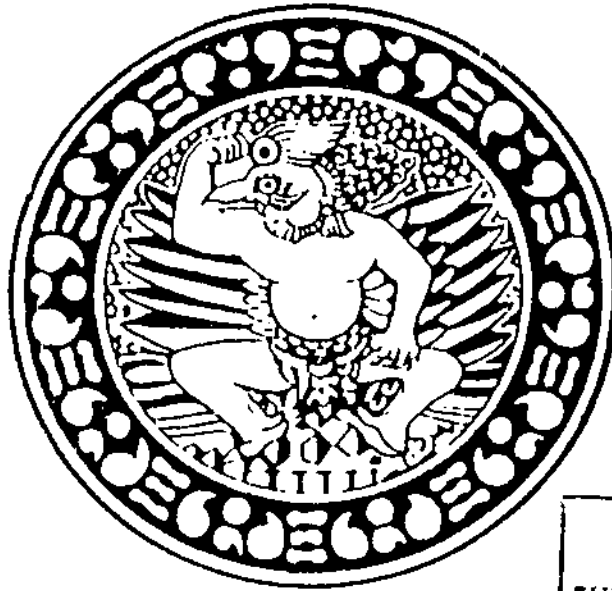


~ TITIK ~

PENGARUH L-ARGININ, KASEIN
HIDROLISAT, TEPUNG PISANG DAN
SAKAROSA TERHADAP KANDUNGAN
SOLASODINA KULTUR PUCUK
SOLANUM LACINIATUM



KK
TF. 43/95
Mun
P.

MILIK
PERPUSTAKAAN
"UNIVERSITAS AIRLANGGA"
SURABAYA

Oleh :

TRISTIANA ERAWATI MUNANDAR

NIM. 099110992 / M

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA

1994

**PENGARUH L-ARGININ, KASEIN
HIDROLISAT, TEPUNG PISANG DAN
SAKAROSA TERHADAP KANDUNGAN SOLASODINA
KULTUR PUCUK *SOLANUM LACINIATUM***

TESIS

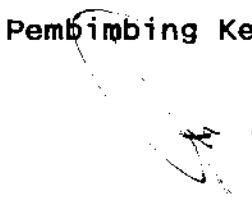
TELAH DISETUJUI OLEH PANITIA PENGUJI TESIS
PADA TANGGAL 17 OKTOBER 1994

MEMENUHI PERSYARATAN PENDIDIKAN
PASCASARJANA PROGRAM MAGISTER
PROGRAM STUDI ILMU FARMASI

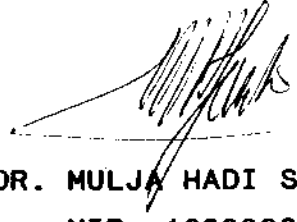
Oleh :

TRISTIANA ERAWATI MUNANDAR
NIM. 099110992/M

Pembimbing Ketua :



DR. GUNAWAN INDRAYANTO
NIP. 130541814

Pembimbing :


DR. MULJA HADI SANTOSA
NIP. 130809084

Mengetahui :

Ketua Program Studi Ilmu Farmasi


DR. WIDJI SOERATRI
NIP. 130611501

PANITIA PENILAI/PENGUJI TESIS

KETUA : PROF. DR. H. A. AZIZ HUBEIS, APT.
ANGGOTA : PROF. DR. H. NOOR CHOLIES ZAINI, APT.
DR. H. NOOR IFANSJAH, APT.
DR. GUNAWAN INDRAYANTO, APT.
DR. MULJA HADI SANTOSA, APT.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karuniaNya, sehingga kami dapat menyelesaikan tesis ini sebagai persyaratan Pendidikan Pascasarjana Program Magister - Program studi Ilmu Farmasi di Universitas Airlangga.

Pada kesempatan ini perkenankanlah kami mengucapkan rasa terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Kepala Laboratorium Preskripsi Formulasi dan Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan ijin kepada kami untuk mengikuti program pendidikan Pascasarjana.
2. Tim Managemen Program Doktor (TMPD) Departemen Pendidikan dan Kebudayaan R.I. yang telah memberikan beasiswa selama pendidikan kami.
3. Dr. Gunawan Indrayanto dan Dr. Mulja Hadi Santosa sebagai pembimbing kami, yang telah banyak memberikan saran, nasehat dan bimbingan selama kami mengikuti pendidikan hingga terselesaikannya tesis ini.
4. Kepala Laboratorium Bioteknologi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga beserta staf yang telah memberikan bantuan dan fasilitas selama berlangsungnya penelitian ini.

5. Kepala Laboratorium Preskripsi dan Formulasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga beserta staf yang telah memberikan, bantuan dan fasilitas khususnya untuk analisa spektrofotometer Shimadzu UV-Vis 160 A.
6. Kepala Laboratorium Bersama Universitas Airlangga beserta staf, khususnya Dr. Mulja Hadi Santosa yang telah memberikan bantuan dalam mengerjakan analisa dengan spektrometri massa dan TLC-Scanner.
7. Dr. Ika Mariska (Puslitbangtri, Bogor) yang telah memberikan kultur pucuk *Solanum laciniatum* sebagai bahan penelitian.
8. Kedua orang tua, suami dan anak kami tercinta yang senantiasa memberikan pengertian, dorongan baik moril maupun materiil selama ini.

Akhirnya rasa terima kasih juga kami sampaikan kepada semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu, sehingga tesis ini dapat terselesaikan.

Semoga Allah SWT memberikan balasan dengan limpahan rahmat dan hidayahNya. Amin.

Surabaya, Oktober 1994

penyusun

RINGKASAN

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh L-arginin, kasein hidrolisat, tepung pisang dan sakarosa terhadap kandungan solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*.

Kultur pucuk *Solanum laciniatum* diperoleh dari Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri, Bogor yang telah berhasil ditumbuhkan dalam media MS yang dimodifikasi dengan hormon tumbuh BA 4 mg/l (media MSK). Setelah diperbanyak kemudian ditanam pada media MSK dengan penambahan L-arginin (50 , 100, dan 150 mg/l), media MSK dengan penambahan kasein hiderolisat (100, 150 dan 200 mg/l), media MSK dengan penambahan tepung pisang (3, 6, dan 8 g/l) dan media MSK dengan penurunan kadar sakarosa (20, 15, 10 dan 0 g/l). Dikultivasi dalam ruang kultur dengan suhu $\pm 25^{\circ}\text{C}$ dan penyinaran lampu fluoresensi putih (± 700 lux). Setelah berumur 4 minggu kultur pucuk dipanen dan dikeringkan dibawah lampu sampai kering, kemudian diserbuk.

Untuk mengetahui pengaruh penambahan bahan perlakuan terhadap pertumbuhan kultur pucuk *Solanum laciniatum* dilakukan perhitungan indeks pertumbuhan (IP), yaitu

dengan membandingkan berat awal dengan berat waktu panen kultur pucuk *Solanum laciniatum*.

Hasil optimalisasi fase gerak metode KLT, diperoleh fase gerak dengan komposisi kloroform-metanol-dietilamin = 20 : 2 : 0,5 . Sedangkan hasil optimalisasi metode hidrolisis, diperoleh metode hidrolisis terbaik adalah metode hidrolisis Carle,(1979).

Untuk analisa selanjutnya dilakukan ekstraksi terhadap \pm 100,0 mg serbuk kultur pucuk kering (kadar air < 2 %), dengan metode Carle,(1979) dan Indrayanto, (1993) yang telah dimodifikasi. Ekstrak fraksi hidrolisat dalam kloroform dikumpulkan dan diuapkan sampai kering.

Pada analisa kualitatif, identifikasi pendahuluan terhadap solasodina dilakukan dengan metoda KTL dibandingkan dengan standar solasodina (SIGMA). Ekstrak fraksi hidrolisat ditotolkan pada lempeng KLT (Kieselgel 60 F₂₅₄), kemudian dikembangkan dengan eluen kloroform-metanol-dietilamin (20 : 2 : 0,5). Didapatkan 4 bercak. Bercak nomor 2 dari bawah searah eluasi (berwarna biru abu-abu) dengan R_f 0,47 sama dengan standar solasodina. Untuk menguji kemurnian bercak dilakukan pengamatan profil spektrum panjang gelombang dengan alat TLC-Scanner Shimadzu CS-930, diperoleh profil yang sama dengan

standar solasodina.

Identifikasi selanjutnya dengan alat MS JEOL DX 303 dan JASCO FT-IR 5300, dilakukan pada isolat hasil KLT preparatif dari bercak nomor 2. Spektra massa dan spektra FT-IR yang diperoleh sama dengan standar solasodina.

Analisa kuantitatif solasodina terhadap ekstrak fraksi hidrolisat dilakukan dengan metode densitometri menggunakan alat TLC-Scanner Shimadzu CS-930. Validasi terhadap metode diperoleh linieritas standar solasodina pada lempeng KLT dengan kadar antara 0,4 - 1,6 $\mu\text{g}/\text{spot}$, LOD = 0,11 $\mu\text{g}/\text{spot}$ dan LOQ = 0,32 $\mu\text{g}/\text{spot}$, akurasi diperoleh recovery = $98,92 \pm 2,352 \%$ ($n = 14$) serta presisi diperoleh kadar rata-rata solasodina = $4,3397 \pm 0,08129$ mg/g berat kering dengan RSD = 1,87 % ($n = 10$).

Dari hasil analisa data menggunakan ANAVA dengan program microstat dan perhitungan HSD diketahui L-arginin, kasein hidrolisat, tepung pisang dan sakarosa berpengaruh terhadap kandungan solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*.

Pengaruh penambahan L-arginin diperoleh kadar solasodina tertinggi ($6,58 \pm 0,1927$ mg/g berat kering) $\pm 1,5$ kali kadar solasodina dalam media MSK ($4,32 \pm 0,10825$ mg/g berat kering) dan produktivitas solasodina

tertinggi ($0,19 \text{ mg.fl}^{-1}.\text{w}^{-1}$) $\pm 2,7$ kali produktivitas solasodina dalam media MSK ($0,07 \text{ mg.fl}^{-1}.\text{w}^{-1}$) pada konsentrasi L-arginin 150 mg/l (P = 99 %).

Pengaruh penambahan kasein hidrolisat diperoleh kadar solasodina tertinggi ($7,03 \pm 0,5018 \text{ mg/g}$ berat kering) $\pm 1,6$ kali kadar solasodina pada media MSK, pada konsentrasi 100 mg/l (P = 99 %). Produktivitas solasodina tertinggi ($0,19 \text{ mg.fl}^{-1}.\text{w}^{-1}$) $\pm 2,7$ kali produktivitas solasodina dalam media MSK ($0,07 \text{ mg.fl}^{-1}.\text{w}^{-1}$) pada konsentrasi kasein hidrolisat 100 mg/l.

Pengaruh penambahan tepung pisang diperoleh kadar solasodina tertinggi ($6,70 \pm 0,2967 \text{ mg/g}$ berat kering) $\pm 1,55$ kali kadar solasodina dalam media MSK dan produktivitas solasodina tertinggi ($0,19 \text{ mg.fl}^{-1}.\text{w}^{-1}$) $\pm 2,7$ kali produktivitas solasodina dalam media MSK ($0,07 \text{ mg. fl}^{-1}.\text{w}^{-1}$), pada konsentrasi 6 g/l (P = 99%).

Pengaruh penurunan kadar sakarosa diperoleh kadar solasodina tertinggi ($6,49 \pm 0,4303 \text{ mg/g}$ berat kering) $\pm 1,5$ kali kadar solasodina MSK, pada keadaan tanpa sakarosa (P = 99 %). Produktivitas solasodina tertinggi ($0,14 \text{ mg.fl}^{-1}.\text{w}^{-1}$) ± 2 kali produktivitas solasodina dalam media MSK, pada konsentrasi sakarosa 10 g/l.

Pengamatan kadar relatif klorofil dilakukan dengan metode Harborne, (1973) menggunakan kultur pucuk segar \pm

0,200 - 0,500 g dalam aceton 80 % (25.0 ml) dengan alat Spektrofotometer Shimadzu UV-Vis 160 A. Ternyata tidak ada korelasi antara kadar relatif klorofil dan indeks pertumbuhan terhadap kadar solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*, r hitung = 0,479 dan $0,334 < r$ tabel ($P > 0,01; n=14$) = 0,661 dan r tabel ($P > 0,05; n=14$) = 0,532.

Ada korelasi antara produktivitas solasodina dengan kadar relatif klorofil, r hitung = 0,679 $>$ r tabel ($P < 0,01; n=14$) = 0,661 dan r tabel ($P < 0,05; n=14$) = 0,532.

Tidak ada korelasi antara indeks pertumbuhan dengan produktivitas solasodina, r hitung = 0,499 $<$ r tabel ($P < 0,01; n=14$) = 0,661 dan r tabel ($P < 0,05; n=14$) = 0,532.

Ada korelasi antara kadar relatif klorofil dengan indeks pertumbuhan, r hitung = 0,675 $>$ r tabel ($P < 0,01; n=14$) = 0,661 dan r tabel ($P < 0,05; n=14$) = 0,532.

DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN PENGESAHAN	i
UCAPAN TERIMAKASIH	iii
RINGKASAN	v
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xix
BAB I : PENDAHULUAN	1
BAB II : TINJAUAN PUSTAKA	8
1. Tinjauan Tentang Steroid	8
2. Tinjauan Tentang Solasodina	12
3. Tinjauan Tentang Tanaman Solanum laciniatum	14
4. Kultur Jaringan Tanaman	14
4.1. Kultur Pucuk Solanum laciniatum	15
4.2. Media Kultur Jaringan Tanaman	16
4.3. Pembuatan Metabolit Sekunder Dalam Kultur Jaringan Tanaman	20
5. Kromatografi Lapisan Tipis	23
6. Densitometri (TLC-Scanner)	25
7. Tinjauan Tentang Spektrometri Massa ...	26
8. Tinjauan Tentang Fourier Transform-IR .	26

BAB III : BAHAN, ALAT DAN METODE PENELITIAN	29
1. Bahan Penelitian	29
1.1. Kultur	29
1.2. Bahan Kimia	29
2. Alat-alat Penelitian	30
3. Metode Penelitian	30
3.1. Rancangan Percobaan	30
3.2. Tahapan Percobaan	31
3.3. Prosedur Kerja	32
3.3.1. Pembuatan Larutan Stok	32
3.3.2. Pembuatan Media	32
3.3.3. Penanaman dan Kultivasi Kultur Pucuk Solanum laciniatum Pada Media Percobaan	33
3.3.4. Panen Kultur	33
3.3.5. Perhitungan Indeks Pertumbuhan Kultur Pucuk	34
3.3.6. Penetapan Kadar Relatif Klorofil...	34
3.3.7. Optimalisasi Fase Gerak Metode KLT.	35
3.3.8. Optimalisasi Metode Hidrolisis	35
3.3.9. Ekstraksi Solasodina	38
3.3.10. Analisa Kualitatif Solasodina	39
3.3.10.1. Identifikasi dengan KLT	39
3.3.10.2. Identifikasi dengan TLC-Scanner.	39
3.3.10.3. Identifikasi dengan Metode Spektroskopi.....	39
3.3.10.3.1. Isolasi Solasodina dengan Me-	

	tode KLT Preparatif	39
	3.3.10.3.2. Identifikasi dengan Spektrometri Massa	40
	3.3.10.3.3. Identifikasi dengan FT-IR	40
	3.3.11. Analisa Kuantitatif Solasodina Dengan Metode Densitometri	41
	3.3.11.1. Validasi	41
	3.3.11.2. Penetapan Kadar	43
	4. Perhitungan Produktifitas Solasodina ..	45
	5. Analisa data	45
BAB IV	: HASIL PENELITIAN	47
	1. Hasil Perhitungan Indeks Pertumbuhan ..	47
	2. Penetapan Kadar Klorofil	48
	3. Optimalisasi Fase Gerak Metode KLT	49
	3.1. Hasil Pengamatan Kromatogram KLT	49
	3.2. Hasil Pengamatan Kemurnian Bercak ...	50
	4. Hasil Optimalisasi Metode Hidrolisis ..	52
	5. Analisa kualitatif solasodina	53
	5.1. Identifikasi dengan KLT	53
	5.2. Identifikasi dengan Spektrometri Massa	56
	5.3. Identifikasi dengan Fourier Transform-IR	56
	6. Analisa kuantitatif Solasodina	61
	6.1. Validasi metode	61
	6.1.1. Linieritas	61
	6.1.2. Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ)	61

6.1.3. Penentuan akurasi	64
6.1.4. Penentuan presisi	64
6.2. Penetapan kadar solasodina	68
7. Perhitungan Produktivitas Solasodina ..	68
8. Analisa data	68
BAB V : PEMBAHASAN	78
BAB VI : KESIMPULAN	90
BAB VII : SARAN	92
DAFTAR PUSTAKA	94
LAMPIRAN	100

DAFTAR GAMBAR

	halaman
Gambar 1 : Gonane	8
Gambar 2 : 5 α -Cholestane-3 β -ol	10
Gambar 3 : 5 α -Cholestane	10
Gambar 4 : 5 α -Estrane	11
Gambar 5 : Estrane	11
Gambar 6 : Solasodina	12
Gambar 7 : Struktur molekul solasonine & solamar- gine	13
Gambar 8 : Kromatogram KLT ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> dengan berbagai fase gerak	49
Gambar 9 : Profil spektra panjang gelombang bercak nomor 3 ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> (y) dan standar solasodina (x) pada lempeng KLT dengan fase gerak H, menggunakan alat TLC-Scanner Shimadzu CS-930	51
Gambar 10 : Kromatogram KLT ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> dengan berbagai metode hidrolisa	52
Gambar 11 : Contoh kromatogram pada lempeng KLT dari ekstrak hidrolisat kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i>	53
Gambar 12 : Profil spektra panjang gelombang standar solasodina (x) dan ekstrak hidrolisat kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> (z) pada panjang gelombang 370-700 nm	54

Gambar 13 :	Contoh kromatogram TLC-Scanner ekstrak hidrolisat kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i>	55
Gambar 14 :	Spektra massa dari kerokan bercak nomor 2 fraksi hidrolisat kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> dengan alat MS JEOL JMS DX 303	57
Gambar 15 :	Spektra massa dari standar solasodina dengan alat MS JEOL JMS DX 303	58
Gambar 16 :	Spektra FT-IR standar solasodina dengan alat JASCO FT-IR 5300	59
Gambar 17 :	Spektra FT-IR isolat hasil KLT preparatif bercak nomor 2 ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> dengan alat JASCO FT-IR 5300	60
Gambar 18 :	Kurva linier antara standar solasodina [$\mu\text{g}/\text{spot}$] terhadap luas area	63
Gambar 19 :	Kurva akurasi standar solasodina dalam ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> antara kadar teoritis [x_c , mg/g] terhadap kadar yang didapat [x_f , mg/g]	66
Gambar 20 :	Pengaruh L-arginin terhadap kadar dan produktifitas solasodina, kadar relatif klorofil dan indeks pertumbuhan. * berbeda pada $P = 99 \%$ dan ** berbeda pada $P = 95 \%$ terhadap + (media MSK)	71
Gambar 21 :	Pengaruh casein hydrolisate terhadap kadar dan produktivitas solasodina, kadar relatif klorofil dan indeks pertumbuhan. * berbeda pada $P = 99 \%$ dan ** berbeda pada $P = 95 \%$ terhadap + (me-	

	dia MSK)	72
Gambar 22 :	Pengaruh tepung pisang terhadap kadar produktivitas solasodina, kadar relatif klorofil dan indeks pertumbuhan. * berbeda pada P = 99 % dan ** berbeda pada P = 95 % terhadap + (media MSK)	73
Gambar 23 :	Pengaruh Sakarosa terhadap kadar dan produktivitas solasodina, kadar relatif klorofil dan indeks pertumbuhan. * berbeda pada P = 99 % dan ** berbeda pada P = 95 % terhadap + (media MSK)	74
Gambar 24 :	Diagram sebaran antara kadar solasodina dengan kadar relatif klorofil pada kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> dalam berbagai media perlakuan	75
Gambar 25 :	Diagram sebaran antara kadar solasodina dengan indeks pertumbuhan kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> dalam berbagai media perlakuan	75
Gambar 26 :	Kurva korelasi antara produktivitas solasodina dengan kadar relatif klorofil pada kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> dalam berbagai media perlakuan	76
Gambar 27 :	Diagram sebaran antara produktivitas solasodina dengan indeks pertumbuhan kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> dalam berbagai media perlakuan	76
Gambar 28 :	Kurva korelasi antara indeks pertumbuhan dengan kadar relatif klorofil pada kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> dalam berbagai media perlakuan	77

DAFTAR LAMPIRAN

	halaman
Lampiran 1 : Bagan Jalur Biosintesis Steroid Pada Tanaman	100
Lampiran 2 : Daftar Larutan Stok	101
Lampiran 3 : Komposisi Media Murashige & Skoog Yang Dimodifikasi Untuk Pertumbuhan Stok Kultur Pada Laboratorium Bioteknologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga	102
Lampiran 4 : Skema Pembuatan Media Percobaan	103
Lampiran 5 : Skema ekstraksi	104

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 1 : Klasifikasi steroid berdasarkan strukturnya	9
Tabel 2 : Hasil perhitungan indeks pertumbuhan (IP) pada kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> yang berumur 4 minggu dalam bermacam-macam media perlakuan	47
Tabel 3 : Hasil penetapan kadar relatif klorofil pada kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> yang berumur 4 minggu dalam berbagai macam media perlakuan	48
Tabel 4 : Hasil uji linieritas larutan standar solasodina pada lempeng KLT dengan metode TLC-Scanner	62
Tabel 5 : Hasil penetapan akurasi pada ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> yang berumur 4 minggu dalam media MSK	65
Tabel 6 : Hasil penetapan presisi ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> yang berumur 4 minggu dalam media MSK	67
Tabel 7 : Hasil penetapan kadar solasodina kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> yang berumur 4 minggu dalam bermacam-macam media perlakuan	69
Tabel 8 : Hasil perhitungan produktivitas solasodina pada kultur pucuk <i>Solanum laciniatum</i> dalam bermacam-macam media perlakuan	70

DAFTAR SINGKATAN

BA	= Benzil adenin
FT-IR	= Fourier Transform-Infra Red
HSD	= Honestly Significant Defferent
IP	= Indeks Pertumbuhan
KLT	= Kromatografi Lapisan Tipis
KJT	= Kultur Jaringan Tanaman
LOD	= Limit of Detection
LOQ	= Limit of Quantitation
Media A	= media MSK dengan perlakuan L-arginin
Media BP	= media MSK dengan perlakuan tepung pisang
Media CS	= media MSK dengan perlakuan kasein hidrolisat
Media MS	= media Murashige & Skoog
Media MSK	= media MS yang dimodifikasi dengan hormon tumbuh BA 4 mg/l
Media S	= media MSK dengan perlakuan sakarosa
MS	= Mass Spectrophotometri
TLC-Scanner	= Thin Layer Chromato - Scanner
R _f	= Retardation factor
RSD	= Relative Standart Deviation

BAB I**PENDAHULUAN**

Sejak diketahui steroid merupakan salah satu bahan obat yang sangat penting maka usaha-usaha untuk mengetahui faktor-faktor yang berpengaruh pada produksinya mulai diperhatikan. Seperti diketahui pada tahun 1982 pangsa pasar steroid nomor dua setelah antibiotik dengan total pasarnya sebesar 1800 juta USD [Keislich,1986]. Hal ini dapat dimengerti karena penggunaan golongan steroid sangat luas meliputi obat-obat kontrasepsi, vitamin, antiinflamasi, antiandrogen, glikosida jantung dan lain-lain [Keislich,1986,Manitto,1981]. Bahan baku yang digunakan untuk sintesa obat-obat golongan steroid tersebut adalah fitosteroid merupakan metabolit sekunder dari tanaman yaitu; solasodina, diosgenin, hekogenin, stigmasterol dan sterol-sterol lainnya [Keislich,1986, Tsoulpha and Doran,1991].

