

KULTUR SUSPENSI SEL MESOFIL DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica* (L.) Urban.) DAN ANALISIS KUALITATIF SENYAWA ASIATIKOSIDA

PROTOPLAST SUSPENSION CULTURE OF LEAVES MESOPHYLLOF *Centella asiatica* (L.) Urban AND QUALITATIVE ANALYSIS ASIATICOSIDE

Erma Prihastanti*, C. J. Soegihardjo**, Susiani Purbaningsih***

*Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang;

**Fakultas Farmasi, **Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

ABSTRAK

Daun pegagan digunakan sebagai obat peluruh air seni (diuretik), anti hipertensi, obat lepra, keloid, luka bakar, dan bisul. Telah dicoba kultur suspensi protoplas dari sel mesofil daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban.) dengan tiga tahap; isolasi, purifikasi, dan kultur protoplas. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh letak daun dan kadar maserosim R-10 terhadap jumlah dan daya hidup (via- bilitas) protoplas, serta pengaruh kadar sukrosa terhadap pertumbuhan protoplas dan biosintesis asiaticosida.

Rancang bangun isolasi dan purifikasi protoplas sel mesofil dilakukan dengan rancangan acak lengkap pola faktorial. Faktor pertama adalah posisi daun dan faktor kedua adalah kadar maserosim. Data yang diperoleh dianalisis dengan Anova dan uji Duncan dengan taraf kepercayaan 0,05. Pada medium pertumbuhan ditambahkan sukrosa berturut-turut dengan kadar 0, 2,5, 5, dan 7,5%. Analisis kualitatif senyawa asiaticosida dilakukan dengan cara kromatografi lapis tipis.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sel mesofil daun pegagan dapat digunakan sebagai eksplan untuk pembuatan kultur suspensi sel. Produksi biomassa yang tinggi serta viabilitas yang tinggi diperoleh dari sel yang diisolasi dari sel mesofil yang berasal dari daun kedua yang diperlakukan dengan maserosim 0,1%, yaitu $1,32 \cdot 10^7$ sel/ml). Dalam kultur suspensi sel, penambahan sukrosa ke dalam medium produksi menghasilkan *packed cells volume*(pcv) atau volume sel termampatkan dengan prosentasi lebih tinggi daripada tanpa sukrosa. Ternyata bahwa hasil pemeriksaan kualitatif produksi asiaticosida tidak hanya tergantung pada sukrosa saja, karena tanpa sukrosapun terjadi pembentukan asiaticosida.

Kata kunci: kultur suspensi sel mesofil, *Centella asiatica*, asiaticosida

ABSTRACT

Centella asiatica leaves has been used as diuretic, antihypertensi, anti leprae, skin infection, burning skin and celloid. Cells suspenson culture of mesophyll of *Centella asiatica* leaves were carried out in three steps: isolation, purification, and cell culture. The aim of this research is to investigate the influences of leaves position (age of leaves) and concentration of macerozyme R-10 for cells number and viability, and the influence of sucrose concentration for cells growth and biosynthesis of asiaticoside.

Isolation and purification of mesophyll cell has been performed using factorial completely randomized design. The first factor was leaf position (age of leaves), and the second factor was concentration of macerozyme. Collected data were analysed using Anova and Duncan's test at 0.0 – 2.5 – 5.0 and 7.5 per cent respectively. Asiaticoside produced by cell biomass were analyzed qualitatively using thin layer chromatography.

The result revealed that mesophyll cells could be used as explant for suspension culture. The highest biomass produced with highest viability were found in cells isolated from second leaves treated with 0.1% macerozyme ($1.32 \cdot 10^7$ cells/ml). Addition of sucrose to suspension culture medium produced higher packed cells volume (pcv) percentage than no sucrose was added, (0% sucrose gave pcv 8.5%, 2.5% sucrose pcv 22%, sucrose 5% pcv 21.5%, and 7.5% sucrose pcv 15.75%). The asiaticoside production not only depended on sucrose, because without any sucrose was added, the asiaticoside was also available..

Key Words: Cell suspension culture, mesophyll, *Centella asiatica* (L.) Urban, asiaticoside

PENDAHULUAN

Herba pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) merupakan tanaman obat yang hampir selalu digunakan pada industri jamu tradisional di Indonesia. Komposisi penggunaannya beragam untuk setiap merek jamu, berkisar antara 5% - 25%. Kegunaan pegagan antara lain sebagai obat peluruh air seni (diuretik), anti hipertensi, obat lepra, keloid, luka bakar, dan bisul (Pramono, 1992, Hefnawi, 1962 a, Hefnawi, 1962 b).

