum	18
3.2. Solasodina	23
4. Analisa Kualitatif Dan Kuantitatif	25
4.1. Kromatografi Lapisan Tipis	25

4.2. Densitometri	26
4.3. Analisis Dengan FT-IR	29
4.4. Analisa Dengan Spektrometri Masa	30
BAB III : BAHAN, ALAT DAN METODE PENELITIAN	32
1. Bahan	32
1.1. Bahan Percobaan	32
1.2. Bahan Kimia	32
1.3. Media	33
2. Alat	33
3. Metode Penelitian	34
3.1. Tahapan Penelitian	34
3.2. Cara Kerja	35
3.2.1. Pembuatan Media	35
3.2.2. Penanaman Dan Kultivasi Kultur Pu - cuk	36
3.2.3. Panen Dan Perhitungan Indeks Per - tumbuhan	37
3.2.4. Penetapan Kadar Relatif Klorofil ...	37
3.2.5. Pengeringan Dan Penetapan Susut Pe - ngeringan	38
3.2.6. Optimalisasi Fase Gerak	39
3.2.7. Optimalisasi Metode Hidrolisa	39
3.2.8. Ekstraksi	43
3.2.9. Identifikasi Dengan KLT	43
3.2.10. Identifikasi Dengan TLC-Scanner ...	44
3.2.11. Identifikasi Dengan FT-IR Dan MS ..	44

3.2.11.1. Isolasi Solasodina	44
3.2.11.2. Identifikasi Dengan FT-IR	45
3.2.11.3. Identifikasi Dengan MS	45
3.2.12. Analisa Kuantitatif Dengan TLC - Scanner	45
3.2.13. Analisa Data	50
BAB IV : HASIL PENELITIAN	52
1. Indeks Pertumbuhan	52
2. Penetapan Kadar Relatif Klorofil	53
3. Optimalisasi Fase Gerak	54
4. Optimalisasi Metode Hidrolisa	54
5. Analisa Kualitatif Solasodina	58
5.1. Uji Selektifitas	58
5.2. Identifikasi Dengan KLT	58
5.3. Identifikasi Dengan TLC-Scanner	58
5.4. Identifikasi Dengan FT-IR	62
5.5. Identifikasi Dengan MS	64
6. Validasi metode Analisa	66
7. Hasil Penetapan Kadar Solasodina	72
8. Hasil Perhitungan Produktivitas Solaso- dina	73
BAB V : PEMBAHASAN	80
BAB VI : KESIMPULAN	91
BAB VII : SARAN	93
DAFTAR PUSTAKA	94
LAMPIRAN	101

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1 : Struktur Inti Molekul Steroid	18
Gambar 2 : Jenis induk inti steroid	19
Gambar 3 : Transformasi sumber steroid alam	21
Gambar 4 : Contoh steroid menurut fungsinya	22
Gambar 5 : Struktur kimia solasodina	24
Gambar 6 : Struktur kimia solasonin	24
Gambar 7 : Struktur kimia solamargin	24
Gambar 8 : Skema kromatogram hasil analisa KLT ekstrak fraksi hidrolisat dengan berbagai jenis dan komposisi fase gerak pada lempeng Kieselgel 60 F ₂₅₄ dan penampak bercak anisaldehyd asam sulfat	55
Gambar 9 : Hasil pemeriksaan spektra absorban reflektan uji kemurnian bercak fraksi hidrolisat dengan fase gerak G(y) pada lempeng Kieselgel 60 F ₂₅₄ secara densitometri pada panjang gelombang 370-700 nm (x:standar)	56
Gambar 10: Profil kromatogram fraksi hidrolisat kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> media MK pada lempeng Kieselgel 60 F ₂₅₄ yang diperoleh melalui berbagai metode hidrolisa	57
Gambar 11: Profil kromatogram KLT fraksi hidrolisat kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> pada lempeng Kieselgel 60 F ₂₅₄ dengan fase gerak kloroform-metanol-dietilamin (20:5:0,5) dan penampak bercak anisaldehyd-asam sulfat	59

- Gambar 12: Profil spektra panjang gelombang standar solasodina (SD) dan fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* (SP) pada panjang gelombang 370-700 nm dengan TLC-Scanner (BL = base line)60
- Gambar 13: Profil kromatogram TLC-Scanner fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum*, diukur pada panjang gelombang 385 nm61
- Gambar 14: Spektra FT-IR standar solasodina dengan cara pelet KBr, diukur pada bilangan gelombang 400-4000 Cm^{-1} 62
- Gambar 15: Spektra FT-IR isolat fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* pada media MK, dengan cara pelet KBr diukur pada bilangan gelombang 400-4000 Cm^{-1} 63
- Gambar 16: Spektra masa standar solasodina, dengan metode ionisasi tumbukan elektron dan energi 70 eV64
- Gambar 17: Spektra masa isolat fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* media MK, dengan metode ionisasi tumbukan elektron dan energi 70 eV65
- Gambar 18: Kurva linier standar solasodina ($\mu\text{g}/\text{spot}$) terhadap luas area67
- Gambar 19: Kurva akurasi standar solasodina dalam fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum*, antara kadar teoritis [$x_c, \text{mg}/\text{g}$] terhadap kadar didapat [$x_f, \text{mg}/\text{g}$]70
- Gambar 20: Pengaruh sumber nitrogen terhadap kadar dan produktivitas solasodina, kadar relatif klorofil dan indeks pertumbuhan

	kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> . *(P=99%);**(P=95%)	74
Gambar 21:	Pengaruh ion kalsium terhadap kadar dan produktivitas solasodina, kadar relatif klorofil dan indeks pertumbuhan kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> . *(p=99%)	75
Gambar 22:	Pengaruh ion magnesium terhadap kadar dan produktivitas solasodina, kadar relatif klorofil dan indeks pertumbuhan kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> . *(P=99%)	76
Gambar 23:	Kurva korelasi antara produktivitas solasodina dengan kadar relatif klorofil pada kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> dalam berbagai media perlakuan	77
Gambar 24:	Diagram sebaran antara produktivitas solasodina dengan indeks pertumbuhan pada kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> dalam berbagai media perlakuan	77
Gambar 25:	Diagram sebaran antara kadar solasodina dengan kadar relatif klorofil pada kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> dalam berbagai media perlakuan	78
Gambar 26:	Diagram sebaran antara kadar solasodina dengan indeks pertumbuhan pada kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> dalam berbagai media perlakuan	78
Gambar 27:	Diagram sebaran antara indeks pertumbuhan dengan kadar relatif klorofil pada kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> dalam berbagai media perlakuan	79

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1 : Hasil perhitungan indeks pertumbuhan (IP) kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> yang berumur 4 minggu pada bermacam-macam media perlakuan	52
Tabel 2 : Hasil penetapan kadar relatif klorofil kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> yang berumur 4 minggu pada bermacam-macam media perlakuan	53
Tabel 3 : Hasil pengamatan linieritas standar solasodina (SIGMA)	66
Tabel 4 : Hasil perhitungan presisi fraksi hidrolisat kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> yang berumur 4 minggu dalam media MK ...	68
Tabel 5 : Hasil penetapan akurasi fraksi hidrolisat kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> yang berumur 4 minggu dalam media MK ...	69
Tabel 6 : Hasil penetapan kadar solasodina kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> yang berumur 4 minggu pada bermacam-macam media perlakuan	72
Tabel 7 : Hasil perhitungan produktivitas solasodina pada kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> yang berumur 4 minggu pada bermacam-macam media perlakuan	73

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Komposisi Media Murashige & Skoog yang dimodifikasi untuk pertumbuhan stok kultur pada Laboratorium Bioteknologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga (diberi kode media MK)	101
Lampiran 2 : Komposisi media perlakuan, sama dengan media MK, kacuali yang tertera dalam tabel	102
Lampiran 3 : Skema ekstraksi	103
Lampiran 4 : Jalur Biosintesis Steroid pada Tanaman	104

SINGKATAN

BA	: Benzyl Adenine
EGTA	: Ethylene Glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetra acetic acid
IP	: Indeks Pertumbuhan
KJT	: Kultur Jaringan Tanaman
KLT	: Kromatografi Lapis Tipis
LOD	: Limit Of Detection
LOQ	: Limit Of Quantitation
Media MS	: Media Murashige & Skoog
Rf	: Retardation factor
TLC-S	: Tin Layer Chromato Scanner
FT-IR	: Fourier Transform-Infra Red
MS	: Mass Spectrometry
RSD	: Relative Standard Deviation

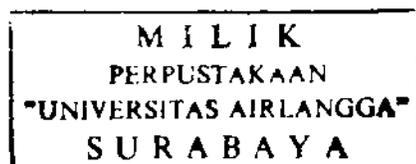
BAB I**PENDAHULUAN**

Steroid merupakan bahan dasar obat-obatan yang banyak digunakan dalam bidang farmasi, terutama yang memiliki aktifitas hormonal seperti kontrasepsi, kortikosteroid, juga obat-obat jantung, anti inflamasi, deuretik dan anabolik [Kieslich, 1986].

Dewasa ini penggunaan obat-obat golongan steroid menduduki peringkat kedua setelah pemakaian obat-obat golongan antibiotika [Kieslich, 1986]. Dengan kebutuhan yang terus meningkat waktu, dituntut penyediaan bahan dasar steroid yang memadai. Sebagai bahan baku steroid, semula digunakan diosgenin, namun dengan meningkatnya kebutuhan mulailah dimanfaatkan sumber potensial lainnya seperti solasodina, tomatidina, solanidina dan hekogenin [Nigra, et al, 1987]

Bahan baku steroid yang banyak dipakai seperti solasodina, diosgenin, hekogenin, stigmasterol umumnya berasal dari tanaman yaitu fitosteroid [Tarigan, 1980] dan keberadaannya dipengaruhi oleh banyak faktor misalnya jenis tanaman, iklim, letak geografis, kesuburan tanah, lahan kultivasi, hama atau penyakit tanaman dan sebagai-

1



nya. Faktor-faktor ini merupakan kendala yang harus dihadapi bila cara mendapatkannya digunakan kultivasi tanaman secara konvensional.

Keberhasilan Haberlandt pada tahun 1900 mengkultivasi sel tanaman secara *in vitro* [Barthlen, 1983] yang disusul suksesnya pada tahun enam puluhan dalam membuat kultur suspensi sel tanaman tertentu, membuka peluang baru dalam penyediaan metabolit sekunder secara bioteknologi sel tanaman menggunakan sistem kultur jaringan tanaman [Alfermann & Reinhard, 1985].

Berdasarkan beberapa penelitian yang sudah dilakukan, diketahui bahwa hampir semua golongan senyawa kimia alam/metabolit sekunder telah berhasil diproduksi menggunakan sistem kultur jaringan tanaman (sistem KJT). Bahkan beberapa di antaranya memberikan konsentrasi relatif lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman asalnya [Ellis, 1988]. Yang cukup menarik adalah adanya kemungkinan sistem KJT memproduksi metabolit sekunder yang sama sekali tidak diproduksi oleh tanaman asalnya. Hal ini membuka peluang untuk pencarian senyawa baru yang memiliki khasiat farmakologis tertentu [Philipson, 1990].

Meskipun telah diketahui bahwa setiap sel bersifat totipotensi, yaitu membawa seluruh informasi genetik tanaman asalnya, kemampuan sistem KJT memproduksi metabolit

sekunder sangat bervariasi dan dipengaruhi/tergantung banyak faktor, kecuali bila produk tersebut esensial bagi perkembangan dan pertumbuhan selnya [Staba, 1991]. Ketidakmampuan suatu sistem KJT memproduksi metabolit spesifiknya, diduga karena tidak terekspresikannya enzim tertentu yang hanya terekspresi pada sel terdiferensiasi [Whitaker, et al, 1986] atau karena tidak tersedianya vakuola sentral sebagai tempat akumulasi produk, sehingga produk yang telah terbentuk mengalami degradasi [Wink, 1988]. Karena pada umumnya metabolit sekunder yang biasanya bersifat toksik bagi tanaman yang bersangkutan, diakumulasi atau disimpan dalam vakuola sentral, dimana vakuola sentral ini tidak terdapat pada sel-sel meristematis seperti pada kultur kalus atau kultur suspensi [Constabel, 1990, Matile, 1990].

Selain faktor-faktor internal seperti telah diuraikan, beberapa faktor eksternal juga dapat mempengaruhi pembentukan metabolit sekunder pada sistem KJT, diantaranya pemberian elisitor logam-logam tertentu [Holden, et al, 1989], variasi komposisi dan konsentrasi nutrisi media [Dougall, 1985] dan sebagainya.

Dibandingkan dengan kultivasi secara konvensional, metode kultur jaringan tanaman mempunyai beberapa keuntungan antara lain kondisi dapat dikendalikan, yaitu de-

ngan pengaturan dan optimalisasi faktor-faktor yang berpengaruh terhadap pembentukan metabolit sekunder.

Pengaruh komposisi media terhadap pembentukan metabolit sekunder telah banyak diteliti para pakar dan terbukti bahwa komposisi media sangat mempengaruhi produktifitas suatu sistem KJT, secara kualitatif maupun kuantitatif, misalnya pengaruh terhadap kadar sterol kultur *Agave sp* [Indrayanto, 1990]. Peningkatan kadar ion kalsium dan magnesium sebesar 10 mM dapat menginduksi pembentukan alkaloid pada kultur *Rauwolfia sp* [Scuebel, et al, 1989]. Tetapi penghilangan ion kalsium pada media justru dapat meningkatkan kadar alkaloid pada kultur *Tabernaemontana divaricata* [Sierra, 1991]. Konsentrasi ion kalsium dan ion magnesium berpengaruh terhadap pembentukan kandungan fitosteroid kultur kalus *Agave amaniensis* [Noeraeni, 1992]. Juga telah diketahui adanya hubungan antara jenis/kadar sumber karbon, asam amino dan nitrogen dengan kandungan alkaloid pada kultur suspensi *Tabernaemontana divaricata* [Sierra, 1991].

Solasodina sebagai salah satu bahan dasar steroid merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *Solanum sp*. Satu di antaranya yang cukup potensial dan prospektif untuk dikembangkan kearah komersial dalam usaha memenuhi kebutuhan bahan baku steroid adalah *Solanum laciniatum*

[Chandler & Dodds, 1983]. Pengembangan tanaman ini secara bioteknologi (sistem KJT) banyak dilakukan para pakar.

Suatu penelitian menyebutkan bahwa, kultur kalus *Solanum laciniatum* mampu memproduksi solasodina 0,5-1,0 mg/g berat kering. Dengan menginduksi terjadinya diferensiasi sel, produksi solasodina dapat ditingkatkan [Chandler dan Dodds, 1983]. Tetapi pada penelitian yang lain dinyatakan bahwa pada kultur kalus *Solanum laciniatum* tidak terdeteksi adanya kandungan solasodina [Indrayanto, 1983].

Proses pembentukan solasodina pada kultur kalus *Solanum dulcamara* L, mempunyai hubungan dengan diferensiasi sel dan kadar klorofil [Emke & Eilert [1986]. Sementara peneliti lain menyatakan bahwa beberapa komponen makronutrien yaitu sukrosa, sumber nitrogen dan ion fosfat dapat mempengaruhi produksi solasodina pada kultur jaringan *Solanum laciniatum* [Chandler & Dodds, 1983].

Sumber nitrogen berpengaruh terhadap pertumbuhan dan pembentukan solasodina pada kultur suspensi *Solanum eleagnifolium* Cav. Dari suatu penelitian diketahui bahwa kombinasi amonium dan nitrat dalam bentuk $\text{NH}_4\text{NO}_3\text{-KNO}_3$ sebagai sumber nitrogen pada kultur suspensi sel tobacco, lebih berpengaruh dibandingkan dalam komposisi dan bentuk senyawa lainnya dengan total nitrogen yang sama. Hal

serupa juga terjadi pembentukan anthocyanin dalam kultur suspensi *Vitis*. Untuk *Solanum eleagnifolium*, biomasa tertinggi (4,08 mg/l berat kering) dan kadar solasodina tertinggi (6,88 mg/g berat kering) dicapai pada komposisi $\text{NH}_4\text{NO}_3:\text{KNO}_3=1:2$. Diketahui pula bahwa amonium dalam bentuk senyawa NH_4NO_3 merupakan sumber nitrogen terbaik dibanding bentuk senyawa amonium lainnya [Nigra, et al, 1990].

Sampai saat ini satu-satunya penelitian menggunakan kultur pucuk *Solanum laciniatum* yang telah ada, dilakukan oleh Conner. Kandungan solasodina pada daun tua *Solanum laciniatum*, mencapai 7,64 mg/g berat kering. Sedangkan pada kultur pucuk dengan kadar sukrosa tertentu dan dibawah pengaruh cahaya, dihasilkan solasodina 1,09 mg/g berat kering, tetapi dengan percobaan yang sama tanpa menggunakan sukrosa dihasilkan solasodina sebesar 2,23 mg/g berat kering. Sedangkan pada kultur kalus dengan kadar sukrosa tertentu dan dibawah pengaruh cahaya hanya dihasilkan solasodina sebesar 0,09 mg/g berat kering. Dari data-data yang diperoleh, diketahui bahwa biosintesis solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* didukung oleh aktifitas fotosintesis kloroplas. Disamping itu diketahui pula bahwa proses pembentukan solasodina dalam KJT dapat berlangsung dalam kondisi fotoautotropik maupun fotoheterotropik, dan dalam kondisi fotoautotropik

memberikan hasil yang lebih tinggi [Conner, 1987].

Berdasarkan hal-hal yang telah diuraikan, dapat dinyatakan bahwa pembentukan metabolit sekunder solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* mempunyai hubungan dengan keberadaan klorofil, karena melibatkan aktifitas fotosintesis kloroplas.

Oleh karena masih sedikitnya penelitian yang menggunakan kultur pucuk *Solanum laciniatum*, serta mengingat adanya pengaruh nutrisi/komponen media dalam proses pembentukan solasodina, perlu diteliti pengaruh beberapa makroelemen, terutama sumber nitrogen, ion kalsium dan ion magnesium terhadap kandungan solasodina kultur pucuk *Solanum laciniatum*. Karena berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan, komponen-komponen tersebut terbukti berpengaruh terhadap pembentukan maupun kandungan fitosteroid dengan berbagai manifestasi pengaruh yang bervariasi antara spesies yang telah diteliti.

Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh sumber nitrogen, ion kalsium dan ion magnesium terhadap kandungan dan produktivitas solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*, serta korelasinya dengan kadar klorofil dan indeks pertumbuhan.

Manfaat Penelitian

Dengan selesainya penelitian ini, diharapkan diketahui pengaruh sumber nitrogen, ion kalsium dan ion magnesium terhadap kandungan dan produktivitas solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*, serta korelasinya dengan kadar klorofil maupun indeks pertumbuhan. Sehingga dapat memberikan sumbangan informasi yang lebih lengkap untuk lebih mengerti dan memahami faktor-faktor yang berpengaruh terhadap pembentukan solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*

Hipotesis Penelitian

Berdasarkan hal-hal yang telah diuraikan, diajukan hipotesis sebagai berikut :

1. Sumber nitrogen , ion kalsium dan ion magnesium berpengaruh terhadap kandungan dan produktivitas solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*.
2. Ada korelasi antara produktivitas solasodina dengan kadar klorofil pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*
3. Ada korelasi antara produktivitas solasodina dengan indeks pertumbuhan pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

1. Tinjauan tentang *Solanum laciniatum*.

1.1. Tanaman *Solanum laciniatum*

Sebagai salah satu tanaman penghasil senyawa steroid khususnya solasodina, *Solanum laciniatum* memiliki prospek yang baik untuk dikembangkan. Dewasa ini penggunaan *Solanum laciniatum* dan *Solanum khasianum* untuk bahan baku steroid diarahkan ke produksi secara komersial, sebagai alternatif baru dalam penyediaan bahan baku steroid [Nigra, et al, 1990]

Di Selandia Baru, tanaman ini dibudidayakan secara besar-besaran untuk diambil solasodinanya [Conner, 1987]. Sistematika tanaman *Solanum laciniatum* [Lawrence, 1979]:

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

1.2. Kultur Pucuk *Solanum laciniatum*

Kultur pucuk *Solanum laciniatum* yang ada di laboratorium Bioteknologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga diperoleh dari PUSLITBANGTRI (Pusat Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Industri), BOGOR. Merupakan suatu kultur terdiferensiasi yang dapat tumbuh dengan baik pada media dasar Murashige & Skoog yang telah dimodifikasi dengan penambahan hormon pertumbuhan bensil adenin 4mg/l media.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diketahui bahwa kandungan solasodina kultur pucuk *Solanum laciniatum* lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan kultur kalus *Solanum laciniatum*, yaitu 2,23 mg/g berat kering, sedangkan kandungan solasodina kultur kalus hanya 0,09 mg/g berat kering [Conner,1987].