Banyak kendala yang harus dihadapi, dalam rangka menyiapkan bahan baku fitosteroid dari tanaman asal, misalnya letak geografis, iklim, memerlukan lahan yang luas dan jangka waktu budidaya yang lama. Maka dalam perkembangan dewasa ini banyak dilakukan penerapan bioteknologi sel tanaman misalnya kultur jaringan tanaman. Metoda ini

1



memiliki banyak keuntungan karena merupakan sistem terisolasi, sehingga kondisi lingkungan dapat dikontrol (suhu, penyiangan, komposisi media), tidak memerlukan lahan yang luas, tidak tergantung pada iklim dan waktu budidaya dapat dipersingkat [Mantell et al,1985, Harborne,1973].

Hampir semua golongan senyawa kimia alami/metabolit sekunder telah berhasil diproduksi dengan sistem kultur jaringan tanaman. Adanya ketidak mampuan suatu sistem kultur jaringan tanaman untuk memproduksi metabolit spesifiknya diduga karena tidak terekspresikannya enzim tertentu, atau enzim tersebut hanya diekspresikan dalam sel tanaman yang terdeferensiasi [Whitaker et al,1986].

Studi tentang fitosteroid dalam kultur jaringan tanaman telah banyak dilakukan yaitu pada *Solanum Spp.*, *Dioscorea Spp.*, *Agave Spp.* dan *Cotus Spp.*. Solasodina yang merupakan salah satu bahan baku obat golongan steroid dihasilkan oleh *Solanum Sp.* antara lain oleh tanaman *Solanum laciniatum Ait* [Chadler and Dodds,1983, Conner, 1987], *Solanum nigrum* [Bhatt et al,1983], *Solanum dulcamara L.* [Emke and Eliert,1986], *Solanum eleagnifolium* [Nigra et al,1989].

Pada umumnya, studi fitosteroid (solasodina) dalam tanaman lebih banyak dilakukan pada kultur kalus dan kultur suspensi, antara lain kultur kalus *Solanum lacini-*

atum [Chandler and Dodds,1983], kultur kalus *Solanum nigrum* [Bhatt et al,1983], kultur kalus *Solanum eleagnifolium* [Nigra et al,1989] dan pada kultur kalus *Solanum dulcamara L* [Emke and Eilert,1986], dimana kadar steroid alkaloidnya (solasodina) masih jauh dibawah kadar tanaman asalnya.

Seperti yang dilaporkan oleh Chandler and Dodds, (1983) pada kultur kalus dan kultur suspensi *Solanum laciniatum Ait* diperoleh kadar solasodina antara 0,5 - 1.0 mg/g berat kering. Pada daun tanaman asal kadar solasodina $7,64 \pm 0,65$ mg/g berat kering, pada batang kadar solasodina $0,93 \pm 0,12$ μ g/g berat kering dan pada akar kadar solasodina $3,22 \pm 0,09$ μ g/g berat kering [Conner,1987].

Dengan menginduksi terjadinya diferensiasi sel (kultur pucuk *Solanum laciniatum Ait*) produksi solasodina dapat ditingkatkan [Conner,1987].

Emke and Eilert (1986), melaporkan bahwa dari proses biosintesa solasodina selain diferensiasi sel ternyata ada hubungan antara kadar solasodina dengan kadar klorofil, pada kalus *Solanum dulcamara L* yaitu semakin banyak kadar klorofil semakin meningkat kadar solasodina yang didapatkan.

Conner,(1987), juga telah membuktikan proses pem-

bentukan solasodina dipengaruhi oleh aktifitas fotosintesis kloroplast (fotoautotropik dan fotoheterotropik), dengan menggunakan kultur kalus dan kultur pucuk *Solanum laciniatum* Ait, kultur pucuk yang dibiakkan pada kondisi heterotropik, kadar solasodina yang didapatkan hampir sama dengan dalam kultur kalus. Sedangkan pada kondisi fotoheterotropik dan fotoautotropik diperoleh kadar solasodina yang lebih tinggi, mendekati kadar solasodina pada tanaman asal.

Untuk meningkatkan kadar klorofil pada kultur kalus *Solanum wrightii* Ratna,(1990), menggunakan tepung pisang yang dikombinasi dengan penurunan kadar sakarosa pada media MS (tepung pisang : sakarosa, % b/v, 0 : 3 ; 7,5 : 3 ; 7,5 : 1,5 ; 7,5 : 0). Diperoleh peningkatan kadar klorofil pada semua kombinasi dengan tepung pisang, kadar klorofil tertinggi didapatkan pada kombinasi tepung pisang : sakarosa 7,5 : 1,5. Sedangkan Anik,(1989) berhasil menginduksi kadar klorofil pada kalus *Solanum indicum* L dengan menurunkan kadar sakarosa dalam media MS 1,5 % b/v dan 0 % b/v, kadar klorofil tertinggi diperoleh pada konsentrasi sakarosa 1,5 % b/v.

Misawa,1985 dan Nigra et al,1989 juga melaporkan produksi metabolit sekunder tergantung pada pertumbuhan kultur (indeks pertumbuhan). Jenis dan kadar komponen pe-

nyusun media yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan pembentukan metabolit sekunder antara lain : sukrosa, fosfat, sumber nitrogen dan hormon pertumbuhan [Mantell et al, 1985, Misawa, 1985, Dixon, 1985, Chandler and Dodds, 1983].

Kaneko et al, (1976), dalam upaya mencari sumber nitrogen pada biosintesis solanidina pada kultur *Veratrum grandiflorum* didapatkan asam amino (L-arginin) 20 kali lebih efisien dibandingkan sumber nitrogen anorganik (NH_4Cl). Disamping itu nitrogen diketahui merupakan unsur yang berperan pada proses pertumbuhan dan perkembangan sel, khususnya pada proses sintesa protein dan enzim-enzim metabolisme [Rokem et al, 1985].

Kasein hidrolisat suatu fosfo-protein diketahui dapat mempengaruhi kadar sterol dan fitosteroid lain pada kultur kalus *Agave amaniensis*. [Utami et al, 1991]. Heble et al, (1976), melaporkan kasein hidrolisat (200 mg/l) dapat meningkatkan pertumbuhan kultur kalus *Holarrhena antidysenterica*. Banyaknya kandungan unsur N pada asam-asam amino dari Kasein hidrolisat, kemungkinan dapat digunakan sebagai sumber N pada pembentukan alkaloid steroid, atau enzim-enzim metabolisme tertentu.

Dari uraian diatas diketahui kadar solasodina dalam kultur pucuk *Solanum laciniatum* lebih tinggi dari pada dalam kultur sel yang tak terdeferensiasi (kultur kalus,

kultur suspensi), serta belum banyak penelitian yang dilakukan pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*. Ada korelasi antara kadar klorofil dan pertumbuhan kultur terhadap kadar solasodina. Disamping itu L-arginin, kasein hidrolisat, tepung pisang dan sakarosa berpengaruh pada pertumbuhan atau pembentukan metabolit sekunder dalam kultur jaringan tanaman. Maka pada penelitian ini dicoba mempengaruhi pembentukan solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* dengan cara menambahkan L-arginin, kasein hidrolisat, tepung pisang dan penurunan kadar sakarosa dalam media, serta mengetahui korelasi antara kadar relatif klorofil dan indeks pertumbuhan terhadap produktivitas solasodina.

Dengan semakin banyak mengetahui faktor-faktor yang berpengaruh pada pembentukan solasodina, dapat dijadikan informasi yang sangat berharga dalam rangka untuk lebih mengerti bagaimana proses pembentukan solasodina sebagai salah satu bahan baku obat golongan steroid yang sangat dibutuhkan.

Tujuan Penelitian

Penelitian ini mempunyai tujuan, dapat diketahui pengaruh L-arginin, kasein hidrolisat, tepung pisang dan sakarosa pada kandungan dan produktivitas solasodina,

serta korelasi antara kadar relatif klorofil dan indeks pertumbuhan terhadap produktivitas solasodina dalam kultur pucuk *Solanum laciniatum*.

Manfaat Penelitian

Dengan selesainya penelitian ini diharapkan diketahui pengaruh dari L-arginin, kasein hidrolisat, tepung pisang dan sakarosa terhadap kandungan solasodina, serta korelasi antara kadar relatif klorofil dan indeks pertumbuhan terhadap produktivitas solasodina dalam kultur pucuk *Solanum laciniatum*. Sehingga dapat memberikan informasi yang lebih lengkap dalam rangka untuk lebih mengerti faktor-faktor eksternal yang berpengaruh pada proses pembentukan solasodina dalam sel tanaman.

Hipotesis Penelitian

Dari apa yang telah diuraikan maka dapat diajukan hipotesis sebagai berikut :

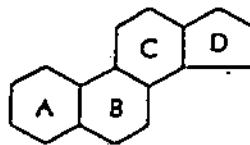
- Ada pengaruh L-arginin, kasein hidrolisat, tepung pisang dan sakarosa terhadap kandungan solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*.
- Ada korelasi antara kadar relatif klorofil dan indeks pertumbuhan terhadap produktivitas solasodina.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

1. Tinjauan Tentang Steroid

Steroid merupakan turunan dari "perhydrocyclopentenophenantrene" suatu kerangka inti yang terdiri dari 17 atom C, terdapat pada binatang dan tumbuh-tumbuhan. Isolasi dari lemak binatang yang pertama kali dilakukan oleh Chevreul tahun 1812 - 1903. Studi tentang struktur molekulnya dimulai tahun 1932 oleh Windaus dan Wieland, sedangkan konfigurasinya secara lengkap baru diketahui setelah diketemukannya metoda analisa X-ray tahun 1952 [Nakanishi et al, 1974]. Inti steroid jenuh yang disebut "gonane" dapat dilihat pada gambar 1 [Heftmann, 1973].



Gambar 1 : Gonane

Substitusi pada R_1 , R_2 dan R_3 menghasilkan bermacam-macam golongan steroid. Secara garis besar steroid dibagi

menjadi dua golongan yaitu steroid sederhana terdiri dari maksimal 21 atom C dan steroid yang mempunyai atom C lebih dari 21 misalnya; sterol, asam-asam empedu, vitamin D glikosida jantung, sapogenin dan alkaloid steroid. Berdasarkan efek farmakologi yang ditimbulkan steroid digolongkan menjadi seks hormon (androgen, estrogen, gestogen), korticosteroid, asam empedu, vitamin [Manitto, 1981]. Klasifikasi steroid berdasarkan strukturnya dapat dilihat pada tabel 1 [Groenendijk,1970].

Mol. Utasa	Struktur	Gol.	Contoh
Estron		Steroid C(18)	Estron
Androstan		Steroid C(19)	Androsteron
Pregnan		Steroid C(21)	5 β -Pregnan, 3 α 20 β -diol
Kholestan		Sterol C(27)	Kholesterol
Ergostan		Sterol C(28)	Ergosterol
Stigmastan		Sterol C(29)	Stigmasterol

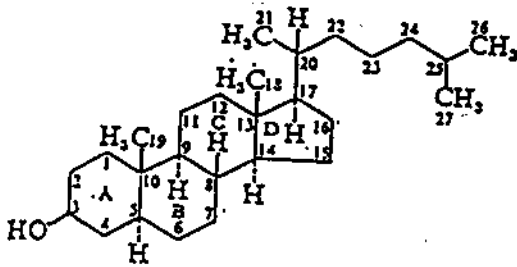
Tabel 1 : Klasifikasi steroid berdasarkan strukturnya [Groenendijk,1970]

Steroid alam pada hewan berasal dari triterpen la-

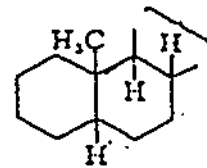
nosterol sedangkan pada tumbuhan berasal dari sikloartenol [Manitto,1981].

Tatanama steroid menurut "IUPAC - IUB 1971" ada 14 aturan antara lain [Nakanishi et al,1974] :

- Pemberian nomor pada atom C dan huruf pada cincin skeleton seperti pada gambar 2.



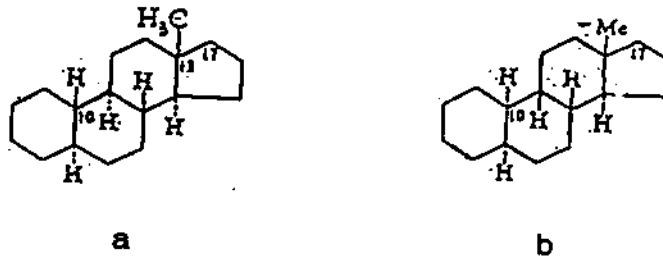
5α-Cholestane-3β-ol
Gambar 2



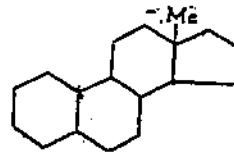
5ε-Cholestane
gambar 3

- Konfigurasi atom atau gugus yang menyerang cincin ditandai sebagai berikut :
 - α : dibawah bidang datar ditandai dengan garis titik - titik (- - -)
 - β : diatas bidang datar ditandai dengan garis tebal (—)
 - ε : bila konfigurasi tidak diketahui ditandai dengan garis bergelombang (~~~~~) seperti pada gambar 3
- Semua atom hidrogen dan gugus metil yang menye-

rang cincin skeleton ditandai dengan H atau CH₃ (Me-) seperti pada gambar 4a dan 4b. Atau menghilangkan H dan mengganti CH₃ dengan garis seperti pada gambar 5.



Gambar 4 : 5 α -Estrane



Gambar 5 : Estrane

- dan seterusnya

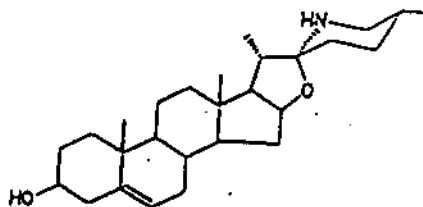
Penggunaan obat-obat golongan steroid ini sangat luas meliputi obat kontrasepsi, antiinflamasi (kortikosteroid), hormon antiandrogen, steroid jantung, vitamin dan lain-lain [Keislich,1986, Manitto,1981]. Sebagai bahan bakunya sebagian besar berasal dari tanaman yaitu fitost-

eroid (solasodina, diosgenin, hekogenin, stigmasterol).

2. Tinjauan Tentang Solasodina

Solasodina merupakan bahan baku alternatif yang sangat penting untuk produksi obat-obat golongan steroid setelah diosgenin [Macek, 1989].

Solasodina termasuk golongan steroid alkaloid. Dalam tanaman terikat dalam bentuk glikosidanya [Wagner et al, 1984, Kiel, 1993]. Solasodina mempunyai 27 atom C, merupakan N analog dari sapogenin yang banyak dihasilkan oleh tanaman *Solanum Sp.* Strukturnya mirip dengan diosgenin dimana satu atom O pada diosgenin diganti dengan atom N sebagai berikut :



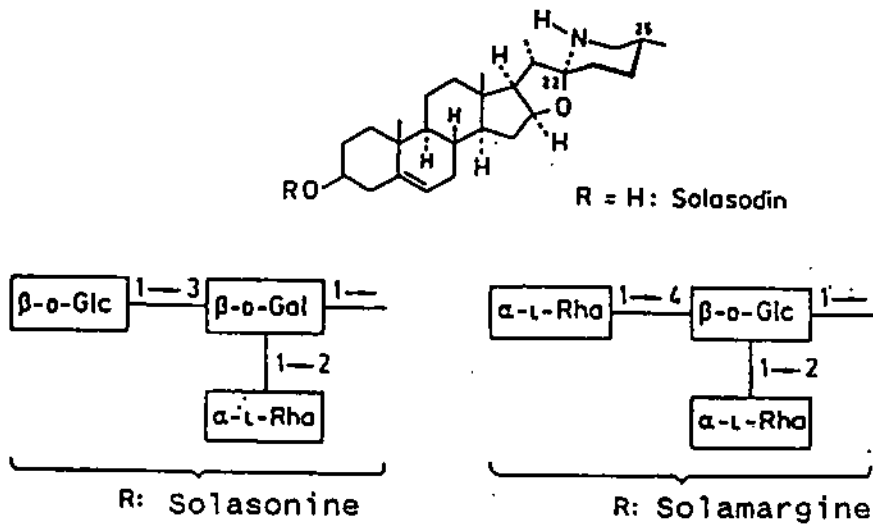
Gambar 6 : Solasodina

Rumus molekul solasodina adalah $C_{27}H_{43}O_2N$ dengan berat molekul 413,62. Larutan bebas dalam benzena, piridina, kloroform, larut dalam alkohol dan aseton, dan sedikit larut dalam air serta praktis tidak larut dalam eter

[Merck index,1983].

Komposisi glikosida yang mengandung solasodina dalam tanaman *Solanum sp* [Wagner et al,1984, Kiel,1993], yaitu:

1. Solasonine : solasodina + galaktosa-glukosa-rhamnosa
2. Solamargine: solasodina + glukosa-rhamnosa-rhamnosa



Gambar 7 : Struktur molekul solasonine & Solamargine

Sebuah penelitian melaporkan pemasukan nitrogen pada biosintesa solasodin terjadi setelah hidroksilasi pada C₂₆ dan sebelum oksidasi lebih lanjut dari rantai samping kolesterol. Setelah diaminasi pada C₂₆ kemungkinan terjadi fungsionalisasi pada C₂₂, sebelum hidroksilasi pada 16 β [Tschesche et al,1980].

Jalur biosintesis steroid pada tanaman dapat dilihat pada lampiran 1 [Indrayanto,1983].

3. Tinjauan Tentang Tanaman *Solanum laciniatum*

Solanum laciniatum adalah salah satu jenis dari marga *solanum* yang banyak tumbuh didaerah tropis. Di Indonesia jumlah *solanum* mencapai 71 jenis, sedangkan di pulau Jawa diperkirakan terdapat 27 jenis [Indrayanto, 1979].

Sistematika dari tanaman *Solanum laciniatum* [Lawrence, 1979]:

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

4. Kultur Jaringan Tanaman

Kultur jaringan tanaman didasarkan pada sifat totipotensi dari sel tanaman yaitu bahwa sel tanaman membawa seluruh informasi genetiknya, sehingga apabila ditanam pada media yang sesuai mampu tumbuh menjadi tanaman baru. Sel jaringan tanaman apabila ditanam pada media tertentu akan tumbuh menjadi massa sel yang meristematis dan belum

terdeferensiasi yang disebut kultur kalus. Dengan mengubah komposisi hormon pada mediana dapat diperoleh kultur yang terdiferensiasi (kultur akar, kultur daun, kultur batang). Bila kultur kalus tersebut dipindahkan kedalam media cair dan diagitasi dengan kecepatan tertentu akan diperoleh kultur suspensi.

Dibandingkan dengan metoda konvensional sistem kultur jaringan tanaman memiliki beberapa keuntungan yaitu :

- Tidak terpengaruh oleh iklim dan letak geografis
- Kondisi dapat dikontrol sehingga dapat dihasilkan produk yang dikehendaki
- Bebas hama dan penyakit tanaman
- Tidak diperlukan lahan yang luas
- waktu budidaya dapat dipersingkat

Dengan adanya keuntungan-keuntungan tersebut maka sistem kultur jaringan tanaman dikembangkan dengan tujuan produksi atau biotransformasi senyawa-senyawa tertentu yang berguna pada bidang farmasi atau medik, seleksi galur tanaman unggul maupun perbanyakan tanaman secara cepat dan seragam [Indrayanto, 1986].

4.1. Kultur pucuk *Solanum laciniatum*

Berdasarkan hasil penelitian Conner, yaitu produksi solasodina dalam kultur pucuk *Solanum laciniatum* ternyata ..

lebih tinggi dari pada kultur kalusnya, maka dalam penelitian ini digunakan kultur pucuk *Solanum laciniatum* ditumbuhkan dalam media padat MS yang telah dimodifikasi dengan hormon tumbuh BA 4 mg/l diperoleh dari Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri, Bogor. Selanjutnya kultur tersebut yang diperbanyak, digunakan untuk kultur stok, serta media tersebut digunakan untuk kultivasi kultur stok (diberi kode media MSK).

4.2. Media Kultur Jaringan Tanaman

Komponen nutrisi yang terdapat pada media kultur jaringan tanama pada dasarnya terdiri dari zat-zat yang secara alami diperlukan oleh tanaman untuk kelangsungan hidupnya [Tisserat,1985, Pierik,1987]. Namun demikian kebutuhan nutrisi untuk pertumbuhan yang optimum dari jaringan tanaman *in vitro* adalah bervariasi, tergantung pada spesiesnya maupun pada jaringan dari bagian-bagian tanaman (akar, batang, daun). Disamping itu komposisi bahan-bahan kandungan yang terdapat dalam media kultur jaringan tanaman sangat berpengaruh pada produksi metabolit sekunder baik secara kuantitatif maupun secara kualitatif. Oleh karena itu media kultur jaringan tanaman merupakan salah satu faktor yang sangat penting terutama karena pengaruhnya pada proses biosintesis yang terjadi

didalam sel tanaman tersebut.

Komposisi media normal yang sering digunakan terdiri dari [Indrayanto,1986]:

- Sumber karbon : sakarosa, glukosa, fruktosa, laktosa
- Makroelemen anorganik (diperlukan 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 organik (diperlukan dalam jumlah lebih kecil dari 0,5 mMol/l) : bermacam-macam logam berat misalnya Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , dan lain-lain.
- Vitamin : tiamina, piridoksina, mio-inositol, nikotinamid.
- Fitohormon : sitokinin, auksin dan giberelin

Untuk membuat media padat biasanya ditambahkan agar $\pm 0,7\%$ b/v.

Pada umumnya kultur jaringan tanaman memerlukan sumber karbon dan energi untuk kelangsungan hidupnya. Sumber karbon ini dapat berupa karbohidrat, disakarida (sakarosa) atau monosakarida (fruktosa, glukosa, maltosa). Nigra,(1990) melaporkan sakarosa menyebabkan pertumbuhan yang lebih baik dalam kultur suspensi *Solanum eleagnifolium* dari pada fruktose, glukose dan maltose. Disamping itu sakarosa diketahui berpengaruh terhadap jumlah klorofil pada kultur jaringan tanaman. Pada kadar

sakarosa yang tinggi dapat menghambat pembentukan klorofil, sedangkan pada penurunan kadar sakarosa dalam media dapat meningkatkan produksi klorofil dalam kultur kalus *Solanum indicum* [Anik,1989]. Emke and Eliert,(1986), melaporkan klorofil berpengaruh terhadap produksi steroid alkaloid.

Untuk meningkatkan kadar klorofil dalam kultur jaringan tanaman Ratna,(1990), menggunakan tepung pisang (7,5 % b/v) yang diperoleh dari buah pisang ambon mentah yang dikeringkan kemudian diserbuk dan penurunan kadar sakarosa (1,5 dan 0 % b/v) dalam media kultur kalus *Solanum wrightii*. Diketahui kadar tepung pisang 7,5 % b/v didapatkan klorofil sebesar $0,3703 \pm 0,0233$ mg/g sedangkan pada media tanpa tepung pisang didapatkan klorofil sebanyak $0,2953 \pm 0,0115$ mg/g berat kering kultur. Kadar klorofil tertinggi ($0,4959 \pm 0,0437$ mg/g berat kering) diperoleh pada media dengan penambahan tepung pisang 7,5 % b/v yang dikombinasi dengan penurunan kadar sakarosa 1,5 % b/v.

Sumber nitrogen yang dapat digunakan untuk biosintesis solasodina dapat berasal dari senyawa organik (asam amino) maupun senyawa anorganik (NH_4Cl). Hasil penelitian Kaneko et.al pada kultur *Veratrum grandiflorum* ternyata sumber N dari asam amino (L-arginine) lebih disukai untuk

pembentukan solanidina dari pada sumber N anargonik (NH_4Cl). Sedangkan asam amino lain (Serin, Thyrosin, Valin, Lysin) yang ditambahkan pada mediana tidak mengalami perubahan konsentrasi selama proses biosintesa solanidina berlangsung. Telah dibuktikan pula unsur N pada L-arginine masuk pada struktur molekul dari solanidina [Kaneko et al, 1976].