Pegagan mengandung banyak senyawa metabolit sekunder, diantaranya asiatikosida, asam asiatikat, madekasoida, asam madekasat, dan lain-lain (Widowati dkk., 1992). Untuk mendapatkan produk metabolit sekunder tanaman pegagan, dapat dilakukan dengan cara ekstraksi langsung dari bagian-bagian tanamannya, maupun dengan cara ekstraksi dari sel maupun kalus dari hasil kultur *in vitro*.

Kultur suspensi sel dapat diperoleh dengan cara menanam eksplan yang berupa kalus yang remah maupun dari sel-sel mesofil (Dixon, 1987). Agar dapat diperoleh kultur suspensi sel dari mesofil daun diperlukan beberapa tahapan kerja diantaranya isolasi sel dari jaringan mesofil daun, purifikasi sel, dan kultur sel. Pada saat dilakukan isolasi sel, ada beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan isolasi sel. Faktor-faktor tersebut adalah sumber eksplan, jenis, dan konsentrasi enzim pektinase, osmotikum, lama waktu inkubasi dan metode inkubasi, serta pH larutan enzim.

Pemilihan urutan daun pegagan yang akan digunakan sebagai eksplan dan penentuan enzim pektinase (maserosim R-10) yang tepat untuk isolasi sel dari daun pegagan dengan jumlah sel dan viabilitas sel yang tinggi merupakan salah satu masalah dalam penelitian ini.

Berdasarkan uraian di atas perlu dikaji lebih lanjut pengaruh urutan daun dan konsentrasi maserosim R-10 terhadap perolehan sel dan viabilitas sel. Di samping itu, perlu dikaji pula pengaruh pemberian kadar sukrosa terhadap pertumbuhan kultur suspensi sel dan terbentuknya senyawa asiatikosida.

METODOLOGI

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Fakultas Biologi dan Laboratorium Biologi Farmasi serta Laboratorium Kimia Instrumentasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Metode penelitian yang digunakan pada tahap isolasi sel adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial 3 x 4 dengan tiga ulangan. Faktor pertama adalah urutan daun (D), yaitu: D₁ = daun urutan ke-1, D₂ = daun urutan ke-2, dan D₃ = daun urutan ke-3. Faktor kedua adalah konsentrasi maserosim (E) yaitu E₀ = 0%, E₁ = 0,1%, E₂ = 0,2%, dan E₃ = 0,3%. Pemberian sukrosa pada medium produksi dengan konsentrasi 0%, 2,5%, 5%, dan 7,5%.

Bahan yang digunakan adalah tanaman pegagan *C. asiatica* yang diambil dari daerah Banyumas, dan ditanam pada rumah kaca Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Fakultas Biologi UGM. Di samping itu, diperlukan pula bahan kimia untuk sterilisasi, untuk pembuatan medium maserasi, medium purifikasi, medium Murashige dan Skoog (MS), zat pengatur tumbuh *Indol Acetic Acid* (IAA), dan *Benzyl Amino Purine* (BAP), larutan fenosafranin, maserosim R-10, dan bahan kimia untuk analisis senyawa asiatikosida.

Alat yang digunakan adalah alat untuk sterilisasi, isolasi sel, purifikasi sel, dan kultur sel, serta alat untuk analisis senyawa asiatikosida.

Penanaman eksplan

Tanaman pegagan ditanam dalam pot-pot yang berisi media tanam, dibiarkan sampai 8 minggu sehingga didapatkan daun urutan ke-1, ke-2, dan ke-3.

Sterilisasi alat dan media

Peralatan dari logam, gelas, serta plastik dan bahan-bahan untuk media maserasi, purifikasi, dan kultur disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada temperatur 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Sterilisasi maserosim disaring menggunakan kertas millipore 0,22 µm dari Whatman secara hampa udara.

Sterilisasi eksplan

Daun pegagan urutan ke-1, ke-2, dan ke-3 dicuci dengan sabun sambil disikat pelan-pelan. Dibuang tulang daunnya dengan menggunakan pisau. Daun tersebut kemudian ditimbang sebanyak 1g, lalu disterilisasi dengan cara direndam dalam larutan baiklin 10% selama 10 menit. Setelah itu dibilas dengan air suling sebanyak tiga kali.