2. Tinjauan Tentang Kultur Jaringan Tanaman (KJT)

2.1. Tinjauan umum

Kultur jaringan tanaman dapat didefinisikan sebagai bagian/jaringan tanaman yang telah dipisahkan dari tanaman asalnya, ditumbuhkan dalam keadaan steril pada suatu media buatan dan sel-selnya mampu tumbuh serta mengadakan pembelahan-pembelahan [Indrayanto, 1986]. Jika media yang digunakan cocok, maka jaringan yang ditanam

sebagai eksplan steril (dalam bentuk tangkai daun, akar, serbuk sari dan sebagainya) akan tumbuh dan membelah menjadi massa sel yang meristematis dan belum terdeferensiasi yang disebut kultur kalus. Dengan merubah komposisi hormon pertumbuhan, kultur kalus dapat diregenerasikan menjadi tanaman baru. Bila kultur kalus dipindahkan ke media cair serta dilakukan agitasi dengan kecepatan tertentu, akan diperoleh kultur suspensi [Indrayanto, 1987]. Dalam perkembangan terakhir telah didapatkan suatu metoda baru yaitu "hairy root cultures" yang membuka peluang untuk penelitian bahan-bahan alam yang diproduksi/ biosintesisnya dalam akar tanaman [Indrayanto, 1989].

Dibandingkan dengan kultivasi tanaman secara konvensional, kultur jaringan tanaman mempunyai beberapa keuntungan [Mantell, et al, 1985, Fowler, 1986] :

1. Tidak terpengaruh oleh letak geografis, iklim, hama dan penyakit tanaman.
2. Kondisi dapat dikontrol, sehingga dihasilkan produk sesuai dengan yang dikehendaki.
3. Tidak membutuhkan lahan yang luas.
4. Waktu untuk pembudidayaan dapat dipersingkat.

Di dalam penerapannya, metode kultur jaringan tanaman dikembangkan untuk [Indrayanto, 1986]:

1. Produksi senyawa-senyawa tertentu yang berguna di

bidang farmasi/medik.

2. Biotransformasi senyawa-senyawa yang dapat digunakan dalam bidang farmasi/medik.
3. Produksi senyawa-senyawa spesifik, misalnya enzim, senyawa intermediet dan sebagainya.
4. Seleksi galur-galur tanaman unggul untuk bidang pertanian dan hortikultura.
5. Multiplikasi tanaman secara cepat dan seragam.

2.2. Media Kultur Jaringan Tanaman

Pada dasarnya komponen nutrisi media KJT terdiri dari senyawa kimia yang secara alami dibutuhkan bagi kelangsungan hidup tanaman [Manitto, 1981, Pierik, 1987]. Komposisi media yang biasa digunakan secara umum adalah sebagai berikut [Indrayanto, 1989]:

- Sumber karbon : sukrosa, glukosa, fruktosa, laktosa
- Makroelemen anorganik, dibutuhkan dalam jumlah lebih besar dari 0,5 mMol/l : NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , SO_4^{2-} .
- Mikroelemen anorganik, dibutuhkan dalam jumlah lebih kecil dari 0,5 mMol/l yaitu beberapa logam berat seperti Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} dan lain-lain.
- Vitamin-vitamin: tiamina, piridoksina, mioinositol, nikotinamid.



- Fitohormon : kinetin, auksin seperti NAA, IAA, 2,4 D dan sebagainya.

Nitrogen

Nitrogen mempunyai peranan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan sel tanaman, khususnya dalam sintesis protein termasuk enzim-enzim [Rokem, et al, 1985]. Telah diketahui bahwa komposisi nutrien, terutama nitrat, fosfat, ammonia, sumber karbon dan kalium sangat berpengaruh dalam proses metabolisme primer dan sekunder kultur sel tanaman [Holden, et al, 1989]. Nitrogen juga berperan dalam stimulasi pembentukan klorofil [Chandler & Dodds, 1983].

Sumber nitrogen dalam media merupakan faktor yang penting bagi pertumbuhan dan pembentukan metabolit sekunder. Konsentrasi sumber nitrogen yang tinggi dapat meningkatkan kadar L-glutamin pada sel *Symphytum officinale* sampai lebih dari 20% berat kering [Misawa, 1985]. Produksi glutamin ini mencapai kadar maksimum pada media dengan komposisi sumber nitrogen 4,95 g/l NH_4NO_3 dan 5,7 g/l KNO_3 [Dougall, 1982]. Untuk pembentukan diosgenin pada *Dioscorea spp*, diperoleh kadar diosgenin yang tinggi bila digunakan sumber nitrogen dengan komposisi $\text{KNO}_3 =$

1,9 g/l dan NH_4NO_3 1,65 g/l [Rokem, et al, 1985]. Sedangkan untuk pembentukan solasodina pada kultur suspensi *Solanum eleagnifolium* diperoleh biomasa dan kadar solasodina tertinggi bila digunakan sumber nitrogen berupa kombinasi KNO_3 - NH_4NO_3 pada perbandingan NO_3^- - NH_4^+ = 2:1 dengan total kandungan nitrogen 30 mM [Nigra, et al, 1990].

Ion kalsium (Ca^{2+})

Ion Kalsium berperan dalam metabolisme organel sel tanaman. Peningkatan ion kalsium sitostolik akan merangsang aktivasi NADH dehydrogenase eksternal yang merupakan suatu enzim mitokondria yang penting dalam proses metabolisme sel tanaman, meskipun peran fisiologis dan mekanisme regulasinya masih belum jelas. Namun diketahui bahwa secara insitu maupun dalam keadaan terisolasi aktivitas tersebut dihambat oleh *chelating agent* kation divalen dan dapat diaktifkan kembali oleh kation divalen [Moore, 1984].

Sintesis kalosa sangat tergantung pada penambahan ion kalsium dari luar sel. Hal ini dibuktikan oleh Kohle et al pada tahun 1985, dalam penelitiannya menggunakan *ethylene glycol-bis (β -aminoethyl eter)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA)*. Dalam penelitian yang lain diketahui

bahwa Verapamil yang bersifat sebagai antagonis ion kalsium mampu menghambat sintesa kalosa. Deposisi kalosa ke dalam dinding sel memegang peranan penting selama pertumbuhan dan pengembangan sel maupun jaringan serta mempengaruhi mekanisme pertahanan melawan bakteri patogen [Waldmann, 1988].

Pertumbuhan dan pembentukan metabolit sekunder dipengaruhi oleh adanya ion kalsium [Misawa, 1985]. Penambahan ion kalsium dengan konsentrasi tinggi dapat mempengaruhi pembentukan total alkaloida pada kultur *Tabernaemontana divaricata* [Indrayanto, 1989]. Pada *Morinda citrifolia*, adanya ion kalsium mutlak diperlukan untuk pertumbuhan dan produksi pigmen. Ohira dkk menyatakan bahwa pertumbuhan maksimum kultur suspensi padi dicapai pada kadar ion kalsium 0,2-1 mM dan pertumbuhan akan menurun bila kadar ion kalsium ditingkatkan. Sedangkan untuk kultur kalus *Lithospermium erythrorhizon*, pertumbuhan dan pembentukan derivat shikinin akan menurun bila terjadi peningkatan ion kalsium sampai di atas 3 mM [Dougall, 1985]. Sementara ion kalsium dengan konsentrasi 10 mM dapat meningkatkan kandungan glikoalkaloid raucaffrisin pada kultur suspensi *Rauwolfia serpentina* [Schuebel, et al, 1989].

Ion Magnesium (Mg^{2+})

Dari beberapa penelitian yang telah dilakukan, diketahui bahwa ion magnesium mampu menginduksi pembentukan metabolit sekunder pada kultur jaringan beberapa jenis tanaman [Schuebel, 1989, Indrayanto, 1990].

Dimungkinkan ion magnesium berperan sebagai salah satu elisitor logam berat, yang dapat menginduksi pembentukan dan akumulasi fitoaleksin, karena seperti telah diketahui bahwa beberapa metabolit sekunder merupakan senyawa fitoaleksin [Holden, et al, 1989, Kolodziej, 1989].

Ion magnesium mempunyai peran dalam pembentukan organel sel tanaman, khususnya pada sintesa asam amino, walaupun peran ini tampaknya tidak begitu spesifik [Pierik, 1987].

2.3. Pembentukan metabolit sekunder pada KJT

Metode KJT merupakan salah satu alternatif untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder. Beberapa publikasi menyatakan bahwa sistem KJT mampu memproduksi metabolit sekunder yang identik dengan tanaman asalnya dalam jumlah sama atau lebih kecil, bahkan beberapa di antaranya dengan kadar yang relatif lebih tinggi. Juga diketahui adanya sistem KJT yang mampu memproduksi

senyawa yang sama sekali berbeda dari tanaman asalnya, walaupun ada juga sistem KJT yang tidak mampu memproduksi senyawa spesifik tanaman asalnya. Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap kecepatan pertumbuhan atau produksi metabolit sekunder pada sistem KJT antara lain [Crocomo, 1981, Dixon, 1985, Indrayanto, 1987]:

- Komposisi dan konsentrasi komponen media yang dipakai, seperti sumber karbon, makroelemen, hormon pertumbuhan, zat kompleks tertentu, elisitor, prekursor dan sebagainya.
- pH media
- Temperatur
- Kecepatan agitasi pada kultur (untuk kultur suspensi)
- Cahaya
- Konsentrasi oksigen, karbon dioksida, etilen

Untuk mendapatkan kadar metabolit sekunder yang tinggi, perlu dilakukan optimalisasi faktor-faktor yang berpengaruh pada pembentukan metabolit sekunder tersebut.

Aktifitas biosintesis dalam kultur sel berkaitan dengan pertumbuhan sel dan pembentukan metabolit sekunder sering melibatkan beberapa mekanisme kontrol. Hubungan antara pertumbuhan dan pembentukan metabolit sekunder dapat diklasifikasikan sebagai berikut [Crocomo, et al,

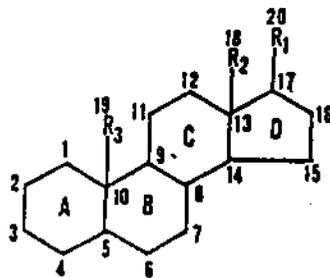
1981] :

- Pertumbuhan sel berlangsung bersamaan dengan akumulasi metabolit sekunder.
- Akumulasi metabolit sekunder terjadi setelah pertumbuhan sel menurun/berhenti.
- Pertumbuhan sel terjadi sedikit mendahului pembentukan metabolit sekunder.

3. Tinjauan tentang steroid

3.1. Tinjauan Umum

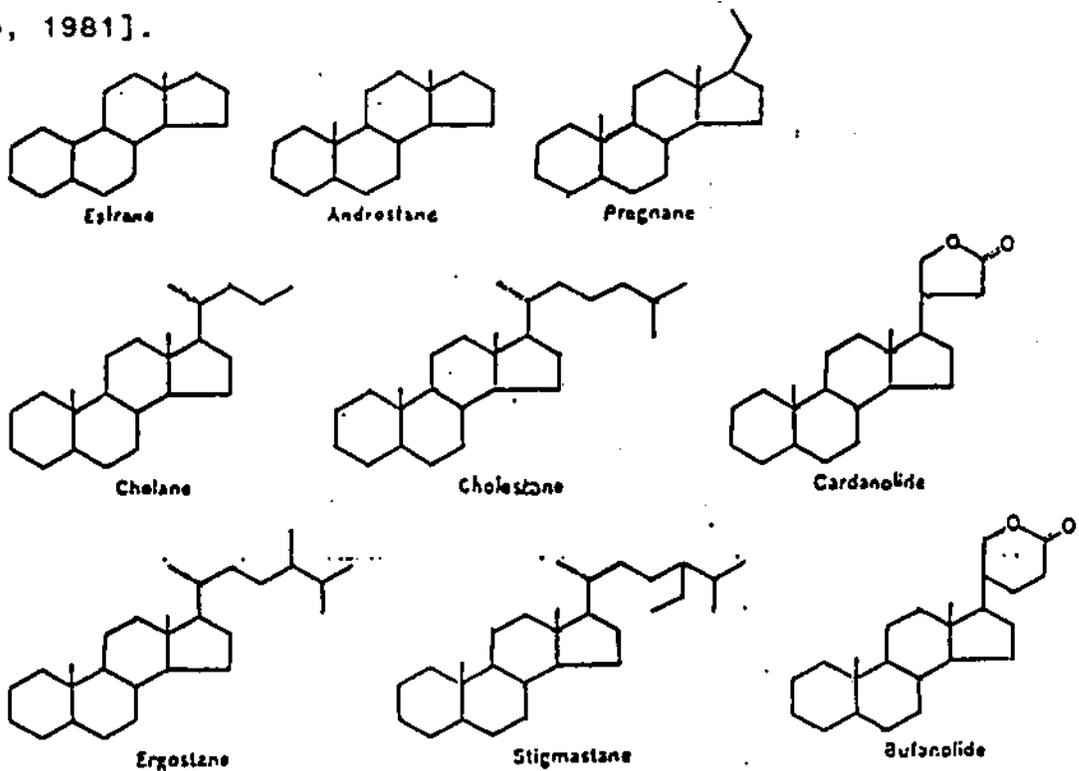
Steroid adalah senyawa yang memiliki kerangka inti siklopentanoperhidrofenantrena, yang banyak terdapat pada tanaman dari suku Solanaceae, Liliaceae, Schrophulariaceae dan juga pada hewan. Struktur inti dari molekul steroid merupakan fusi dari tiga sikloheksana dengan 17 buah atom karbon. Struktur inti molekul steroid jenuh ini disebut gonan [Manitto, 1981]



Gambar 1 : Struktur inti steroid

Semua golongan steroid dianggap sebagai turunan gonan yang telah mengalami substitusi, oksidasi dan atau dehidrogenasi. R_1 , R_2 dan R_3 akan membedakan macam steroid tersebut. [Groenendijk, 1970, Varro, et al, 1981, Manitto, 1981]. Setiap induk dari tetrasiklik hidrokarbon mempunyai nama spesifik [Varro, et al, 1981] seperti tertera pada gambar 2.

Berdasarkan strukturnya, senyawa steroid secara garis besar dibagi menjadi dua golongan yaitu steroid sederhana dengan atom karbon tidak lebih dari 21 dan steroid yang memiliki jumlah atom karbon lebih dari 21 [Manitto, 1981].



Gambar 2 : Jenis induk intisteroid [Varro, et al, 1981]

Steroid yang memiliki lebih dari 21 atom C dibagi lagi menjadi beberapa golongan [Fieser, L.F. & Fieser, M., 1980, Manitto, 1981] yaitu :

- Sterol : kolesterol, stigmasterol
- Hormon seks : androgen, estrogen, gestogen
- Asam empedu : apocholic acid, hyocholic acid,
pythocholic acid
- Vitamin : vitamin D₂, vitamin D₃
- Glikosida jantung : sarmentogenin, sarvogenin
- Sapogenin steroid : diosgenin, kryptogenin
- Alkaloid steroid : solanidina, tomatidina.

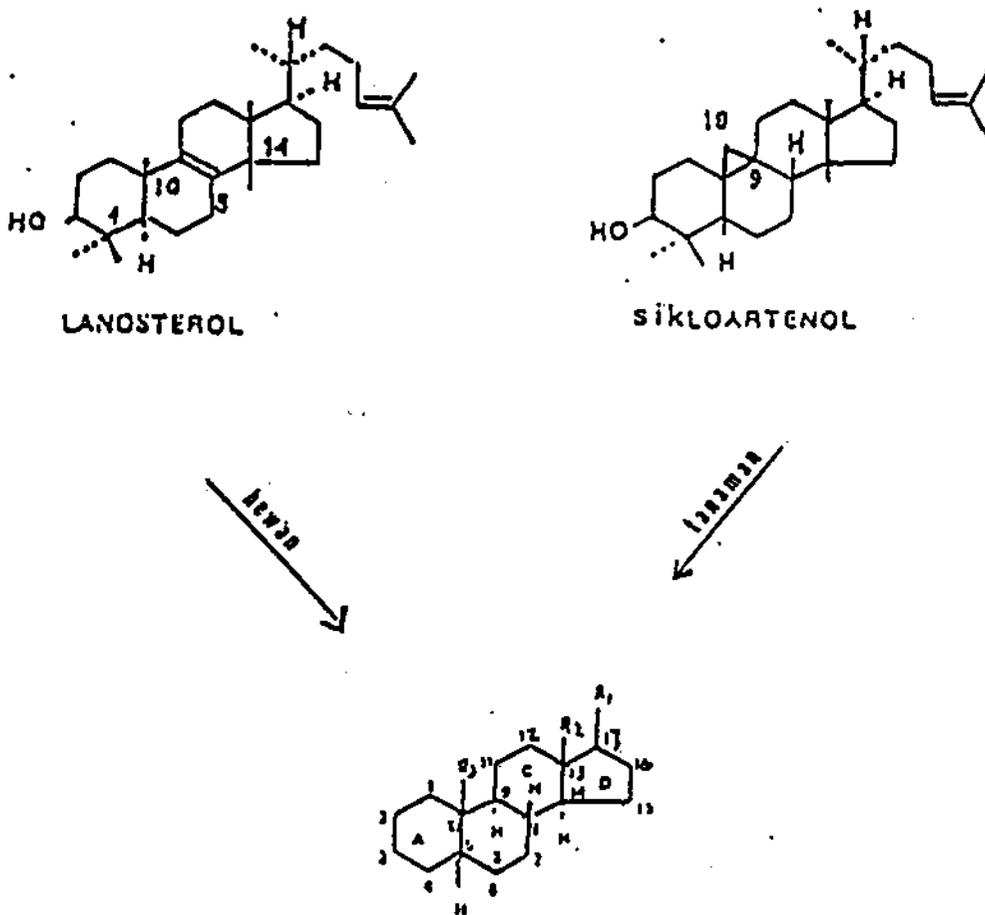
Steroid alam pada tumbuhan, biasanya berasal dari sikloartenol, sedangkan yang berasal dari hewan umumnya merupakan hasil transformasi kimia triterpen lanosterol (gambar 3).

Berdasarkan aktifitasnya, senyawa steroid digolongkan menjadi 3 golongan yaitu hormon seks (androgen, estrogen, gestogen), kortikosteroid dan asam empedu [Groenendijk, 1970].

Steroid mewakili sejumlah besar senyawa yang terbagi dalam berbagai golongan sesuai dengan macam gugus fungsi dari rantai samping struktur induk, yaitu sterol, sapogenin, kardiak aglikon, asam empedu, steroida adrenal dan hormon seks [Varro, et al, 1981, Manitto, 1981, Torssell,

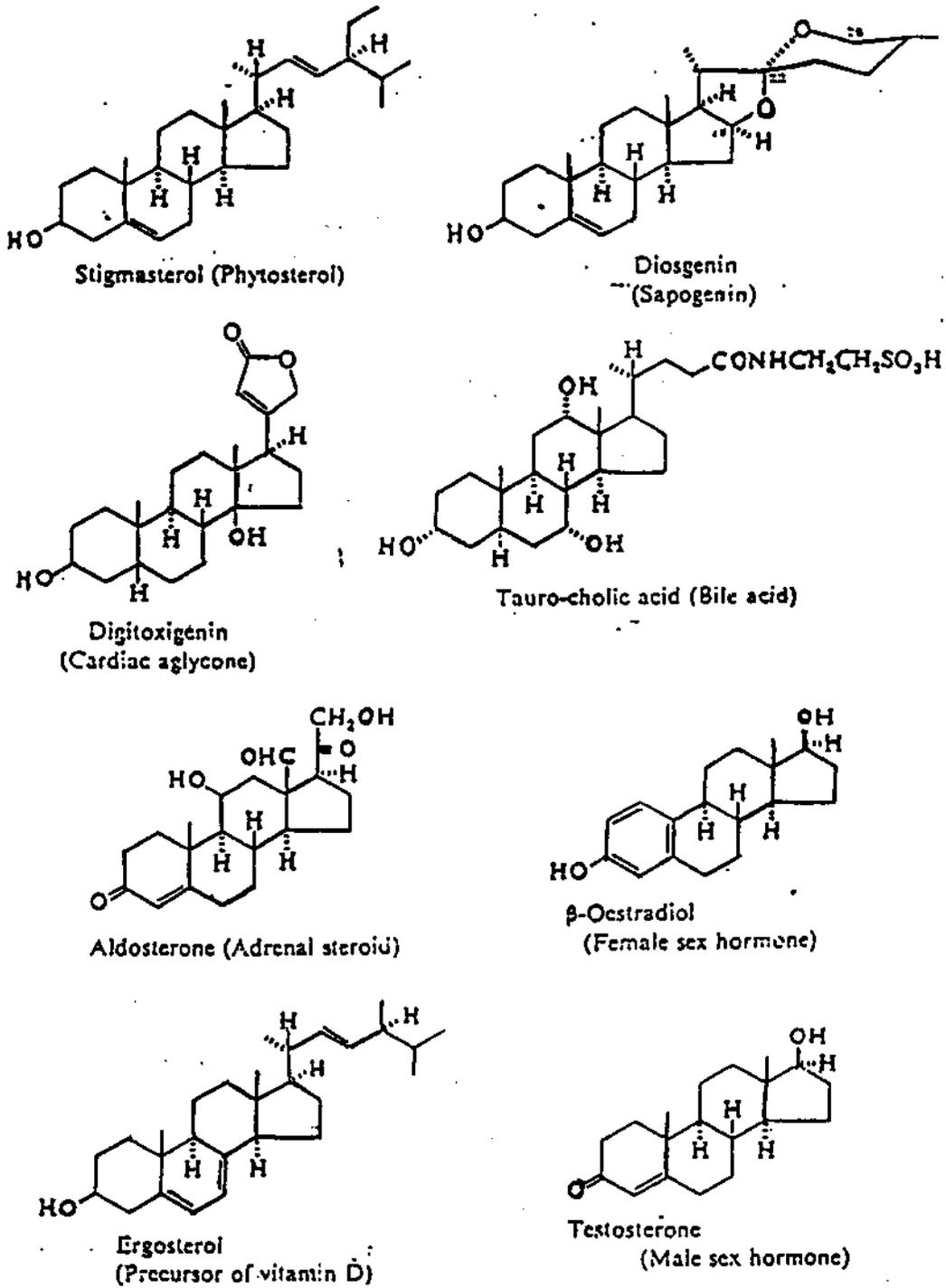
1983]. Beberapa contoh tercantum pada gambar 4.