Dari penelitian terdahulu casein hydrolisate dapat meningkatkan pertumbuhan dari kalus *Holarrhena antidy-senterica* yang memproduksi fitosteroid [Heble et al, 1976]. Kemudian peneliti lain mendapatkan penambahan casein hydrolisate justru menurunkan kadar sterol-sterol bebas dalam kultur kalus *Agave amaniensis* [Utami et al, 1991]. Dugaan sementara unsur N yang banyak terdapat pada casein hydrolisate dapat digunakan sebagai sumber nitrogen pada biosintesis steroid alkaloid.

Disamping itu biosintesis steroid alkaloid juga dipengaruhi diferensiasi sel [Chandler and Dodds, 1983, Misawa, 1985, Nigra, et al, 1989].

Maka pada penelitian ini diharapkan dapat diketahui ada atau tidak pengaruh L-arginin, kasein hidrolisat, tepung pisang dan sakarosa terhadap kandungan solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*.

4.3. Pembuatan Metabolit Sekunder Dalam Kultur jaringan Tanaman

Umumnya bahan obat yang berasal dari tanaman seperti, antibiotika, minyak astiri, alkaloida, steroid merupakan metabolit sekunder dari tanaman yang bersifat "fitoaleksin". Dimana pada tanaman asalnya selalu dibiosintesis dan disimpan pada organ-organ tertentu seperti akar, daun, buah dan lain-lain. Namun demikian telah banyak publikasi yang melaporkan tentang keberhasilan sistem kultur jaringan tanaman yang berupa kultur sel yang belum terdiferensiasi (kultur kalus, kultur suspensi). Tetapi beberapa metabolit sekunder yang penting pada bidang farmasi misalnya digoksin., kodein, kinina, reserpina, solasodina, diosgenin [Ingrayanto,1986] hanya dapat diproduksi dalam konsentrasi sangat rendah bahkan tidak terdeteksi pada sistem kultur jaringan tertentu. Oleh karena itu mendorong para peneliti untuk berusaha mengoptimisasikan kandungan metabolit sekunder dalam suatu sistem kultur jaringan yang terdeferensiasi.

Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap pertumbuhan dan produktivitas metabolit sekunder dalam suatu sistem kultur jaringan tanaman antara lain :

a. Pemilihan jenis kultur

Ketidak mampuan suatu sistem kultur jaringan tanaman tertentu (kultur kalus, kultur suspensi) dalam memproduksi metabolit yang diinginkan dan adanya pengaruh diferensiasi sel pada metabolisme metabolit sekunder maka dalam beberapa dasawarsa terakhir ini dikembangkan sistem kultur organ antara lain kultur pucuk, misalnya pada produksi solasodina dari kultur pucuk *Solanum laciniatum* [Conner, 1987] serta akhir-akhir ini juga mulai dikembangkan kultur akar berambut [Indrayanto, 1986].

b. Komposisi media

Komposisi dan konsentrasi media sangat berpengaruh baik pada pertumbuhan maupun produktivitas suatu sistem kultur jaringan tanaman. Seperti yang dilaporkan Evi (1992) makroelemen Ca^{2+} dapat mempengaruhi produksi fitosteroid pada kultur *Agave amaniensis*. Kemudian adanya perbedaan jenis dan kadar sumber karbon, asam amino dan sumber nitrogen berpengaruh pada produksi solasodina pada kultur kalus *Solanum laciniatum* Ait [Chandler and Dodds, 1983]. Utami et al, (1991) melaporkan adanya pengaruh kadar fosfat dan komposisi hormon dalam media yang digunakan terhadap kandungan fitosteroid dalam kultur

kalus *Agave amaniensis*.

c. Pengaruh pH media

Sel-sel tanaman yang ditumbuhkan secara *in vitro* mempunyai toleransi pH yang relatif sempit, dengan titik optimum antara pH 5,0 dan 6,0. Bila pertumbuhan dimulai pH dalam lingkungan kultur umumnya akan bergeser naik. Senyawa fosfat dalam media kultur mempunyai peran yang penting dalam menstabilkan pH [Witherell, 1982].

d. Suhu

Sebagian besar dari laporan penelitian yang telah dipublikasikan memakai suhu konstan yang baik antara 20 - 28°C dan paling sering digunakan antara 25 - 27°C yang dapat dicapai menggunakan lampu fluoresensi secara efisien. Suatu laboratorium yang menggunakan banyak penerangan dan dalam keadaan tertutup baik memerlukan pendinginan yang dapat diperoleh dengan menggunakan AC [Witherell, 1982].

e. Penyinaran

Beberapa peneliti melaporkan cahaya merupakan salah satu faktor yang sangat berpengaruh terhadap produksi steroid alkaloid. Chandler and Dodds, (1983) menyatakan

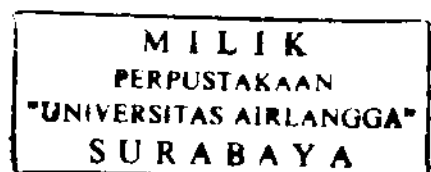
cahaya menghambat produksi solasodina. Nigra et al, (1989) melaporkan konsentrasi solasodina pada kultur kalus *Solanum eleagnifolium* dalam gelap lebih rendah dari pada dalam kondisi 16 jam penyinaran. Conner, (1987), mendapatkan pada kultur kalus *Solanum laciniatum* yang disimpan dalam gelap menghasilkan kadar solasodina yang lebih rendah dibandingkan dengan kultur kalus yang disimpan dengan penyinaran.

Sebagai sumber sinar tiruan yang banyak disukai dalam pertumbuhan tanaman adalah lampu-lampu flouresensi karena panas yang ditimbulkannya relatif sangat rendah [Witherell, 1982].

5. kromatografi lapisan tipis

Kromatografi adalah teknik pemisahan zat yang didasarkan pada perbedaan kecepatan migrasi dari masing-masing komponen pada fase diam dibawah pengaruh suatu fase gerak.

Ada bermacam-macam metoda kromatografi, antara lain: kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, kromatografi gas, kromatografi cair kinerja tinggi, kromatografi kolom, yang dapat digunakan untuk analisa kualitatif maupun kuantitatif, dan masing-masing memiliki kelebihan dan kekurangan sendiri-sendiri [Stahl, 1985].



Penggunaan kromatografi lapis tipis untuk menunjang analisa kandungan dalam kultur jaringan tanaman disebabkan beberapa keuntungan yang dimiliki yaitu [Dyatmiko, Zaini, 1976] :

- konsentrasi zat yang diperlukan untuk analisa relatif kecil
- waktu yang dibutuhkan singkat
- lebih banyak macam adsorben maupun eluen yang dapat dipakai
- peka dan pemisahan sempurna
- penyemprotan dengan asam-asam kuat tak menjadi masalah
- kepekaan noda kromatogram 10 - 100 kali dibandingkan dengan kromatografi kertas setelah penyemprotan
- dapat dipakai untuk metode isolasi kandungan dalam jumlah cukup besar

Mekanisme pemisahan berdasarkan prinsip adsorpsi, partisi, pertukaran ion dan sebagainya. Jenis yang paling sering digunakan adalah prinsip adsorpsi dan partisi. Pada proses adsorpsi molekul-molekul zat yang diadsorpsi paling lemah oleh fase diam akan terbawa keatas oleh fase gerak, sehingga memberikan bercak paling atas, dan sebaliknya zat yang diadsorpsi paling kuat oleh fase diam

akan memberikan bercak paling bawah.

Untuk identifikasi suatu senyawa dapat dilakukan dengan cara membandingkannya dengan senyawa standar yang dieluasi pada lempeng yang sama bila perlu menggunakan pereaksi penampak noda yang sesuai atau dengan menggunakan lampu ultraviolet, kemudian harga R_f (Retardation factor) masing-masing diukur dan dibandingkan, dimana ;

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

Untuk keperluan penetapan kadar dari komponen yang terpisah, maka bercak yang terbentuk tadi diamati dengan alat Densitometri (TLC-Scanner).

6. Densitometri (TLC-Scanner)

Densitometri adalah metode optik yang dapat digunakan untuk menunjang analisa kualitatif dan untuk analisa kuantitatif suatu senyawa atau campuran senyawa setelah dipisahkan dengan metoda KLT [Blunden et al, 1987].

Untuk analisa kuantitatif metoda Densitometri dapat diandalkan karena sensitifitasnya tinggi serta pelaksanaannya relatif membutuhkan waktu yang singkat. Adanya hamburan cahaya (scattering) oleh lempeng lapisan tipis

maka hubungan antara luas area dengan konsentrasi tidak linier. Untuk itu terapkan hukum Kubelka Munk menggunakan kurva linier yang diprogram dalam komputer sebagai berikut :

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

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

dimana ;

- i = intensitas cahaya dengan arah tegak lurus menuju permukaan lapisan tipis
- j = intensitas cahaya dengan arah tegak lurus meninggalkan lempeng lapisan tipis
- S = faktor scattering untuk tiap satu satuan tebal lapisan tipis
- K = faktor penyerapan untuk tiap satu satuan tebal lapisan tipis
- x = jarak antara permukaan sampai ketempat kejadian dalam lapisan tipis

Faktor-faktor yang mempengaruhi reproduksibilitas hasil antara lain :

- homogenitas lempeng
- penyemprotan dan pemanasan
- arah scanning bercak

7. Tinjauan Tentang Spektrometri Massa

Dalam kamar pengion spektrometri massa, molekul dibombardir dengan elektron berenergi 70 eV menghasilkan partikel bermuatan positif. Molekul yang kehilangan satu elektron membentuk ion molekul atau ion induk, yang mengalami pemecahan lebih lanjut menghasilkan ion pecahan dan molekul netral yang lebih kecil. Ion-ion tersebut dipisahkan berdasarkan harga perbandingan massa/muatan (m/e). macam-macam cara ionisasi yang dikenal antara lain : "Electrone impact" (EI), "Chemical ionization" (CI), "Field ionization" (FI) [Willard et al, 1981].

Setiap molekul senyawa akan mempunyai spektra massa yang spesifik.

8. Tinjauan Tentang Fourier Transform - Infra Red

Metode Fourier Transform - Infra Red (FT-IR) merupakan peningkatan dari metode Infra Red (IR) biasa, pada FT-IR frekuensi domain diubah menjadi time domain.

Radiasi infra merah terletak antara spektrum elektromagnetik cahaya tampak dan spektrum radio yakni antara $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Suatu molekul yang mengabsorpsi radiasi infra merah maka amplitudo getaran atomnya akan meningkat oleh energi dari radiasi tersebut, dan molekul mengalami perubahan tingkat energi vibrasi. Panjang gelombang radi-

asi yang diserap oleh suatu jenis ikatan tergantung pada macam getaran ikatan tersebut. Sehingga setiap jenis ikatan akan menyerap radiasi infra merah pada panjang gelombang yang berlainan. Hal ini menyebabkan setiap molekul selain dari senyawa isomer-optik tidak satupun mempunyai spektrum infra merah yang identik [Noerdin, 1986].

Spektrum infra merah adalah grafik bilangan gelombang terhadap % transmisi. Bila tidak terjadi penyerapan radiasi infra merah oleh molekul maka transmisi 100 %.

Daerah penyerapan antara $1500 - 700 \text{ cm}^{-1}$ merupakan daerah sidik jari. Perubahan sedikit dari molekul dan adanya substitusi pada gugus fungsi menyebabkan perubahan menyolok pada daerah ini. Spektrum didaerah ini sangat rumit, namun khas untuk setiap senyawa sehingga berguna untuk identifikasi [Noerdin, 1986].

Karena pada metode FT-IR memanfaatkan laser untuk membawa sinar yang datang, maka semua vibrasi molekul dapat terdeteksi, sehingga identifikasi bisa lebih akurat.

BAB III

BAHAN, ALAT DAN METODE PENELITIAN

1. Bahan Penelitian

1.1. Kultur

Kultur yang digunakan adalah kultur pucuk *Solanum laciniatum*, diperoleh dari Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri, Bogor. Ditanam pada media padat Murashige & Skoog (MS), yang dimodifikasi dengan hormon tumbuh bensil adenin 4 mg/l (diberi kode media MSK).

1.2. Bahan Kimia

- Kecuali dinyatakan lain, semua bahan kimia yang digunakan adalah produk E. Merck Darmstadt dengan derajat kemurnian proanalisa.
- Gibco Agar Bacteriological L 87 di produksi di Inggris oleh Gibco LTD Scotland.
- L-arginin (SIGMA)
- Kloroform
- Kasein hidrolisat (SIGMA)
- Metanol
- Tepung pisang (SIGMA)
- Aceton
- Bensil adenin (SIGMA)
- Dietilamin
- Standar Solasodina (SIGMA)
- Sakarosa (SIGMA)
- Standar Solasodiena (Lab. Bioteknologi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga)

2. Alat-alat Penelitian

- Alat gelas
- pH meter Fischer Accumet model 230 A
- Autoclave SMIC tipe WS2 - 84 - 64
- Perlengkapan untuk pekerjaan aseptis (pisau, pinset dan gunting)
- Laminar air flow cabinet, Dalton model, San Ei Seisakusho, Ltd., type PCV-750-APG
- Thermolyne Type 16700 Mixer
- Centrifuge Jenetzki T-5 & Hettick Universal 25
- Oven Despatch, Fisher Scientific, model LEB 1-28
- Lempeng Kieselgel 60 F₂₅₄ (E. Merk Darmstadt)
- TLC-Scanner Shimadzu CS-930
- MS JEOL JMS DX 303
- JASCO FT-IR 5300
- Socorex Micropipete 811/821
- Ultrasonic Julabo Labortechnik GMBH
- Spektrofotometer Shimadzu UV-Vis 160 A

3. Metode Penelitian

3.1. Rancangan Percobaan

Kultur pucuk *Solanum laciniatum* diperbanyak secara aseptis dalam media MS yang dimodifikasi dengan hormon tumbuh BA 4 mg/l (media MSK), dikultivasi dalam ruang

kultur pada suhu $\pm 25^{\circ}\text{C}$ dengan lampu fluoresensi berkekuatan ± 700 lux. Setelah 4 minggu, sebagian dipindahkan dalam media perlakuan yaitu media MSK dengan penambahan L-arginin, kasein hidrolisat, tepung pisang dan penurunan kadar sakarosa (untuk masing-masing perlakuan ± 40 botol), sedangkan yang sebagian dipindahkan dalam media MSK.

3.2. Tahapan Percobaan

- Pembuatan media
- Penanaman, kultivasi kultur pada media percobaan
- Panen kultur
- Perhitungan indeks pertumbuhan
- Penetapan kadar relatif klorofil
- Optimalisasi metode hidrolisis
- Optimalisasi fase gerak metode KLT
- Ekstraksi solasodina
- Analisa kualitatif
- Analisa kuantitatif
 - Validasi metode penetapan kadar
 - Penetapan kadar solasodina
- Perhitungan produktivitas solasodina
- Analisa data

3.3. Prosedur Kerja

3.3.1. Pembuatan Larutan Stok

Pembuatan larutan stok sesuai dengan yang tertera pada lampiran 2, menggunakan pelarut air suling, kecuali untuk;

BA : dilarutkan dahulu dengan larutan NaOH 0,1N sedikit demi sedikit sampai larut, kemudian ditambah air suling sampai volume tertentu.

3.3.2. Pembuatan Media

- Pembuatan Media MSK

Masing-masing komponen media dibuat larutan stok kecuali mio-inositol, sakarosa, agar. Semua komponen media MS (lampiran 3) dicampurkan dalam bentuk larutan, ditambahkan mio-inositol dan sakarosa dalam jumlah tertentu, kemudian diencerkan dengan air suling sampai $\frac{3}{4}$ volume akhir, pH larutan diatur antara pH 5,7 - 5,8 dengan menambahkan NaOH 0,1 N atau HCl 0,1 N. Selanjutnya tambahkan agar 0,7% b/v dan ditambah air suling sampai volume tertentu. Larutan dipanaskan dengan diaduk terus menerus sampai jernih. Larutan yang sudah jernih dituangkan kedalam botol bermulut lebar kira-kira 10 - 15 ml, botol ditutup dengan aluminium foil, dan diseterilkan dalam autoclaf suhu 121°C selama 20 menit, kemudian

disimpan dalam ruang kultur dengan suhu 25°C.

- Pembuatan Media Perlakuan

Cara pembuatan media perlakuan, sama dengan media MS yang dimodifikasi dengan BA 4 mg/l (media MSK). Penambahan L-Arginin, tepung pisang dan kasein hidrolisat dilakukan sebelum penambahan agar. Skema pembuatan media percobaan tertera pada lampiran 4.

3.3.3. Penanaman dan Kultivasi Kultur Pucuk *Solanum laciniatum* Pada Media Percobaan

Penanaman kultur pucuk dilakukan secara aseptis dalam laminar air flow cabinet. Setiap kali penanaman dilakukan penimbangan berat media percobaan dan berat media percobaan dengan kultur pucuk. Hasil pengurangan kedua harga tersebut diperoleh berat basah kultur pucuk awal. Kemudian dikultivasi dalam ruang kultur pada suhu $\pm 25^{\circ}\text{C}$, dan penyinaran lampu fluoresensi berkekuatan ± 700 lux. Setiap empat minggu kultur pucuk dipanen, dibersihkan dari sisa media, ditimbang lalu dikeringkan.

3.3.4. Panen Kultur

Setelah empat minggu, kultur pucuk dipanen dengan cara mengeluarkan dari botol kultur dan dibersihkan dari

sis media yang menempel. Kultur hasil panen dikeringkan dibawah lampu kemudian diserbuk dan dihomogenkan.

3.3.5. Perhitungan Indeks Pertumbuhan Kultur Pucuk

Perhitungan indeks pertumbuhan (IP) kultur pucuk dinyatakan sebagai perbandingan berat akhir kultur pada saat panen terhadap berat awal kultur pada saat penanaman, sebagai berikut :

$$IP = \frac{\text{berat akhir kultur pucuk}}{\text{berat awal kultur pucuk}}$$

3.3.5. Penetapan Kadar Relatif Klorofil

Penetapan kadar relatif klorofil dilakukan menurut metode Harborne, (1973) sebagai berikut :

Ditimbang $\pm 0,2 - 0,5$ gram kultur pucuk segar dimasukkan kedalam mortir, ditambah 0,01 gram CaCO_3 lalu digerus. Ditambah aseton 80 %, digerus sampai semua warna hijau terbebas dari kultur pucuk, disaring kedalam labu ukur 25,0 ml. Residu dicuci dengan aseton 80 % sampai tidak berwarna, ditambah aseton 80 % sampai garis tanda, dikocok sampai homogen.

Klorofil hasil ekstraksi ditentukan serapannya dengan alat spektrofotometer Shimadzu UV-Vis 160 A pada

panjang gelombang 645 dan 663 nm. Kadar klorofil dapat dihitung dengan persamaan berikut [Harborne, 1973]:

$$\text{Total klorofil (mg/l)} = 20,2 A_{645} + 8,02 A_{663}$$

dimana,

A_{645} = serapan pada panjang gelombang 645

A_{663} = serapan pada panjang gelombang 663

3.3.7. Optimalisasi Fase Gerak Metode KLT

Untuk optimalisasi fase gerak pada metode KLT digunakan beberapa macam campuran fase gerak sebagai berikut,

- kloroform-metanol = 19 : 1
- kloroform-metanol = 19 : 3
- heksan-etilasetat-dietilamin = 70 : 20 : 10
- kloroform-metanol-dietilamin = 20 : 2 : 0,5
- kloroform-metanol-dietilamin = 20 : 2 : 0,75

3.3.8. Optimalisasi Metode Hidrolisis

Untuk optimalisasi metode hidrolisis, dicoba beberapa metode yaitu :

- Metode hidrolisis Van Gelder, (1989) yang dimodifikasi

Serbuk kering kultur pucuk sebanyak $\pm 0,1$ gram, dipindahkan dalam erlemeyer. Ditambah 5

ml kloroform, divortex selama 10 menit , lalu disaring, ekstraksi diulangi tiga kali. Residu dihidrolisis dengan 7,5 ml HCl 2N dan 5 ml kloroform selama 2 jam pada suhu $\pm 80^{\circ}\text{C}$, kemudian setelah dingin, dibasakan dengan larutan NaOH 10 N sampai $\pm \text{pH } 10$. Diekstraksi (divortex) dengan kloroform 5 ml selama 10 menit. Kemudian disentrifugasi ± 3750 rpm selama 5 menit. Lapisan kloroform dipisahkan, ekstraksi diulang 4 kali. Ekstrak dalam kloroform (ekstrak fraksi hidrolisat) yang diperoleh dikumpulkan.

- Metode hidrolisis sapogenin steroid yang dilakukan Indrayanto et al,(1993)

Serbuk kering kultur pucuk sebanyak $\pm 0,1$ gram, dipindahkan dalam erlemeyer. Ditambah 5 ml kloroform, divortex selama 10 menit, lalu disaring, ekstraksi diulangi tiga kali. Residu dihidrolisis dengan 7,5 ml HCl 2N dalam air selama 2 jam pada suhu $\pm 100^{\circ}\text{C}$, kemudian setelah dingin, dibasakan dengan larutan NaOH 10 N sampai $\pm \text{pH } 10$. Diekstraksi (divortex) dengan kloroform 5 ml selama 10 menit. Kemudian

disentrifugasi \pm 3750 rpm selama 5 menit. Lapisan kloroform dipisahkan, ekstraksi diulang 4 kali. Ekstrak dalam kloroform (ekstrak fraksi hidrolisat) yang diperoleh dikumpulkan.

- Metode hidrolisis Carle, (1979)

Serbuk kering kultur pucuk sebanyak \pm 0,1 gram, dipindahkan dalam erlemeyer. Ditambah 5 ml kloroform, divortex selama 10 menit, lalu disaring, ekstraksi diulangi tiga kali. Residu dihidrolisis dengan 7,5 ml HCl 2N dalam metanol selama 2 jam pada suhu \pm 70 - 75°C, kemudian setelah dingin, dibasakan dengan larutan NaOH 10 N sampai \pm pH 10. Diencerkan dengan air suling 5 ml. Diekstraksi (divortex) dengan kloroform 5 ml selama 10 menit. Kemudian disentrifugasi \pm 3750 rpm selama 5 menit. Lapisan kloroform dipisahkan, ekstraksi diulang 4 kali. Ekstrak dalam kloroform (ekstrak fraksi hidrolisat) yang diperoleh dikumpulkan.

- Metode hidrolisis Carle, (1979) dengan pemanasan 100°C

Cara yang dilakukan sama dengan metode hidrolisis Carle, bedanya pada saat hidrolisa dipanaska 100°C.

3.3.9. Ekstraksi Solasodina

Sebelum diekstraksi, pada serbuk sampel dilakukan Penetapan susut kering menurut Farmakope Indonesia edisi III,(1979).

Ekstraksi solasodina dilakukan dengan metode Carle, (1979) dan Indrayanto,(1993), yang dimodifikasi sebagai berikut :

Serbuk kering kultur pucuk sebanyak $\pm 0,1$ gram, dipindahkan dalam erlemeyer. Tambahkan 5 ml kloroform, divortex selama 10 menit, lalu disaring, ekstraksi diulang tiga kali. Residu dihidrolisis dengan 7,5 ml HCl 2N dalam metanol selama 2 jam pada suhu $\pm 70 - 75^\circ\text{C}$, kemudian setelah dingin, dibasakan dengan larutan NaOH 10 N sampai $\pm \text{pH } 10$. Diencerkan dengan air suling 5 ml. Ekstraksi (divortex) dengan kloroform 5 ml selama 10 menit. Kemudian disentrifugasi ± 3750 rpm selama 5 menit. Lapisan kloroform dipisahkan, ekstraksi diulang 4 kali. Ekstrak dalam kloroform (ekstrak fraksi hidrolisat) yang diperoleh dikumpulkan, diuapkan sampai kering pada suhu kamar. Bila akan dilakukan analisa dilarutkan dalam kloroform.