Isolasi sel

Potongan daun pegagan yang telah disterilisasi dipotong-potong dengan ukuran kurang lebih 1 mm. Kemudian potongan daun tadi diinkubasi pada medium maserasi. Perlakuan yang dicobakan pada medium ini adalah penggunaan maserosim R-10 dengan konsentrasi 0%, 0,1%, 0,2%, dan 0,3%. Inkubasi sel dilakukan dengan pengaduk magnetik pada kecepatan rendah selama 15 menit. Untuk membuang sisa atau fragmen yang tidak tercerna disaring dengan *nylon filter*.

Purifikasi sel

Setelah sel-sel tadi dimaserasi, sel kemudian dicuci pada medium purifikasi dengan cara disentrifugasi menggunakan kecepatan 250 rpm. Sentrifugasi dilakukan sebanyak dua kali. Sel diamati viabilitasnya dengan menggunakan larutan fenosaframin 0,2%. Di samping itu juga dihitung jumlah sel (baik yang viabel maupun non viabel) dengan menggunakan *haemocytometer* pada daerah *one triple line square* (Suryowinoto, 1996).

Kultur suspensi sel

Inokulasi pada medium pertumbuhan. Setelah didapatkan sejumlah sel, kemudian dikultur pada cawan petri. Medium yang digunakan adalah medium MS dengan konsentrasi sukrosa 2,5%. Kultur tersebut diinkubasi pada suhu 25°C dan ditempatkan di atas *shaker gyrorotatory* pada kecepatan 80 rpm selama 5 hari. Dari cawan petri, sel ditransfer ke dalam 40 ml medium MS baru pada erlenmeyer. Pada tahapan ini dihitung *packed cell volume (pcv)* untuk menentukan waktu transfer ke dalam medium produksi. Perhitungan *pcv* dilakukan selama 14 hari.

Transfer sel pada medium produksi. Untuk transfer medium produksi, diambil 20 ml kultur suspensi sel dari medium pertumbuhan dan dimasukkan ke dalam 40 ml medium produksi untuk mengetahui pengaruh perlakuan kadar sukrosa pada medium kultur suspensi sel, dilakukan pula perhitungan *pcv* selama 18 hari kultur.

Penanaman sel

Sel-sel yang telah berumur 15 hari pada medium produksi disaring dengan kertas saring Whatman no.1. sel yang tidak tersaring disentrifugasi. Pellet yang didapatkan dikeringkan di atas kertas saring selama kurang lebih 10 menit. Setelah itu sel dioven pada suhu 60°C sampai mencapai berat konstan (berat kering).

Analisis asiatikosida

Setelah sampel ditimbang teliti, dilanjutkan dengan ekstraksi menggunakan metanol 70%. Analisis senyawa asiatikosida dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan sistem kromatografi lapis tipis. Untuk fase diam digunakan *silika gel GF₂₅₄* dan fase geraknya digunakan n-butanol : asam asetat glasial : air (3 : 1 : 1, v/v). sebagai standar digunakan *TECA (Titrated Extract of Centella asiatica)*.

Parameter yang diamati berupa jumlah sel, viabilitas sel, volume sel terkumpul (*pcv*), senyawa asiatikosida pada medium pertumbuhan, medium produksi (umur 7 hari dan 15 hari).

Analisis data untuk jumlah sel dan viabilitas sel digunakan analisis sidik ragam dan uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test (DMRT)* pada α 0,05 (Gomez dan Gomez, 1995). Data pertumbuhan kultur suspensi sel dan terbentuknya senyawa asiatikosida dianalisis secara kualitatif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh urutan daun dan konsentrasi maserosim terhadap perolehan sel dari proses isolasi dan purifikasi disajikan pada Tabel 1.

Tabel I. Jumlah perolehan sel setelah proses isolasi dan purifikasi (sel/ml)

Perlakuan	E ₀	E ₁	E ₂	E ₃
D ₁	1.37.10	4.58.10	7.77.10	1.37.10
D ₂	8.68.10 ⁵	1.32.10	1.18.10	1.30.10
D ₃	5.53.10 ⁵	5.04.10	5.22.10	7.22.10

Keterangan:

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama, pada kolom atau baris yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 0,05 menurut *DMRT*. D (urutan daun), E (kadar maserosim).