Biosintesis senyawa golongan steroid pada tanaman, secara umum [Indrayanto, 1983] dapat dilihat pada lampiran 4.



Gambar 3 : Transformasi sumber steroid alam

[Manitto, 1981]



Gambar 4 : Contoh steroid menurut fungsinya

[Torssell, 1983]

3.2. Solasodina

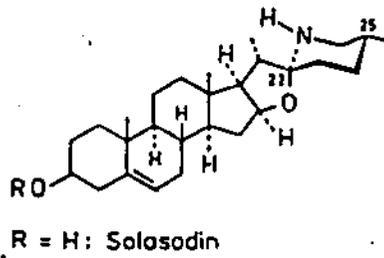
Solasodina adalah senyawa alkaloid steroid, merupakan salah satu bahan baku obat-obat golongan steroid yang cukup penting. Senyawa ini merupakan aglikon dari solasodin (gambar 6) dan solamargin (gambar 7) yang merupakan dua senyawa steroid utama yang dihasilkan oleh beberapa jenis solanum. Pada *Solanum laciniatum*, *Solanum aviculare* dan *Solanum aleagnifolium*, solasodina terdapat pada bagian akar, batang, daun dan buah. Sedangkan pada jenis solanum yang lain kandungan solasodina terkonsentrasi pada bagian buah [Telek, et al, 1971].

Struktur molekul solasodina (gambar 5) analog dengan diosgenin, kecuali satu atom N pada solasodina diganti oleh atom O pada diosgenin. Rumus molekul solasodina adalah $C_{27}H_{43}O_2N$ dengan berat molekul 413,62.

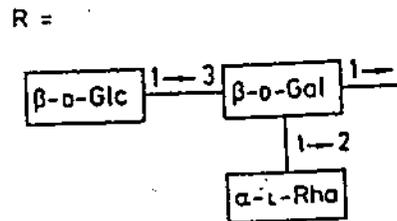
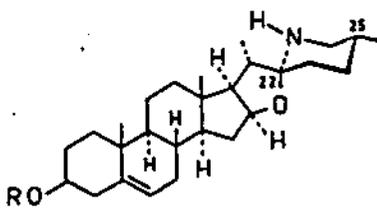
Solasodina mempunyai kelebihan dibanding bahan baku alternatif yang lain, yaitu dapat dikonversi menjadi dehydropregnenolone. Meskipun pada tanaman terikat dalam bentuk trigliserida, solasodina mudah diisolasi secara kuantitatif sebagai steroid bebas [Macek, 1989].

Solasodina larut bebas dalam benzena, piridina, kloroform, larut dalam alkohol maupun aseton, sedikit larut dalam air, tetapi praktis tidak larut dalam eter [The Merck Index, 1983].

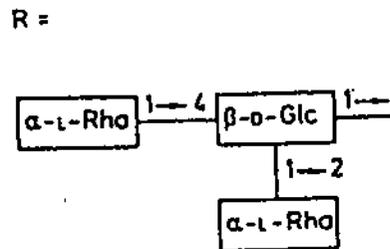
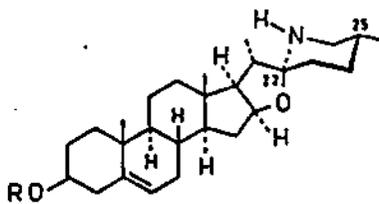




Gambar 5 : Struktur kimia solasodina



Gambar 6 : Struktur kimia solasonin



Gambar 7 : Struktur kimia solamargin

4. Analisa kualitatif dan kuantitatif

4.1. Kromatografi Lapisan Tipis (KLT)

[Stahl, 1985, Harborne, 1973].

Untuk melakukan identifikasi pendahuluan kandungan solasodina digunakan cara KLT. Dibandingkan dengan cara lain, cara KLT ini memiliki beberapa keuntungan antara lain memerlukan jumlah cuplikan sedikit dan waktu yang lebih singkat, namun memberikan hasil pemisahan yang cukup baik.

Kromatografi lapisan tipis (KLT) merupakan suatu teknik pemisahan campuran zat yang didasarkan pada kecepatan migrasi masing-masing komponennya pada fase diam, dibawah pengaruh suatu pelarut (eluen) yang bergerak atau yang disebut fase gerak. Fase diam biasanya merupakan lapisan tipis absorben yang ditaburkan pada bahan/lem-
peng inert berupa kaca, plastik atau aluminium. Mekanisme terjadinya pemisahan dapat berdasarkan prinsip adsorbsi, partisi, pertukaran ion maupun filtrasi. Namun jenis yang paling sering digunakan adalah prinsip adsorbsi dan partisi. Pada pemisahan yang berdasarkan prinsip adsorb-
si, molekul molekul zat yang paling lemah diadsorbsi oleh fase diam akan terbawa ke atas oleh fase gerak sehingga memberikan bercak paling atas. Sedangkan molekul-molekul yang diadsorbsi paling kuat akan memberikan bercak paling

bawah.

Identifikasi dari komponen-komponen zat/senyawa dilakukan dengan menggunakan pereaksi penampak bercak yang sesuai atau dengan sinar ultraviolet. Untuk menganalisa suatu campuran senyawa atau untuk tujuan pemurnian suatu senyawa harus dilakukan beberapa kali eluasi menggunakan berbagai macam eluen sampai suatu saat didapatkan satu bercak yang baik. Bercak yang terbentuk dibandingkan harga R_f nya dengan suatu senyawa/zat standar yang dikromatografi pada lempeng yang sama. Perhitungan harga R_f (retardation factor) adalah sebagai berikut :

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh komponen}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

4.2. Densitometri (TLC-scanner)

[Blunden, et al 1897]

Densitometri merupakan suatu metode optik yang dapat digunakan untuk analisa kualitatif maupun kuantitatif suatu campuran senyawa atau zat yang telah dipisahkan terlebih dahulu menggunakan KLT.

Pada analisa kualitatif, spektrum yang dihasilkan

merupakan spektrum panjang gelombang. Bila terbukti panjang gelombang maksimum sampel sama dengan panjang gelombang zat standar, ada kemungkinan zat tersebut sama.

Untuk keperluan analisis kuantitatif zat-zat berkadarnya kecil dalam suatu campuran, metode densitometri cukup memberikan hasil yang memuaskan dan dapat diandalkan. Disamping itu juga memiliki sensitifitas tinggi dan waktu pengerjaannya relatif singkat. Hal yang perlu diperhatikan dalam penggunaan metode ini adalah, bahwa hubungan antara luas area dan konsentrasi tidak linier, disebabkan karena adanya efek hamburan cahaya (*scattering*) dari lempeng lapisan tipis. Hubungan linier antara luas area dengan konsentrasi diperoleh menggunakan persamaan kurva linier berdasarkan hukum Kubelka Munk yang telah terprogram pada mikrokomputer.

Hukum Kubelka Munk

$$- d_i/dx = - (S + K) i + S_j$$

$$d_j/dx = - (S + K) j + S_i$$

Keterangan :

i = intensitas cahaya dengan arah tegak lurus menuju permukaan lapisan tipis

- j = intensitas cahaya dengan arah tegak lurus meninggalkan lapisan tipis
- S = faktor penghamburan untuk setiap satu satuan tebal lapisan tipis
- K = faktor penyerapan untuk tiap satu satuan tebal lapisan tipis

Karena medium tidak homogen, maka dikenal adanya parameter koefisien penghamburan (SX). Koefisien penghamburan dari lempeng lapisan tipis tergantung pada ukuran dan distribusi adsorben yang digunakan.

Beberapa faktor yang dapat berpengaruh terhadap reproduisibilitas antara lain :

- Homogenitas lempeng.

Lempeng dengan ketebalan yang bervariasi mengakibatkan jumlah cahaya yang ditransmisikan bervariasi, sehingga berpengaruh terhadap hasil pencatatan oleh densitometer.

- Penyemprotan dan pemanasan.

Penyemprotan harus merata, hal ini untuk menghindari terbentuknya bercak dengan intensitas warna tidak sama yang dapat mengakibatkan kesalahan dalam pengukuran.

- Arah scanning bercak.

Arah scanning harus sama yaitu berlawanan dengan arah eluasi, karena arah yang berbeda menyebabkan terjadinya variasi hasil.

4.3. Fourier Transform-Infra Red (FT-IR)

[Silverstein, R.M., et al, 1991]

Pada prinsipnya analisis ini adalah suatu radiasi infra merah yang dikenakan pada molekul senyawa.

Suatu molekul atau gugus fungsi yang struktur molekulnya tidak simetris, yaitu mempunyai atom-atom dengan kerapatan elektron berbeda (keelektronegatifan berbeda), merupakan dwikutub/dipole, karena pusat muatan positif dan negatif tidak saling berimpit. Bila jarak antara kedua pusat muatan tersebut berubah-ubah, karena bergesernya molekul, maka dalam molekul akan terjadi medan listrik berosilasi yang dapat berinteraksi dengan medan listrik bolak-balik dari sinar yang datang.

Bila frekuensi sinar infra merah yang datang tepat sama dengan salah satu frekuensi vibrasi alamiah molekul tersebut, maka energi infra merah akan diserap molekul. Hal ini mengakibatkan terjadi perubahan amplitudo vibrasi molekul dan bukan perubahan frekuensi vibrasinya. Disamping itu, vibrasi molekul tidak simetris disekitar pusat-pusat muatan akan mengakibatkan terjadinya fluktuasi

berkala dari momen dwikutub. Sehingga memungkinkan terjadinya interaksi dengan sinar, atau terjadi penyerapan energi oleh molekul tersebut.

Penggunaan infra merah sebagai sumber radiasi memiliki banyak kelemahan antara lain :

- radiasi tidak kontinyu
- kepekaan detektor IR terhadap energi vibrasi semakin menurun selama proses berlangsung
- banyak energi yang hilang selama proses radiasi

Hal-hal semacam ini menyebabkan banyak vibrasi molekul yang tidak terdeteksi.

Oleh karena itu digunakan suatu teknik dengan merubah frekuensi domain pada infra merah menjadi time domain dan teknik ini dikenal sebagai Fourier Transform-Infra Red (FT-IR). Disamping itu digunakan sinar laser sebagai pembawa, untuk menjamin tetap utuhnya radiasi infra merah, sehingga semua vibrasi yang ada pada molekul sampel dapat terdeteksi secara lengkap dan sempurna.

Spektra hasil pemeriksaan dibandingkan dengan spektra zat standar yang diamati pada kondisi sama.

4.4. Spektrometri Masa

[Willard, et al, 1981]

Prinsip spektrometri masa adalah penembakan atau

bombardemen molekul menggunakan elektron berenergi tertentu, sehingga menghasilkan partikel bermuatan positif. Molekul yang telah kehilangan satu elektron, membentuk ion molekul atau molekul induk yang dalam pemecahan lebih lanjut menghasilkan ion pecahan dan molekul netral yang lebih kecil. Selanjutnya ion-ion tersebut dipisahkan berdasarkan harga perbandingan massa/muatan (m/e).

Dengan bantuan suatu alat pengukur atau detektor, jumlah ion positif yang meninggalkan sumber ion (*total ion current*) dapat dihitung. Untuk tujuan analisis campuran, alat ini tidak saja memberikan hasil pemisahan yang baik, tetapi juga memberikan karakteristik yang tinggi.

Dikenal beberapa cara ionisasi, antara lain *electron impact* (EI), *chemical ionization* (CI) dan *field ionization*

Reprodusibilitas dari spektra masa yang dihasilkan ditentukan oleh jenis spektrometer yang dipakai, sistem inlet, energi, temperatur sumber ion dan metode derivatisasi yang digunakan.

BAB III

BAHAN, ALAT DAN METODE PENELITIAN

1. Bahan

1.1. Bahan Percobaan

Dalam penelitian ini, bahan percobaan yang digunakan adalah kultur pucuk *Solanum laciniatum* yang diperoleh dari PUSLITBANGTRI (Pusat Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Industri), BOGOR, ditanam pada media padat Murashige & Skoog yang dimodifikasi dengan penambahan hormon pertumbuhan bensil adenin 4 mg/l sebagai stok kultur di Laboratorium Bioteknologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga.

1.2. Bahan Kimia

- Apabila tidak dinyatakan lain, semua bahan kimia yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah produksi E-Merck Darmstadt dengan derajat kemurnian pro analisis.
- Agar yang digunakan adalah Gibco Agar Bacteriological L 87 produced in UK by Gibco LTD Skotland.
- Standar solasodina adalah produksi Sigma.

1.3. Media

Media dasar yang digunakan adalah media Murashige & Skoog (MS) yang telah dimodifikasi untuk pertumbuhan stok kultur pada laboratorium Bioteknologi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, dengan penambahan hormon tumbuh bensil adenin 4mg/l dan dinyatakan sebagai media kultivasi (diberi kode media MK).

Media terdiri dari beberapa komponen yaitu makroelemen, mikroelemen, sumber karbon, vitamin, hormon pertumbuhan dan komponen penyangga agar. Komposisi media tertera pada lampiran 1.

Media percobaan merupakan modifikasi dari media MK dengan berbagai perlakuan yaitu variasi konsentrasi sumber nitrogen, variasi konsentrasi ion kalsium dan EGTA (suatu antagonis ion kalsium) serta variasi konsentrasi ion magnesium. Komposisi media perlakuan tertera pada lampiran 2.

2. Alat

- a. *Laminar Air Flow Cabinet*, Dalton model, San Ei Seisakusho, Ltd., type PCV-750-APG.
- b. Otoklaf SMIC tipe WS2-84-64
- c. pH meter Fisher Accumet model 230 A

- d. Thermolyne Type 16700 Mixer
- e. Spektrofotometer Shimadzu UV-Vis 160 A
- f. Spektrometri Masa JEOL JMX DX 303
- g. Lempeng Kieselgel 60 F254 (E Merck Darmstadt)
- h. Shimadzu Dual-Wavelength Thin Layer Chromato Scanner model CS-930
- i. Oven Despatch, Fisher Scientific, model LEB 1-28
- j. JASCO Fourier Transform-Infra Red (FT-IR) 5300
- k. Ultrasonic Julabo Labortechnik GMBH
- l. Alat-alat untuk keperluan analisa KLT
- m. Alat-alat gelas untuk pembuatan media
- n. Botol bermulut lebar untuk pembiakan kultur.

3. Metode Penelitian

3.1. Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui tahapan-tahapan sebagai berikut :

1. Pembuatan media kultur.
2. Penanaman kultur pucuk pada media, sesuai dengan media perlakuan seperti yang tercantum pada lampiran 2.
3. Kultivasi kultur.
4. Panen kultur dan perhitungan indeks pertumbuhan.
5. Penetapan kadar relatif klorofil.

6. Pengeringan dan penetapan susut pengeringan.
7. Optimalisasi fase gerak untuk KLT.
8. Optimalisasi metode hidrolisa sampel.
9. Ekstraksi.
10. Analisa kualitatif/identifikasi solasodina :
 - Identifikasi dengan KLT
 - Identifikasi dengan TLC-Scanner
 - Identifikasi dengan FT-IR
 - Identifikasi dengan spektrometri masa
11. Analisa kuantitatif dengan TLC-Scanner.
 - Validasi metoda analisa
 - Penetapan kadar solasodina
 - Perhitungan produktivitas solasodina
12. Analisa data.

3.2. Cara Kerja

3.2.1. Pembuatan Media

Media dibuat dengan cara mencampur sejumlah tertentu komponen media MS yang berupa larutan persediaan (masing-masing komponen diperlukan 10 ml untuk membuat 1 liter media). Tambahkan ke dalam larutan tersebut 100 mg mioinositol, 30 g sukrose dan 40 ml hormon pertumbuhan bensil adenin, serta tambahkan air suling sampai volume \pm 900 ml. pH diatur menggunakan larutan NaOH 0,1N atau HCl

0,1N sampai diperoleh pH 5,7-5,8. Tambahkan agar 7,5 g dan air suling sampai diperoleh volume 1 L. Sambil terus diaduk, panaskan larutan media tersebut sampai jernih/hampir mendidih. Tuang panas-panas ke dalam botol bermulut lebar, masing-masing ± 25 ml, tutup rapat dengan aluminium foil, kemudian disterilkan dengan otoklaf pada temperatur 121° C selama 20 menit. Simpan dalam ruang kultur dengan suhu 25° C, di bawah penyinaran dengan intensitas cahaya ± 700 Lux. Untuk pembuatan media perlakuan caranya sama, perbedaan hanya terletak pada jumlah (volume) komponen yang ditambahkan, karena disesuaikan dengan perlakuan. Sedangkan untuk penambahan EGTA dilakukan pada saat sebelum penambahan myo-inositol, sukrose dan agar. Dalam penambahan EGTA, perlu dilakukan pemanasan untuk membantu proses kelarutannya serta perlu dilakukan penyesuaian pH, karena akan terjadi penurunan pH larutan secara drastis.

3.2.2. Penanaman Dan Kultivasi Kultur Pucuk

Kultur pucuk *Solanum laciniatum* yang diperoleh dari stok kultur dengan media MK (lampiran 1), ditanam secara aseptis melalui Laminar Air Flow Cabinet pada bermacam-macam media (media perlakuan), seperti tertera pada lampiran 2. Kemudian disimpan dalam ruang kultur dengan

temperatur 25°C, dibawah penyinaran dengan intensitas cahaya ± 700 Lux, selama 4 minggu.

3.2.3. Panen Dan Perhitungan Indeks Pertumbuhan

Setelah jangka waktu 4 minggu, kultur dipanen. Kultur pucuk dari masing-masing botol pembiakan dipisahkan dari mediana sampai bersih, tanpa dilakukan pencucian, lalu ditimbang. Parameter kecepatan pertumbuhan dinyatakan sebagai IP (Indeks Pertumbuhan) dan diperhitungkan sebagai perbandingan bobot akhir dari kultur pada saat panen terhadap bobot awal kultur pada saat penanaman. Harga IP dinyatakan dengan rumus :

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

3.2.4. Penetapan Kadar Relatif Klorofil

Pada saat panen kultur, segera dilakukan penetapan kadar relatif klorofil karena diperlukan sampel segar. Cara penetapan kadar relatif klorofil adalah sebagai berikut [Harborne,1973]:

Ditimbang seksama ± 250 mg kultur segar, masukkan ke dalam mortir, lalu tambahkan CaCO₃ 10 mg dan gerus

sampai halus dan homogen. Tambahkan aseton 80% (dalam air), kemudian digerus sampai semua warna hijau terbebas dari kultur dan terlarut dalam aseton. Saring dan cuci residu dengan aseton 80% sampai aseton tidak berwarna lagi. Filtrat hasil penyaringan dan pencucian ditampung dalam labu ukur 25,0 ml dan ditambahkan aseton 80% ad tanda, lalu kocok homogen. Amati absorpsinya dengan Spektrofotometer Shimadzu UV-Vis 160 A pada panjang gelombang 645 nm dan 663 nm.

Estimasi kadar relatif klorofil total dilakukan dengan perhitungan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$C = 20,2 A_{645} + 8,02 A_{663} \quad (29)$$

C adalah kadar relatif klorofil total (mg/l)

A_{645} dan A_{663} adalah absorpsi pada panjang gelombang 645 nm dan 663 nm.

3.2.5. Pengeringan dan Penetapan Susut Pengeringan

Pengeringan kultur hasil panen dilakukan dibawah sinar lampu, dengan temperatur 40-60°C. Setelah kering, kultur diserbuk dan selanjutnya dilakukan penetapan susut pengeringan menurut Farmakope Indonesia Edisi III, tahun 1979 dengan cara sebagai berikut :

- Sejumlah tertentu serbuk ditimbang, dicatat beratnya.
- Dipanaskan dengan temperatur 105° C selama 30 menit, lalu ditimbang beratnya. Penimbangan dan pemanasan dilakukan berulang-ulang sampai diperoleh berat yang konstan.
- Dihitung harga susut pengeringannya. Harga susut pengeringan tidak boleh lebih dari 2%

3.2.6. Optimalisasi fase gerak

Pada tahap optimalisasi fase gerak dicoba berbagai macam fase gerak dalam berbagai komposisi perbandingan sebagai berikut :

1. Kloroform - metanol = 19 : 1
2. Kloroform - metanol = 19 : 3
3. Heksana - etil asetat - dietilamin = 70 : 20 : 10
4. Kloroform - metanol - dietilamin = 20 : 2 : 7,5
5. Kloroform - metanol - dietilamin = 20 : 2 : 0,5

3.2.7. Optimalisasi metode hidrolisa

Pada optimalisasi metoda hidrolisa digunakan metode coba 3 macam yaitu metode Carle [Carle, 1979], metode Van Gelder [Van Gelder, 1989] dan metode yang biasa digunakan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Farmasi Universitas

Airlangga untuk hidrolisa sapogenin steroid (Indrayanto, 1989) sebagai berikut:

1. Metode Carle

Ditimbang seksama $\pm 0,1$ gram serbuk kering (kadar air $<2\%$), diekstraksi dengan kloroform 5 ml 3 kali menggunakan vortex, setiap kali ekstraksi dilakukan selama 10 menit. Saring dan kumpulkan filtratnya, lalu sisihkan. Hal ini dilakukan untuk memisahkan sterol-sterol bebas dan klorofil yang dikandung kultur pucuk *Solanum laciniatum*. Residu dihidrolisis dengan 7,5 ml larutan HCl 2N dalam metanol pada temperatur $70 - 75^{\circ}\text{C}$ selama 2 jam, di dalam oven. Setelah dingin tambahkan larutan NaOH 10N secukupnya, sampai didapatkan pH larutan sekitar 10, lalu encerkan dengan 5 ml air suling. Campuran di ekstraksi dengan 5ml kloroform 4 kali menggunakan vortex, setiap kali ekstraksi dan diperlukan waktu 10 menit. Campuran di sentrifugasi dengan kecepatan 3750 rpm, fase kloroform dipisahkan dan dikumpulkan, kemudian diuapkan sampai kering. Larutkan hasil ekstrak kering dengan 2,0 ml kloroform, bila akan dilakukan analisis.