3.3.10. Analisa Kualitatif Solasodina

3.3.10.1. Identifikasi dengan Kromatografi Lapisan Tipis.

Ekstrak fraksi hidrolisat hasil ekstraksi serbuk kering kultur pucuk *Solanum laciniatum* dengan metode Carle,(1979) dan metode Indrayanto,(1993), yang dimodifikasi, ditotolkan pada lempeng Kieselgel 60 F₂₅₄, dibiarkan mengering diudara. Kemudian diekluasi dengan kloroform-metanol-dietilamin (20 : 2 : 0,5), selanjutnya disemprot dengan penampak bercak anisaldehyd-asamsulfat (dipanaskan pada suhu ± 100 - 110°C), warna bercak dan harga R_f dibandingkan dengan standar solasodina.

3.3.10.2. Identifikasi dengan TLC-Scanner

Identifikasi selanjutnya, bercak pada lempeng KLT dari sampel diamati absorpsi-refleksinya dengan alat TLC-Scanner Shimadzu CS-930 pada panjang gelombang 370 - 700 nm. Profil spektra yang dihasilkan dari sampel berupa spektra panjang gelombang dibandingkan dengan solasodina standar (SIGMA) pada lempeng KLT yang sama.

3.3.10.3. Identifikasi dengan Metode Spektroskopi

3.3.10.3.1. Isolasi Solasodina dengan metode KLT

Preparatif

Solasodina dalam ekstrak fraksi hidrolisat diisola-

si menggunakan metode KLT preparatif, pada lempeng Keiselgel 60 F₂₅₄ dengan eluen kloroform-metanol-dietilamin (20 : 2 : 0,5). Bercak yang diduga mengandung solasodina dikerok, ditambah 5 ml kloroform diultrasonic selama 5 menit, lalu disentrifugasi ± 3750 rpm selama 5 menit, lapisan kloroform dipisahkan, prosedur ini diulangi tiga kali. Isolat dalam kloroform yang didapat dikumpulkan dan dikeringkan.

3.3.10.3.2. Identifikasi dengan Spektrometri Massa

Isolat hasil isolasi dengan metode KLT preparatif diamati dengan alat MS JEOL JMS DX 303. Spektra massa yang diperoleh dibandingkan dengan standar solasodina (SIGMA).

3.3.10.3.3. Identifikasi dengan Fourier Transform -IR

Isolat hasil isolasi dengan metode KLT preparatif dibentuk pelet dengan KBr. Kemudian discan 500 kali pada bilangan gelombang 400 - 4000 cm⁻¹ dengan alat JASCO FT-IR 5300 . Spektra yang dihasilkan, dibandingkan dengan standar solasodina (SIGMA)

3.3.11. Analisa kuantitatif Solasodina dengan Metode Densitometri

3.3.11.1. Validasi

Linieritas

Larutan standar solasodina dalam kloroform, ditotolkan pada lempeng KLT dengan kadar 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 dan 1,6 µg/spot. Diekspansi dengan kloroform-metanol-dietilamin (20: 2: 0,5), selanjutnya disemprot dengan penampak bercak anisaldehyd-asamsulfat. Setelah dipanaskan suhu ± 100-110°C, selama 10 menit. Luas area-nya diamati dengan metode densitometri. Kemudian dibuat kurva regresi linier antara kadar dengan luas area. Uji linieritas dilakukan menurut Funk, et al. (1992).

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

Untuk menentukan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) dilakukan dengan menggunakan larutan solasodina standar pada konsentrasi kecil sampai tidak terbaca luas areanya oleh alat TLC-Scanner. Pada penelitian ini larutan standar solasodina dalam kloroform, ditotolkan pada lempeng KLT dengan konsentrasi 0,3 : 0,2 ; 0,1 ; 0,08 ; 0,06 ; 0,04 ; 0,02 dan 0,00 µg/spot. Diekspansi dengan kloroform-metanol-dietilamin (20: 2: 0,5) lalu

disemprot dengan penampak bercak anisaldehyd-asamsulfat (dipanaskan pada suhu $\pm 100 - 110^{\circ}\text{C}$). Kemudian diamati luas areanya dengan metode densitometri. Harga LOD dan LOQ ditentukan menurut Funk et al,(1992).

Penentuan Akurasi

Untuk penentuan akurasi dilakukan metode adisi. Ditimbang serbuk kering kultur pucuk *Solanum laciniatum* $\pm 0,1$ gram (8 kali), masing-masing diekstraksi dengan 5 ml kloroform, vortex selama 10 menit, fase kloroform dipisahkan dengan disaring. Ulangi ekstraksi tiga kali. Pada residu ditambahkan berturut-turut larutan solasodina standar 0, 80, 160, 200, 240, 280, 320 dan 360 μg . Selanjutnya masing-masing dihidrolisa dengan 7,5 ml HCl 2 N dalam metanol pada suhu $70 - 75^{\circ}\text{C}$ selama 2 jam. Setelah dingin basakan dengan NaOH 10 N sampai pH 10. Lalu diencerkan dengan 5 ml air suling. Kemudian diekstraksi dengan 5 ml kloroform (vortex selama 10 menit), disentrifugasi ± 3750 rpm selama 5 menit. Lapisan kloroform dipisahkan. Ekstraksi dengan kloroform diulangi 4 kali. Hasil ekstraksi dalam kloroform (ekstrak fraksi hidrolisat) dikumpulkan dan dikeringkan. Kadar solasodina dalam ekstrak fraksi hidrolisat ditentukan dengan metode densitometri.

Kemudian dibuat kurva antara kadar teoritis (x_c),

yaitu kadar solasodina berdasarkan perhitungan, terhadap kadar yang diketemukan (x_f), serta dihitung persen recovery-nya. Harga rentang signifikansi (VB) dari a_f dan b_f , dihitung menurut Funk et al,(1992).

Penentuan Presisi

Ditimbang $\pm 0,1$ gram serbuk kering kultur pucuk *Solanum laciniatum* (10 kali). Kemudian masing-masing diekstraksi menurut metode Carle,(1979) dan Indrayanto,(1993) yang dimodifikasi. Ekstrak fraksi hidrolisat kering yang telah dilarutkan kembali dengan kloroform 2,0 ml masing-masing ditotolkan 4 μ l/spot (dua kali), dieluasikan dengan kloroform-metanol-dietilamin (20 : 2 : 0,5). Disemprot dengan penampak bercak anisaldehyd-asamsulfat, dipanaskan suhu $\pm 100 - 110^\circ\text{C}$, selama 10 menit. Selanjutnya ditentukan kadar solasodinya dengan metode densitometri. Dihitung harga rata-rata kadar ekstrak dan koefisien variasi atau relative standart deviasi (RSD)-nya.

3.3.11.2. Penetapan Kadar Solasodina

Serbuk kering kultur pucuk *Solanum laciniatum* ± 100 mg diekstraksi menurut metode Carle,(1979) dan Indrayanto (1993) yang dimodifikasi. Ekstrak fraksi hidrolisat yang diperoleh dikeringkan pada suhu kamar, kemudian dilarut-

kan kembali dengan 2,0 ml kloroform, ditotolkan 4 µl/spot pada lempeng KLT dengan pembanding solasodina standar (lima konsentrasi antara kadar 0,4 - 1,6 µg/spot). Die-luasi dengan kloroform-metanol-dietilamin (20: 2: 0,5), lalu disemprot dengan penampak bercak anisaldehyd-asam sulfat. Dipanaskan ± 100 - 110°C selama 10 menit. Selanjutnya dengan alat TLC-Scanner diukur luas area masing-masing bercak pada panjang gelombang 385 nm.

Kadar sampel diketahui dengan jalan intrapolasi luas area bercak sampel ke dalam persamaan garis regresi kurva baku yang dibuat dalam lempeng KLT yang sama.

Perhitungan kadar sampel dapat dilakukan dengan rumus sebagai berikut :

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

dimana,

Ks = kadar sampel (µg/g)

V = volume kloroform untuk melarutkan ekstrak (µl)

Vp = volume penotolan (µl)

Cn = konsentrasi bercak/sampel (µg)

B = berat serbuk kering yang diekstraksi (g)

4. Perhitungan Produktivitas Solasodina

Produktivitas solasodina dihitung menurut rumus sebagai berikut :

$$\text{Produktivitas (mg.fl}^{-1}\text{.w}^{-1}) = (A - B) \times \frac{KS'}{n \cdot w}$$

dimana,

- A = total berat kering kultur pucuk (gram) waktu panen (pada media tertentu)
- B = total berat kering kultur pucuk (gram) waktu tanam (pada media tertentu)
- KS' = kadar solasodina rata-rata (mg/g) dalam kultur pucuk (pada media tertentu)
- n = jumlah botol (fl)
- w = jumlah minggu (lama kultivasi)

5. Analisis Data

Dari data-data yang diperoleh dilakukan analisa statistik sebagai berikut :

- Perhitungan koefisien regresi untuk mengetahui linearitas antara luas area dan konsentrasi
- Perhitungan standar deviasi untuk menentukan batas LOD dan LOQ

- Perhitungan persen recovery untuk menentukan akurasi
- Perhitungan harga koefisien variasi atau relative standart deviasi untuk menentukan presisi
- Pembuatan persamaan regresi kurva baku untuk menghitung kadar sampel
- Dibuat grafik antara kadar dan produktivitas solasodina, kadar relatif klorofil serta indeks pertumbuhan dengan konsentrasi bahan perlakuan untuk mengetahui pengaruh dari bahan perlakuan
- Dilakukan uji Anava dengan program microstat dan perhitungan HSD menurut Zar, (1974) untuk menguji kemaknaan dari perbedaan data hasil pengamatan

BAB 1 V**HASIL PENELITIAN****1. Hasil Perhitungan Indeks Pertumbuhan :****TABEL 2 : HASIL PERHITUNGAN INDEKS PERTUMBUHAN (IP) KULTUR PUCUK SOLANUM LACINIATUM YANG BERUMUR 4 MINGGU DALAM BERMACAM-MACAM MEDIA PERLAKUAN**

NO	KODE MEDIA	n (REPLIKASI)	INDEKS PERTUMBUHAN		
			x	±	SD
1	MSK	27	7,407	±	1,2729
2	A-50	36	7,662	±	1,4873
3	A-100	40	8,406	±	1,4623
4	A-150	33	9,811	±	1,4279
5	CS-100	35	8,682	±	1,3381
6	CS-150	35	7,219	±	1,2035
7	CS-200	41	6,992	±	1,3050
8	BP-3	38	5,557	±	0,9329
9	BP-6	36	5,578	±	0,8507
10	BP-8	36	4,043	±	0,6503
11	S-0	40	2,663	±	0,4867
12	S-10	32	6,066	±	1,0240
13	S-15	39	4,868	±	0,9362
14	S-20	32	4,955	±	0,8706

Keterangan:

media MSK = media A-0, CS-0, BP-0 dan S-30

2. Penetapan Kadar Klorofil

Hasil penetapan kadar relatif klorofil pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* yang berumur 4 minggu dalam berbagai media perlakuan dengan alat Spektrofotometer Shimadzu UV-Vis 160A dapat dilihat pada tabel 3, sedangkan profil pengaruh masing-masing perlakuan terhadap kadar relatif klorofil dalam kultur pucuk *Solanum laciniatum* dapat dilihat pada gambar 20, 21, 22 dan 23.

TABEL 3 : HASIL PENETAPAN KADAR KLOROFIL PADA KULTUR PUCUK SOLANUM LACINIATUM YANG BERUMUR 4 MINGGU DALAM BERMACAM-MACAM MEDIA PERLAKUAN

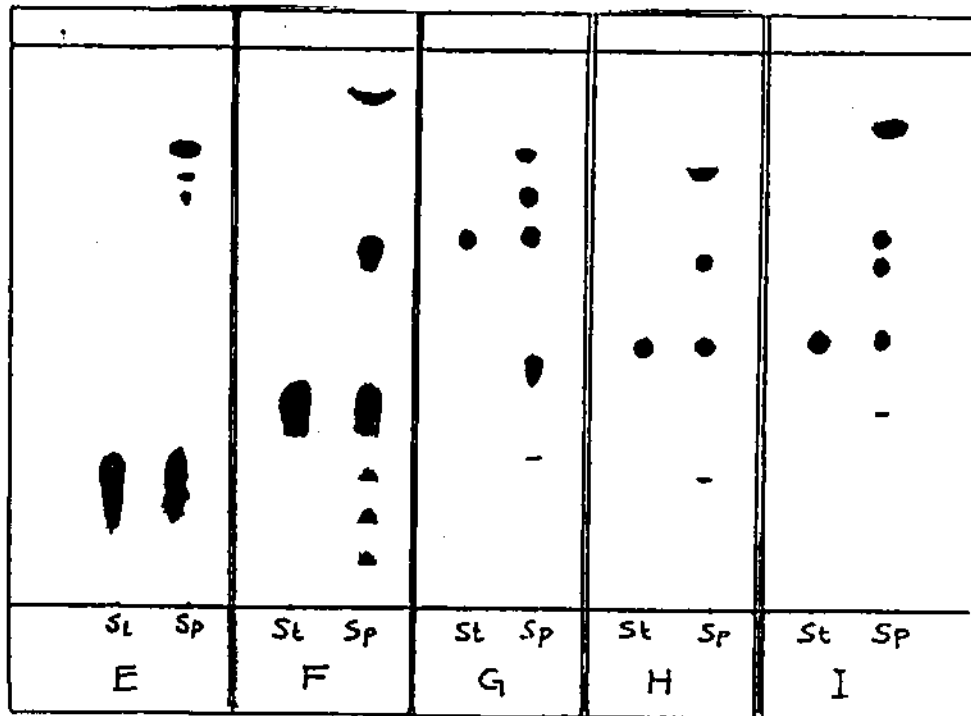
NO	KODE MEDIA	n (REPLIKASI)	KADAR KLOROFIL (mg/g)		
			x	±	SD
1	MSK	3	0,839	±	0,0164
2	A-50	3	1,162	±	0,0147
3	A-100	3	1,354	±	0,0957
4	A-150	3	1,458	±	0,0458
5	CS-100	3	1,450	±	0,0868
6	CS-150	3	1,583	±	0,0543
7	CS-200	3	1,519	±	0,1029
8	BP-3	3	1,227	±	0,0389
9	BP-6	3	1,310	±	0,0737
10	BP-8	3	0,933	±	0,0707
11	S-0	3	0,676	±	0,0098
12	S-10	3	1,026	±	0,0805
13	S-15	3	1,214	±	0,0370
14	S-20	3	0,897	±	0,0513

Keterangan:

media MSK = media A-0, CS-0, BP-0 dan S-30

3. Hasil Optimalisasi Fase Gerak Metode KLT

3.1. Hasil Pengamatan Kromatogram KLT



Gambar 8 : Kromatogram KLT ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* dengan berbagai macam fase gerak.

Keterangan :

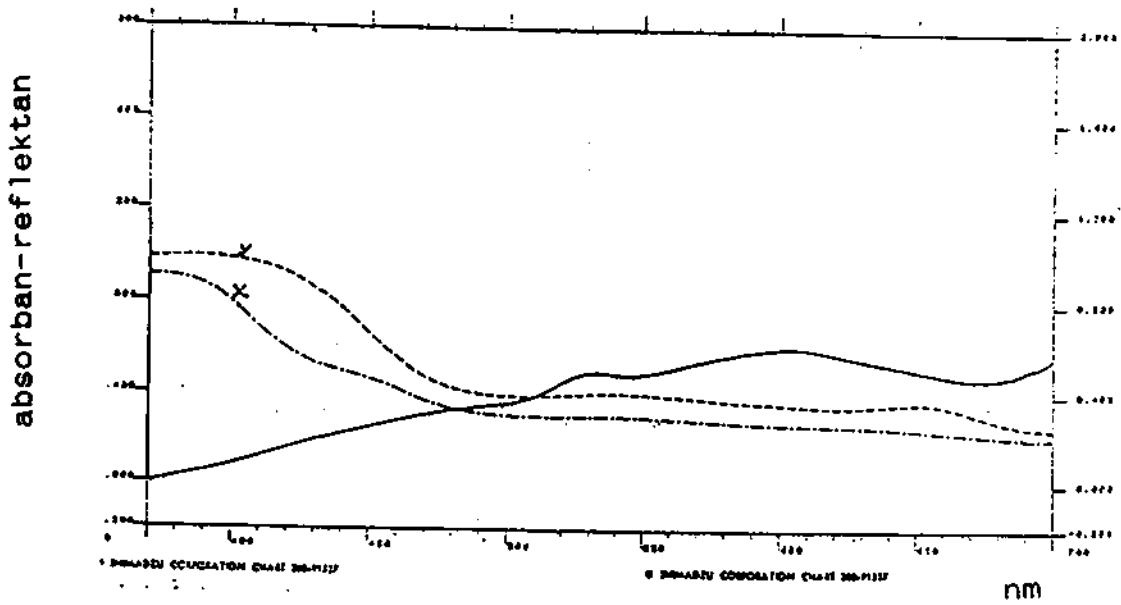
- st = standar solasodina
- sp = ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum*

Huruf lain pada gambar menyatakan eluasi dengan berbagai macam campuran fase gerak,

- E = kloroform-metanol (19 : 1)
- F = kloroform-metanol (19 : 3)
- G = heksan-etilasetat-dietilamin (70 : 20 : 10)
- H = kloroform-metanol-dietilamin (20 : 2 : 0,5)
- I = kloroform-metanol-dietilamin (20 : 2 : 0,75)

3.2. Hasil Pengamatan Kemurnian Bercak

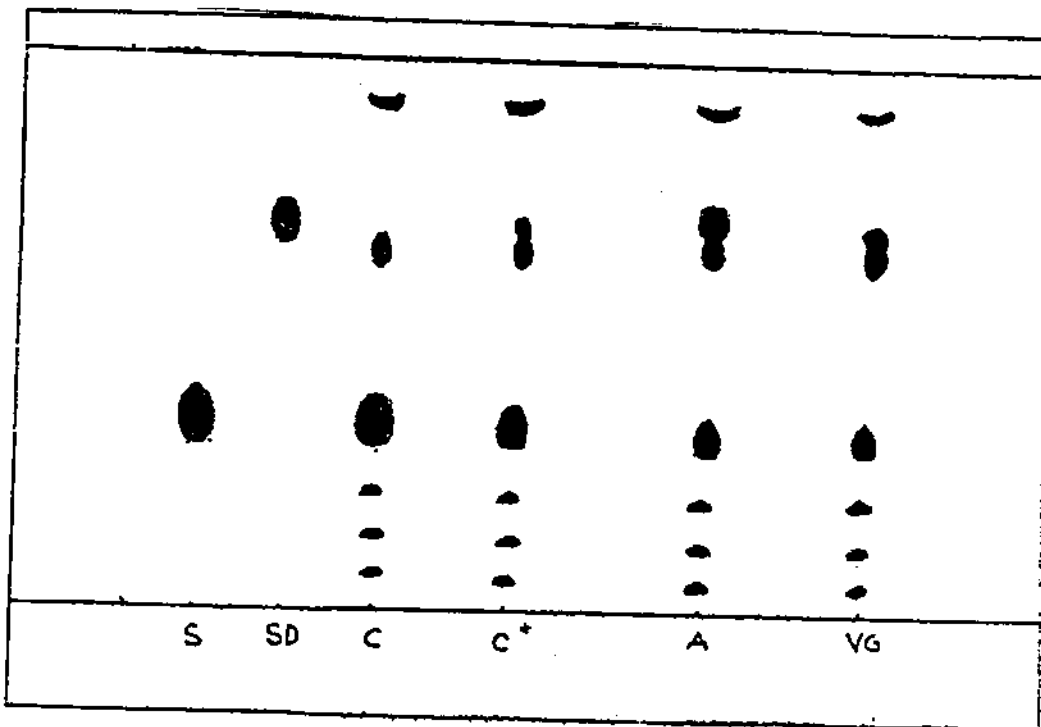
- Pengamatan kemurnian bercak yang diduga mengandung solasodina (bercak nomor 3 dari bawah searah eluasi) pada lempeng KLT Kieselgel 60 F₂₅₄ menggunakan fase gerak heksan-etilasetat-dietilamin (70 : 2 : 10) diberi kode fase gerak H, dengan alat TLC-Scanner Shimadzu CS-930 dapat dilihat pada gambar 9.
- Hasil pengamatan kemurnian bercak yang diduga mengandung solasodina (bercak nomor 2 dari bawah searah eluasi) pada lempeng KLT Kieselgel 60 F₂₅₄ menggunakan fase gerak kloroform-metanol-dietilamin (20 : 2 : 0,5) dengan alat TLC-Scanner Shimadzu CS-930 dapat dilihat pada gambar 12



Gambar 9 : Profil spektra panjang gelombang bercak nomor 3 ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* (y) dan standar solasodina (x) pada lempeng KLT dengan fase gerak H menggunakan alat TLC-Scanner Shimadzu CS-930

4. Hasil Optimalisasi Metode Hidrolisis

Kromatogram KLT ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* hasil ekstraksi menggunakan berbagai metoda hidrolisis dapat dilihat pada gambar 10.