Dari hasil analisis sidik ragam, didapatkan bahwa perlakuan urutan daun, konsentrasi maserosim dan interaksi keduanya memberikan pengaruh nyata pada perolehan sel. Penggunaan maserosim R-10 dalam larutan maserasi mempunyai kecenderungan menaikkan jumlah perolehan sel baik pada daun urutan ke-1, ke-2, dan ke-3. Terdapat perbedaan yang nyata antara larutan yang mengandung maserosim dengan larutan yang tidak mengandung maserosim. Jumlah sel yang diperoleh lebih banyak pada larutan yang diberi maserosim baik pada konsentrasi 0,1%, 0,2%, dan 0,3% dan ada kecenderungan semakin tinggi konsentrasi maserosim semakin banyak perolehan selnya. Karena pada dasarnya peranan utama dari maserosim adalah mennguraikan lamela tengah (Bhojwani dan Razdan, 1983). Menurut Hadini (1997), total perolehan sel meningkat sejalan dengan meningkatnya kadar maserosim. Hal ini karena semakin besar kadar enzim maserosim maka semakin banyak lamela tengah sel yang terurai sehingga banyak sel-sel yang terlepas dari jaringan.

Pada perlakuan D₁E₂, D₂E₁, D₂E₂, dan D₂E₃ diperoleh jumlah sel yang lebih banyak dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal ini dimungkinkan karena daun urutan ke-1 (D₁) dan urutan ke-2 (D₂) mempunyai umur relatif lebih muda dibandingkan daun urutan ke-3 (D₃). Dengan demikian ukuran sel-selnya juga relatif lebih kecil, sehingga lamela tengah yang tergradasi lebih banyak. Menurut Seabrook (Staba, 1982), untuk mendapatkan sel dalam proses isolasi sangat tergantung pada sumber tanaman (umur bagian organ tanaman yang digunakan dan fase perkembangan). Umur tanaman sangat menentukan tingkat keberhasilan perolehan sel. Selain itu umur tanaman juga menentukan ukuran sel, bentuk sel, dan tebal tipisnya dinding sel.

Hasil pengamatan ukuran sel yang diperoleh pada daun urutan ke-1 rata-rata mempunyai lebar 10-20 µm. Sedangkan pada daun urutan ke-2 dan ke-3 mempunyai lebar 10-30 µm dengan panjang 20-50 µm. Pengukuran terhadap ukuran sel pada preparat awetan daun pegagan didapatkan bahwa pada daun urutan ke-1 mempunyai ukuran berkisar 15-50 µm, sedangkan daun urutan ke-2 dan ke-3 mempunyai ukuran sel antara 15-100 µm. Dari hasil pengukuran tersebut dapat dikatakan bahwa sel yang diperoleh melalui proses isolasi sel mempunyai ukuran yang lebih kecil jika dibandingkan dengan ukuran pada preparat daun. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi maserosim tersebut mempunyai kemampuan mendegradasi ukuran-ukuran sel-sel yang mempunyai ukuran relatif kecil. Di samping itu, pada proses isolasi sel ini diperoleh sel dengan bentuk yang relatif sama yaitu isodiametris. Selama pertumbuhannya, sel tumbuhan mempunyai ukuran yang beragam tergantung jaringan asal, spesies, dan umur tanaman (Salisbury dan Ross, 1994).

Inkubasi eksplan pada medium maserasi selama 15 menit pada semua perlakuan menunjukkan bahwa semakin tua umur daun, hasil perolehan selnya semakin sedikit. Menurut Vasil (1984), untuk melepaskan sel-sel pada daun tua dibutuhkan waktu inkubasi yang lebih lama. Pada medium maserasi yang tidak diberi maserosim (D₁E₀, D₂E₀, dan D₃E₀) ternyata juga diperoleh sejumlah sel, hal ini dikarenakan daun urutan ke-1, ke-2, dan ke-3 masih termasuk daun yang masih muda. Telah diketahui, pada roset akar selain daun ke-1, ke-2, dan ke-3, masih ada daun yang lebih tua. Dengan demikian, bila eksplan berupa jaringan atau organ yang relatif muda, masih dimungkinkan dipisahkan sel-selnya dengan menggunakan pengaduk

Erma, dkk.

magnetik. Di samping itu, proses pemotongan eksplan menjadi potongan kecil (± 1 mm) turut pula membantu pelepasan sel dari jaringan eksplan.