Pada prinsipnya hidrolisa dilakukan menggunakan HCl 2N dalam metanol dengan pemanasan $70-75^{\circ}\text{C}$, selama 2 jam di dalam oven.

2. Metode Van Gelder.

Ditimbang seksama $\pm 0,1$ gram serbuk kering (kadar air $<2\%$), diekstraksi dengan kloroform 5 ml 3 kali menggunakan vorteks, setiap kali ekstraksi dilakukan selama 10 menit. Saring dan kumpulkan filtratnya, lalu sisihkan. Hal ini dilakukan untuk memisahkan sterol-sterol bebas dan klorofil yang dikandung kultur pucuk *Solanum laciniatum*. Residu dihidrolisis dengan 7,5 ml larutan HCl 2N dalam metanol dengan penambahan 5ml karbon tetra klorida pada temperatur $70 - 75^{\circ}C$ selama 2 jam, di dalam oven. Setelah dingin tambahkan larutan NaOH 10N secukupnya, sampai didapatkan pH larutan sekitar 10, lalu encerkan dengan 5 ml air suling. Campuran di ekstraksi dengan 5ml kloroform 4 kali menggunakan vorteks, setiap kali ekstraksi dan diperlukan waktu 10 menit. Campuran di sentrifugasi dengan kecepatan 3750 rpm, fase kloroform dipisahkan dan dikumpulkan, kemudian diuapkan sampai kering. Larutkan hasil ekstrak kering dengan 2,0 ml kloroform, bila akan dilakukan analisis.

Pada prinsipnya hidrolisa dilakukan menggunakan HCl 2N disertai penambahan 5 ml CCl_4 , dengan pemanasan $80^{\circ}C$, selama 2 jam di dalam oven. Namun dalam penelitian ini dilakukan modifikasi yaitu penggantian 5 ml karbon tetra

klorida dengan 5 ml kloroform.

3. *Metoda hidrolisa sapogenin steroid*

Ditimbang seksama $\pm 0,1$ gram serbuk kering (kadar air <2%), diekstraksi dengan kloroform 5 ml 3 kali menggunakan vorteks, setiap kali ekstraksi dilakukan selama 10 menit. Saring dan kumpulkan filtratnya, lalu sisihkan. Hal ini dilakukan untuk memisahkan sterol-sterol bebas dan klorofil yang dikandung kultur pucuk *Solanum laciniatum*. Residu dihidrolisis dengan 7,5 ml larutan HCl 2N pada temperatur 100° C selama 2 jam, di dalam oven. Setelah dingin tambahkan larutan NaOH 10N secukupnya, sampai didapatkan pH larutan sekitar 10, lalu encerkan dengan 5 ml air suling. Campuran di ekstraksi dengan 5ml kloroform 4 kali menggunakan vorteks, setiap kali ekstraksi dan diperlukan waktu 10 menit. Campuran di sentrifugasi dengan kecepatan 3750 rpm, fase kloroform dipisahkan dan dikumpulkan, kemudian diuapkan sampai kering. Larutkan hasil ekstrak kering dengan 2,0 ml kloroform, bila akan dilakukan analisis.

Pada prinsipnya hidrolisa dilakukan menggunakan HCl 2N dengan pemanasan 100° C, selama 2 jam di dalam oven.

3.2.8. Ekstraksi

Untuk ekstraksi solasodina dari kultur pucuk, digunakan metode Carle [1979] dan Indrayanto [1985] yang telah dimodifikasi sebagai berikut :

Ditimbang seksama $\pm 0,1$ gram serbuk kering (kadar air <2%), diekstraksi dengan kloroform 5 ml 3 kali menggunakan vorteks, setiap kali ekstraksi dilakukan selama 10 menit. Saring dan kumpulkan filtratnya, lalu sisihkan. Hal ini dilakukan untuk memisahkan sterol-sterol bebas dan klorofil yang dikandung kultur pucuk *Solanum laciniatum*. Residu dihidrolisis dengan 7,5 ml larutan HCl 2N dalam metanol pada temperatur 70 - 75^o C selama 2 jam, di dalam oven. Setelah dingin tambahkan larutan NaOH 10N secukupnya, sampai didapatkan pH larutan sekitar 10, lalu encerkan dengan 5 ml air suling. Campuran di ekstraksi dengan 5ml kloroform 4 kali menggunakan vorteks , setiap kali ekstraksi diperlukan waktu 10 menit. Campuran di sentrifugasi dengan kecepatan 3750 rpm, fase kloroform dipisahkan dan dikumpulkan, kemudian diuapkan sampai kering. Larutkan ekstrak kering dengan 2,0 ml kloroform, bila akan dilakukan analisis.

3.2.9. Identifikasi dengan KLT

Analisa KLT dilakukan pada lempeng Kieselgel 60 F

254, dengan :

- Fase mobil : kloroform - metanol - dietilamin
(20 : 2 : 0,5)
- Penampak bercak : anisaldehyd - asam sulfat
- Perbandingan : solasodina (SIGMA)

Pengamatan dilakukan dengan membandingkan warna bercak dan harga R_f bercak sampel dengan warna bercak dan harga R_f bercak perbandingan (solasodina-SIGMA).

3.2.10. Identifikasi dengan *TLC-Scanner Shimadzu 930*

Uji ini merupakan kelanjutan uji kualitatif dengan KLT. Lempong silika gel hasil KLT yang mengandung bercak senyawa yang dianalisis maupun solasodina standar dimasukkan ke dalam alat *TLC-Scanner* dan dibuat profil spektra absorpsi refleksinya pada panjang gelombang 370-700 nm. Profil spektra panjang gelombang dari senyawa yang dianalisis dibandingkan dengan profil spektra panjang gelombang solasodina standar.

3.2.11. Identifikasi dengan FT-IR dan Spektrometri Masa

3.2.11.1. Isolasi solasodina

Kerokan hasil preparatif fraksi hidrolisat diekstraksi dengan kloroform menggunakan ultra sonic selama

3 kali 5 menit (setiap kali ekstraksi digunakan 5 ml kloroform). Kemudian dilakukan penyaringan, filtrat yang diperoleh diuapkan hingga kering dan diperoleh isolat yang berupa kristal atau amorf. Terhadap isolat dilakukan identifikasi menggunakan JASCO Fourier Transform-Infra Red (FT-IR) 5300 dan Spektrometri Masa JEOL JMX DX 303.

3.2.11.2. Identifikasi dengan FT-IR

Isolat yang diperoleh dibuat pelet KBR kemudian diperiksa dengan JASCO Fourier Transform-Infra Red 5300 pada bilangan gelombang $400 - 4000 \text{ Cm}^{-1}$. Profil spektra FT-IR isolat dibandingkan dengan profil spektra FT-IR standar solasodina.

3.2.11.3. Identifikasi dengan Spektrometri Masa

Terhadap isolat dilakukan identifikasi menggunakan Spektrometri Masa JEOL JMX DX 303. Digunakan cara ionisasi tumbukan elektron (Electron Impact) dengan energi elektron sebesar 70 eV. Spektra masa yang diperoleh dibandingkan dengan spektra masa standar solasodina.

3.2. 12. Analisa Kuantitatif Dengan TLC-Scanner

Pada analisa kuantitatif ini, terlebih dahulu dilakukan validasi metode analisis yang kemudian dilanjutkan

dengan penetapan kadar solasodina secara densitometri. Validasi metode analisis yang dilakukan meliputi linieritas, presisi, akurasi, penentuan batas deteksi (LOD) dan penentuan batas kuantitasi (LOQ).

Linieritas

Untuk penentuan linieritas, dilakukan dengan cara menotolkan larutan solasodina standar pada lempeng KLT dengan konsentrasi 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6 ug/spot, lalu diekspansi dengan fase gerak kloroform - metanol - dietilamin (20:2:0,5). Setelah disemprot dengan penampak bercak anisaldehida-asam sulfat dan dipanaskan pada 100°C selama 10 menit, ditentukan luas areanya secara densitometri. Selanjutnya dibuat kurva linier antara luas area dan konsentrasi (ug/spot). Dilakukan perhitungan untuk uji linieritas [Funk, et al, 1992].

Penentuan presisi

Presisi ditentukan dengan cara menghitung kadar solasodina pada fraksi hidrolisat sampel dengan beberapa kali pengulangan/replikasi ekstraksi (dalam penelitian ini dilakukan 20 replikasi). Kemudian dilakukan penetapan kadar solasodina fraksi hidrolisat pada KLT secara densitometri. Dihitung harga rata-rata kadar solasodin

yang diperoleh dan ditentukan harga koefisien variasi atau *relative standard deviasi*-nya. Dipersyaratakan untuk analisa bahan alam harga RSD tidak lebih dari 10%

Penentuan akurasi

Penentuan akurasi dilakukan dengan cara adisi, yaitu dengan menambahkan sejumlah tertentu solasodina standar pada saat akan dilakukan hidrolisa sampel. Jumlah solasodina standar yang ditambahkan adalah sebesar 20%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% dan 90% dihitung terhadap kadar solasodina fraksi hidrolisat sampel dengan media MK (hasil orientasi penetapan kadar).

Terhadap fraksi hidrolisat kering yang telah dilarutkan kembali dalam 2,0 ml kloroform dilakukan analisa KLT seperti pada penentuan linieritas maupun LOD dan LOQ dengan volume penotolan 4 μ l/spot. Terhadap hasil pengamatan luas area secara densitometri, dihitung harga X_f dan X_c (kemudian dibuat kurva regresinya), prosen recovery dan RSD nya [Funk, et al, 1992].

Penentuan Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) ditentukan menggunakan larutan solasodina standar dengan berbagai konsentrasi tertentu sampai pada konsentrasi

terkecil dimana densitometer tidak lagi dapat melakukan pembacaan serapan (luas areanya). Digunakan konsentrasi 0,3; 0,2; 0,1; 0,08; 0,06; 0,04; 0,02 ug/spot. Ditotolkan pada lempeng KLT, dieluasi dengan fase gerak kloroform-metanol-dietilamin (20:2:0,5), kemudian disemprot dengan penampak bercak anisaldehyda-asam sulfat dan dipanaskan pada temperatur 100 °C selama 10 menit. Selanjutnya ditentukan luas areanya dengan densitometri. Dilakukan perhitungan LOD dan LOQ [Funk, et al, 1992]

Penetapan kadar solasodina dalam sampel

Masing-masing ekstrak fraksi hidrolisat yang diperoleh dari berbagai media perlakuan dilarutkan dengan sejumlah tertentu kloroform (2,0ml), kemudian ditotolkan pada lempeng KLT masing-masing 4 ul/spot. Pada lempeng yang sama juga ditotolkan larutan standar solasodina dengan berbagai konsentrasi (0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6 ug/spot), lalu dilakukan eluasi. Selanjutnya, plate dibiarkan kering di udara terbuka, lalu disemprot dengan pereaksi anisaldehyd-asam sulfat serta dipanaskan selama 10 menit pada temperatur 100°C sampai terlihat warna bercak (biru). Luas area bercak yang terbentuk diukur menggunakan densitometer pada panjang gelombang maksimum (385 nm). Ekstraksi dan penotolan pada KLT dilakukan

minimal dua kali (duplo) untuk masing-masing perlakuan Pada satu plate/lempeng KLT yang sama selalu dibuat kurva bakunya.

Perhitungan kadar sampel

Untuk mengetahui kadar sampel dilakukan intrapolasi luas area bercak sampel ke dalam persamaan garis regresi kurva baku yang dibuat dalam satu lempeng KLT yang sama.

Perhitungan kadar sampel :

$$Ks = \frac{1}{B} \times \frac{V}{Vp} \times Cn$$

Ks = kadar sampel (ug/g)

V = volume kloroform untuk melarutkan ekstrak (ul)

Vp = volume penotolan (ul)

Cn = konsentrasi noda sampel (ug)

B = berat serbuk kering yang diekstraksi (g)

Produktivitas Solasodina

Produktivitas solasodine dinyatakan sebagai jumlah

solasodina yang dibentuk setiap minggu pada setiap botol kultur.

Untuk mengetahui harga produktivitas solasodina, dapat dilakukan perhitungan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Produktivitas} = \frac{\text{total biomasa (berat kering)}}{\text{jml. botol} \times \text{kadar solasodina} \times 4}$$

Keterangan :

- total biomasa dihitung dalam bentuk serbuk kering (dalam gram)
- kadar solasodina dalam mg.g^{-1} berat kering
- produktivitas dalam $\text{mg.fl}^{-1}.\text{w}^{-1}$ (w adalah week atau minggu, fl adalah flask atau botol).

3.2.13. Analisa Data

Terhadap data-data yang diperoleh dilakukan beberapa perhitungan secara statistik antara lain :

- perhitungan regresi, untuk pembuatan kurva regresi linier dan kurva akurasi
- perhitungan untuk penentuan LOD dan LOQ
- perhitungan persen recovery

- perhitungan harga rata-rata, koefisien variasi atau standar deviasi relatif, untuk penentuan presisi
- pembuatan persamaan garis regresi kurva baku, untuk perhitungan kadar solasodina
- pembuatan histogram hubungan antara variasi konsentrasi komponen media (perlakuan) dengan kadar solasodina
- uji anava , menggunakan program microstat
- perhitungan harga HSD , untuk menguji kemaknaan perbedaan hasil pengamatan berbagai perlakuan

BAB IV**HASIL PENELITIAN****1. Indeks Pertumbuhan**

Perhitungan harga indeks pertumbuhan dilakukan waktu panen, yaitu pada saat kultur berumur 4 minggu. Hasil perhitungan indeks pertumbuhan (IP) dapat dilihat pada tabel 1.

**TABEL 1 : HASIL PERHITUNGAN INDEKS PERTUMBUHAN (IP)
KULTUR PUCUK *SOLANUM LACINIATUM* YANG BERUMUR
4 MINGGU PADA BERMACAM-MACAM MEDIA PERLAKUAN**

NO	KODE MEDIA	n (REPLIKASI)	INDEKS PERTUMBUHAN		
			x	±	SD
1	Ca-0E2	27	4,002	±	0,6544
2	Ca-0E1	29	5,126	±	0,5650
3	Ca-0	37	4,951	±	0,6928
4	Ca-1/2	35	4,940	±	0,4204
5*	Ca-1	25	7,801	±	1,1756
6	Ca-2	34	5,157	±	0,4997
7	Ca-3	35	4,184	±	0,4329
8	N0-K0	34	3,577	±	0,6064
9	N0-K1	29	4,516	±	0,8319
10	N0-K2	30	3,480	±	0,5275
11	N1-K0	24	3,530	±	0,6476
12	N2-K0	30	5,468	±	0,8286
13	N2-K2	26	6,802	±	1,2718
14	Mg-5	25	6,545	±	1,0577
15	Mg-10	30	6,149	±	1,1237
16	Mg-15	27	6,844	±	0,9357

Ket :

* = media MK

2. Penetapan kadar relatif klorofil

Penetapan kadar relatif klorofil dilakukan menggunakan Spektrofotometer Shimadzu UV-Vis 160 A pada panjang gelombang 645 nm dan 663 nm. Hasil perhitungan kadar relatif klorofil dapat dilihat pada tabel 2.

TABEL 2 : HASIL PENETAPAN KADAR RELATIF KLOORIFIL KULTUR PUCUK *SOLANUM LACINIATUM* YANG BERUMUR 4MINGGU PADA BERMACAM-MACAM MEDIA PERLAKUAN

NO	KODE MEDIA	n (REPLIKASI)	KADAR KLOORIFIL (mg/g)		
			x	±	SD
1	Ca-0E2	3	0,766	±	0,0371
2	Ca-0E1	3	0,998	±	0,0453
3	Ca-0	3	0,865	±	0,0133
4	Ca-1/2	3	1,230	±	0,0623
5*	Ca-1	3	0,839	±	0,0164
6	Ca-2	3	1,254	±	0,0381
7	Ca-3	3	1,031	±	0,0222
8	N0-K0	3	0,234	±	0,0134
9	N0-K1	4	0,234	±	0,0063
10	N0-K2	3	0,111	±	0,0016
11	N1-K0	3	1,197	±	0,0132
12	N2-K0	3	0,833	±	0,0174
13	N2-K2	3	0,800	±	0,0252
14	Mg-5	4	1,124	±	0,0334
15	Mg-10	4	1,299	±	0,0432
16	Mg-15	4	1,486	±	0,0523

Ket.: * = media MK

3. Optimalisasi Fase Gerak

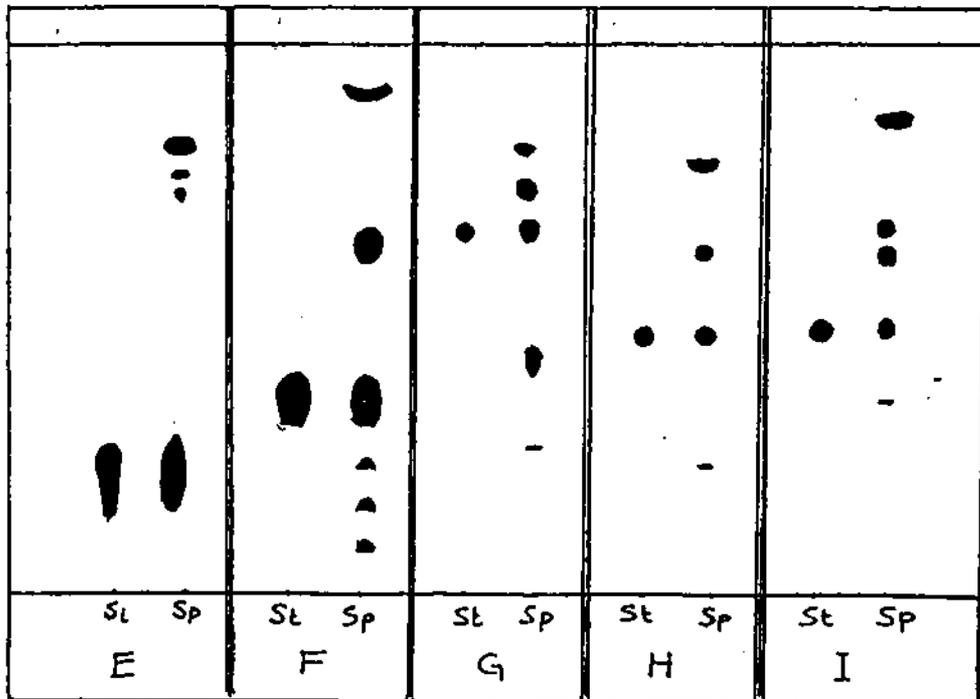
Hasil pengamatan optimalisasi fase gerak dapat dilihat pada skema kromatogram (gambar 8). Untuk uji kemurnian bercak dilakukan pemeriksaan spektra absorban reflektannya menggunakan TLC-Scanner yang diamati pada panjang gelombang 270 - 700 nm. Contoh hasil pemeriksaan kemurnian bercak dapat dilihat pada gambar 9.

4. Optimalisasi metode hidrolisa

Berdasarkan hasil pengamatan profil kromatogram bercak fraksi hidrolisat (gambar 10), diketahui bahwa :

- Dengan metode hidrolisa C, penotolan ekstrak fraksi hidrolisat menghasilkan 6 bercak pada lempeng Kieselgel 60 F₂₅₄ dan bercak yang mengandung solasodina adalah bercak nomor 4 dari bawah, karena memiliki warna dan harga R_f yang sama dengan bercak standar solasodina.
- Dengan metode hidrolisa C*, A dan VG, penotolan masing-masing ekstrak fraksi hidrolisat menghasilkan 7 bercak dan bercak tambahan berhimpit dengan bercak nomor 5 yang ternyata sama dengan bercak standar solasodina.