Gambar 10 : Kromatogram KLT ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* dengan berbagai metode hidrolisis

Keterangan :

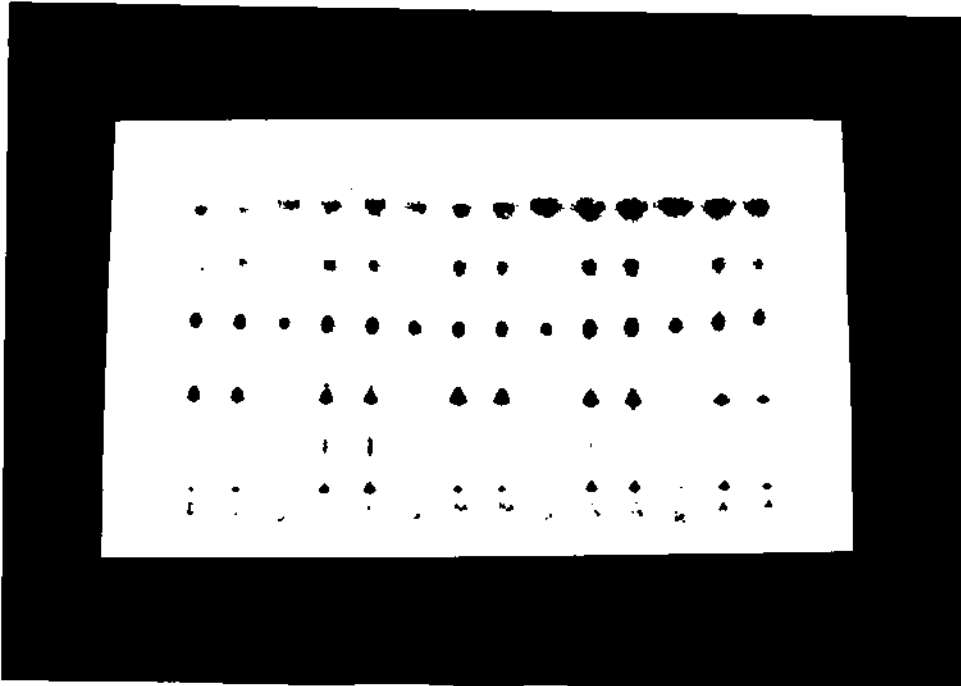
- S = standar solasodina
- SD = standar solasodiena

Huruf lain pada gambar menyatakan ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk dengan berbagai metode hidrolisis,

- C = metode hidrolisis Carle, (1979)
- C* = metode hidrolisis Carle dengan suhu $\pm 100^{\circ}\text{C}$
- A = metode hidrolisis sapogenin yang dilakukan Indrayanto et al, (1993)
- VG = metode hidrolisis Van Gelder, (1989) yang dimodifikasi

5. Analisa Kualitatif Solasodina

5.1. Identifikasi dengan KLT



Gambar 11 : Contoh kromatogram pada lempeng KLT dari ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum*

Keterangan:

fase gerak adalah : kloroform-metanol-etilasetat = 20 : 2 : 0,5
 fase diam : lempeng Keisegel 60 F₂₅₄
 penampak bercak : anisaldehyd-asamsulfat

Huruf pada gambar menyatakan ekstrak fraksi hidrolisat dari kultur pucuk *Solanum laciniatum* dalam bermacam-macam media yaitu :

S = media dengan perlakuan sakarosa

St = standar solasodina

P = media dengan perlakuan tepung pisang

BA = media MSK

Cs = media dengan perlakuan kasein hidrolisat

A = media dengan perlakuan L-arginin

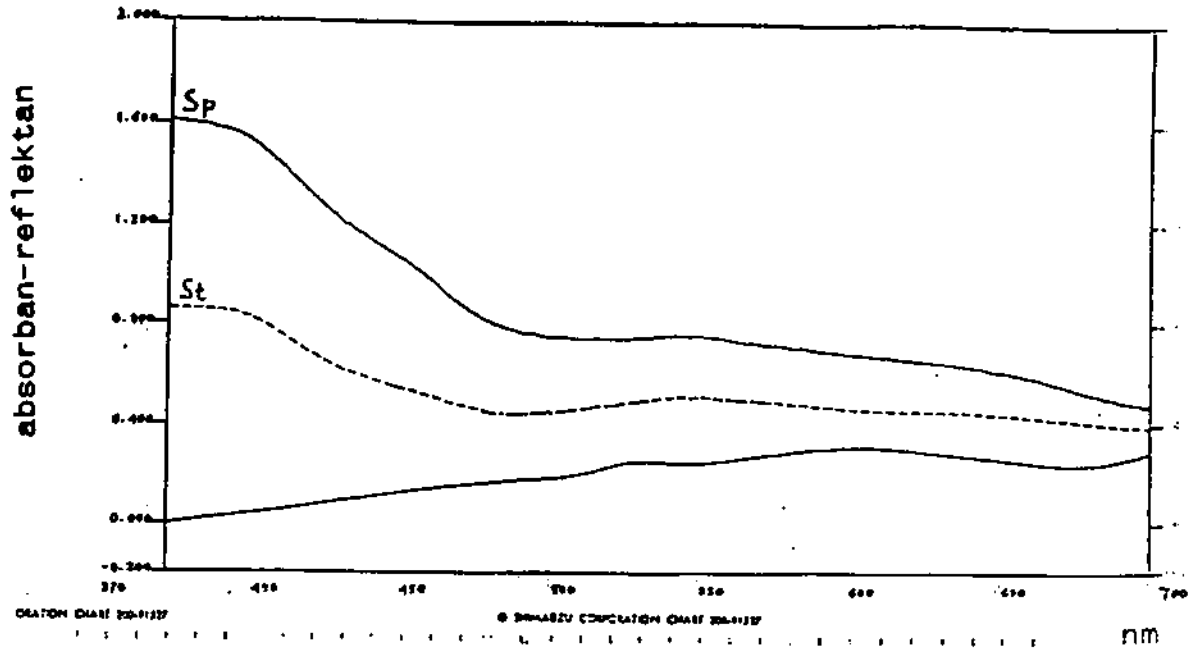
R_f bercak nomor :

1 dari bawah = 0,23

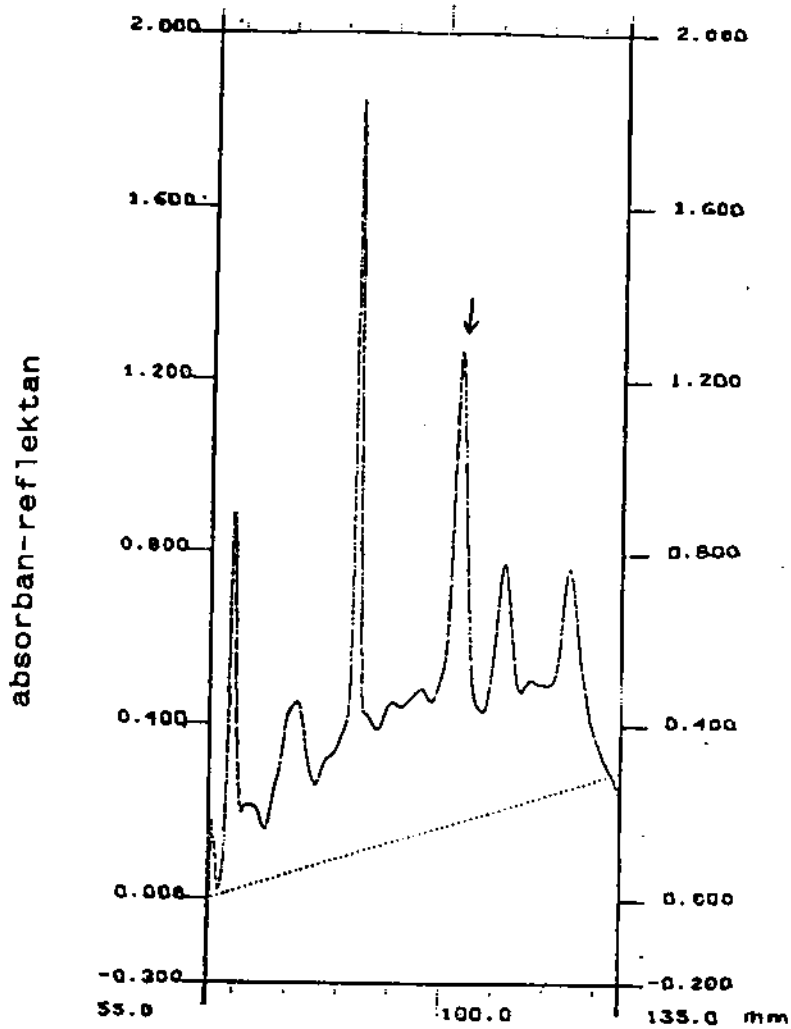
2 dari bawah = 0,47

3 dari bawah = 0,68

4 dari bawah = 0,78



Gambar 12 : Profil spektra panjang gelombang standar Solasodina (x) dan ekstrak fraksi hidro lisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* (z) dengan alat TLC- Scanner Shimadzu CS-930 pada panjang gelombang 370 - 700 nm.



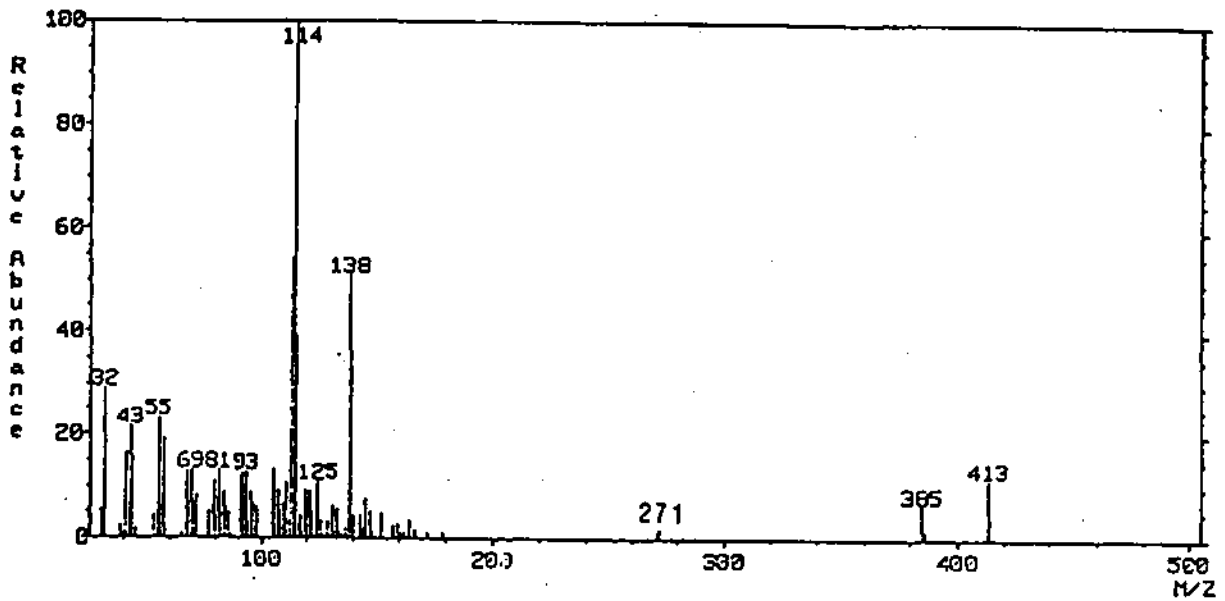
Gambar 13 : Contoh kromatogram ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* dengan alat TLC-Scanner Shimadzu CS-930

5.2. Identifikasi dengan Spektrometri Massa

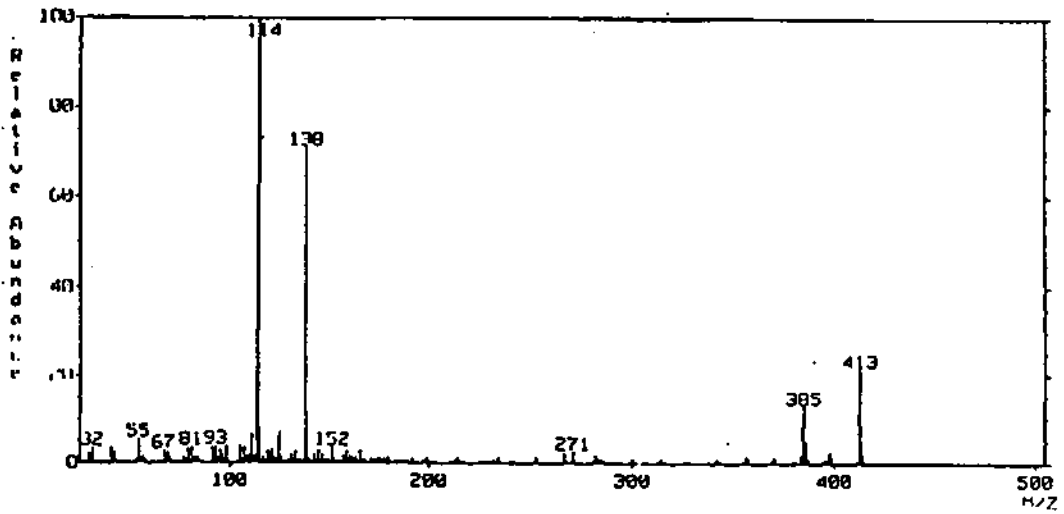
Isolat hasil KLT preparatif, bercak nomer 2 ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* dianalisa dengan alat MS JEOL JMS DX 303. Spektra massa yang didapat (gambar 14) setelah dibandingkan sama dengan spektra massa standar solasodina (gambar 15), dihasilkan fragmen-fragmen ion yang spesifik yaitu m/z 413 (M^+), 385, 271, 138 dan 114.

5.3. Identifikasi dengan Fourier Transform-IR

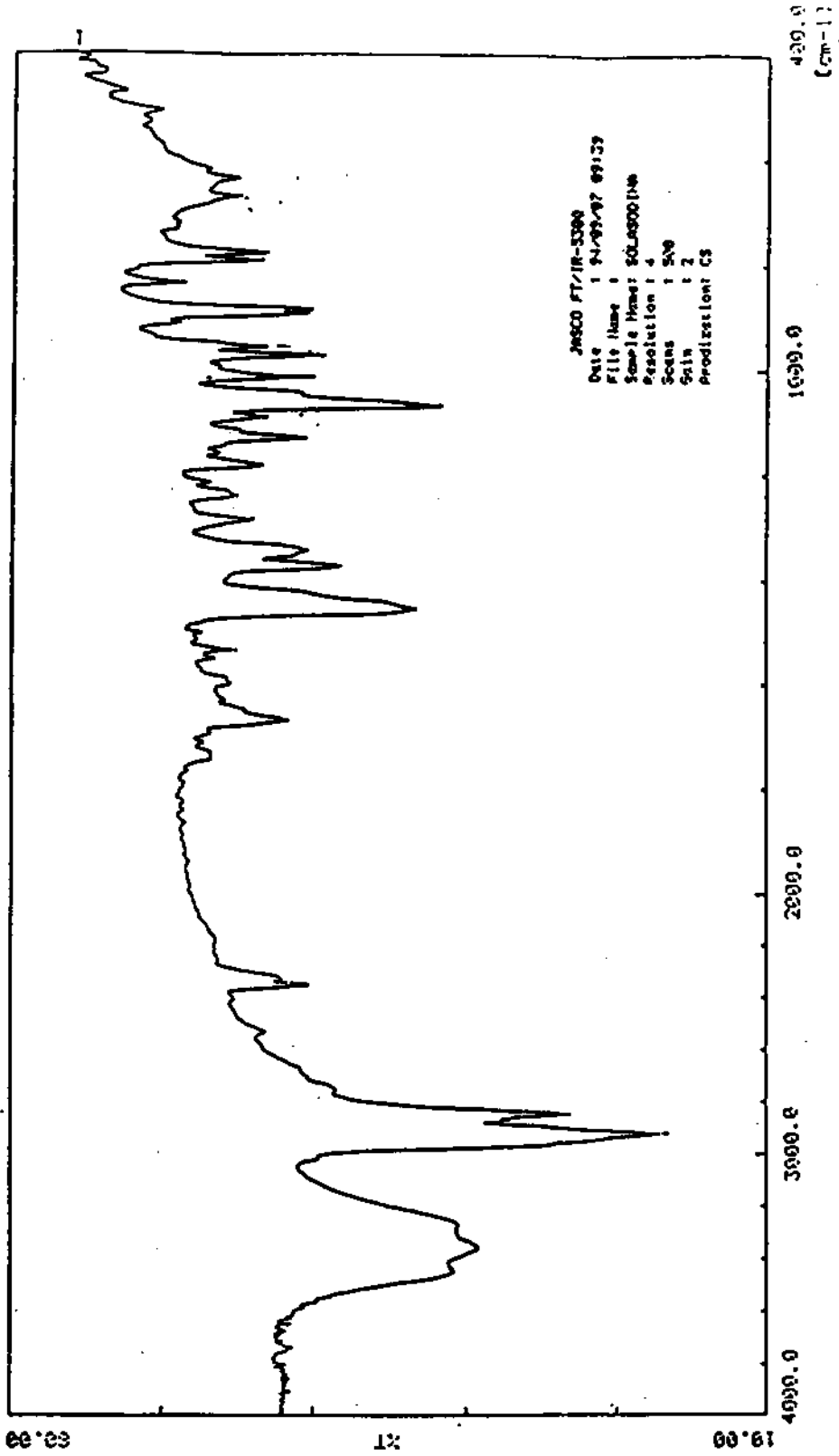
Isolat hasil KLT preparatif, bercak nomor 2 ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* yang diamati dengan alat JASCO FT-IR 5300. Diperoleh spektra FT-IR (gambar 16), setelah dibandingkan sama dengan spektra FT-IR standar solasodin (SIGMA) gambar 17



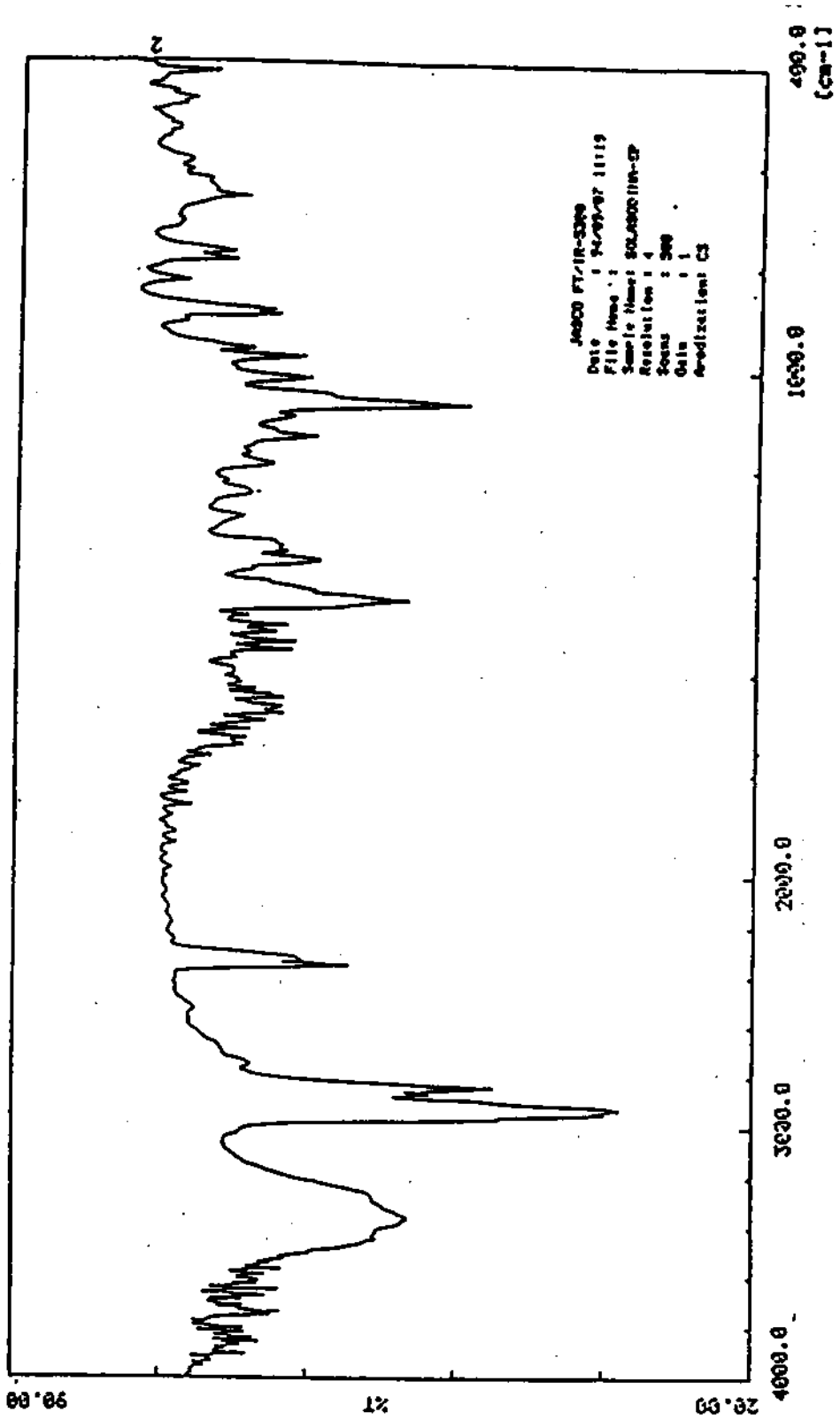
Gambar 14 : Spektra massa dari isolat hasil KLT preparatif bercak nomor 2 ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* dengan alat MS JEOL JMS DX 303



Gambar 15 : Spektra massa dari standar solasodina dengan alat MS JEOL JMS DX 303



Gambar 16 : Spektra FT-IR dari standar Solasodina dengan alat JASCO FT-IR 5300



Gambar 17 : Spektra FT-IR isolat hasil KLT preparatif bercak nomor 2 ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* dengan alat JASCO FT-IR 5300

6. Analisa Kuantitatif Solasodina

6.1. Validasi

6.1.1. Linieritas

Hasil uji linieritas larutan standar solasodina pada lempeng KLT antara kadar 0,4 - 1,6 µg/spot terhadap luas area yang diamati dengan metode densitometri (TLC-Scanner), dapat dilihat pada tabel 4. Setelah dianalisa dengan cara Funk, et al., (1992) diperoleh grafik regresi linier gambar 18,

persamaan garis regresi : $y = -3329,114 + 14744,82 x$

koefisien korelasi : 0,9989886

Harga S_y : 314,0512

Harga V_{x0} : 2,129909 %

Harga X_p : 0,1192375

6.1.2. Penentuan Batas Deteksi (LOD) & Batas Kuantitasi (LOQ)

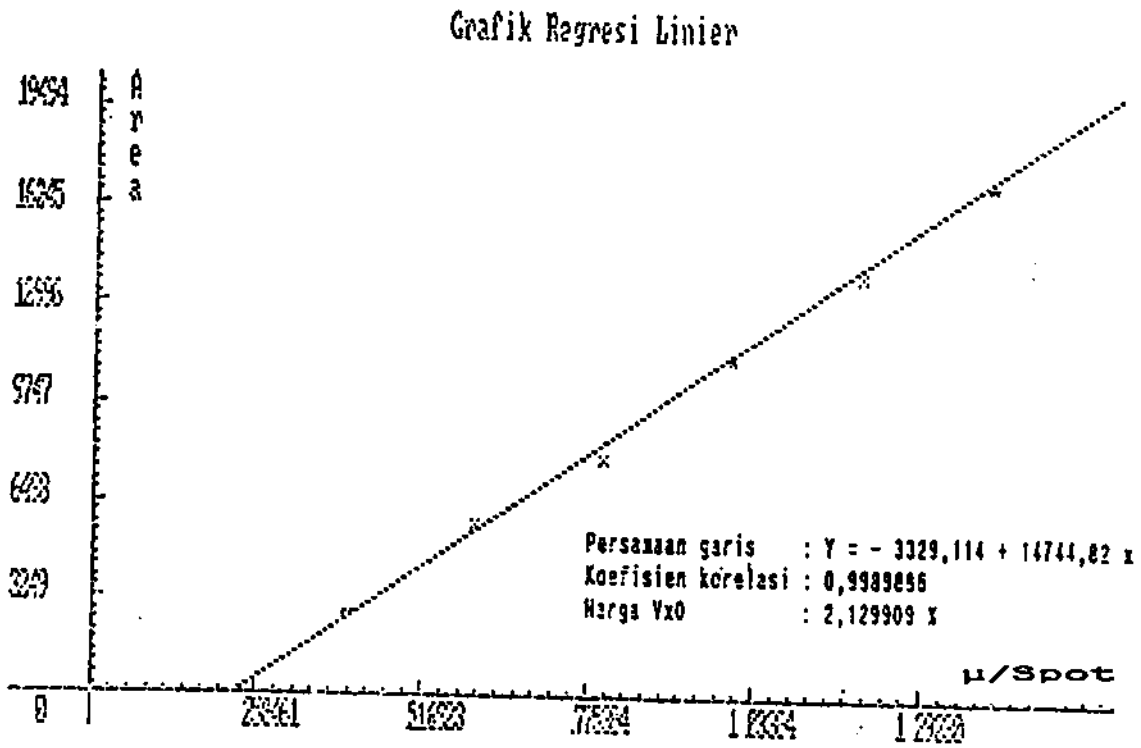
Hasil perhitungan LOD dan LOQ pada larutan standar solasodina antara konsentari 0,3 - 0,0 µg/spot pada lempeng KLT yang diamati dengan metode densitometri (TLC-Scanner) diperoleh :

- batas deteksi (LOD) = 0,11 µg/spot

- batas kuantitasi (LOQ) = 0,32 µg/spot

TABEL 4 : HASIL UJI LINIERITAS LARUTAN STANDAR SOLASODINA PADA LEMPENG KLT DENGAN METODE TLC-SCANNER

NO.	KADAR SOLASODINA ($\mu\text{g}/\text{Spot}$)	LUAS AREA
1	1,6	20629,84
2	1,4	17197,91
3	1,2	14151,92
4	1,0	11376,86
5	0,8	8021,14
6	0,6	5751,62
7	0,4	2780,633



Gambar 18 : Kurva linier antara konsentrasi standar solasodina [$\mu\text{g}/\text{spot}$] terhadap luas area.