Pengaruh urutan daun dan konsentrasi maserosim terhadap viabilitas sel

Salah satu syarat untuk kultur suspensi sel, yaitu sel-sel yang diisolasi harus mempunyai viabilitas yang tinggi, (Tabel II).

Tabel II. Viabilitas sel mesofil daun pegagan *Centella asiatica* (%)

Perlakuan	E ₀	E ₁	E ₂	E ₃
D ₁	97,43	97,57	94,39	93,54
D ₂	100	100	99,77	99,76
D ₃	100	100	100	98,55

Keterangan:

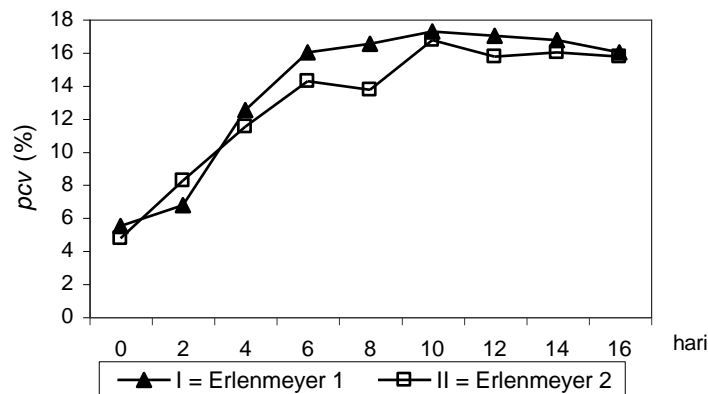
Angka yang diikuti oleh huruf yang sama, pada kolom atau baris yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 0,05 menurut *DMRT*. D (urutan Daun), E (konsentrasi maserosim).

Dari hasil analisis diperoleh viabilitas sel berkisar antara 93,54% - 100%. Pada daun urutan ke-1 (D₁) semakin tinggi konsentrasi maserosim, yaitu pada konsentrasi 0,2% dan 0,3% mempunyai kecenderungan berkurang viabilitas sel-selnya. Seperti diketahui, viabilitas sel sangat ditentukan oleh teknik pemisahan, keadaan fisiologi sel, dan keadaan saat mengisolasi. Viabilitas sel yang relatif tinggi pada isolasi sel mesofil pegagan ini dimungkinkan karena lama inkubasi dalam medium maserasi relatif singkat yaitu 15 menit serta penggunaan pengaduk magnetik yang pelan dan sentrifugasi dengan kecepatan relatif rendah yaitu 250 rpm. Menurut Kao *et al.* (1974), konsentrasi enzim yang tinggi dengan waktu inkubasi yang lama dapat mempengaruhi viabilitas sel karena dapat merusak membran.

Dilihat dari jumlah perolehan sel (Tabel I) dan dari penghitungan viabilitas sel, maka untuk kultur sel mesofil daun pegagan sebenarnya dapat digunakan daun urutan ke-1 dan ke-2, pada konsentrasi enzim 0,1%, 0,2%, dan 0,3%, tetapi dengan pertimbangan untuk mendapatkan viabilitas sel yang tinggi, maka daun urutan ke-2 dan konsentrasi maserosim 0,1% yang digunakan pada percobaan selanjutnya.

Pertumbuhan kultur suspensi sel

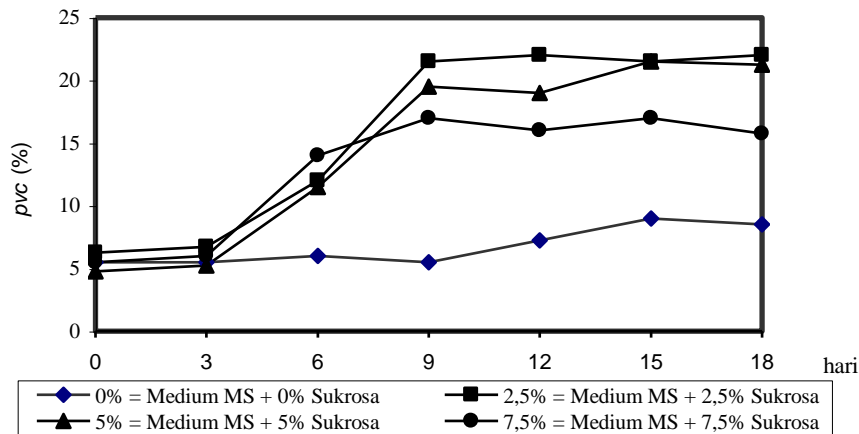
Medium pertumbuhan. Setelah sel berhasil diisolasi, kemudian sejumlah sel dikulturkan dalam medium. Untuk mengetahui pertumbuhan sel dilakukan pengukuran *pvc* atau volume sel terkumpul yang dinyatakan dengan persentase. Hasil perhitungan *pvc* pada medium pertumbuhan (Gambar 1), terdiri dari kumpulan sebanyak 200 sel yang berdiameter 2 mm.