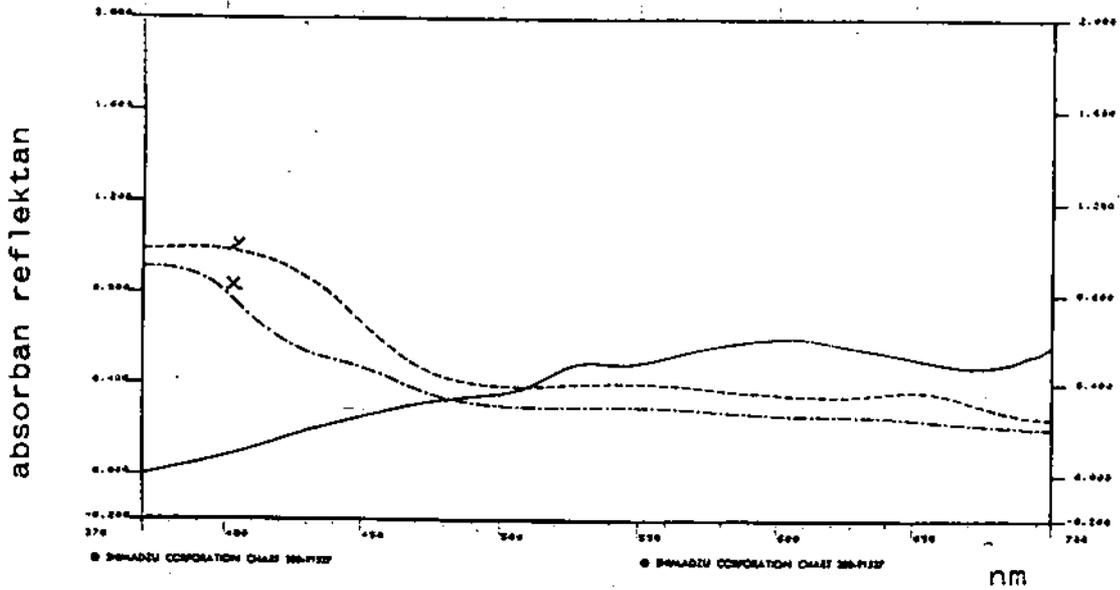
Untuk pemeriksaan profil kromatogram, digunakan fase gerak kloroform-metanol dengan perbandingan 19:3, sebagai penampak bercak digunakan anisaldehyd - asam sulfat.



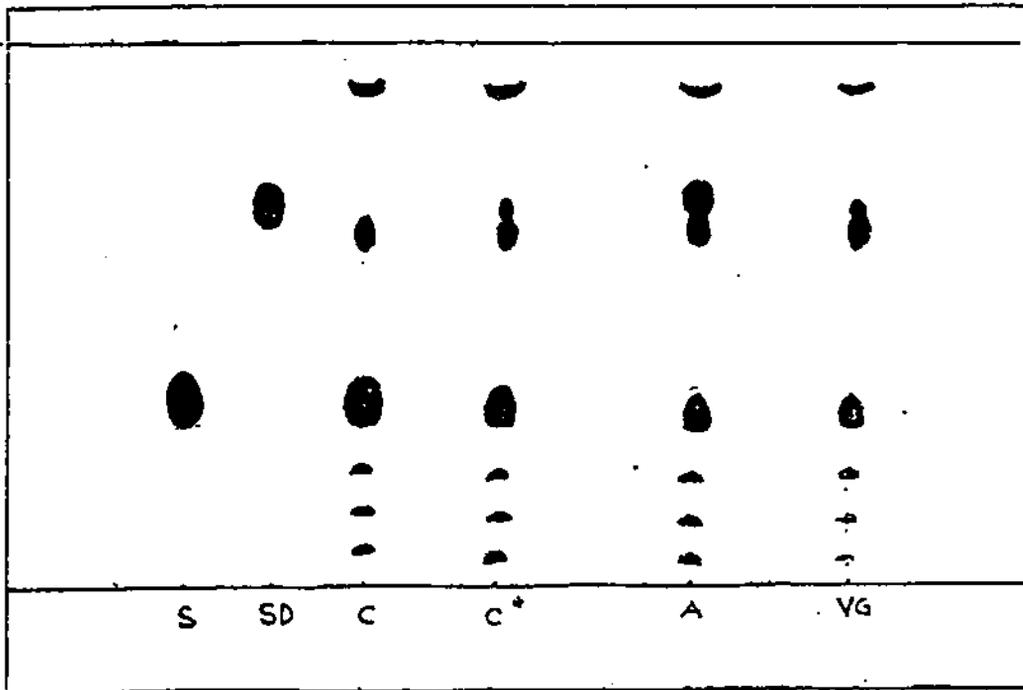
Gambar 8 : Skema kromatogram hasil analisa KLT ekstrak fraksi hidrolisat dengan berbagai jenis dan komposisi fase gerak pada lempeng Kieselgel 60 F₂₅₄ dan penampak bercak anisaldehyd-asam sulfat.

Keterangan :

- E adalah fase gerak kloroform-metanol (19:1)
- F adalah fase gerak kloroform-metanol (19:3)
- G adalah fase gerak heksana-etil asetat-dietilamin (70:20:10)
- H adalah fase gerak kloroform-metanol-dietilamin (20:2:0,5)
- I adalah fase gerak kloroform-metanol-dietilamin (20:2:0,75)



Gambar 9 : Hasil pemeriksaan spektra absorban reflektan pada uji kemurnian bercak ekstrak fraksihidrolisat dengan fase gerak G (y) pada lempeng Kiesel gel 60 F₂₅₄ secara densitometri, pada panjang gelombang 270-700 nm (x = standar so-lasodina).



Gambar 10 : Profil kromatogram fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* media MK pada lempeng Kieselgel 60 F₂₅₄ yang diperoleh melalui berbagai metode hidrolisa .

Keterangan :

- S adalah standar solasodina
- SD adalah standar solasodiena
- C adalah hidrolisa menggunakan metode Carle dengan temperatur 70-75°C.
- C* adalah hidrolisa menggunakan metode Carle dengan temperatur 100°C.
- A adalah metode hidrolisa sapogenin steroid
- VG adalah hidrolisa menggunakan metode Van Gelder yang dimodifikasi.

5. Analisa kualitatif solasodina

5.1. Uji selektifitas

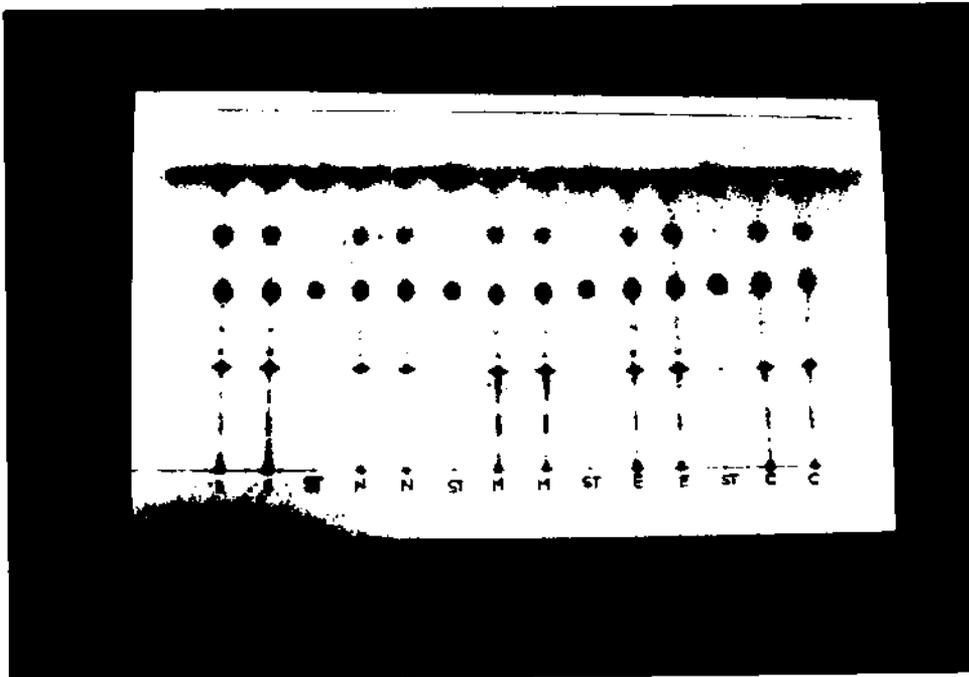
Berdasarkan hasil pengamatan optimalisasi metode hidrolisa dan optimalisasi fase gerak, dipilih metode hidrolisa Carle dengan temperatur hidrolisa 70-75°C (metode C). Sedangkan fase gerak yang digunakan adalah kloroform-metanol-dietilamin dengan perbandingan 20:2:0,5 (fase gerak H), karena memberikan hasil pemisahan bercak paling baik (gambar 11). Pada pemeriksaan kemurnian bercak menggunakan TLC-Scanner, terbukti bercak yang diperoleh cukup murni.

5.2. Identifikasi dengan KLT

Pada gambar 11 dapat dilihat bercak yang mengandung solasodina adalah bercak warna biru, nomor 2 dari bawah (searah eluasi) dengan harga R_f 0,5

5.3. Identifikasi dengan TLC-Scanner

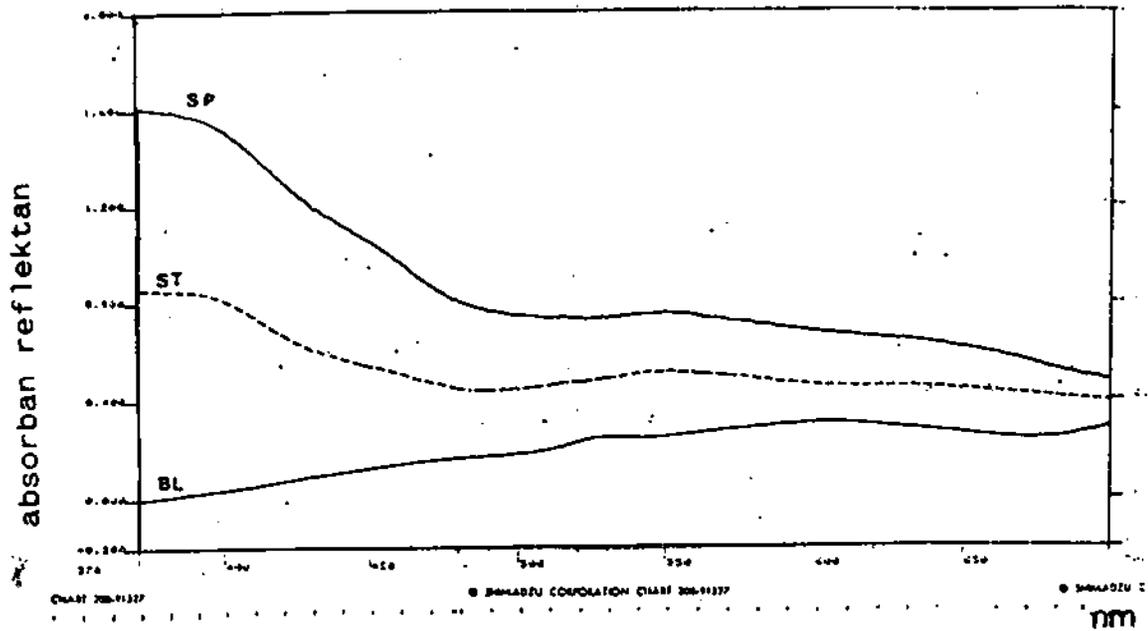
Uji kemurnian bercak solasodina dilakukan dengan melihat spektra panjang gelombangnya secara densitometri yang kemudian dibandingkan dengan spektra standar solasodina (hasil pada gambar 12). Sedangkan profil kromatogram TLC-Scanner fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* pada media MK dapat dilihat pada gambar 13.



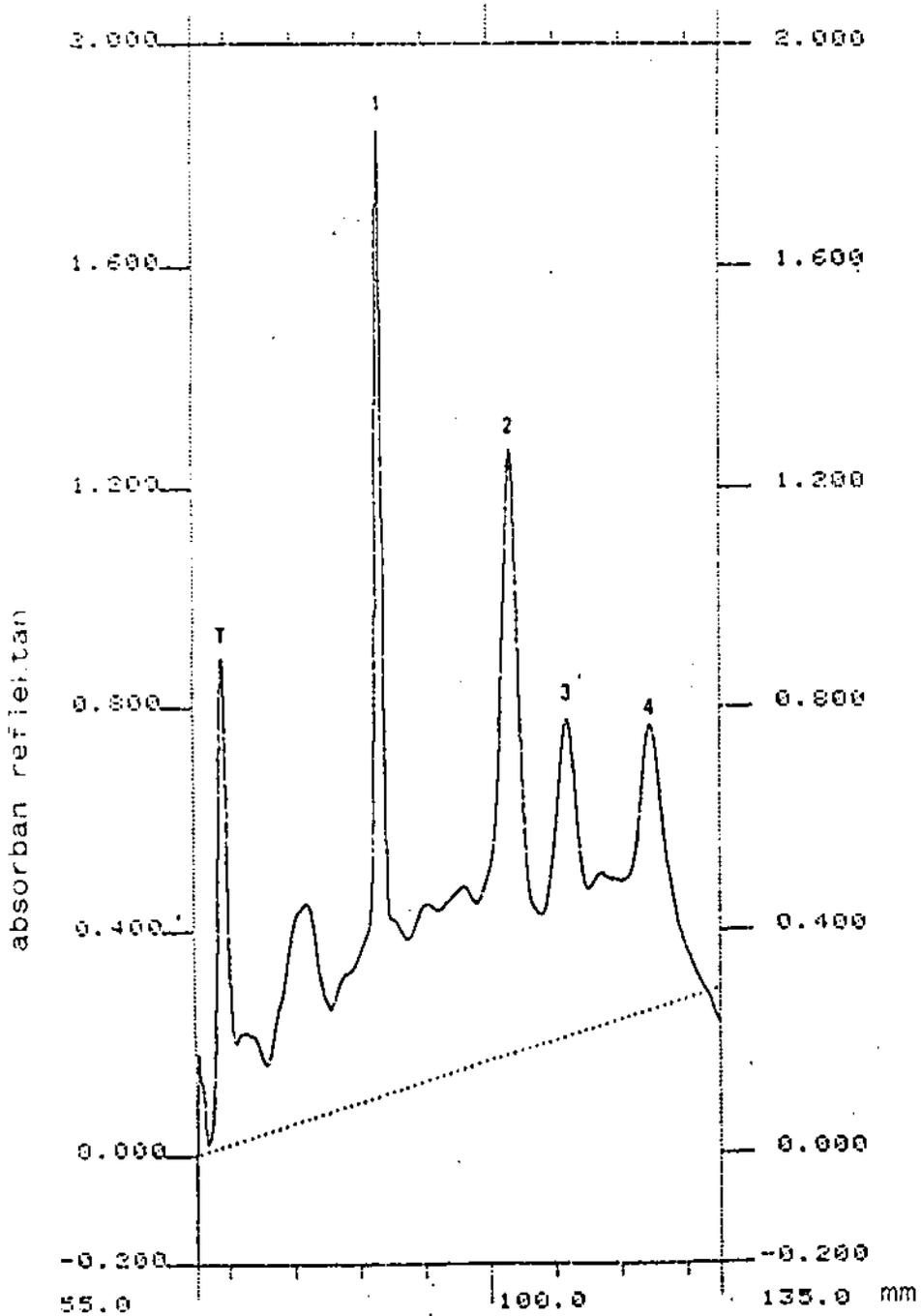
Gambar 11 : Profil kromatogram KLT fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* pada lempeng Kieselgel 60 F₂₅₄ dengan fase gerak kloroform-metanol-diethylamin (20:2:0,5) dan penampak bercak anisaldehyd-asam sulfat.

Keterangan :

- B : fraksi hidrolisat kultur pada media MK
- N : fraksi hidrolisat kultur pada media dengan variasi konsentrasi sumber nitrogen
- M : fraksi hidrolisat kultur pada media dengan variasi konsentrasi ion magnesium
- E : fraksi hidrolisat kultur pada media dengan variasi konsentrasi EGTA
- C : fraksi hidrolisat kultur pada media dengan variasi konsentrasi ion kalsium
- ST: totolan dari larutan standar solasodina.



Gambar 12 : Profil spektra panjang gelombang standar solasodina (SD) dan ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* (SP) diukur pada panjang gelombang 370-700 nm dengan TLC-Scanner (BL=baseline).



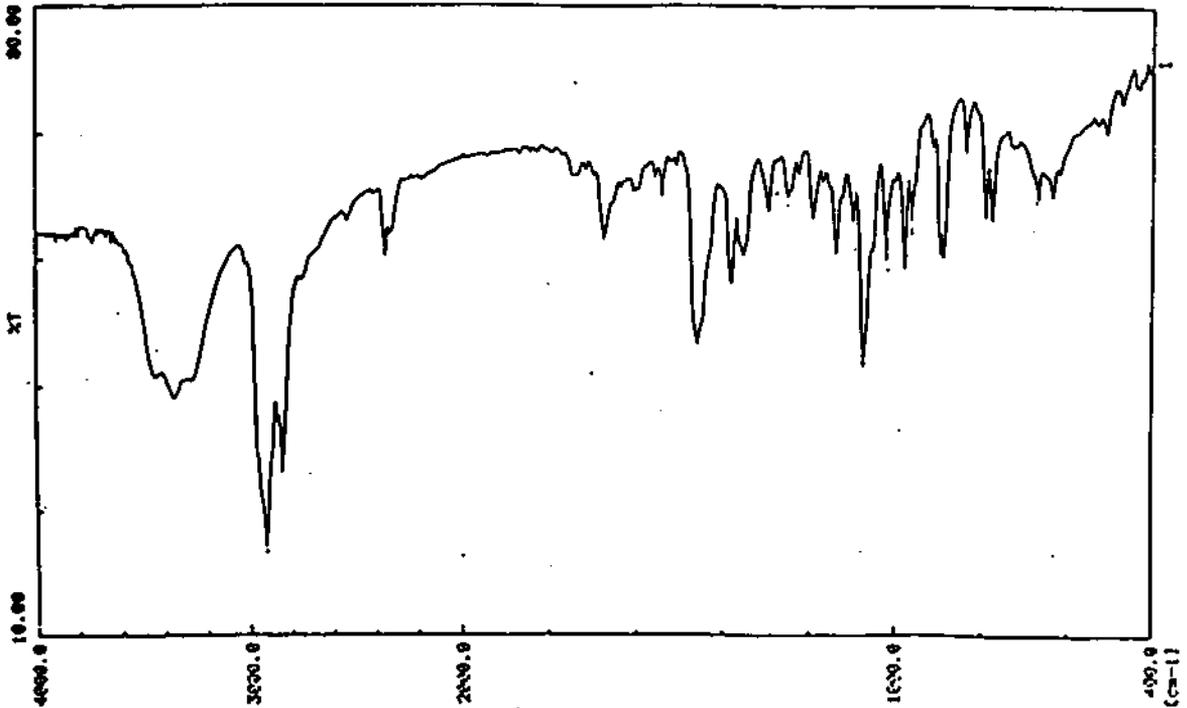
Gambar 13 : Profil kromatogram TLC-Scanner ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum*, diukur pada panjang gelombang 385 nm.

Keterangan :

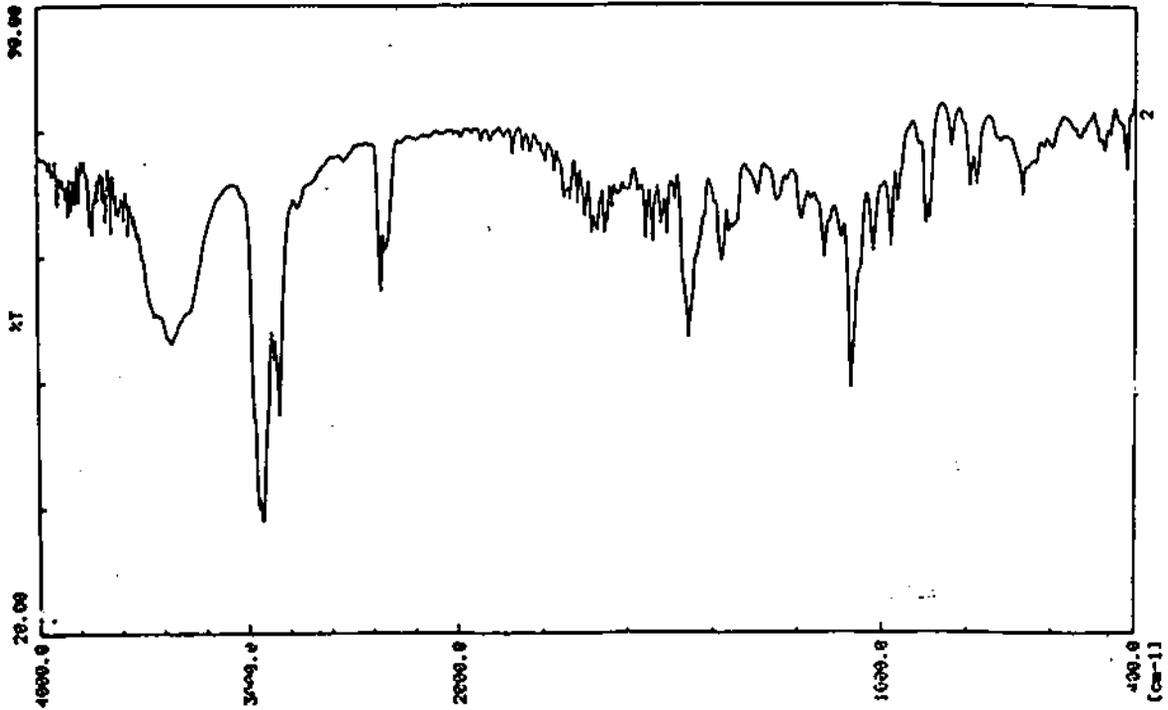
- T adalah totolan awal
- puncak kromatogram bercak warna hijau
- puncak kromatogram solasodina
- puncak kromatogram bercak warna hijau-kuning
- puncak kromatogram bercak warna ungu

5.4. Identifikasi dengan FT-IR

Spektra FT-IR standar solasodina dan spektra isolat dapat dilihat pada gambar 14 dan 15.