6.1.3. Penentuan Akurasi

Hasil penentuan akurasi menggunakan metode adisi, dengan cara menambahkan standar solasodina 0, 80, 160, 200, 240, 280, 320 dan μg pada masing-masing ± 100 mg serbuk sampel kultur pucuk *Solanum laciniatum* sebelum dihidrolisa. Diperoleh kurva akurasi antara kadar solasodina teoritis (x_c) terhadap kadar solasodina yang ditemukan (x_f) pada lempeng KLT menggunakan metode densitometri (TLC-Scanner) seperti pada gambar 19, dengan :

- persamaan garis regresi :

$$x_f = - 0,1306658 + 1,009814 x_c$$

- harga VB $a_f = - 0,1306658 \pm 0,7003925$

- harga VB $b_f = 1,009814 \pm 0,117434$

- Persen recovery rata-rata = $98,92 \pm 2,352 \%$ ($n = 14$)

6.1.4. Penentuan Presisi

Hasil penentuan presisi dengan cara menetapkan kadar solasodin pada fraksi hidrolisat dengan 10 kali pengulangan dan dua kali penotolan dapat dilihat pada tabel 6, harga rata-rata kadar solasodina :

$$x = 4,3397 \pm 0,08129 \text{ mg/g } (n = 10)$$

$$\text{RSD} = 1,87 \%$$

TABEL 5 : HASIL PENETAPAN AKURASI PADA EKSTRAK FRAKSI
HIDROLISAT KULTUR PUCUK SOLANUM LACINIATUM
YANG BER UMUR 4 MINGGU DALAM MEDIA MSK

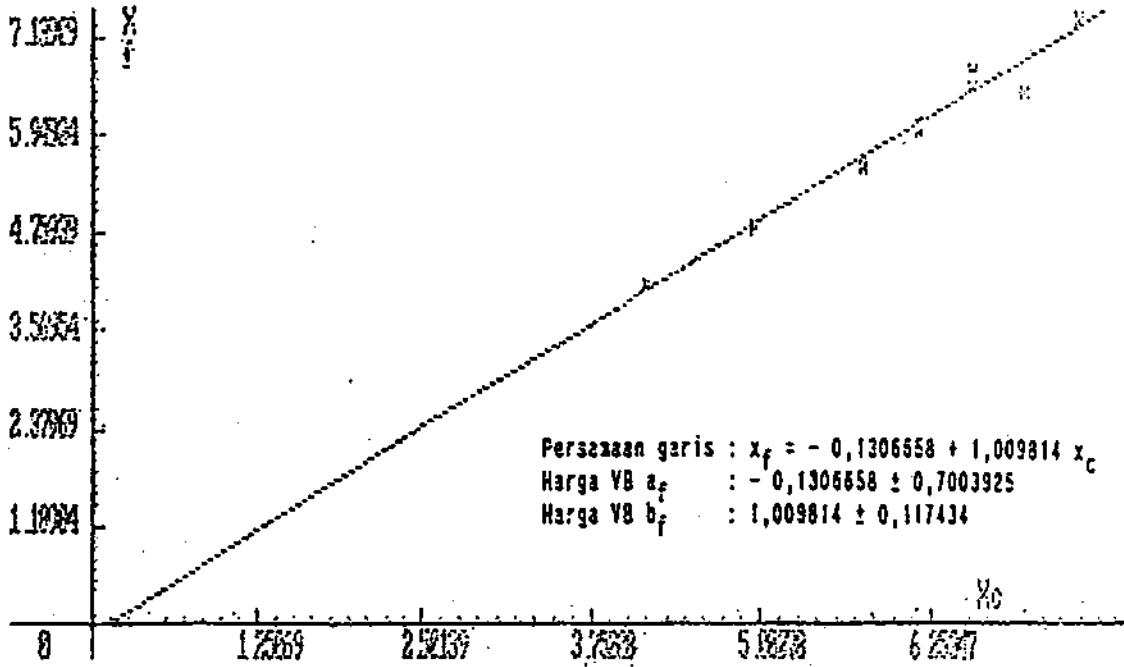
X_f (mg/g)	X_c (mg/g)	PERSEN RECOVERY (%)
7,5546	7,7424	97,57
7,3827	7,3539	102,63
7,5475	7,3539	100,39
6,7955	6,9491	97,79
6,5143	6,9491	93,74
6,7955	6,5507	103,69
6,5584	6,5507	100,12
5,9806	6,1583	97,11
6,1405	6,1583	99,71
5,6126	5,7539	97,54
5,5244	5,7539	96,01
4,8314	4,9563	97,48
4,8856	4,9563	98,57
4,1603	4,1603	100,00
rata-rata persen recovery = 98,92 ± 2,352 % (n =14)		

Keterangan :

X_f = kadar solasodina yang diperoleh

X_c = kadar solasodina teoritis

Grafik Kurva Akurasi



Gambar 19 : Kurva akurasi standar solasodina dalam ekstrak fraksi hydrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum*, antara kadar teoritis [x_c , mg/g] terhadap kadar yang didapat [x_f , mg/g].

TABEL 6 : HASIL PENETAPAN PRESISI EKSTRAK FRAKSI HIDROLISAT KULTUR PUCUK SOLANUM LACINIATUM YANG BERUMUR 4 MINGGU DALAM MEDIA MSK

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

6.2. Penetapan Kadar Solasodina

Hasil penetapan kadar rata-rata solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* dalam berbagai media perlakuan dapat dilihat pada tabel 7, sedangkan profil pengaruh masing-masing perlakuan terhadap kadar rata-rata solasodina dalam kultur pucuk *Solanum laciniatum* dapat dilihat pada gambar 20, 21, 22 dan 23.

7. Perhitungan Produktivitas Solasodina

Hasil perhitungan produktivitas solasodina kultur pucuk *Solanum laciniatum* dalam berbagai media perlakuan dapat dilihat pada tabel 8.

8. Analisa Data

Untuk mengetahui ada perbedaan yang bermakna atau tidak pada kadar rata-rata solasodina dan kadar relatif rata-rata klorofil dalam kultur pucuk *Solanum laciniatum* dengan berbagai perlakuan, dilakukan uji anava satu arah dan perhitungan HSD menurut Zar, (1974). Hasilnya dapat dilihat pada gambar 20, 21, 22 dan 23.

TABEL 7 : HASIL PENETAPAN KADAR SOLASODINA KULTUR PUCUK SOLANUM LACINIATUM YANG BERUMUR 4 MINGGU DALAM BERMACAM-MACAM MEDIA PERLAKUAN

NO	KODE MEDIA	n (REPLIKASI)	KADAR SOLASODINA (mg/g)		
			x	±	SD
1	MSK	10	4,32	±	0,1083
2	A-50	6	5,97	±	0,5042
3	A-100	5	5,76	±	0,3567
4	A-150	5	6,58	±	0,1927
5	CS-100	7	7,03	±	0,5018
6	CS-150	5	6,51	±	0,0769
7	CS-200	6	5,70	±	0,5246
8	BP-3	6	5,10	±	0,3498
9	BP-6	6	6,70	±	0,2967
10	BP-8	6	5,11	±	0,3093
11	S-0	6	6,49	±	0,4303
12	S-10	5	5,85	±	0,4479
13	S-15	6	4,46	±	0,4452
14	S-20	5	4,13	±	0,1922

Keterangan :

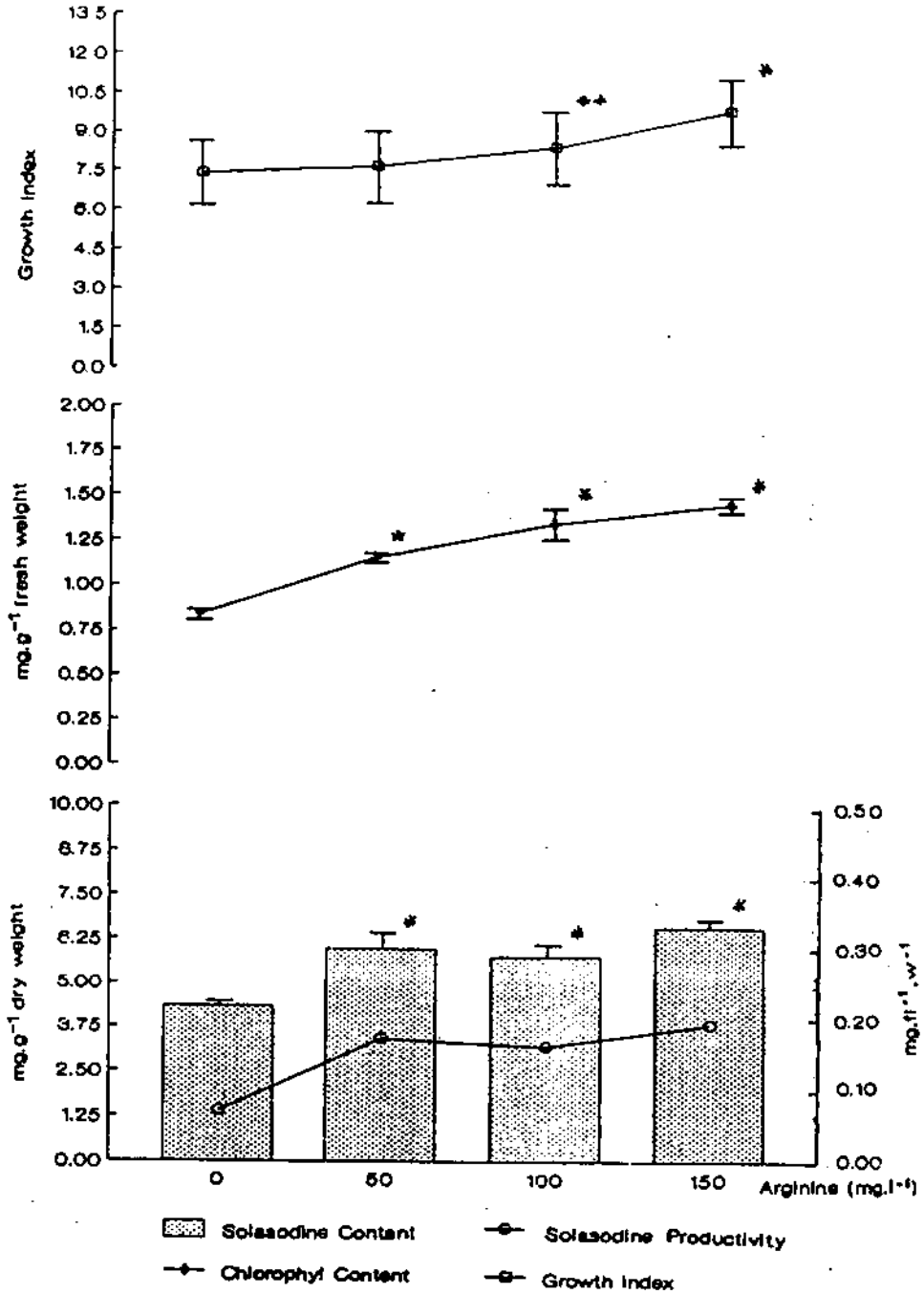
media MSK = media A-0, CS-0, BP-0 dan S-30

TABEL 8 : HASIL PERHITUNGAN PRODUKTIVITAS SOLASODINA PADA KULTUR PUCUK *SOLANUM LACINIATUM* DALAM BERMACAM-MACAM MEDIA PER LAKUAN

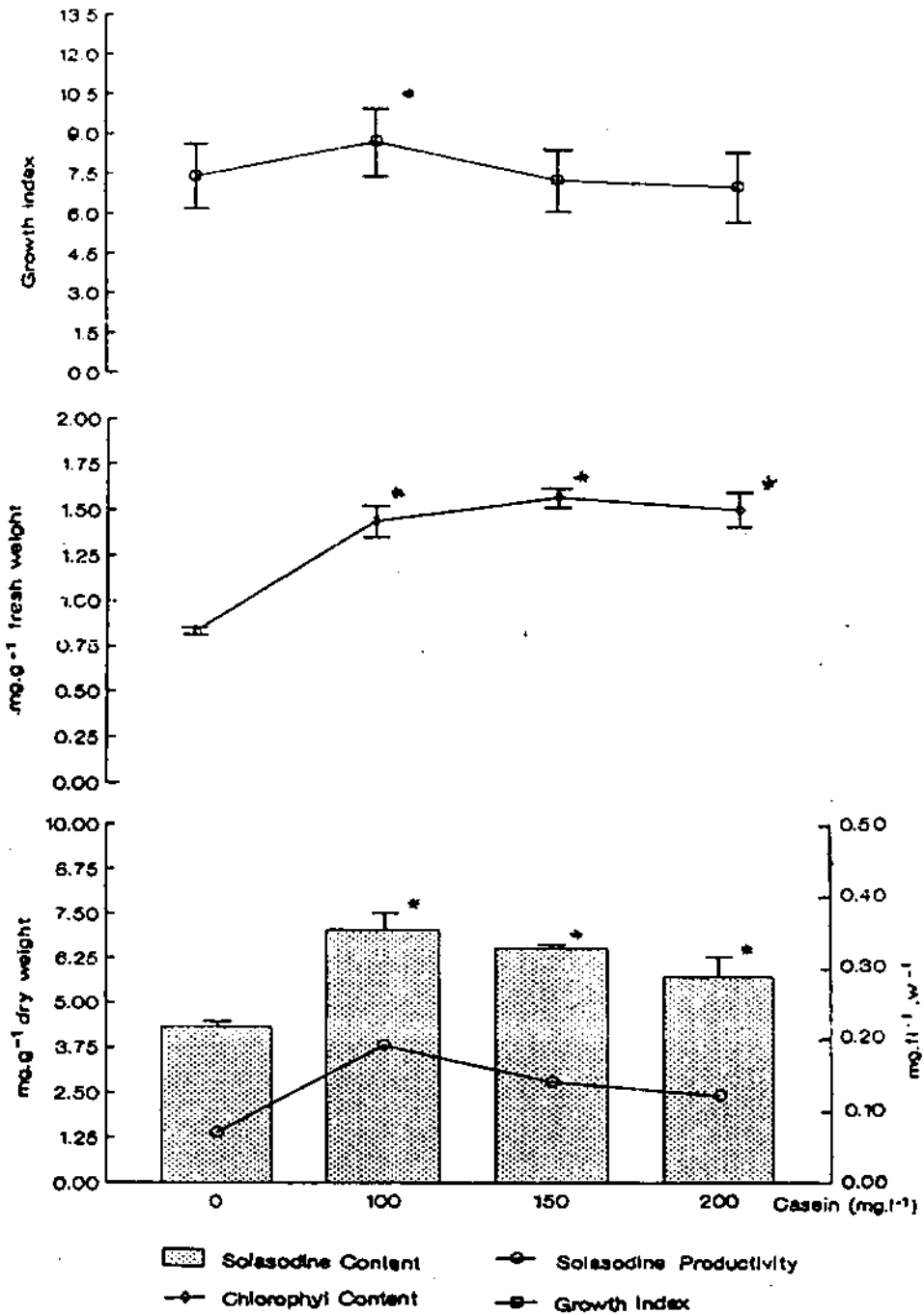
KODE MEDIA	PRODUKTIVITAS SOLASODINA (mg.fl ⁻¹ .w ⁻¹)
MSK	0,07
A-50	0,17
A-100	0,16
A-150	0,19
CS-100	0,19
CS-150	0,14
CS-200	0,12
BP-3	0,18
BP-6	0,19
BP-8	0,14
S-0	0,07
S-10	0,14
S-15	0,13
S-20	0,12

Keterangan :

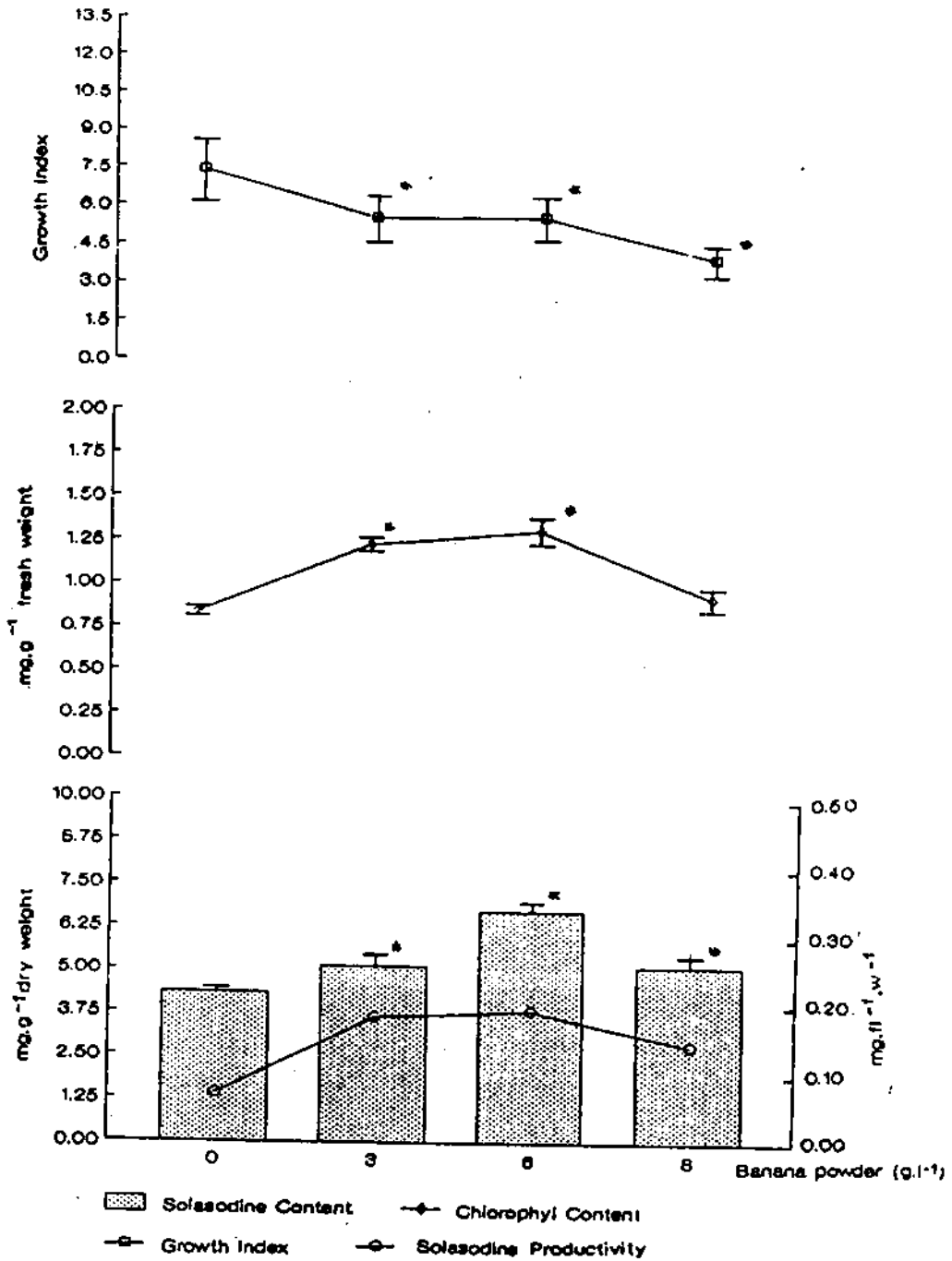
media MSK = media A-0, CS-0, BP-0
dan S-30



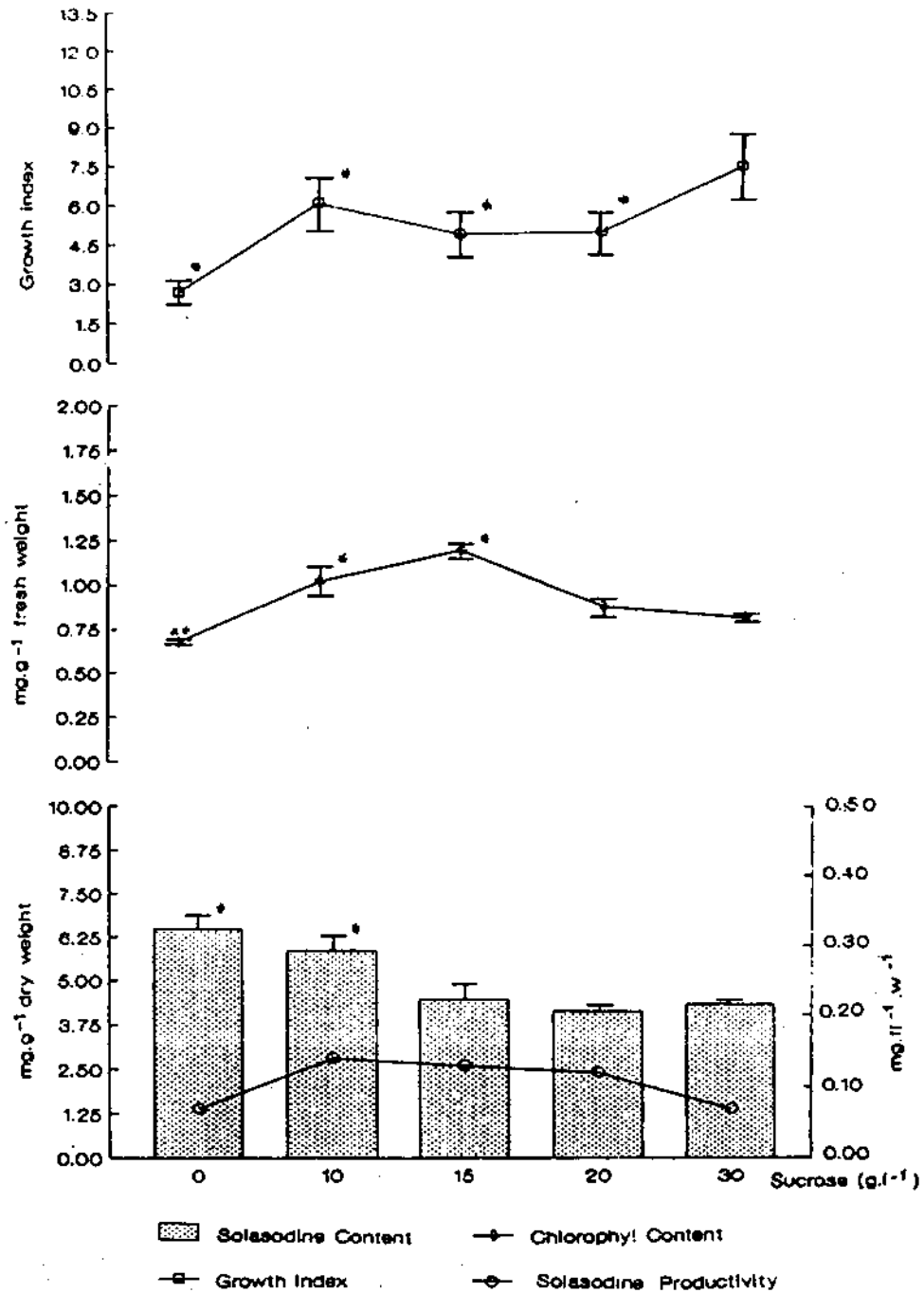
Gambar 20 : Pengaruh L-Arginin terhadap Kadar dan Produktivitas Solasodina, Kadar Relatif Klorofil, serta Indeks Pertumbuhan. * berbeda pada P = 99 % dan ** berbeda pada P = 95 % terhadap 0⁺ (media MSK).



