

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Biologi Pegagan

Pegagan mempunyai nama ilmiah *Centella asiatica* (L.) Urban. Menurut Tjitrosoepomo (1993), klasifikasi pegagan dalam dunia tumbuhan adalah sebagai berikut

Divisi : Spermatophyta  
Sub-divisi : Angiospermae  
Kelas : Dicotyledonae  
Bangsa : Umbellales  
Suku : Umbelliferae  
Marga : *Centella*  
Jenis : *Centella asiatica* (L.) Urban

Pegagan merupakan tumbuhan kosmopolit atau memiliki daerah penyebaran sangat luas, terutama di daerah tropis dan subtropis. Pegagan tumbuh liar dan dapat tumbuh subur pada ketinggian 1-2500 meter dari permukaan laut (dpl) (Winarto & Surbakti, 2003). Pegagan merupakan herba menahun, tumbuh liar pada tanah lembab, seperti sepanjang pematang atau galangan sawah, tebing tanah serta tempat-tempat lain yang basah atau lembab (Suriawiria, 2002).

Pegagan memiliki rimpang pendek dan stolon-stolon yang menjalar, dengan panjang antara 10-80 cm. Daun pegagan merupakan daun tunggal yang tersusun dalam roset dan terdiri atas 10-20 daun, kadang-kadang agak berambut. Helai daun berbentuk

ginjal, lebar dan bundar dengan garis tengah 1-7 cm, pinggir daun beringgit sampai beringgit-bergerigi (Anonim, 1977).

Tangkai daun agak panjang dan berukuran 5-15 cm tergantung dari kesuburan tempat tumbuhnya. Tangkai bunga pegagan sangat pendek, keluar dari ketiak daun, tersusun dalam karangan seperti payung, berwarna putih sampai merah muda atau agak kemerahan. Bentuk bunga bundar lonjong, cekung, dan runcing ke ujung dengan ukuran sangat kecil. (Winarto & Surbakti, 2003).

Menurut Prajogo & Santa (1992) dalam Prihastanti (1999), tipe daun pegagan adalah dorsiventral, epidermis atas terdiri dari satu lapis sel berbentuk poligonal, di bagian luar dilapisi kutikula. Epidermis bawah seringkali dengan rambut penutup yang berbentuk kerucut terdiri dari 2 lapis sel. Jaringan bunga karang terdiri dari 5-7 lapis sel. Pada mesofil seringkali terdapat kristal kalsium oksalat dan mempunyai berkas pengangkut tipe kolateral.

## **2.2 Kandungan kimia dan kegunaan Pegagan**

Pegagan memiliki kandungan zat kimia yang bermanfaat bagi manusia. Berbagai kandungan kimia yang sudah diketahui antara lain asiatikosida, thankunsida, isothankunsida, madekosida, brahmasida, asam modasiatika, meso-inositol, karotenoid, garam K, Na, Ca, Fe, tannin, mucilago, resin, pektin, gula, protein, fosfor, dan vitamin B. Pegagan juga mengandung sedikit vitamin C dan minyak atsiri (Winarto & Surbakti, 2003).

Potensi pegagan sebagai bahan obat disebabkan beberapa kandungan kimia yang terkandung di dalamnya. Kandungan asiatikosida dan asam asiatikat dalam pegagan dapat digunakan sebagai diuretik (Anonim, 1977). Selain itu pegagan juga mengandung senyawa golongan flavonoid yang belum diketahui strukturnya ( Pramono, 1992) yang terbukti menurunkan tekanan darah pada percobaan dengan anjing yang dianestesi ( Suwono, 1992 ). Menurut Suriawiria (2002), pegagan di kawasan Asia dan Afrika banyak digunakan untuk menangkal penyakit kusta, campak, hepatitis, demam, bronkhitis, radang amandel, keracunan logam berat, muntah darah, wasir, cacangan dan sebagainya.

### 2.3 Sel Tumbuhan

Kata sel berasal dari bahasa Latin *Cella* yang artinya ruang kosong. Seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan, sel didefinisikan sebagai suatu unit biologi yang dibatasi oleh membran semipermeabel dan mempunyai kemampuan untuk bereproduksi di dalam suatu medium yang bebas dari sistem kehidupan yang lain ( Santoso & Nursandi, 2003).

Sel tumbuhan dikelilingi oleh sebuah dinding sel yang keras. Dinding sel tumbuhan tingkat tinggi tersusun dari selulosa yang tergolong polisakarida. Dinding sel tumbuhan mempunyai struktur kompleks, tetapi dapat dibedakan menjadi 3 bagian pokok yaitu lamela tengah, dinding primer dan dinding sekunder (Santoso & Nursandi, 2003).

## 2.4 Isolasi Sel dan Kultur Sel

Isolasi sel adalah proses untuk memisahkan sel satu dengan sel lainnya dalam suatu jaringan, baik dari organ daun ataupun jaringan kalus. Isolasi sel diikuti dengan tahap purifikasi bertujuan untuk mendapatkan sejumlah sel-sel tertentu dan viabel yang nantinya akan digunakan untuk kultur sel. Sehingga teknik kultur sel memerlukan tahap isolasi sel terlebih dahulu.

Ada 2 cara untuk mengisolasi sel, yaitu : metode mekanis dan metode enzimatik. Kedua metode tersebut dapat diterapkan pada jaringan tumbuhan maupun dari kalus (Santoso & Nursandi, 2003).