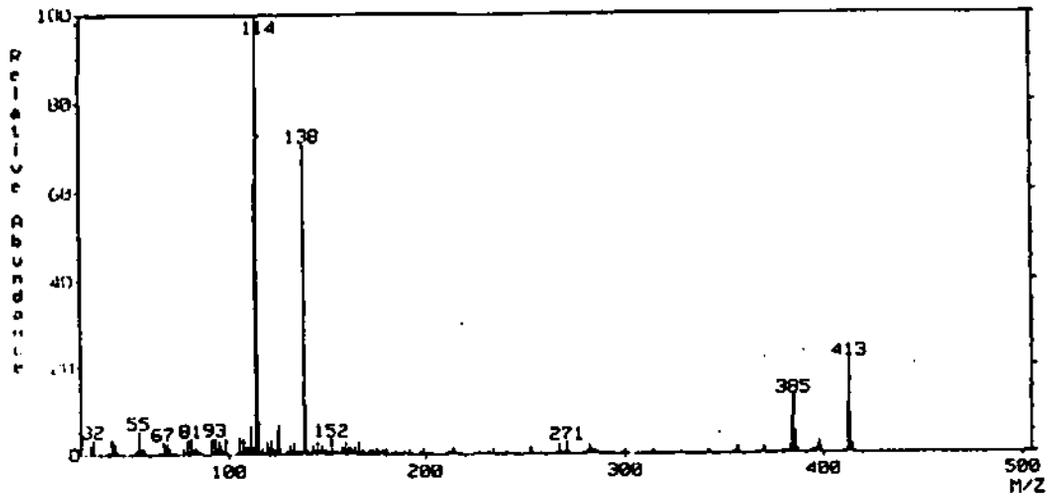
Gambar 14 : Spektra FT-IR standar solasodina dengan cara pelet KBr, diukur pada bilangan gelombang 400 - 4000 cm^{-1} .



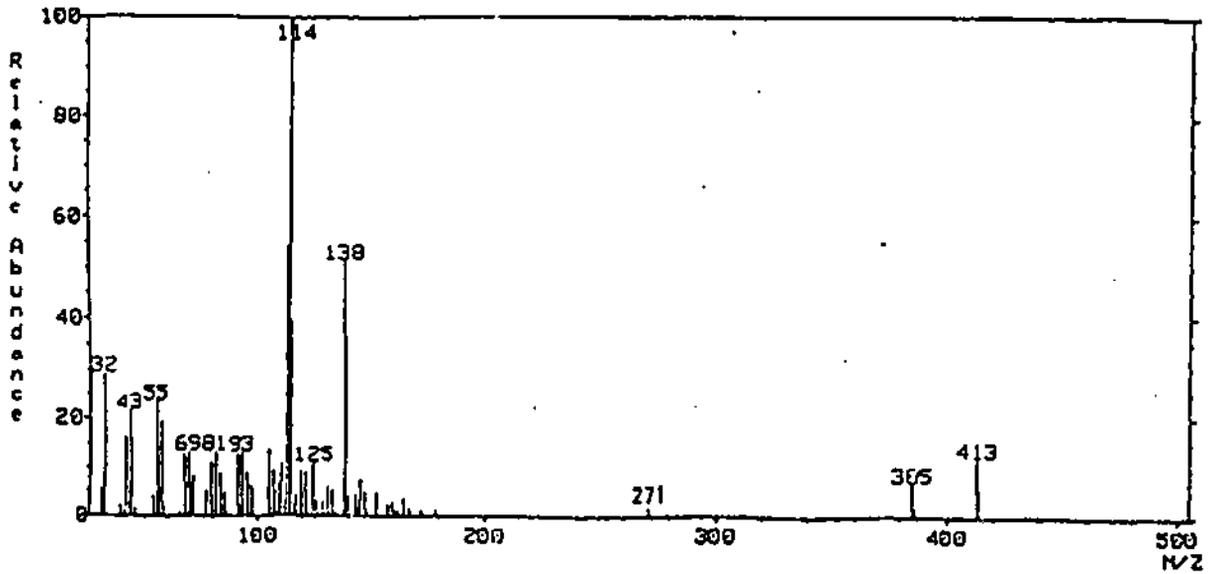
Gambar 15 : Spektra FT-IR isolat dari fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* pada media MK, dengan cara pelet KBr, diukur pada bilangan gelombang 400 - 4000 Cm^{-1} .

5.5. Identifikasi dengan Spektrometri Masa

Spektra masa standar solasodina dan spektra masa isolat dapat dilihat pada gambar 16 dan 17.



Gambar 16 : Spektra masa standar solasodina, dengan metode ionisasi tumbukan elektron (electron impact) dan energi elektron 70 eV.



Gambar 17 : Spektra masa isolat dari fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* pada media MK dengan metode ionisasi tumbukan elektron (electron impact) dan energi elektron 70 eV.

6. Validasi metoda analisa

- Linieritas

Uji linieritas antara konsentrasi larutan standar solasodina dengan luas area pada lempeng KLT dilakukan pada konsentrasi 0,6 - 1,6 ug/spot dengan menggunakan TLC-Scanner. Kemudian dibuat kurva regresi liniernya. Hasil pengamatan dapat dilihat pada tabel 3 dan kurva regresi liniernya dapat dilihat pada gambar 18.

TABEL 3 : HASIL PENGAMATAN LINIERITAS
STANDAR SOLASODINA (SIGMA)

KADAR /x (ug/spot)	LUAS AREA (y)
1,6	43552,1992
1,4	34273,8008
1,2	28875,1094
1,0	23551,8594
0,8	17035,7500
0,6	13305,5898

Pers. regresi : $Y = -5975,451 + 29758,64X$

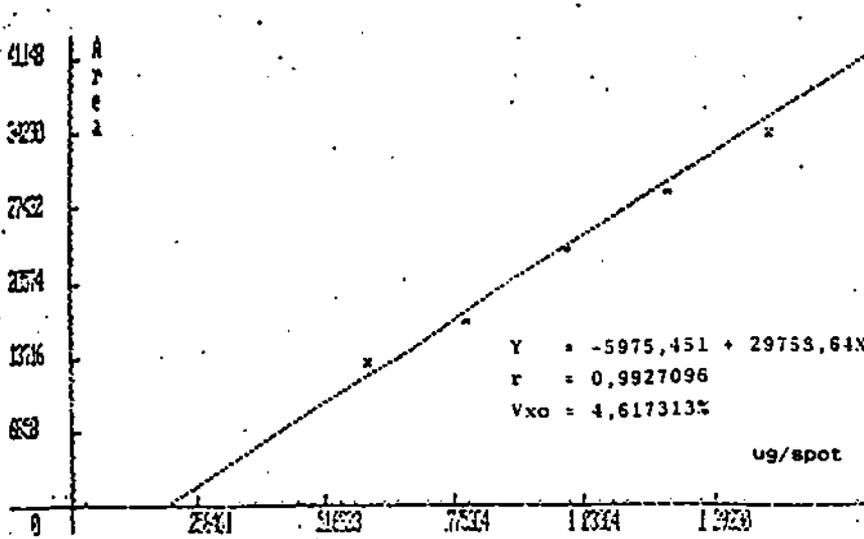
Koef. korelasi : $r = 0,9927096$

$S_y = 1511,454$

$V_{x_0} = 4,617313 \%$

$X_p = 0.3330301$

Berdasarkan tabel 3 dan gambar 18 , dapat dilihat bahwa linieritas larutan standar solasodina terjadi pada konsentrasi 0,6 - 1,6 ug/spot.



Gambar 18 : Kurva linier standar solasodina (ug/spot) terhadap luas area

- *Presisi*

Dilakukan penetapan kadar solasodina secara densitometri dengan 10 kali replikasi dan masing-masing replikasi dilakukan 2 kali penotolan pada lempeng KLT dengan volume totolan 4 ul/spot, sehingga diperoleh 20 data pengamatan. Hasil perhitungan kadarnya dapat dilihat pada tabel 4.

TABEL 4 : HASIL PERHITUNGAN PRESISI FRAKSI HIDROLISAT KULTUR PUCUK *SOLANUM LACINIATUM* YANG BER-UMUR 4 MINGGU DALAM MEDIA MK

REPLIKASI	BERAT SAMPEL (mg)	KADAR SOLASODINA (mg/g)
1	104,2	4,4302
2	104,2	4,3465
3	103,6	4,4111
4	103,6	4,3630
5	103,9	4,3849
6	103,9	4,3715
7	101,7	4,3296
8	101,7	4,2753
9	104,0	4,3679
10	104,0	4,2226
	102,7	4,4214
	102,7	4,4994
	101,7	4,1763
	101,7	4,2210
	101,7	4,4032
	101,7	4,4149
	102,7	4,2885
	102,7	4,2521
	100,6	4,2915
	100,6	4,2189
$\bar{X} = 4,3397 \pm 0,08129 \text{ mg/g (n = 10)}$ RSD = 1,87 %		

- Akurasi

Digunakan cara adisi dengan variasi penambahan standar solasodina 0 %, 20 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % dan 90 %. Pengukuran luas area bercak fraksi hidrolisat pada lempeng KLT dilakukan secara densitometri. Hasil perhitungan dapat dilihat pada tabel 5, sedangkan kurva akurasi dapat dilihat pada gambar 19 .

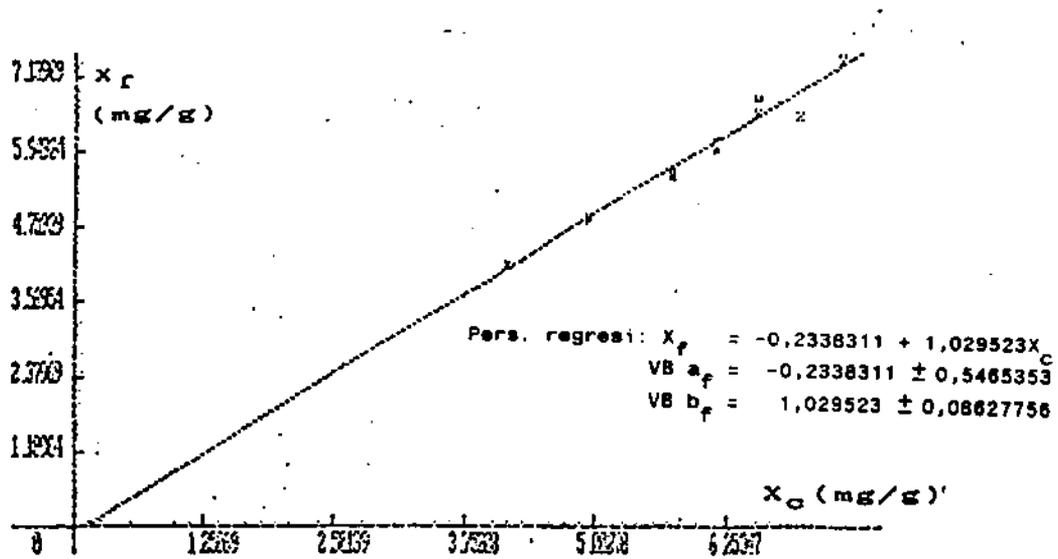
TABEL 5 : HASIL PENETAPAN AKURASI FRAKSI HIDROLISAT KULTUR PUCUK *SOLANUM LACINIATUM* YANG BERUMUR 4 MINGGU DALAM MEDIA MK

X_f (mg/g)	X_C (mg/g)	PROSEN RECOVERY (%)
7,5001	7,7767	96,44
7,4916	7,3882	101,40
7,5742	7,3882	102,52
7,1312	6,9834	102,12
7,0054	6,9834	100,32
6,5394	6,5850	99,31
6,1602	6,1926	99,48
5,9690	6,1926	96,39
5,5812	5,7882	96,42
5,6480	5,7882	97,58
4,8566	4,9906	97,31
4,9495	4,9906	99,18
4,1946	4,1946	100,00

Prosen recovery solasodina rata-rata :

$$\bar{X} = 99,11 \pm 2,1547 \% (n = 13)$$

$$RSD = 1,4247 \%$$



Gambar 19 : Kurva akurasi standar solasodiena dalam fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum*, antara kadar teoritis [x_c , mg/g] terhadap kadar didapat [x_f , mg/g]

- *LOD dan LOQ*

Untuk menentukan LOD dan LOQ dilakukan pengukuran luas area bercak larutan standar solasodina pada lempeng KLT dengan variasi konsentrasi 0,02 - 0,3 ug/spot secara densitometri. Berdasarkan hasil perhitungan, diketahui bahwa harga :

- LOD = X_p = 0,1056 ug/spot

- LOQ = 3 x LOD = 0,3168 ug/spot

7. Hasil Penetapan Kadar Solasodina

Hasil penetapan kadar solasodina dapat dilihat pada tabel 6.

TABEL 6 : HASIL PENETAPAN KADAR SOLASODINA KULTUR PUCUK *SOLANUM LACINIATUM* YANG BERUMUR 4 MINGGU PADA BERMACAM-MACAM MEDIA PERLAKUAN

NO	KODE MEDIA	n (REPLIKASI)	KADAR SOLASODINA (mg/g)		
			x	±	SD
1	Ca-0E2	5	5,08	±	0,2922
2	Ca-0E1	5	6,98	±	0,3583
3	Ca-0	5	5,87	±	0,4363
4	Ca-1/2	5	4,58	±	0,2917
5*	Ca-1	10	4,32	±	0,1082
6	Ca-2	5	7,33	±	0,2731
7	Ca-3	5	5,64	±	0,3572
8	N0-K0	5	4,59	±	0,1897
9	N0-K1	5	4,51	±	0,2977
10	N0-K2	5	4,05	±	0,2942
11	N1-K0	6	4,77	±	0,1935
12	N2-K0	5	4,92	±	0,2064
13	N2-K2	5	4,91	±	0,2857
14	Mg-5	6	5,98	±	0,3878
15	Mg-10	5	7,28	±	0,1492
16	Mg-15	5	5,88	±	0,6437

Ket :

* = media MK

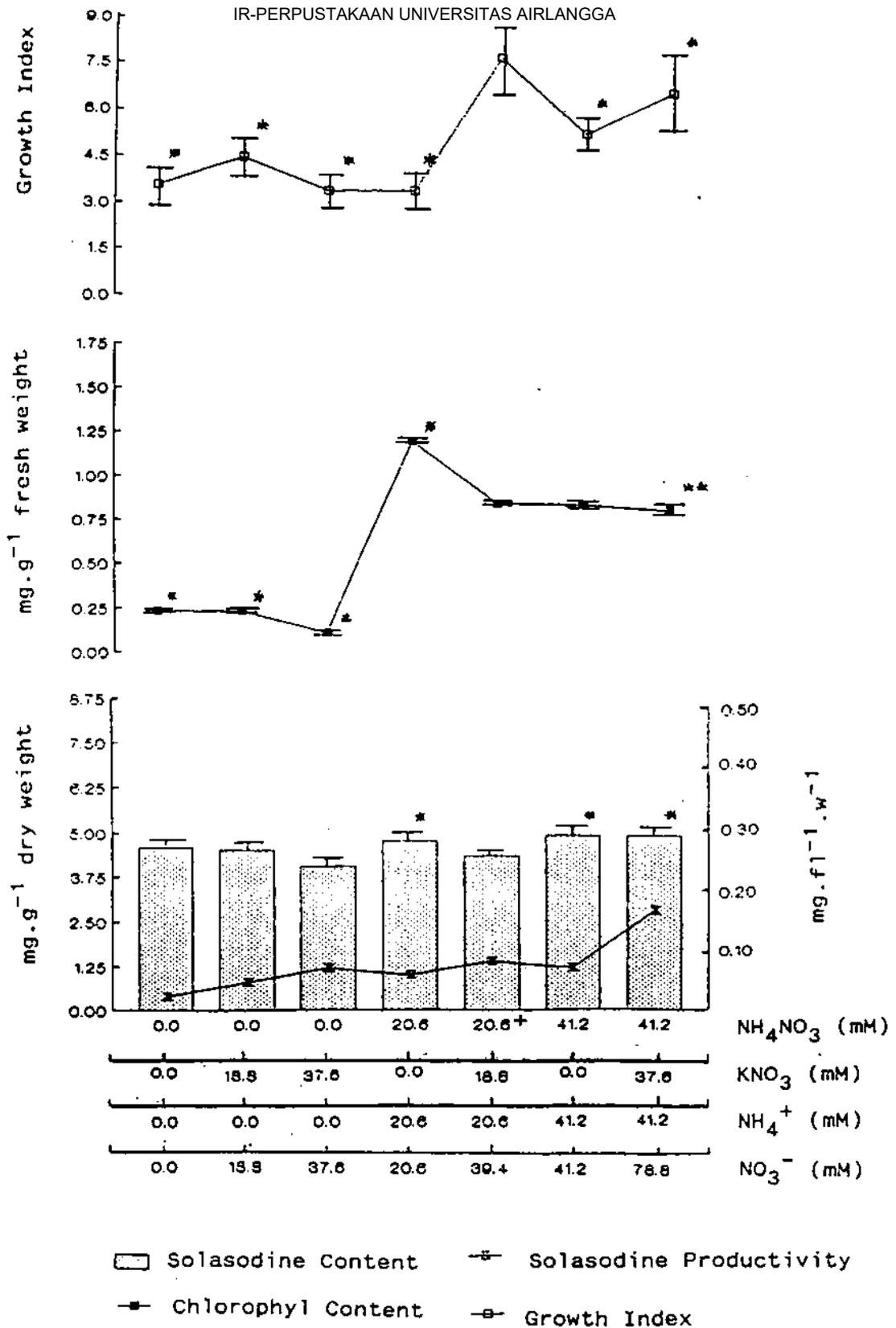
8. Hasil Perhitungan Produktivitas Solasodina

Hasil perhitungan produktivitas solasodina dapat dilihat pada tabel 7

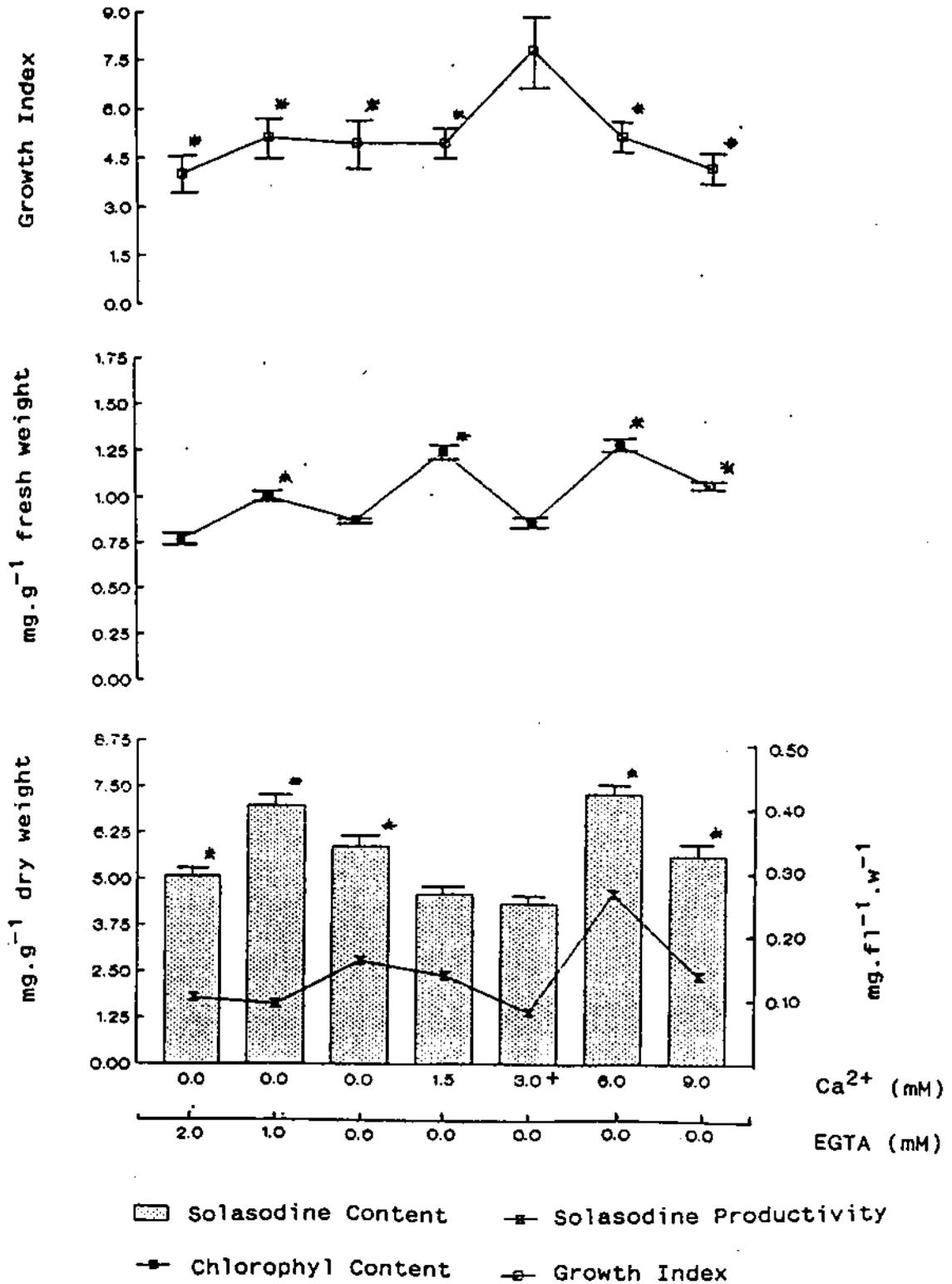
TABEL 7 : HASIL PERHITUNGAN PRODUKTIVITAS SOLASODINA PADA KULTUR PUCUH *SOLANUM LACINIATUM* YANG BERUMUR 4 MINGGU PADA BERMACAM-MACAM MEDIA PERLAKUAN