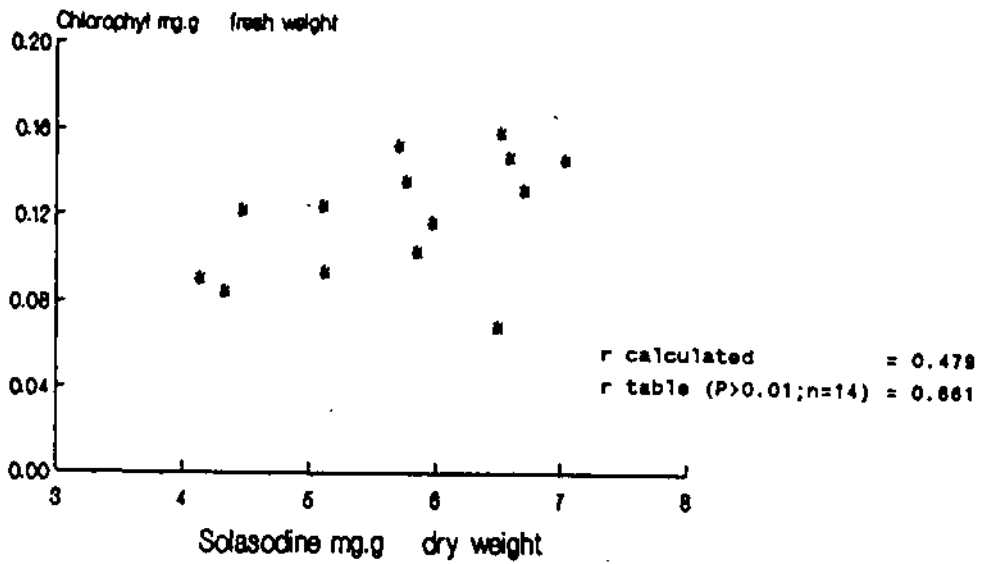
Gambar 21 : Pengaruh Kasein hidrolisat terhadap Kadar dan Produktivitas Solasodina, Kadar Relatif Klorofil, serta Indeks Pertumbuhan. * berbeda pada P = 99 % dan ** berbeda pada P = 95 % terhadap 0⁺ (media MSK).



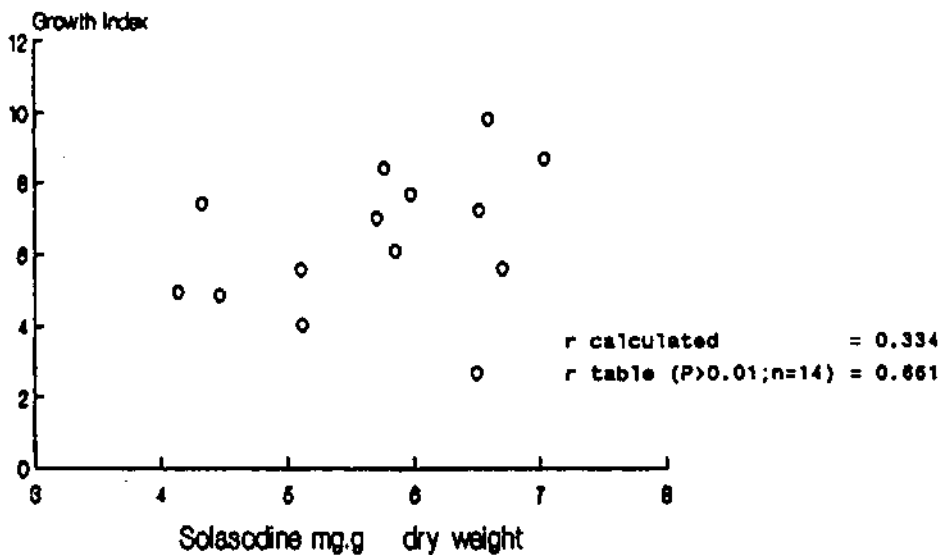
Gambar 22 : Pengaruh Tepung Pisang terhadap Kadar dan Produktivitas Solasodina, Kadar relatif Klorofil serta Indeks Pertumbuhan. * berbeda pada P = 99 % dan ** berbeda pada P = 95 % terhadap 0⁺ (media MSK).



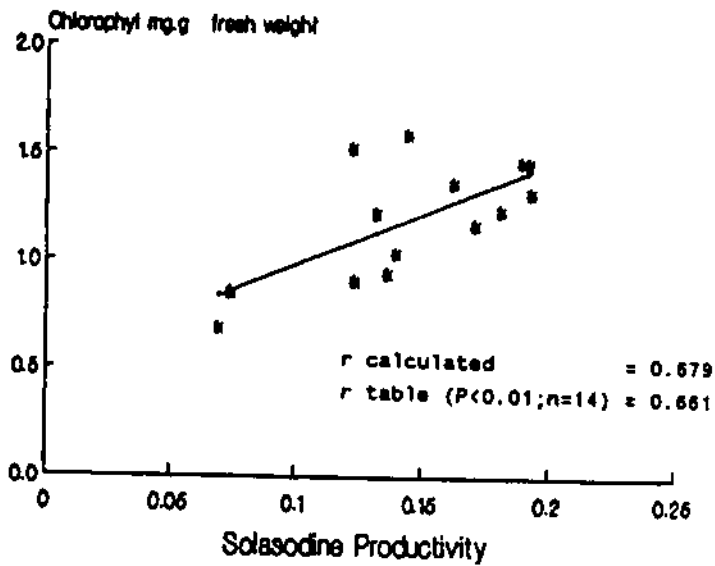
Gambar 23 : Pengaruh Sakarosa terhadap Kadar dan Produktivitas Solasodina, Kadar relatif Klorofil, serta Indeks Pertumbuhan. * berbeda pada P = 99 % dan ** berbeda pada P = 95 % terhadap 30⁺ (media MSK).



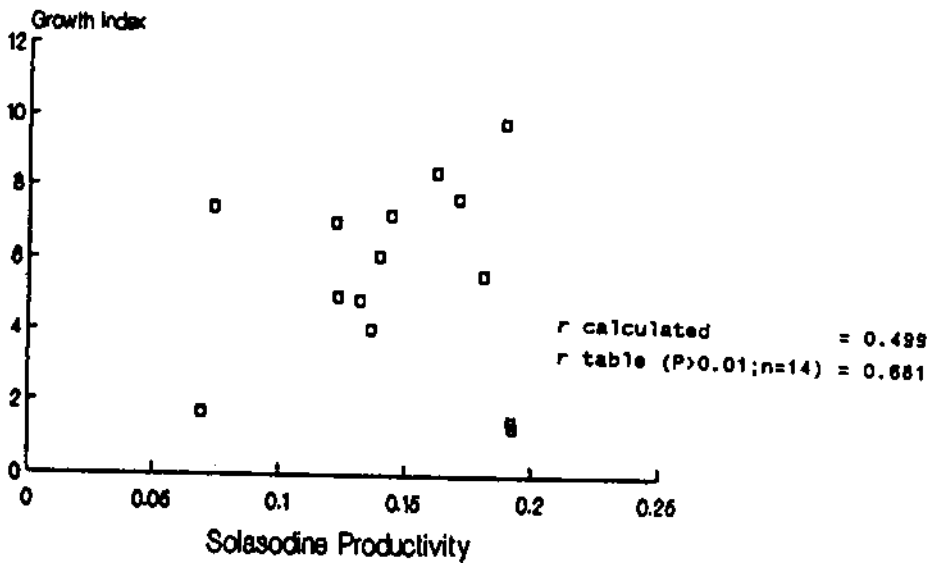
Gambar 24 : Diagram sebaran antara kadar solasodina dengan kadar relatif klorofil dalam kultu pucuk *Solanum laciniatum* dalam berbagai media perlakuan.



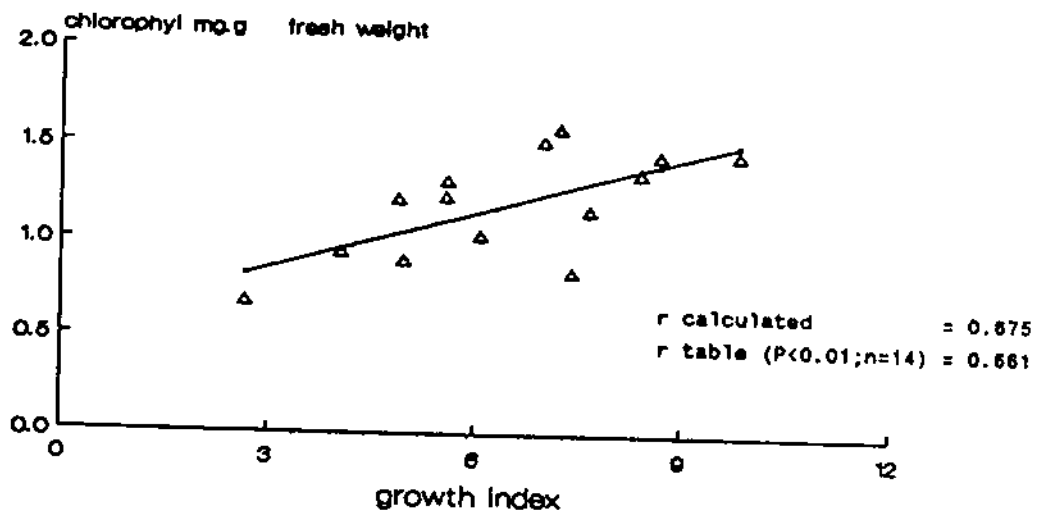
Gambar 25 : Diagram sebaran antara kadar solasodina dengan indeks pertumbuhan pada kultur *Solanum laciniatum* dalam berbagai media perlakuan.



Gambar 26 : Kurva korelasi antara produktivitas so- lasodina dengan kadar relatif klorofil pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* dalam berbagai media perlakuan.



Gambar 27 : Diagram sebaran antara produktivitas so- lasodina dengan indeks pertumbuhan pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* dalam berbagai media perlakuan.



Gambar 28 : Kurva korelasi antara indeks pertumbuhan dengan kadar relatif klorofil pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* dalam berbagai media perlakuan.

BAB V

PEMBAHASAN

Semua kultur pucuk hasil panen dari berbagai macam media perlakuan yang berumur 4 minggu, ditentukan indeks pertumbuhan dan kadar relatif klorofilnya. Selanjutnya dikeringkan dibawah lampu sampai kering. Kemudian diserbuk dan ditentukan susut keringnya sampai diperoleh susut pengeringan < 2 %.

Untuk mendapatkan hasil pemisahan dengan metode KLT yang terbaik dilakukan optimalisasi fase gerak menggunakan beberapa campuran fase gerak yaitu : kloroform-metanol = 19 : 1 (E), kloroform-metanol = 19 : 3 (F), heksan-etilasetat-dietilamin = 70 : 20 : 10 (G), kloroform-metanol-dietilamin = 20 : 2 : 0,5 (H) dan kloroform-metanol-dietilamin = 20 : 2 : 0,75 (I). Diperoleh kromatogram KLT seperti pada gambar 8.

Bercak solasodina ekstrak fraksi hidrolisat pada kromatogram KLT menggunakan fase gerak E, terjadi "tailing" pemisahan tidak baik, ada bercak lain yang menumpuk. Bercak solasodina ekstrak fraksi hidrolisat pada kromatogram KLT menggunakan fase gerak F, pemisahan lebih baik tetapi masih tetap terjadi "tailing". Bercak solasodina ekstrak fraksi hidrolisat pada kromatogram

KLT menggunakan fase gerak G bercak yang diperoleh sudah bulat, tetapi ketika diamati lebih lanjut dengan alat TLC-Scanner ternyata bercak tersebut tidak murni, didapatkan profil spektra panjang gelombang yang berbeda dengan profil spektra panjang gelombang standar solasodina (gambar 9). Bercak solasodina ekstrak fraksi hidrolisat pada kromatogram KLT menggunakan fase gerak H dan I yang di peroleh bulat, pada pengamatan kemurnian bercak dengan alat TLC-Scanner diperoleh profil spektra panjang gelombang yang sama dengan profil panjang gelombang standar solasodina. Pemisahan pada metode KLT dengan fase gerak H lebih baik dari pada pemisahan pada metode KLT dengan fase gerak I. Maka pada analisa dengan metode KLT selanjutnya digunakan fase gerak H.

Untuk mendapatkan hasil ekstraksi yang terbaik dilakukan optimalisasi metode hidrolisis, dengan cara membandingkan beberapa metode hidrolisis yaitu ; metode hidrolisis Van Gelder,(1989) yang dimodifikasi, metode hidrolisis sapogenin steroid yang dilakukan Indrayanto et al., 1993, metode hidrolisis Carle,(1979) dan metode hidrolisis Carle,(1979) dengan pemanasan 100°C. Hasilnya (ekstrak fraksi hidrolisat) diamati dengan metode KLT, didapatkan kromatogram KLT seperti pada gambar 10.

Pada ekstrak fraksi hidrolisat hasil ekstraksi menggunakan metode hidrolisis Van Gelder,(1989) yang

dimodifikasi (VG), diperoleh solasodina dan timbul bercak yang memiliki warna dan R_f sama dengan standar solasodiena. Karena kloroform yang ditambahkan selama proses hidrolisa menguap. Kemungkinan yang terjadi tidak ada yang menangkap solasodina yang didapat sehingga mengalami pengeluaran air dari molekul menjadi solasodiena. Pada Ekstrak fraksi hidrolisat hasil ekstraksi menggunakan metode hidrolisis sapogenin steroid yang dilakukan Indrayanto et al,(1993) (A) dan metode Carle,(1979) dengan pemanasan 100°C (C^*), juga timbul solasodiena. Kemungkinan pada kedua metode tersebut proses hidrolisa terlalu kuat sehingga solasodina mengalami pengeluaran air dari molekulnya. Sedangkan pada ekstrak fraksi hidrolisat hasil ekstraksi menggunakan metode Carle,1979 (C), didapatkan solasodina dan tidak didapatkan solasodiena. Maka dari hasil optimalisasi metode hidrolisis yang dilakukan dipilih metode hidrolisis terbaik yaitu metode hidrolisis Carle,1979.

Ekstraksi terhadap serbuk kering kultur pucuk *Solanum laciniatum* dilakukan menurut metode Carle, (1979) dan Indrayanto,(1993) yang dimodifikasi.

Pada serbuk kering kultur pucuk *Solanum laciniatum*, mula-mula dilakukan ekstraksi untuk menghilangkan klorofil dan sterol bebas menggunakan kloroform. Residu dihidrolisa untuk melepaskan solasodina dari glikosida-

nya. Setelah dingin dibasakan dengan NaOH 10. N sampai pH 10 untuk mengendapkan solasodina, diencerkan dengan air suling, kemudian diekstraksi dengan kloroform. Lapisan kloroform (ekstrak fraksi hidrolisat) dipisahkan kemudian dikeringkan dalam suhu kamar.

Untuk analisa kualitatif solasodina, ekstrak fraksi hidrolisat dalam kloroform, ditotolkan pada lempeng KLT Kieselgel 60 F₂₅₄ dan dieluasi menggunakan campuran kloroform-metanol-dietilamin (20 : 2 : 0,5). Selanjutnya disemprot dengan penampak bercak anisaldehyd-asamsulfat dipanaskan (dalam oven 100 - 110°C, 10 menit). Pada kromatogram KLT (gambar 8) didapat 4 bercak, bercak ke 2 dari bawah searah eluasi berwarna biru abu-abu dan memiliki R_f (0,47) yang sama dengan standar solasodina (SIGMA). Pada pengamatan spektra panjang gelombang dengan TLC-Scanner memiliki panjang gelombang maksimum yang sama dengan standar solasodina yaitu 385 nm. Sedangkan bercak nomor 3 (hijau kuning) memiliki R_f (0,68) yang sama dengan diosgenin (hijau kuning) dan Kolesterol (ungu), sehingga perlu dicurigai adanya steroid lain.

Isolasi solasodina pada ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* dilakukan dengan metoda KLT preparatif menggunakan lempeng Kieselgel 60 F₂₅₄ dan eluen kloroform-metanol-dietilamin (20 : 2 : 0,5), bercak nomor 2 dari bawah searah eluasi (yang diduga

mengandung solasodina) dikerok, diultrasonic dalam pelarut kloroform selama 5 menit, kemudian disentrifugasi (3750 rpm, 5 menit), dan disaring. Diulangi 3 kali, isolat dalam kloroform dikumpulkan dan dikeringkan. Kemudian dianalisa dengan alat MS JEOL JMS DX 303 dan JASCO FT-IR 5300, spektra yang dihasilkan identik dengan spektra dari standar solasodina, yaitu :

Pada spektra massa dihasilkan fragmentasi solasodina pada m/z [Indrayanto et al,1994],

$$413 = M^+$$

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

$$271 = C_9H_{27}NO^+$$



Pada spektra FT-IR diperoleh puncak-puncak serapan pada bilangan gelombang (Cm^{-1}) [Indrayanto et al,1994],

$$3455 = \text{vibrasi regang OH}$$

$$3362 = \text{vibrasi regang NH}$$

$$2843, 2967 = \text{vibrasi regang CH steroid skeleton}$$

$$1690 = \text{vibrasi regang C=C}$$

$$1675 = \text{vibrasi deformasi NH}$$

$$1451, 1344 = \text{vibrasi deformasi metil}$$

$$1379 = \text{vibrasi deformasi metilen}$$

$$1060, 1239 = \text{vibrasi regang CO}$$

Penetapan kadar solasodina pada ekstrak fraksi hidrolisat kultur pucuk *Solanum laciniatum* dilakukan dengan metode densitometri menggunakan alat TLC-Scanner Shimadzu CS-930. Pada proses ini dilakukan validasi metode analisa meliputi linieritas, batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ), akurasi serta presisi. Linieritas standar solasodina diperoleh pada konsentrasi 0,4 - 1,6 µg/spot dengan koefisien korelasi (r) = 0,9989886 dan harga X_p = 0,1192375. Sedangkan batas deteksi (LOD) = 0,11 µg/spot dan batas kuantitasi (LOQ) = 0,32 µg/spot. Akurasi, diperoleh persen rata-rata recovery = 98,92 ± 2,352 % (n = 14) dan presisi diperoleh kadar rata-rata solasodina = 4,3397 ± 0,08129 mg/g berat kering (n = 10) dengan harga relative standar deviasi (RSD) = 1,87 %.

Pada tabel 7 dan gambar 20, 21, 22 dan 23, didapatkan ada pengaruh L-arginin, kasein hidrolisat, tepung pisang dan sakarosa terhadap kandungan solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* pada P = 99 %.

Pada gambar 20 dan 21, penambahan L-arginin dan kasein hidrolisat dapat meningkatkan kandungan solasodina dalam kultur pucuk *Solanum laciniatum*. Keberhasilan L-arginin dan kasein hidrolisat mempengaruhi produksi solasodina kemungkinan karena adanya enzim yang sesuai sebagai katalis masuknya unsur N dari L-arginin dan

kasein hidrolisat kedalam struktur molekul dari solasodina. Diketahui biosintesis metabolit sekunder melibatkan enzim-enzim tertentu (Whitaker et al, 1986). Sebagaimana pada studi biosintesis solanidina dalam kultur tunas *Veratrum grandiflorum*, sumber nitrogen dari L-arginin lebih disukai dari pada sumber nitrogen anorganik, sedangkan asam amino lain (serin, Thyrosin, valin, lysin) tidak dimanfaatkan (Kaneko et al, 1976).

Kadar solasodina tertinggi ($6,58 \pm 0,1927$ mg/g berat kering) $\pm 1,5$ kali kadar solasodina ($4,32 \pm 0,1083$ mg/g berat kering) pada media MSK, diperoleh pada konsentrasi L-arginin 150 mg/l (P = 99 %). Sedangkan pada penambahan kasein hidrolisat, kadar solasodina tertinggi ($7,03 \pm 0,5018$ mg/g berat kering) $\pm 1,6$ kali kadar solasodina ($4,32 \pm 0,1083$ mg/g berat kering) pada media MSK, diperoleh pada konsentrasi kasein hidrolisat 100 mg/l (P = 99 %).

Produktivitas solasodina tertinggi ($0,19 \text{ mg.f1}^{-1} \cdot \text{w}^{-1}$) $\pm 2,7$ kali produktivitas solasodina ($0,07 \text{ mg.f1}^{-1} \cdot \text{w}^{-1}$) pada media tanpa L-arginin (media MSK), diperoleh pada konsentrasi L-arginin 150 mg/l. Sedangkan pada penambahan kasein hidrolisat, produktivitas solasodina tertinggi ($0,19 \text{ mg.f1}^{-1} \cdot \text{w}^{-1}$) $\pm 2,7$ kali produktivitas solasodina ($0,07 \text{ mg.f1}^{-1} \cdot \text{w}^{-1}$) pada media tanpa kasein hidrolisat (media MSK), diperoleh pada konsentrasi

kasein hidrolisat 100 mg/l.

Pada penelitian ini diketahui penambahan kasein hidrolisat dan L-arginin dapat meningkatkan kadar relatif klorofil dalam kultur pucuk *Solanum laciniatum*. Penambahan L-arginin juga meningkatkan indeks pertumbuhan dari kultur pucuk *Solanum laciniatum*, diperoleh indeks pertumbuhan tertinggi ($9,811 \pm 1,4279$) pada konsentrasi L-arginin 150 mg/l. Sedangkan pada kasein hidrolisat pengaruhnya terhadap indeks pertumbuhan tidak seberapa tampak, peningkatan indeks pertumbuhan hanya terjadi pada konsentrasi kasein hidrolisat 100 mg/l yaitu sebesar $8,682 \pm 1,3381$ ($P = 99 \%$). Pada konsentrasi kasein hidrolisat 150 dan 200 mg/l indeks pertumbuhan tidak berbeda dengan indeks pertumbuhan pada media MSK.

Pada gambar 19, penambahan tepung pisang antara 3 g/l - 8 g/l dapat meningkatkan kadar solasodina dalam kultur pucuk *Solanum laciniatum* (bermakna pada $P = 99 \%$) Peningkatan kadar solasodina tertinggi diperoleh pada konsentrasi tepung pisang 6 g/l ($6,70 \pm 0,2967$ mg/g berat kering) $\pm 1,55$ kali kadar solasodina ($4,32 \pm 0,10825$ mg berat kering) pada media tanpa tepung pisang (media MSK), sedangkan pada konsentrasi tepung pisang 8 g/l produksi solasodina turun lagi ($5,11 \pm 0,3093$ mg/g berat kering). Hal ini kemungkinan disebabkan pertumbuhan daun kultur pucuk *Solanum laciniatum* pada konsentra-

si tepung pisang 8 g/l terhambat, serta banyak tumbuh bonggol dan kalus. Seperti diketahui pada tanaman asal kadar solasodina dalam daun lebih besar dari pada dalam batang ataupun dalam batang (Conner, 1987). Produktivitas solasodina yang tinggi diperoleh pada konsentrasi tepung pisang 3g/l ($0,18 \text{ mg.fl}^{-1}.\text{w}^{-1}$) dan konsentrasi tepung pisang 6g/l ($0,19 \text{ mg.fl}^{-1}.\text{w}^{-1}$).

Penambahan tepung pisang pada konsentrasi 3 g/l dan pada konsentrasi 6 g/l meningkatkan kadar relatif klorofil ($1.227 \pm 0.0389 \text{ mg/g}$ berat basah) dan ($1,310 \pm 0,0737 \text{ mg/g}$ berat basah), sedangkan kadar relatif klorofil ($0,933 \pm 0,0707 \text{ mg/g}$ berat basah) pada konsentrasi tepung pisang 8 g/l tidak berbeda dengan kadar relatif klorofil pada media tanpa tepung pisang ($0,839 \pm 0,0513 \text{ mg/g}$ berat basah). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Ratna, (1990), yaitu penambahan tepung pisang dapat meningkatkan kadar klorofil dalam kultur kalus *Solanum wrightii*, perbedaan yang terjadi kemungkinan disebabkan oleh tepung pisang yang digunakan oleh Ratna, (1990), adalah tepung pisang buatan sendiri sedang pada penelitian ini digunakan tepung pisang dari SIGMA. Secara umum penambahan tepung pisang mengakibatkan penurunan indeks pertumbuhan kultur pucuk *Solanum laciniatum*.