Gambar 1. Prosentase *pvc* pada medium pertumbuhan sel mesofil *C. asiatica*

Keadaan ini sangat dipengaruhi oleh asal sel, formula media, dan umur kalus. Untuk menentukan waktu perpindahan dari medium pertumbuhan ke medium produksi dipilih hari ke-10. Di samping karena tidak terjadi penambahan persentase *pvc* sel-selnya juga relatif banyak yang *viable*.

Medium produksi. Hasil perhitungan *pvc* pada medium produksi disajikan pada gambar 2. Pada gambar 2 terlihat bahwa antara hari ke-0 sampai hari ke-3 terlihat garis putus-putus, hal itu disebabkan kultur selnya mulai hari ke-3 merupakan kultur yang “independen”.



Gambar 2. Persentase *pvc* pada medium produksi sel mesofil *C. asiatica*

Hasil pemindahan inokulum ke dalam medium produksi menunjukkan adanya pertumbuhan sel dalam kultur sel tersebut. Hal ini ditunjukkan dengan kenaikan *pvc* untuk masing-masing perlakuan. Pada medium yang ditambahkan sukrosa (2,5%, 5%, dan 7,5%) persentase *pvc* lebih besar dibandingkan dengan medium tanpa penambahan sukrosa. Dari kenyataan tersebut dapat dikatakan bahwa penambahan sukrosa dapat meningkatkan pertumbuhan sel. Pertumbuhan sel berlangsung lambat pada medium dengan kadar gula yang rendah (Huseman, 1984). Komatsu *et al.* (1996) menyatakan bahwa pada medium kultur terjadi perubahan dari autotropik ke heterotropik, sehingga penambahan gula sebagai sumber karbon menjadi penting. Selanjutnya George dan Sherington (1984) menyatakan pula bahwa kadar optimum sukrosa pada kultur *in vitro* sangat tergantung pada jenis tanaman dan metode kultur. Pertumbuhan dan perkembangan eksplan akan meningkat bila kadar gula yang diberikan pada kadar optimum dan akan menurun bila kadar gula terlalu tinggi. Pada umumnya kadar gula yang efektif berkisar antara 2-4 g/liter.

Analisis kualitatif senyawa asiatikosida

Dari hasil analisis kualitatif biomasa dari kultur suspensi sel pada medium pertumbuhan dan medium produksi, serta ekstrak daun urutan ke-2, dan ekstrak daun tua (urutan ke-6) serta larutan TECA yang dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis dengan fase diam silikagel GF₂₅₄ dan fase gerak n-butanol-asam asetat glasial-air (5:1:4,v/v), (Tabel III).

Dari hasil deteksi dengan pereaksi semprot asam sulfat dalam metanol senyawa asiatikosida dari pembanding TECA didapatkan bercak dengan Rf 0,63 (biru keunguan) dan Rf 0,85 (kekuningan). Bercak pertama diduga asiatikosida. Kromatogram lapis tipis ekstrak daun ke-2 menghasilkan enam bercak. Namun demikian, dari keenam bercak tersebut tidak ada yang sama dengan asiatikosida. Hal ini dapat terjadi karena kemungkinan belum terbentuknya asiatikosida dalam daun ke-2 tersebut, karena daun tersebut masih dalam tahap pertumbuhan linier sehingga belum terjadi metabolisme sekunder atau kemungkinan lain, yaitu sudah terbentuk asiatikosida namun jumlahnya sangat kecil sehingga tidak dapat dideteksi dengan metode KLT. Analisis kualitatif dengan metode KLT untuk biomasa yang berasal dari medium pertumbuhan juga tidak

Erma, dkk.

ditemukan asiaticosida, namun ditemukan bercak bewarna biru keunguan dengan R_f 0,57 dan 0,71. Bercak tersebut diduga senyawa yang sekerabat dengan asiaticosida. Kultur suspensi sel pada medium pertumbuhan belum menghasilkan asiaticosida mungkin karena senyawa asiaticosida baru terbentuk pada fase stasioner atau akhir fase pertumbuhan linier.