NO	KODE MEDIA	PRODUKTIVITAS SOLASODINA $\text{mg. fl}^{-1} . \text{w}^{-1}$
1	Ca-0E2	0.07
2	Ca-0E1	0.11
3	Ca-0	0.14
4	Ca-1/2	0.12
5*	Ca-1	0.07
6	Ca-2	0.23
7	Ca-3	0.12
8	N0-K0	0.02
9	N0-K1	0.04
10	N0-K2	0.06
11	N1-K0	0.05
12	N2-K0	0.06
13	N2-K2	0.14
14	Mg-5	0.12
15	Mg-10	0.15
16	Mg-15	0.12

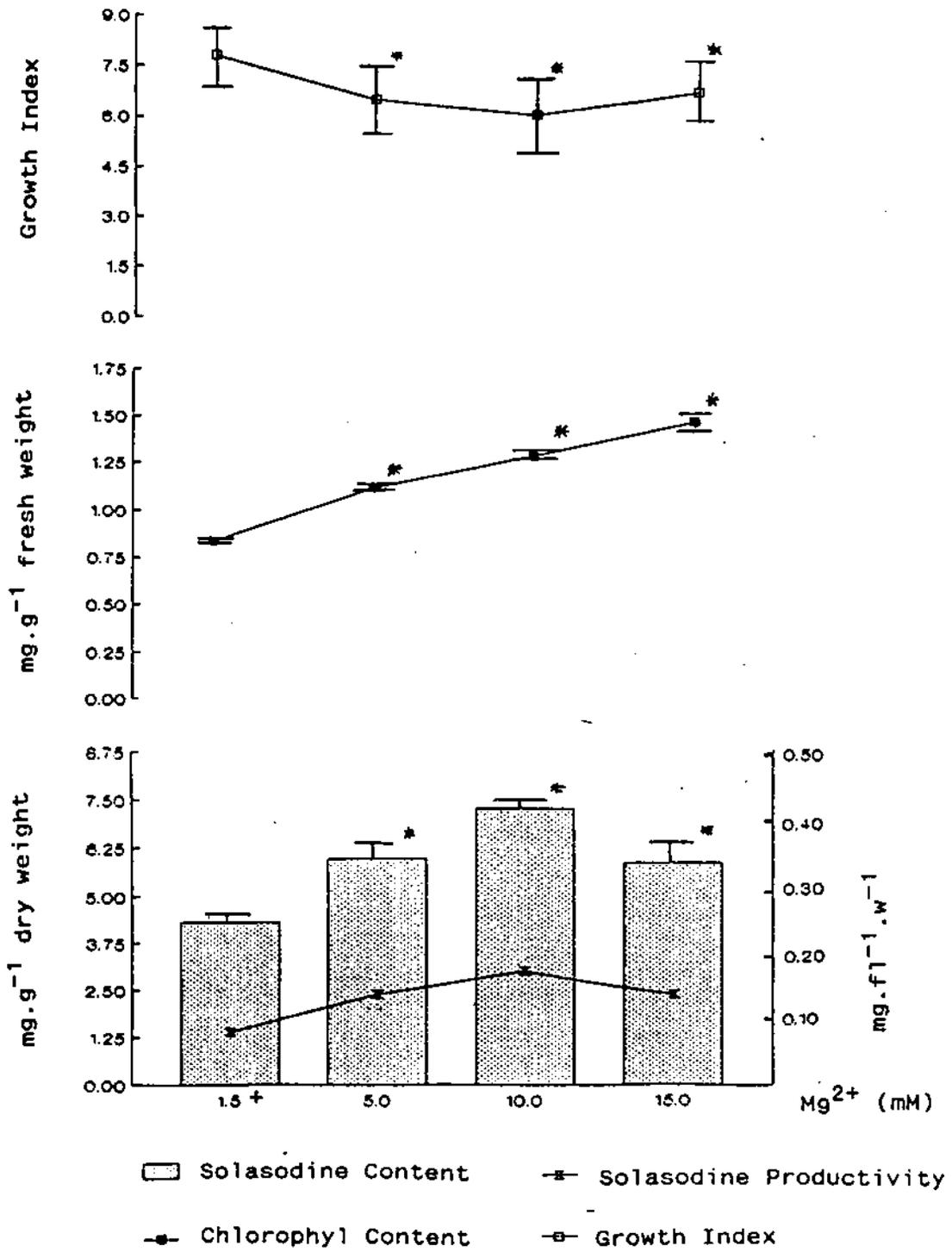
Ket.: * = media MK



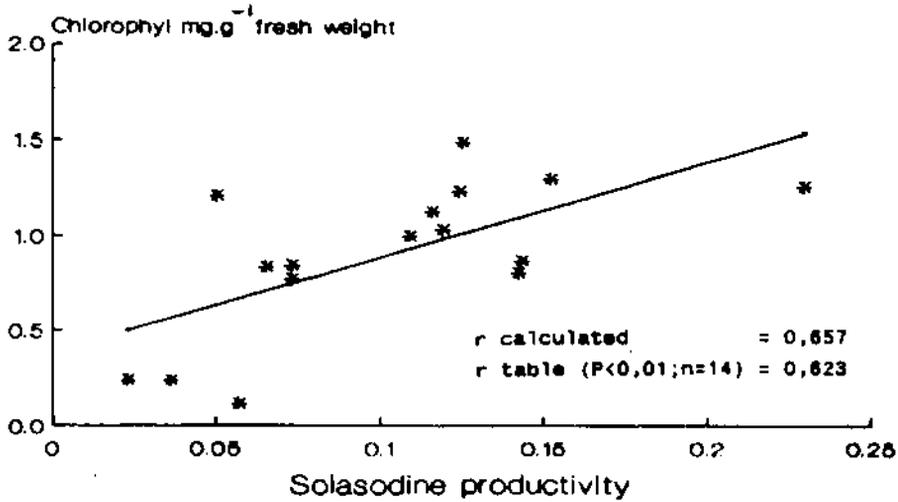
Gambar 20 : Pengaruh sumber nitrogen terhadap kadar dan produktifitas solasodina, kadar klorofil dan indeks pertumbuhan kultur pucuk *Solanum laciniatum*. * (P=99 %) ** (P=95 %)



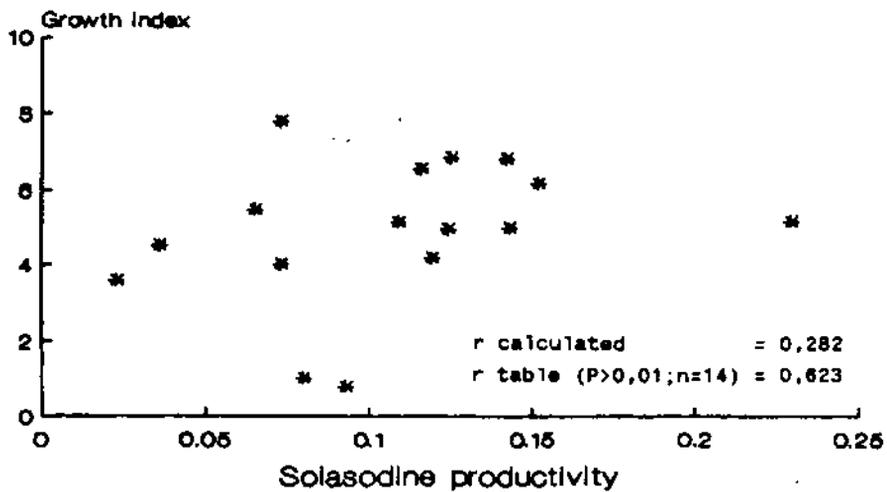
Gambar 21 : Pengaruh ion kalsium terhadap kadar dan produktifitas solasodina, kadar klorofil dan indeks pertumbuhan kultur pucuk *Solanum laciniatum*. * (P=99 %).



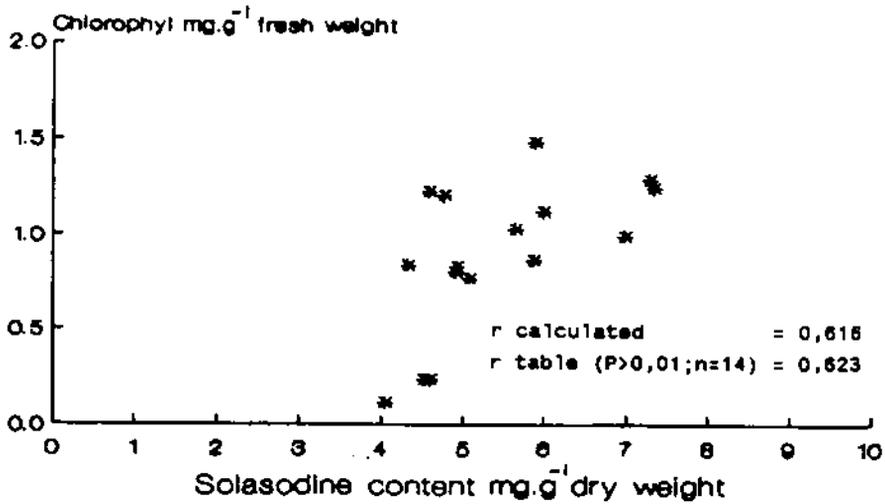
Gambar 22 : Pengaruh ion magnesium terhadap kadar dan produktifitas solasodina, kadar klorofil dan indeks pertumbuhan kultur pucuk *Solanum laciniatum*. * (P=99 %).



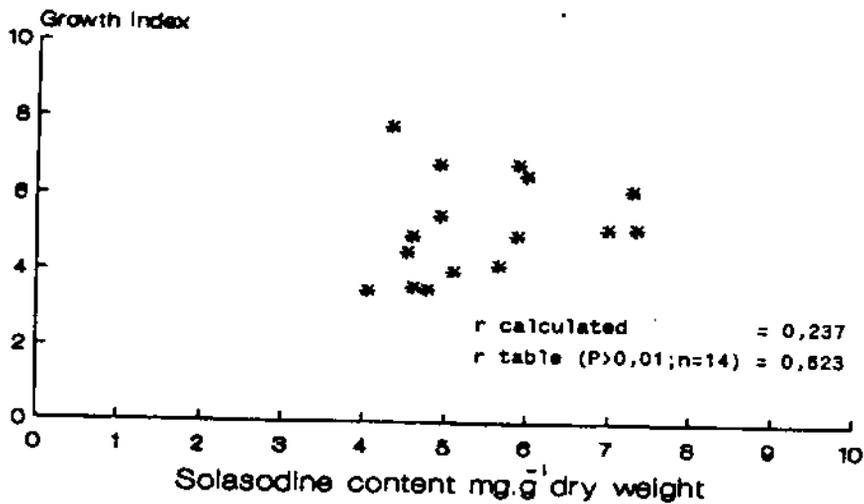
Gambar 23 : Kurva korelasi antara produktivitas solasodina dengan kadar relatif klorofil pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* dalam berbagai media perlakuan.



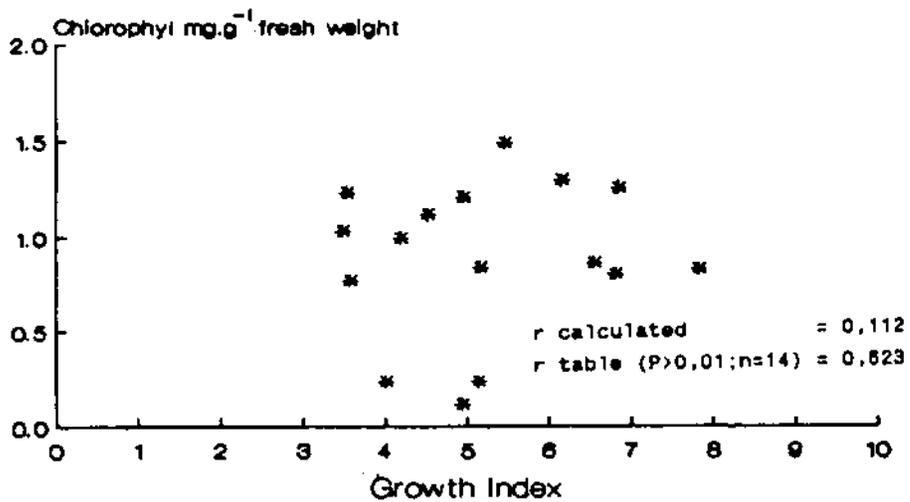
Gambar 24 : Diagram sebaran antara produktivitas solasodina dengan indeks pertumbuhan pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* dalam berbagai media perlakuan.



Gambar 25 : Diagram sebaran antara kadar solasodina dengan kadar relatif klorofil pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* dalam berbagai media perlakuan.



Gambar 26 : Diagram sebaran antara kadar solasodina dengan indeks pertumbuhan pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* dalam berbagai media perlakuan.



Gambar 27 : Diagram sebaran antara indeks pertumbuhan dengan kadar relatif klorofil pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* dalam berbagai media perlakuan.

BAB V

PEMBAHASAN

Solanum laciniatum merupakan salah satu tanaman penghasil solasodina yang cukup potensial dan prospektif. Penggunaan kultur pucuk *Solanum laciniatum* sebagai bahan sampel dengan pertimbangan untuk memperoleh kadar solasodina yang tinggi, karena berdasarkan penelitian diketahui bahwa pembentukan solasodina akan meningkat pada kultur terdiferensiasi [Chandler & Dodds, 1983].

Semua kultur dari berbagai media perlakuan dipanen setelah berumur 4 minggu. Dihitung indeks pertumbuhannya serta ditetapkan kadar relatif klorofilnya menggunakan Spektrofotometer Shimadzu UV-Vis 160 A. Pengeringan dilakukan dibawah sinar lampu dan ditentukan susut keringnya sampai diperoleh susut pengeringan < 2 %.

Untuk mendapatkan hasil pemisahan KLT terbaik, dilakukan optimalisasi fase gerak.

Berdasarkan hasil optimalisasi fase gerak (gambar 8), terlihat bahwa fase gerak E (kloroform-metanol = 19:1) dan fase gerak F (kloroform-metanol =

19:3) terjadi tailing pada bercak yang terbentuk, pemisahan tidak baik dan terjadi penumpukan bercak. Pada fase gerak G (heksana-etilasetat-dietilamin=70:20:10) bercak yang diperoleh sudah bulat, tetapi setelah diperiksa lebih lanjut dengan TLC-Scanner, ternyata bercak tersebut tidak murni (gambar 9). Sedangkan fase gerak H (kloroform-metanol-dietilamin=20:2:0,5) maupun fase gerak I (kloroform-metanol-dietilamin (20:2:0,75) diperoleh bercak yang bulat dan pada pemeriksaan kemurnian bercak menggunakan TLC-Scanner diperoleh profil spektra panjang gelombang yang sama dengan solasodina standar. Namun fase gerak H memberikan hasil pemisahan yang lebih baik dibandingkan fase gerak I, sehingga dalam penelitian ini dipilih fase gerak dengan komposisi kloroform-metanol-dietilamin (20:2:0,5).

Berdasarkan hasil optimalisasi metode hidrolisa (gambar 10) terlihat bahwa hidrolisa dengan metode Carle, temperatur 100°C (C*) dihasilkan bercak dengan warna dan harga R_f yang sama dengan standar solasodina. Demikian pula halnya pada metode hidrolisa sapogenin steroid seperti yang biasa dilakukan di laboratorium Bioteknologi Fakultas Farmasi Unair (A). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh karena hidrolisa yang terjadi terlalu kuat, sehingga sebagian solaso-

dina yang terbentuk mengalami reaksi lebih lanjut dengan terjadinya ikatan antara atom H dan OH menjadi H₂O yang keluar dari struktur molekulnya, sehingga terbentuk solasodiena. Sementara dihasilkannya solasodiena pada metode hidrolisa Van Gelder (VG), kemungkinan disebabkan selama proses hidrolisa berlangsung kloroform banyak yang menguap sehingga tidak berfungsi menerima solasodina hasil hidrolisa dan terjadi reaksi lebih lanjut seperti pada metode hidrolisa C* dan A yaitu berupa pengeluaran molekul air, sehingga terbentuk solasodiena. Sementara hidrolisa dengan metode Carle dengan temperatur 70-75°C (C) hanya dihasilkan solasodina tanpa solasodiena dan diperoleh pemisahan yang baik, sehingga dalam penelitian ini dipilih metode hidrolisis Carle dengan temperatur 70-75°C.

Ekstraksi serbuk kering sampel (kadar air <2%) digunakan metode Carle (1979) dan Indrayanto (1993) yang dimodifikasi. Ekstraksi dilakukan dua tahap, tahap I bertujuan untuk memisahkan fraksi sterol dan klorofil, sedangkan tahap II ditujukan untuk memperoleh ekstrak fraksi hidrolisat yang mengandung solasodina.

Pada uji KLT dari ekstrak fraksi hidrolisat menggunakan lempeng Kieselgel 60 F 254 dengan fase

gerak kloroform-metanol-dietilamin (20:5:0,5) dengan penampak bercak anisaldehyd-asam sulfat dihasilkan empat buah bercak. Warna bercak berturut-turut searah eluasi adalah bercak warna hijau, bercak warna biru, bercak warna kuning kehijauan dengan R_f 5,8 sama dengan standar diosgenin dan bercak warna ungu sama dengan standar kolesterol. Bercak warna biru memiliki harga R_f 0,50 sementara standar solasodina memberikan warna bercak dan harga R_f yang sama dengan bercak nomor dua. Hasil pemeriksaan spektra panjang gelombang bercak warna biru maupun bercak standar solasodina menggunakan TLC-Scanner menunjukkan profil spektra yang sama, dengan serapan maksimum pada panjang gelombang 385 nm (gambar 12).

Dilakukan KLT preparatif terhadap ekstrak fraksi hidrolisat menggunakan fase gerak kloroform-metanol-dietilamin (20:2:0,5), diperoleh suatu isolat yang kemudian dianalisis menggunakan FT-IR dan Spektrometri masa.

Pemeriksaan isolat maupun standar solasodina menggunakan FT-IR menunjukkan profil spektra yang identik, dengan puncak-puncak serapan pada bilangan gelombang (Cm^{-1}) [Indrayanto, et al, 1994],

3455 = vibrasi regang OH

3362 = vibrasi regang NH

2843, 2967 = vibrasi regang CH kerangka steroid

1690 = vibrasi regang C=C

1675 = vibrasi deformasi NH

1451, 1344 = vibrasi deformasi metil

1379 = vibrasi deformasi metilen

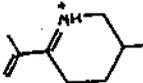
1060, 1239 = vibrasi regang CO

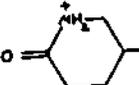
Pemeriksaan isolat dan solasodina standar menggunakan spektrometri masa dengan cara ionisasi tumbukan elektron dan energi 70 eV, menunjukkan spektra fragmentasi yang identik, yaitu pada m/z :

413 = M^+

385 = $M^+ - 28 (C_2H_4)$

271 = $C_9H_{27}NO^+$

138 = 

114 = 

Penetapan kadar solasodina pada ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* dilakukan dengan metode densitometri menggunakan TLC-Scanner Shimadzu CS-930. Dilakukan validasi metode analisis yang meliputi linieritas, presisi, akurasi, batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ). Linieritas standar solasodina diperoleh pada konsentrasi 0,6 -

1,6 ug/spot dengan koefisien korelasi (r) = 0,9927096 dan harga X_p = 0,3330301. Presisi diperoleh harga rata-rata kadar solasodina \bar{X} = 4,3397 \pm 0,08129 mg/g berat kering (n = 10) dan relatif standar deviasi (RSD) = 1,87 %. Untuk akurasi diperoleh prosen rata-rata recovery = 99,11 \pm 2,1547 % (n = 13). Sedangkan batas deteksi (LOD) = 0,11 ug/spot dan batas kuantitasi (LOQ) = 0,32 ug/spot.

Dari hasil pemeriksaan spektra menggunakan FT-IR maupun Spektrometri Masa dapat disimpulkan bahwa isolat adalah solasodina. Sementara ketiga bercak yang lain yang tampak pada kromatogram KLT belum teridentifikasi dalam penelitian ini. Kemungkinan selain solasodina, masih ada kandungan steroid lain dalam fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum*.

Berdasarkan gambar 20 dapat dilihat bahwa sumber nitrogen dalam bentuk kombinasi NH_4^+ - NO_3^- berpengaruh terhadap peningkatan produktivitas solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*. Produktivitas tertinggi ($0,14 \text{ mg.fl}^{-1}.\text{w}^{-1}$) \pm 2 kali produktivitas pada media MK diperoleh pada komposisi NH_4^+ - NO_3^- = \pm 1:2 (41,2mM-78,8mM). Peningkatan produktivitas ini kemungkinan disebabkan oleh total nitrogen yang tinggi, sehingga nitrogen yang tersedia

lebih banyak dan lebih memungkinkan terjadi masuknya N oleh enzim dalam proses pembentukan solasodina. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya terhadap produksi solasodina pada kultur suspensi *Solanum eleagnifolium*, bahwa produktivitas tertinggi diperoleh pada komposisi $\text{NH}_4^+ - \text{NO}_3^- = 1 : 2$ [Nigra, et al, 1990]. Sedangkan tingginya kandungan solasodina ($4,77 \pm 0,1935$ mg/g berat kering) $\pm 1,1$ kali kadar dalam media MK, pada komposisi $\text{NH}_4^+ - \text{NO}_3^- = 1:1$ (20,6mM-20,6mM) kemungkinan disebabkan karena kadar klorofilnya yang tinggi. Mengenai tingginya kadar klorofil ($1,197 \pm 0,0132$ mg/g berat segar) $\pm 1,43$ kali kadar dalam media MK, pada komposisi ini belum bisa dijelaskan secara lebih rinci. Diduga hal ini kemungkinan terjadi kesalahan teknis selama pengerjaan, oleh karena itu bisa diatasi dengan cara melakukan pengulangan percobaan atau dilakukan 'rejection data'. Sedangkan pengaruhnya terhadap indeks pertumbuhan secara umum adalah terjadi penghambatan pertumbuhan pada seluruh media perlakuan.