Pada gambar 20, penurunan kadar sakarosa dalam media dari 30 g/l menjadi 20 g/l, 15g/l, 10g/l dan tanpa

sakarosa (0 g/l), pengaruhnya terhadap produksi solasodina baru terlihat pada konsentrasi 10 g/l dan tanpa sakarosa. Dimana pada keadaan tanpa sakarosa kadar solasodina naik ($6,49 \pm 0,4303$ mg/g berat kering) $\pm 1,5$ kali dari kadar solasodina pada media dengan konsentrasi sakarosa 30 g/l (media MSK) ($4,32 \pm 0,1083$ mg/g berat kering). Hasil ini sesuai dengan yang diperoleh Conner,(1987), yaitu penurunan kadar sakarosa dalam media diperoleh peningkatan kadar solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum* Ait, dalam media tanpa sakarosa kadar solasodina yang didapat ($2,23 \pm 0,06$ mg/g berat kering) ± 2 kali kadar solasodina pada media dengan kadar sakarosa 30 g/l ($1,09 \pm 0,13$ mg/g berat kering).

Produktivitas solasodina tertinggi ($0,14$ mg.fl⁻¹.w⁻¹) ± 2 kali produktivitas solasodina pada media MSK ($0,07$ mg.fl⁻¹.w⁻¹) diperoleh pada media dengan kadar sakarosa 10 g/l. Hal ini dapat dimengerti karena pada kadar sakarosa 10 g/l penghambatan pertumbuhan kultur (IP = 6,066) dibandingkan pertumbuhan kultur pada media normal (IP = 7,407) relatif kecil dari pada penghambatan pertumbuhan kultur pada media tanpa sakarosa (IP = 2,663). Peningkatan kadar solasodina pada media tanpa sakarosa mungkin disebabkan karena penambahan biomasa relatif lebih kecil, sehingga solasodina yang terbentuk tidak mengalami penyebaran.

Bila dibandingkan dengan pengaruhnya terhadap kadar relatif klorofil, maka penurunan kadar sakarosa dalam media menyebabkan meningkatnya kadar relatif klorofil dan mencapai kadar tertinggi ($1,214 \pm 0,0370$ mg/g berat basah) pada kadar sakarosa 15 g/l. Sedangkan pada keadaan tanpa sakarosa kadar relatif klorofil justru menurun ($0,676 \pm 0,0098$ mg/g berat basah) dibawah kadar pada media MSK ($0,897 \pm 0,0513$ mg/g berat basah). Hasil ini sama dengan hasil penelitian Anik,(1989), dalam kultur kalus *Solanum indicum* diperoleh kadar klorofil tertinggi pada kadar sakarosa 15 g/l dalam media. Maka dapat disimpulkan peningkatan kadar solasodina tidak hanya disebabkan oleh meningkatnya kadar relatif klorofil. Dalam hal ini peningkatan kadar solasodina lebih banyak diakibatkan oleh adanya stres nutrisi dan penghambatan pertumbuhan [Mak and Doran,1983].

Secara keseluruhan dari penelitian ini diketahui, tidak ada korelasi antara kadar relatif klorofil dan indeks pertumbuhan terhadap kadar solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*, r hitung = 0,479 dan $0,334 < r$ tabel ($P > 0,01; n=14$) = 0,661 dan r tabel ($P > 0,05; n=14$) = 0,532.

Ada korelasi antara produktivitas solasodina dengan kadar relatif klorofil, r hitung = 0,679 > r tabel ($P < 0,01; n=14$) = 0,661 dan r tabel ($P < 0,05; n=14$) =

0,532. Berarti klorofil mempengaruhi produktivitas solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*.

Tidak ada korelasi antara indeks pertumbuhan dengan produktivitas solasodina, r hitung = 0,499 < r tabel ($P > 0,01; n = 14$) = 0,661 dan r tabel ($P > 0,01; n = 14$) = 0,532. Berarti produktivitas solasodina tidak terpengaruh oleh pertumbuhan pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*.

Ada korelasi antara kadar relatif klorofil dengan indeks pertumbuhan, r hitung = 0,675 > r tabel ($P < 0,01; n = 14$) = 0,661 dan r tabel ($P < 0,05; n = 14$) = 0,532.

BAB VI

KESIMPULAN

1. Ada pengaruh L-arginin, kasein hidrolisat, tepung pisang dan sakarosa terhadap kandungan solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*.
2. Penambahan L-arginin pada konsentrasi 50 - 150 mg/l meningkatkan kadar solasodina, diperoleh kadar solasodina tertinggi ($6,58 \pm 0,1927$ mg/g berat kering) pada konsentrasi 150 mg/l ($P = 99 \%$). Produktivitas solasodina tertinggi ($0,19 \text{ mg.f1}^{-1}.\text{w}^{-1}$) $\pm 2,7$ kali produktivitas solasodina ($0,07 \text{ mg.f1}^{-1}.\text{w}^{-1}$) pada media tanpa L-arginin (media MSK), diperoleh pada media dengan konsentrasi L-arginin 150 mg/l.
3. Penambahan kasein hidrolisat pada konsentrasi 100 - 200 mg/l meningkatkan kadar solasodina, diperoleh kadar solasodina tertinggi ($7,03 \pm 0,5018$ mg/g berat kering) pada konsentrasi 100 mg/l ($P = 99 \%$). Produktivitas solasodina tertinggi ($0,19 \text{ mg.f1}^{-1}.\text{w}^{-1}$) $\pm 2,7$ kali produktivitas solasodina ($0,07 \text{ mg.f1}^{-1}.\text{w}^{-1}$) pada media tanpa kasein hidrolisat (media MSK), didapat pada media dengan kadar kasein hidrolisat 100 mg/l.

4. Penambahan tepung pisang pada konsentrasi 3 - 8 g/l meningkatkan kadar solasodina, diperoleh kadar solasodina tertinggi ($6,70 \pm 0,2967$ mg/g berat kering) pada konsentrasi 6 g/l ($P = 99 \%$). Produktivitas solasodina tertinggi ($0,19 \text{ mg.f1}^{-1}.\text{w}^{-1}$) $\pm 2,7$ kali produktivitas solasodina ($0,07 \text{ mg.f1}^{-1}.\text{w}^{-1}$) pada media tanpa tepung pisang (media MSK), diperoleh pada media dengan konsentrasi tepung pisang 6 g/l.
5. Penurunan kadar sakarosa pada konsentrasi 30 - 0 g/l, baru diperoleh peningkatan kadar solasodina pada konsentrasi 10 dan 0 g/l dan diperoleh kadar solasodina tertinggi ($6,49 \pm 0,4303$ mg/g berat kering) pada konsentrasi sakarosa 0 g/l ($P = 99 \%$). Produktivitas solasodina tertinggi ($0,14 \text{ mg.f1}^{-1}.\text{w}^{-1}$) ± 2 kali produktivitas solasodina ($0,07 \text{ mg.f1}^{-1}.\text{w}^{-1}$) pada media dengan konsentrasi sakarosa 30 g/l (media MSK), diperoleh pada media dengan kadar sakarosa 10 g/l.
6. Tidak ada korelasi antara kadar relatif klorofil dan indeks pertumbuhan terhadap kadar solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*, r hitung = 0,479 dan $0,334 < r \text{ tabel } (P < 0,01; n = 14) = 0,661$.

7. Ada korelasi antara produktivitas solasodina dengan kadar relatif klorofil, r hitung = 0,679 > r tabel ($P < 0,01; n = 14$) = 0,661.

8. Tidak ada korelasi antara indeks pertumbuhan dengan produktivitas solasodina, r hitung = 0,499 < r tabel ($P < 0,01; n = 14$) = 0,661.

9. Ada korelasi antara kadar relatif klorofil dengan indeks pertumbuhan, r hitung = 0,675 > r tabel ($P < 0,01; n = 14$) = 0,661.

BAB VII

SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pengaruh sumber karbon dan sumber nitrogen yang lain terhadap kandungan solasodina pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kadungan steroid yang lain pada kultur pucuk *Solanum laciniatum*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anik, S., (1989), Usaha Percobaan Induksi Pembentukan Solasodina pada Kalus *Solanum indicum*, Skripsi Fakultas Farmasi Unair, Surabaya
- Bhatt, et al., (1983), Studies on Some Factors Affecting Solasodine Contents in Tissue Cultures of *Solanum Nigrum*, *Physiol. Plant*, 57, 69-72
- Blunden, G., Hardman, R. and Morrison, J.C., (1987), Quantitative Estimation of Diosgenin in *Dioscorea* Tubers by Densitometric Thin Layer Chromatography, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56, 8, 948-950.
- Carle, R., (1979), Untersuchungen zur Steroid Alkaloid und Sapogenin F\u00fchrung in Pflanzen und Zalkulturen der Gattung *Solanum L.*, Dissertation
- Carr, G.P. and Wachlich, J.C., (1990), A Practical Approach to Method Validation in Pharmaceutical Analysis. In : *Journal of Pharmaceutical & Biochemical Analysis*, Vol. 8, Nos 8-12, 613-618
- Chadler, S.F. and Dodds, J.H., (1983) The Effect of Phosphate, Nitrogen and Sucrose on The Production of Phenolics and Solasodine in Callus Culture of *Solanum laciniatum*, *Plant Cell Report*, 2, 205-208
- Chandler, S.F. and Dodds, J.H., (1993), Solasodine Production in Rapidly Proliferating Tissue Cultures of *Solanum laciniatum* Ait, *Plant Cell Reports*, 2, 69-72.
- Conner, A.J., (1987), Differential Solasodine Accumulation in Photoautotrophic and Heterotrophic Tissue Culture of *Solanum laciniatum*, *Phytochemistry*, Great Britain, 26, 10, 2749-2750.
- Dixon, R.A., (1985), Isolation and Maintenance of Callus and Cell Suspension Culture In ; Dixon, R.A. (Ed) *Plant Cell Culture, a Practical Approach*, IRL Press, Oxford - Washington DC , 1-20
- Dyatmiko, W., Zaini, N.C., (1976), Penggunaan Kromatografi Lapisan Tipis Dalam Analisa Semplicia, Kursus Penyegar Fakultas Farmasi, UNAIR, Surabaya

- Emke, A. and Eilert, U., (1986), Steroid Alkaloids in Tissue Cultures and Regenerated Plants of *Solanum dulcamara*, Plant cell Report:5,31-34
- Evi, P.N.,(1992), Pengaruh ion Kalsium terhadap Kandungan Fitosteroid Kalus *Agave amaniensis*, Skripsi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya
- Farmakope Indonesia,(1979), edisi III, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 807
- Groenendijk,H.,(1970), Problems in Quantitative Gas Chromatographic Analysis of Steroids on Openhole Capillary Columns. Proefschrift,1-39
- Harborne,J.B.,(1987), Metode Fitokimia, Penuntun cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Penerjemah Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Penerbit ITB, Bandung
- Heble, M.R.,et al.,(1976), Metabolism of Cholesterol by Callus Culture of *Holarrhena antidysenterica*, Phytochemistry, vol. 15, 1911-1912
- Heftmann, E.,(1973), Steroids in; Phytocemestry, organic Metabotiles,vol.II, Lawrence P. Miller, Van Nostrand Reinhold company,193-198
- Indrayanto, G., (1979), Mencari Sumber Hormon Steroid dari *Solanum* Sp yang tumbuh di Indonesia. Penelitian Pelita Fakultas Farmasi Unair, Surabaya, 1-12
- Indrayanto,G.,(1983),Steroid und Triterpene in Zellkulturen Untersuchungen mit Zellkulturen von *Solanum laciniatum* Ait., *Solanum wrightii* Beth und *Costus spesiosus* (Koen)SM. Dissertation. Universitat Tubingen
- Indrayanto,G.,(1985), Influence of Fruit Size of *Solanum wrightii* on its Solasodine Content, *Planta Medica*,5,470
- Indrayanto,G.,(1986), Prospek Kultur Jaringan Tanaman pada Bidang Farmasi, *Bulletin ISFI Jatim*, 17,(1), 12-18
- Indrayanto,G. et al,(1993), *Planta Med.*, 59,97-98

- Indrayanto, G. et al., (1994), Solasodine, submitted for Publication
- Instruction Manual, Shimadzu High Speed Thin Layer Chromato Scanner, Model CS-930
- Isnaeni, (1986), Optimalisasi Pertumbuhan Kulus dan Identifikasi Steroid dari *Solanum mammosom* L, Thesis Universitas Airlangga, Surabaya
- Kaneko, K., et al., (1976), Origin of Nitrogen in The Biosynthesis of Solanidine by *Veratrum grandiflorum*, *Phytochemistry*, vol. 15, 1391-1393
- Keil, D.F., (1993), *Solanum dulcamara* L. Der Bittersüße Nachtschatten, *Zeitschrift für Phytotherapie*, 14, 337-342
- Keislich, K., (1986), Production of Drugs by Microbial Biosynthesis and Biotransformation, *Arzneim. Forsch/ Drugs Res.* 36(1), 5, p 888-892
- Lawrence, G. M. H., (1979), *Taxonomy of Vascular Plants*, The Mac Millan Company
- Macek, T.E., (1989), *Solanum aviculare* Forst., *Solanum laciniatum* Ait. (Poroporo): In Vitro Culture and the Production of Solasodine, *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 7, Medical and Aromatic Plant II (ed by Y.P.S. Bajaj), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 443-467
- Mak, Y. and Doran, P.M., (1993), Effect of Cell-Cycle Inhibition on Synthesis of Steroidal Alkaloids by *Solanum aviculare* Plant Cells, 15, 10, 1031-1034.
- Manitto, P., (1981), *Biosynthesis of Natural Product*, Ellis Horwood Ltd., Chichester, 314-345.
- Mantell, S.H., et al., (1985), *Principles of Plant Biotechnology, An Introduction to Genetic Engineering in Plants*, Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Misawa, M., (1985), Production of Useful Plant Metabolite in : Fiescher, A., (Ed), *Advances In Biochemical Engineering/Biotechnology, Plant Cell Culture* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 59-84

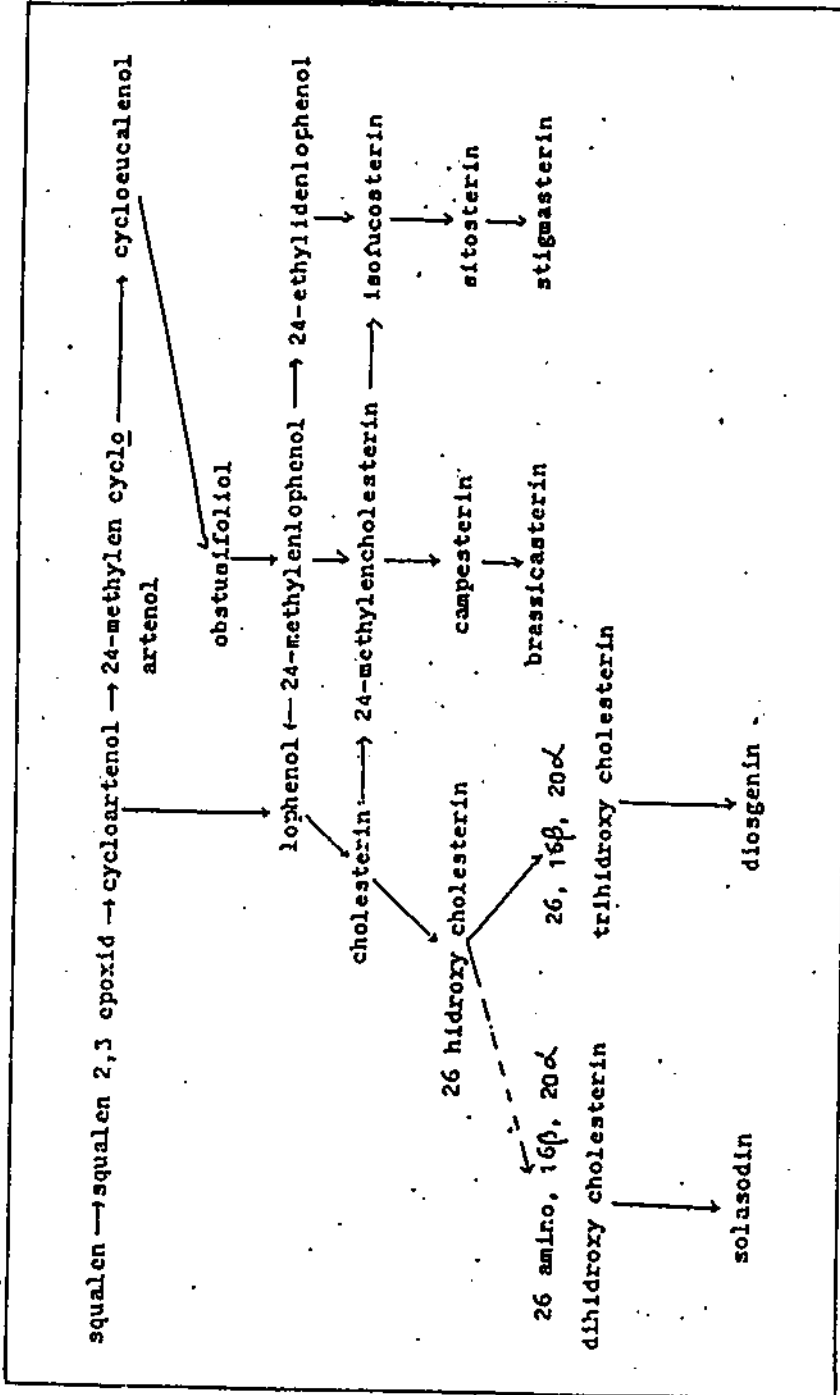
- Nabeta, K., (1993), *Solanum aculeatissimum* Jack : In Vitro Culture and the Production of Secondary Metabolites, *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 24, Medicinal and Aromatic Plants (ed. by Y.P.S. Bajaj), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 329-341.
- Nakanishi, K., et al., (1974), *Steroid, Nat. Products Chemistry*, Kodansha Ltd., Tokyo Accademic Press Inc., New York, 421-426
- Nickel, L.G., (1982), *Products In: Staba J., (ed), Plant Tissue Cultures as a Source of Biochemicals*, CRC Press
- Nigra, H.M., et al., (1989), The influence of auxins, light and cell differentiation on solasodine production by *Solanum eleagnifolium* Cav. calli, *Plant Cell Reports*, 8, 230-233.
- Nigra, H.M., et al., (1987), Production of Solasodine by calli from Different Parts of *Solanum eleagnifolium* Cav. Plants, *Plant Cell Reports*, 6, 135-137.
- Noerdin, D., (1985), *Elucidasi Struktur Senyawa Organik dengan Cara Spektroskopi Ultralembayung dan Infra-merah*, Penerbit Angkasa, Bandung
- Norris, R.D., and Lea, P.J., (1976), a Review, The Use of Amino Acid Analogues in Studies on Plant Metabolism, *Phytochemistry*, vol. 15, 585-595
- Pierik, R.L.N., (1987), *In Vitro Culture of Higher Plants*, Martinens Nijhoff Publisher
- Ratna, H., (1990), Percobaan Induksi Kalus Pembentukan Solasodina Pada Kultur kalus *Solanum wrightii* Benth, Skripsi Fakultas Farmasi Unair, Surabaya.
- Rokem, J.S., Tal, B. and Goldberg, I., (1985), Methods For Increasing Diosgenin Production By *Dioscorea* Cell In Suspension Cultures, *J. Nat. Products*, 48.2; 210-222
- Seabrook, J.E.A., (1980), *Laboratory Culture*, In: Staba E.J. (ed), *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals*, CRC Press Inc, Boca Rotan, Florida
- Segal, R., et al., (1978), Solasodine Stability under Conditions of Saponin Hydrolysis, *Journal of Pharma-*

- ceutical Sciences, 67, 8, 1169
- Stahl, E., (1969), Thin Layer Chromatography, A Laboratory Handbook, 2nd. Ed., Spinger-Verlag Berlin Hidelberg, New York, 348
- The Merck Index, (1983), An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, Merck and Co, Inc, USA, 1245
- Tisserat, B., (1985), Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration In : Dixon, P.A. (ed), Plant Cell Culture, A Practical Approach, IRL Press, Oxford-Wasington DC, p 83-90
- Tschesche, R. and Brennecke, H.R., (1980), Side Chain Fungtionalization of Cholesterol in the Boisynthesis of Solasodine in Solanum laciniatum, Phytochemistry, 19, 1449-1451.
- Tsoulpha, P. and Doran, P.M., (1991), Solasodine Production from Self-immobilised Solanum aviculare Cells, Journal of Biotechnology, 19, 99-110.
- Utami, W., dkk, (1991), Kandungan Fitosteroid dalam Kultur Kalus Agave amaniensis, Simposium Bioteknologi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Van Gelder, W.M.J., (1989), Tesis Doktor Universitas Wageningen.
- Wagner, H., Blads, S., Zgainski, E.M., (1984), Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas. Translated by Th. A. Scott., Spinger-Verlag Berlin Hidelberg, New York, 299-300
- Willard, H., Lynne, L.M.J.R., Frank, A.S.J.R., (1981), Instrumental Methods of Analysis, 6th (Ed), D. Van Nostrand Co, New York, 454-486, 515-627
- Wink, M., (1988); Physiology of the accumulation of secondary metabolite with special reference to alkaloids, in; Vasil, I.K., (ed) Cell Cultures and Somatic cell Genetic of Plats, Academic Press, vol.5
- Whitaker, R., et.al., (1986), Production of Secondary Metabolites in Plant Cell Cultures in; Biogeneration of Aroma, American Chemical Society

Witherell, D.F., (1982), Pengantar Propagasi Tanaman Secara In Vitro, penterjemah Koensoemardiyah, penerbit IKIP Semarang Press, Semarang.

Zar, J.H., (1974), Biostatistical Analysis, Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J., 153-154.

Lampiran 1



Bagan Jalur biosintesis steroid dalam tanaman
[Indrayanto, 1983]

Lampiran 2

DAFTAR LARUTAN STOK

Komponen	:	Jumlah mg/l
NH_4NO_3		165.000
KNO_3		190.000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		44.000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		37.000
KH_2PO_4		17.000
KJ		83
H_3BO_3		620
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		2.230
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		860
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		2,5
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		2,5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		2.780
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		3.730
Asam nokitinat		50
piridoksin HCl		50
Glisin		200
Thiamin HCl		10
BA		100

Lampiran 3

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

Kode Media MSK

Komponen	Jumlah mg/l
NH ₄ NO ₃	1.650
KNO ₃	1.900
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
MgSO ₄ · 4H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	340
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,20
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,30
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,60
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2,025
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,80
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37,30
MiO-inositol	100
Asam nikotinat	0,50
Piridoksin HCl	0,50
Glisin HCl	2
Thiamin HCl	0,10
Agar	7.000
Sakarosa	30.000
Hormon tumbuh :	
-Bensil adenin	4

Lampiran 4

SKEMA PEMBUATAN MEDIA PERCOBAAN

KODE MEDIA	MEDIA DASAR BA-4 TANPA SAKAROSA	KOMPONEN PERLAKUAN			
		SAKAROSA	BANANA POWDER	L-ARGININ	CASEIN H.
MSK	+	30 g	-	-	-
A-50	+	30 g	-	50 mg	-
A-100	+	30 g	-	100 mg	-
A-150	+	30 g	-	150 mg	-
CS-100	+	30 g	-	-	100 mg
CS-150	+	30 g	-	-	150 mg
CS-200	+	30 g	-	-	200 mg
BP-3	+	30 g	3 g	-	-
BP-6	+	30 g	6 g	-	-
BP-8	+	30 g	8 g	-	-
S-0	+	-	-	-	-
S-10	+	10 g	-	-	-
S-15	+	15 g	-	-	-
S-20	+	20 g	-	-	-

Keterangan :

media MSK = media A-0, CS-0, BP-0 dan S-30

Lampiran 5

SKEMA EKSTRAKSI