Tabel III. Daftar harga R_f dan warna bercak pada kromatogram KLT dilat dengan UV 365 nm

Sumber		R _f	Pereaksi asam sulfat 5% Dalam metanol
Standar TECA		0,63a 0,85	Biru keunguan Kekuningan
Daun ke 2		0,41 0,53 0,57 0,68 0,78 0,88	Kuning coklat Coklat Hijau Coklat Coklat kekuningan Merah bata
Suspensi sel dalam medium produksi selama 15 hari	Ulangan I	0,75 0,56 0,71	Biru keunguan Biru keunguan Biru keunguan
	II	0,31 0,44 0,56 0,71	Hijau kecoklatan Hijau kecoklatan Biru keunguan Biru keunguan
	III	0,31 0,56 0,71	Hijau kekuningan Biru keunguan Biru keunguan
	IV	0,31 0,56 0,71	Hijau Biru keunguan Biru keunguan
	Kadar Sukrose		
Suspensi sel dalam medium produksi umur 7 hari	0 %	0,75	Biru keunguan
	2,5 %	0,25 0,63 a 0,69	Hijau Biru keunguan Biru keunguan
	5 %	0,31 0,63 a 0,69	Hijau Biru keunguan Biru keunguan
	7,5 %	0,19 0,31	Hijau kecoklatan Hijau kecoklatan
Suspensi sel dalam medium produksi umur 15 hari	0 %	0,63 a 0,69 0,85	Hijau Biru keunguan Biru keunguan
	2,5 %	0,63 a 0,69 0,71	Biru keunguan Biru keunguan Biru keunguan
	5 %	0,38 0,63 a	Hijau Biru keunguan
	7,5 %	0,38 0,63 a 0,69	Hijau Biru keunguan Biru keunguan

Catatan: Tanda huruf **a**, menunjukkan adanya senyawa **asiatikosida** dilihat dengan UV 365 nm

Pada perhitungan *pvc* pada umur sepuluh hari pada medium pertumbuhan, sel-selnya baru memasuki fase stasioner dan pada penelitian ini tidak diketahui kapan fase stasioner ini berakhir. Menurut Soegihardjo (1993), metabolit sekunder pada fase pertumbuhan yang berjalan cepat sering belum diproduksi. Setelah fase pertumbuhan berakhir atau mulai permulaan fase stasioner, metabolit sekunder baru diproduksi.

Analisis kualitatif senyawa asiaticosida dengan metode KLT untuk biomasa yang berasal dari kultur suspensi sel dalam media produksi dan yang berumur tujuh hari didapatkan senyawa dengan Rf yang sama dengan asiaticosida, yaitu pada penambahan sukrosa 2,5 dan 5%. Memasuki hari ke-15 didapatkan senyawa asiaticosida pada semua perlakuan baik tanpa penambahan sukrosa maupun dengan penambahan sukrosa (2,5, 5, dan 7,5%) dalam medium produksi (Tabel III). Hal ini menunjukkan bahwa sukrosa bukan satu-satunya faktor penentu untuk biosintesis asiaticosida. Morris *et al.* (1987) menyatakan bahwa faktor yang berpengaruh dalam pembentukan metabolit sekunder adalah (a) komposisi medium, dan (b) keadaan lingkungan, antara lain intensitas dan kualitas pencahayaan, kecepatan penggojogan, suhu inkubasi, pH, dan sebagainya. Di samping itu pada kultur suspensi sel tidak dilakukan sinkronisasi sel-selnya, sehingga kondisi sel secara individual ada yang sama ada yang berbeda. Biomasa dari medium produksi yang dipanen setelah 15 hari jika dilihat grafik pertumbuhannya (Gambar 2) sampai hari ke-18 masih dalam fase stasioner, sehingga kisaran waktu panen dapat ditentukan. Menurut Tyler *et al.* (1976) pembentukan metabolit sekunder dipengaruhi oleh faktor keturunan (komposisi gen), ontogeni (tahap perkembangan), dan lingkungan. Faktor keturunan menimbulkan dua macam perubahan yang disebabkan oleh pengaruh tahap perkembangan dan lingkungan. Faktor keturunan menimbulkan dua macam perubahan, yaitu perubahan secara kualitatif dan kuantitatif, sedangkan perubahan yang disebabkan oleh pengaruh tahap perkembangan dan lingkungan utamanya bersifat kuantitatif.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut.