Berdasarkan gambar 21 diketahui bahwa peningkatan konsentrasi ion kalsium sebesar 6,0 mM dan 9,0 mM berpengaruh terhadap peningkatan kandungan maupun produktivitas solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*. Kandungan tertinggi ($7,33 \pm 0,2731$ mg/g

berat kering) $\pm 1,7$ kali kadar pada media MK, diperoleh pada konsentrasi ion kalsium 6,0 mM. Pada konsentrasi ion kalsium 6,0 mM ini juga terjadi produktivitas solasodina tertinggi yaitu $0,23 \text{ mg.fl}^{-1}.\text{w}^{-1}$ ($\pm 3,29$ kali produktivitas pada media MK). Hal ini mungkin disebabkan oleh karena ion kalsium bersifat sebagai elisitor abiotik yang dapat merangsang pembentukan dan akumulasi metabolit sekunder. Telah diketahui bahwa pertumbuhan dan pembentukan metabolit sekunder dipengaruhi oleh ion kalsium [Misawa, 1985]. Penambahan ion kalsium dengan konsentrasi tinggi dapat mempengaruhi total alkaloida pada kultur *Tabernaemontana divaricata* [Indrayanto, 1989]. Penelitian lain menyebutkan bahwa konsentrasi ion kalsium 10 mM dapat meningkatkan glikoalkaloid raucaffrisin pada kultur suspensi *Rauwolfia serpentina* [Schuebel, et al, 1989].

Penurunan konsentrasi ion kalsium sampai dengan 0,0 mM serta penambahan EGTA sebagai antagonis ion kalsium pada konsentrasi 1,0 mM dan 2,0 mM juga mengakibatkan peningkatan kandungan maupun produktivitas solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*. Kandungan tertinggi ($6,98 \pm 0,3583 \text{ mg/g}$ berat kering) $\pm 1,62$ kali kadar pada media MK diperoleh pada konsentrasi EGTA 1,0 mM. Sedangkan produktivitas

tertinggi $0,14 \text{ mg.fl}^{-1}.\text{w}^{-1}$ (± 2 kali produktivitas pada media MK, diperoleh pada media dengan konsentrasi ion kalsium $0,0 \text{ mM}$ (tanpa mengandung ion kalsium). Hal ini mungkin disebabkan karena dengan tiadanya ion kalsium dalam media, menyebabkan tidak aktifnya suatu sistem enzim yang terlibat dalam proses degradasi solasodina, sehingga terjadi akumulasi produk solasodina tanpa diikuti suatu proses degradasi oleh karena itu kadarnya menjadi tinggi. Sementara pengaruhnya terhadap kadar relatif klorofil, pada umumnya adalah meningkatkan kadar klorofil.

Berdasarkan gambar 21 diketahui bahwa penambahan konsentrasi ion magnesium sebesar $5,0 \text{ mM}$; $10,0 \text{ mM}$ dan $15,0 \text{ mM}$, seluruhnya berpengaruh terhadap indeks pertumbuhan, kadar klorofil maupun pada kandungan dan produktivitas solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*. Terhadap indeks pertumbuhan secara keseluruhan terjadi penghambatan pertumbuhan. Sedangkan pengaruhnya terhadap klorofil, seluruh perlakuan menghasilkan peningkatan kadar relatif klorofil. Hal ini kemungkinan disebabkan ion magnesium terlibat dalam proses pembentukan klorofil atau ikut berperan dalam aktifitas kloroplas. Kandungan solasodina tertinggi ($7,28 \pm 0,1492 \text{ mg/g}$ berat kering) $\pm 1,7$ kali kadar pada media MK dan produktivitas solasodina

tertinggi $1,15 \text{ mg.fl}^{-1}.\text{w}^{-1}$, diperoleh pada konsentrasi ion magnesium $10,0 \text{ mM}$. Hal ini mungkin disebabkan oleh pengaruh ion magnesium sebagai elisitor abiotik. Diketahui bahwa ion magnesium mampu menginduksi pembentukan metabolit sekunder pada kultur jaringan beberapa jenis tanaman [Schuebel, 1989, Indrayanto, 1990]. Ion magnesium mempunyai peran dalam pembentukan organel sel tanaman, khususnya pada sintesa asam amino, walaupun peran ini tampaknya tidak begitu spesifik [Pierik, 1987].

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, secara keseluruhan dapat diketahui bahwa :

Tidak ada korelasi antara kadar relatif klorofil dengan kadar solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*, r hitung = $0,616$ dan r tabel ($P > 0,01; n = 14$) = $0,623$.

Tidak ada korelasi antara indeks pertumbuhan dengan kadar solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*, r hitung = $0,237$ dan r tabel ($P > 0,01; n = 14$) = $0,623$.

Ada korelasi antara kadar relatif klorofil dengan produktivitas solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*, r hitung = $0,657$ dan r tabel ($P < 0,01; n = 14$) = $0,623$.

Tidak ada korelasi antara indeks pertumbuhan

dengan produktivitas solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*, r hitung = 0,282 dan r tabel ($P > 0,01; n = 14$) = 0,623.

Tidak ada korelasi antara indeks pertumbuhan dengan kadar relatif klorofil pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*, r hitung = 0,112 dan r tabel ($P > 0,01; n = 14$) = 0,623.

Dari kenyataan tersebut dapat diketahui bahwa produktivitas solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* dipengaruhi oleh keberadaan klorofil seperti telah diketahui bahwa pembentukan solasodina dipengaruhi/tergantung pada keberadaan klorofil, karena melibatkan aktifitas fotosintesis kloroplas [Conner, 1987].

Sementara kadar solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* tidak dipengaruhi oleh klorofil maupun indeks pertumbuhan. Produktivitas solasodina kultur pucuk *Solanum laciniatum* juga tidak dipengaruhi oleh indeks pertumbuhan. Sedangkan kadar relatif klorofil pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* juga tidak dipengaruhi oleh indeks pertumbuhan.

BAB VI**KESIMPULAN**

1. Sumber nitrogen berpengaruh terhadap peningkatan kandungan maupun produktivitas solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*. Peningkatan yang terjadi berkaitan dengan jumlah total nitrogen. Produktivitas tertinggi ($0,14 \text{ mg.fl}^{-1}\text{w.}^{-1}$) \pm 2kali produktivitas pada media MK, diperoleh pada komposisi $\text{NH}_4^+ - \text{NO}_3^- = 1:2$ dengan total nitrogen 130 mM.
2. Peningkatan konsentrasi ion kalsium sebesar 6,0 mM memberikan peningkatan produktivitas solasodina $0,23 \text{ mg.fl}^{-1}\text{w.}^{-1}$ atau dua kali produktivitas solasodina pada media MK. Penghilangan ion kalsium pada media memberikan peningkatan produktivitas solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* sebesar $0,14 \text{ mg.fl}^{-1}\text{w.}^{-1}$ atau dua kali produktivitas solasodina pada media MK. Sementara kandungan tertinggi ($7,33 \pm 0,2731 \text{ mg/g}$ berat kering) \pm 1,7 kali kadar MK diperoleh pada konsentrasi ion kalsium 6,0 mM (P = 99%).

3. Penambahan ion magnesium dengan konsentrasi 5,0 mM, 10,0 mM, 15,0 mM meningkatkan produktivitas solasodina, kandungan tertinggi ($7,28 \pm 0,1492$ mg/g berat kering) $\pm 1,7$ kali kadar MK diperoleh pada konsentrasi ion magnesium 10,0 mM ($P = 99\%$). Produktivitas tertinggi $1,15 \text{ mg.fl}^{-1}.\text{w}^{-1}$, diperoleh pada konsentrasi ion magnesium 10,0 mM.

4. Ada korelasi antara produktivitas solasodina dengan kadar relatif klorofil pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* r hitung = 0,657 dan r tabel ($P < 0,01; n = 14$) = 0,623.

BAB VII

SARAN

1. Perlu diteliti pengaruh komposisi sumber nitrogen yang lain terhadap produktivitas dan kandungan solasodina kultur pucuk *Solanum laciniatum*
2. Perlu diteliti pengaruh logam-logam berat yang lain terhadap produktivitas dan kandungan solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*.
3. Perlu diteliti pengaruh komponen makroelemen yang lain terhadap produktivitas dan kandungan solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*.
4. Perlu diteliti tiga bercak selain solasodina yang didapat pada kromatogram hasil KLT fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum*

DAFTAR PUSTAKA

- Alfermann, W., Reinhard, E., (1985), Kultivierung Pflanzlicher Zellen in Bioreaktoren zur Natur stoffsgewinnung, BMFT-SEMINAR, Juellich, Germany.
- Atipayakul, S., Jatisatiens, A., (1978) *Planta Medica* 55:661.
- Barthlen, U., (1983) , Tesis Ph.D., Universitas Tuebingen.
- Blunden, G. , Hardman , R. and Morrison, J.C., (1987), Quantitative Estimation of Diosgenin in *Dioscorea* Tuber by Densitometric Thin Layer Chromatography. In : *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56., No. 8 : 948-950.
- Cohen, A.S. and Zalik, S., (1978), Magnesium Replacement by Polyamines in Higher Plant Cell-Free Polyphe-nylalanine Synthesis, *Phytochemistry*, Vol. 17, Pergamon Press Printed, England : 113-118.
- Carle, R., (1979), Untersuchungen zur Steroid Alka-loid und Sapogenin Fuhung in Pflanzen und Zellkultu-ren der Gatung *Solanum* L, Dissertation.
- Crocomo, O.J., Aquarone, E., Gottlieb, O.R., (1981), Biosynthesis of Secondary Products In Vitro. In : Thorpe, T.A., (Ed), *Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture*, Academic Press, INC : 359-371.
- Chandler , S. and Dodds, J., (1983), Solasodine Production in Rapidly Proliferating Tissue Cultures of *Solanum Laciniatum* Ait, *Plant Cell Report*, Depart-ment of Plant Biology, University of Brimingham, Brimingham.

Chandler, S. and Dodds, J., (1983), The Effect of Phosphate, Nitrogen and Sucrose on the Production of Phenolics and Solasodine in Callus Cultures of *Solanum laciniatum*, Plant Cell Reports, Springer-Verlag, 2 :205-208.

Conner, A.J.,(1987), Differential Solasodine Accumulation in Photoautotrophic and Heterotrophic Tissue Cultures of *Solanum laciniatum*, Phytochemistry, Vol. 26. No. 10, Pergamon Journals Ltd : 2749-2750.

Constabel,F., (1990), *Planta Medica*, 56 : 422.

Dixon, R.A., (1985), Isolation and Maintenance of Callus and Cell Suspension Cultures. In : Dixon, R.A. (Ed), *Plant Cell Culture, a Practical Approach*, IRL Press, Oxford-Washington DC : 1-20.

Dougall, D.K., (1985), Chemicals From Plant Cell Cultures : Yield and Variation. In : Milton Zaitlin, Peter Day and Alexander Hollaender, (Ed) *Biotechnology in Plant Science, Relevance to Agriculture in the Eighties*, Academic Press : 8-34.

Emke, A. and Eilert, U., (1986), Steroidal Alkaloids in Tissue Cultures and Regenerated Plants of *Solanum dulcamara*, Institut für Pharmazeutische Biologie der Technischen Universität, Mendelssohnstr.

Ellis, B.E., (1988), *Natural Product Reports*, 5, : 581-612.

Fieser, L.F., Fieser, M., (1967), *Steroids*, Reinhold Company, New York.

Farmakope Indonesia, (1979), Edisi III, Departemen Kesehatan Republik Indonesia : XXXIII.
Funk, W., Dammann, V., Donnervert, (1992), *Qualitätssicherung in der Analytical Chemistry*, 342 : 769-778.

Fowler, M.W., (1986), Commercial Applications And Economic Aspects of Mass Plant Cell Culture. In : Mantell, S.H. and Smith, H., (Ed), Plant Biotechnology, Cambridge University Press : 8 - 34.

Funk, W., et al, (1992), Qualitätssicherung in der Analytische Chemie, VCH :5 - 39.

Harborne, J.B., (1987), Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan, Terbitan kedua, Penerbit ITB, Bandung : 13, 155.

Holden, M.A., Holden, P.R. and Yeoman, M.M., (1989), Elicitation of Cell Culture. In : Robins, R.J. and Rhodes, M.J.C., (Ed), Manipulating Secondary Metabolism In Culture, Cambridge University Press :57 -63.

Indrayanto, G., (1983), Steroid and Triterpene in Zell Kulturen Untersuchungen mit Zellkulturen von Solanum laciniatum Ait, Solanum wrightii Bent und Costus speciosus (Koen) SM, Dissertation Universitat in Tuebingen : 6-83.

Isnaeni, (1986) , Optimalisasi Pertumbuhan Kalus dan Identifikasi Steroid dari Solanum mammosum L., Tesis, Universitas Airlangga.

Indrayanto, G., (1986), Prospek Kultur Jaringan Tanaman pada bidang Farmasi, buletin ISFI Jatim : 17.

Indrayanto, G., (1987), Produksi Metabolit Sekunder Dengan Teknik Kultur Jaringan Tanaman, Dalam Seminar Nasional Metabolit Sekunder, PAU Bioteknologi, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta

Indrayanto, G., Rachman, A., (1989), Aplikasi Bioteknologi Sel Tanaman Untuk Bidang Farmasi. Suatu Tinjauan Tentang Prospek dan Keterbatasannya, Dalam Kumpulan Makalah Seminar Sehari Bioteknologi Ditinjau

Dari Berbagai Disiplin Ilmu, Universitas Airlangga, Surabaya.

Indrayanto, G., (1990), Analisis Pengaruh Komposisi Media Terhadap Jenis dan Kadar Senyawa Steroid dalam Kultur Jaringan Tanaman *Dioscorea* sp. dan *Agave* sp., Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.

Intruction Manual, Shimadzu High Speed Thin Layer Chromato Scanner, Model CS - 930.

Kaneko Ko et al, (1976), Origin of Nitrogen in the Biosynthesis of Solanidine by *Veratrum grandiflorum*, *Phytochemistry*, Vol. 15, Pergamon Press Printed, England.

Kieslich, K., (1986), Production of Drugs by Microbial Biosynthesis and Biotransformation, Institute for Biotechnological Research Ltd., Braunschweig (Federal Republic of Germany : 888-892.

Kolodziej, H., (1989), *Deutcher Apotheker Zeitung*, 129 : 1385-1389.

Lawrence ,G.M.H.,(1979), *Taxonomy of Vascular Plants*, The Macmillan Company.

Manitto, P., (1981), *Biosynthesis of Natural Products*, Ellis Horwood Limited, England : 314-330.

Moore, A.L. and Akerman, K.E.O., (1984), *Calerium and Plants Organelles*, *Plant Cells Environment*, 7 : 423-429.

Mantell,S.H., Matthews, J.A.and McKee, R.A., (1985), *Principles of Plant Biotechnology, An Introduction to Genetic Engineering in Plants*, Black Well Scientific Publication, Oxford, London, Edinburgh : 186.

- Misawa, M. (1985), Production of Useful Plant Metabolites. In : Fiechter, A., (Ed). *Advances In Biochemical Engineering Biotechnology*, Springer Verlag, New York : 59-84.
- Matile, P., (1990), The Toxic Compartment of Plant Cells. In : Nijkamp, J.J., et al., (Eds), *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, Kluwer Academic Press.
- Mak, Y. and Doran, P.M., (1993), Effect of cell-cycle inhibition on synthesis of steroidal alkaloids by *Solanum aviculare* plant cells, *Biotechnology Letters*, Vol. 15, No. 10 : 1031-1034.
- Nigra, H.M., et al, (1987), Production of Solasodine by calli from different parts of *Solanum eleagnifolium* Cav. plant, *Plant Cell Reports*, Springer-Verlag : 135-137.
- Nigra, H.M., et al, (1989), The influence of auxins, light and cell differentiation on solasodine production by *Solanum eleagnifolium* Cav. calli, *Plant Cell report* ; 230-233.
- Nigra, H.M., et al, (1990), Effect of Carbon and Nitrogen sources on growth and solasodine production in batch suspension cultures of *Solanum eleagnifolium* Cav., Kluwer Academic Publishers, Netherlands : 55-60.
- Noeraeni, P.E., (1992), Pengaruh Ion Kalsium Terhadap Kandungan Fitosteroid Kalus *Agave Amaniensis*, Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Pierik, R.L.N., (1987), *In Vitro Culture of Higher Plants*, Martines Nighoff Publishers.
- Philipson, J.D., (1990), Possibilities of Finding New Products from Plant Cell Cultures. In : Nijkamp, H.J., et al., (eds), *Progress in Plant Cellular and*

Molecular Biology, Kluwer Acad Publication.

Rokem, J.S., Tal, B. and Goldberg, I., (1985), Methods For Increasing Diosgenin Production By Dioscorea Cells In Suspension Cultures, Journal of Natural Products, 48.2 : 210-222.

Stahl, E., (1985), Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi, Penerbit ITB, Bandung : 1-8.

Schuebel, H., et al, (1989), Improved Production of Raucaffricine by Cultivated Rauwolfia Cell, Phytochemistry, 28.2 : 491-494.

Staba, E.J., (1991), Kuliah Tamu Pada Kursus Kultur Jaringan Tanaman, PAU Bioteknologi, Universitas Gajah Mada.

Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Morrill, T., (1991) Spectroscopy of Organic Compounds, John Willey & Sons New York.

Telek, L.H., Delpin and E. Cabanillas, (1971), Solanum mammosum as a Source of Solasodine in the Low land Tropics Economy Botany, 31 : 120-128.

The Merck Index, (1983), An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, Merck and Co, Ind, USA : 1245.

Torsell, K.B.G., (1983), Natural Product Chemistry, A Mechanistic and Biosynthetic Approach to Secondary Metabolism, John Wiley and Sons Limited : 206-215.

Van Gelder, W.M.I., (1989), Ph.D. Thesis , Agriculture Wageningen University.

Varro, E.T., et al, Ed (1981), Pharmacognosy, Lea and

Febiger, Philadelphia : 164-194.

Willard, H.H., Lynne, L M J R, Frank A S J R, Instrumental Methods of Analysis, (1981), 6th Ed, D Van Nostrand Co, New York : 454-486; 515-627.

Whitaker, R., et al, (1986), Production of Secondary Metabolites in Plant Cell Cultures, In : Biogenesis of Aroma, American Chemical Society.

Wink, M., (1988), Physiology of the Accumulation of Secondary Metabolites With Special Reference to Alkaloids. In : Vasil, I.K., (Eds), Cell Cultures and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 5, Academic Press.

Waldmann, T., Jeblick, W. and Kauss, H., (1988), Induced Net Ca^{2+} Uptake and Callose Biosynthesis In Suspension Cultured Plant Cells, Planta, 173 : 88-95.

Lampiran 1 :

**KOMPOSISI MEDIA MURASHIGE & SKOOG
YANG DIMODIFIKASI UNTUK PERTUMBUHAN STOK KULTUR PADA
LABORATORIUM BIOTEKNOLOGI FARMASI, FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Kode Media MK

Komponen	Jumlah (mg/l)
* NH_4NO_3	1.650
* KNO_3	1.900
* $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
* $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	340
KI	0,83
H_3BO_3	6,20
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,30
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,60
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,80
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,30
Asam nikotinat	0,50
Piridoksin HCl	0,50
Glisin	2
Thiamin HCl	0,10
Mio-inositol	100
Agar	7.500
Sukrosa	30.000
Hormon tumbuh : -Bensil adenin	4

Lampiran 2 :

**KOMPOSISI MEDIA PERLAKUAN
SAMA DENGAN KOMPOSISI MEDIA MK,
KECUALI YANG TERTERA DALAM TABEL**

Perlakuan I

No.	Kode Media	CaCl ₂ .2H ₂ O (mg/l)	EGTA (mg/l)
1	Ca-0E2	-	760
2.	Ca-0E1	-	380
3.	Ca-0	-	-
4.	Ca-1/2	220	-
*5.	Ca-1	440	-
6.	Ca-2	880	-
7.	Ca-3	1320	-

Perlakuan II

No.	Kode Media	NH ₄ NO ₃ (mg/l)	KNO ₃ (mg/l)
1.	N0-K0	-	-
2.	N0-K1	-	1900
3.	N0-K2	-	3800
4.	N1-K0	1650	-
*5.	N1-K1	1650	1900
6.	N2-K0	3300	-
7.	N2-K2	3300	3800

Perlakuan III

No.	Kode Media	MgSO ₄ . 7H ₂ O (mg/l)
*1.	Mg.MK	370
2.	Mg.5	1230
3.	Mg.10	2460
4.	Mg.15	3690

Lampiran 3 :