Umur daun dan kadar maserosim mempengaruhi perolehan jumlah dan viabilitas sel. Pada daun ke-2 dengan kadar maserosim 0,1% memberikan jumlah sel dan viabilitas tertinggi, berturut-turut $1,32 \cdot 10^7$ sel/ml dan 100%.

Penambahan sukrosa pada medium produksi menghasilkan volum sel terkumpul (*pvc*) lebih tinggi dibandingkan dengan medium tanpa sukrosa. Tanpa sukrosa menghasilkan *pvc* sebesar 8,5%, dengan sukrosa 2,5%, 5%, dan 7,5% menghasilkan *pvc* berturut-turut sebesar 22, 21,5, dan 15,75%.

Secara kualitatif asiaticosida pada kultur suspensi sel mesofil *C. asiatica* dapat terbentuk pada medium produksi dengan atau tanpa penambahan sukrosa.

DAFTAR PUSTAKA

- Bhojwani, S.S., and Razdan, M.K., 1983, *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, Elsevier Publishing Company, Inc., New York.
- Dixon, R.a., 1987, *Plant Cell Cultures-A Practical Approach*, Dept. of Biochemistry, Royal Holloway College.
- George, E.F. and Sherrington, F.D., 1984, *Plant Propagation by Tissue Culture*, Handbook and Directory of Commercial Laboratories, Exergetics Ltd., England.
- Gomez, K.A. and Gomez, A.A., 1995, *Prosedur Statistik untuk Penelitian Pertanian*, Diterjemahkan oleh Susilo H., UI Pres, Jakarta.
- Hadini, H., 1997, Hibridisasi somatik pisang ambon dan kavendis secara *in vitro*, *Tesis*, Program Pasca Sarjana UGM, Yogyakarta.
- Hefnawi, H.E., 1962A, Treatment of Keloid with Asiaticoside, *Dermatologica*, **124**: 387-392, Dermatology Department, Cairo University, Cairo.
- Hefnawi, H.E., 1962B, Madecassol in the Treatment of Chronic Ulcers, *Egyptian Medical Association*, **45**: 7-8.
- Huseman, W., 1984, Photoautotrophic Cell Cultures, in: *Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants* (Vasil, I.K., ed.), Academic Press, London.

Erma, dkk.

- Kao,K.N., Constabel,C., Michayluk,M.R., Gamborg,O.L., 1974, Plant Protoplast Fusion and Growth of Intergeneric Hybrid Cells, *Planta*, **120**:215-227.
- Komatsu,S., Taizo, Keisuke, 1996, Phosphorylation of a Protein is Related to the Regeneration of Rice Cultured Suspension Cells, *Plant Cell Physiol.*, **37b**:748-753.
- Morris,P., Sragg,A.H., Smart,N.J., Stafford,A., 1987, Secondary Product Formation by Cell Suspension Culture, in: *Plant Cell Culture-A practical approach*, Dept. of Biochemistry, Royal Holloway College.
- Pramono,S., 1992, Profil Kromatogram Ekstrak Herba Pegagan yang Berefek Antihipertensi, *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*, Vol. I, **2**:37-39.
- Salisbury,F.B. and Ross,C.W., 1995, *Fisiologi Tumbuhan* , Jilid I, Diterjemahkan oleh Diah,R.L. dan Sumaryono, Penerbit ITB, Bandung.
- Soegigardjo,C.J., 1993, *Bioteknologi Kultur Jaringan Tanaman*, Jilid III, Program Studi Ilmu Farmasi, Program Pasca Sarjana UGM, Yogyakarta.
- Staba,E.J., 1980, *Plant Tissue Culture A Source of Biochemicals*, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Suryowinoto,M., 1996, *Pemuliaan Tanaman Secara In Vitro*, PAU Bioteknologi UGM, Yogyakarta.
- Tyler,V.E., Brady,L.R., Roberr,J.E., 1976, *Pharmacognosy*, Seventh Ed., Lea&Febiger, Philadephia.
- Vasil,I.K., 1984, *Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants* , Vol.I, Academic Press Inc., New York.
- Widowati, Pudjiastuti,L., Dea,I., Dian,S., 1992, Beberapa Informasi Khasiat, Keamanan, dan Fitokimia Tanaman Pegagan (*Centella asiatica* (L.)Urban.), *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*, Vol.I, **2**: 39-42.