### a. metode mekanis

Cara mekanis dilakukan dengan mengupas jaringan epidermis atau dengan cara diblender. Jaringan tanpa epidermis tersebut kemudian disikat, hasil sikatan kemudian dimasukkan ke dalam larutan osmotikum yang mengandung manitol, sorbitol, sukrosa,  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$  sehingga sel tetap terjaga dan tidak rusak atau mengkerut (Santoso & Nursandi, 2003).

### b. metode enzimatik

Metode enzimatik adalah metode isolasi sel dengan menggunakan larutan enzim. Hal yang harus diperhatikan dalam melakukan isolasi sel dengan metode enzimatik tersebut adalah :

#### 1) Sumber eksplan

Setiap macam jaringan atau organ pada tumbuhan hampir semuanya dapat digunakan. Kultur sel biasanya menggunakan eksplan yang berasal dari kalus

(Santoso & Nursandi, 2003), atau sel mesofil daun (Dixon, 1987). Hal ini disebabkan karena sel-sel mesofil memiliki ukuran seragam. Selain itu, sel-sel mesofil daun mempunyai kemampuan diferensiasi yang lebih baik daripada kalus (Santoso & Nursandi, 2003). Jaringan mesofil tersusun oleh jaringan yang bersifat parenkimatis di sebelah dalam epidermis, yang biasanya mengalami diferensiasi untuk membangun jaringan fotosintetik serta mengandung klorofil (Fahn, 1991).

## 2) Jenis dan konsentrasi enzim

Enzim yang digunakan untuk isolasi sel adalah enzim pektinase atau enzim poligalakturonase yang dapat melarutkan senyawa pektat sehingga lamela tengah lunak dan akhirnya sel – sel terpisah. Enzim pektinase yang sering digunakan adalah pektoliase 4-23 dan Macerozyme R – 10 (Santoso & Nursandi, 2003).

## 3) Lama waktu inkubasi

Pelepasan sel – sel dari sel lainnya bervariasi untuk setiap spesies. Beberapa sel toleran terhadap waktu inkubasi yang lama, tetapi ada sel yang protoplasnya rusak karena terlalu lama waktu inkubasinya (Hadisantosa (1988) dalam Prihastanti, 1999).

## 4) pH larutan

Aktivitas enzim tergantung pada pH atau keasaman lingkungan, pada umumnya pH optimal larutan enzim adalah 5,4 – 6,2. Menurut Dixon (1987) pH 6,0 merupakan pH yang umum pada medium maserasi. Selama proses isolasi sering terjadi perubahan pH yang dapat berpengaruh terhadap aktivitas enzim sehingga untuk mempertahankan pH selama proses isolasi berlangsung ditambahkan senyawa buffer diantaranya  $MgSO_4$  atau MES (N-Morpholino Ethane Sulphonic acid) (Dixon, 1987).

## 5) Osmotikum

Osmotikum merupakan larutan yang berperan dalam mempertahankan tekanan osmosis sel. Larutan osmotikum yang sering digunakan dalam media maserasi adalah manitol, sorbitol, sukrosa dan  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$  sehingga sel tetap terjaga, tidak rusak atau mengkerut (Santoso & Nursandi, 2003).

Tahap isolasi sel dalam kultur suspensi sel diikuti dengan tahap purifikasi. Purifikasi sel merupakan proses untuk mendapatkan sejumlah sel tertentu yang betul-betul murni. Pada tahap purifikasi sel disentrifugasi atau disaring agar dapat dipisahkan dari agregat – agregat yang mengganggu sehingga didapatkan suspensi sel saja. Selanjutnya sel - sel tersebut ditanam pada medium padat (MS, B5, Erikson atau Nitsch) dengan kepadatan sel yang minimal untuk tumbuh menjadi kalus. Kalus yang sudah tumbuh dapat dipindah ke dalam medium segar (Santoso & Nursandi, 2003).

## 2.5 Viabilitas sel

Salah satu syarat kultur suspensi sel adalah sel-sel yang mempunyai viabilitas tinggi. Viabilitas merupakan kemampuan untuk tumbuh (Sandra, 2003). Viabilitas sel dapat diamati dengan berbagai cara, antara lain diamati langsung di bawah mikroskop dengan melihat aliran sitoplasmik dan adanya inti sel yang utuh atau dapat diamati dengan menggunakan pewarnaan (Santoso & Nursandi, 2003).

## 2.6 Sterilisasi Eksplan

Teknik kultur sel memerlukan 3 hal penting yang harus dipertimbangkan, yaitu bagian tumbuhan yang digunakan sebagai eksplan harus dapat diisolasi dari tumbuhan yang utuh, sel-selnya mampu tumbuh di lingkungan yang cocok, serta pelaksanaannya dalam kondisi steril untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme (Pighin, 2004).

Eksplan merupakan salah satu sumber kontaminasi kultur, di samping komponen media, faktor manusia dan lingkungan. Oleh karena itu, eksplan harus dibersihkan dari kotoran sebelum ditanam secara aseptik serta harus disterilisasi (Yusnita, 2003). Sterilisasi eksplan memerlukan metode sterilisasi kimia, yaitu menggunakan senyawa kimia tertentu. Senyawa sterilan adalah bahan pensteril yang biasanya berupa senyawa kimia tersebut. Prinsip dasar sterilan adalah senyawa yang dapat mensterilkan eksplan dari berbagai mikroorganisme, tetapi eksplannya tidak ikut mati (Sandra, 2003).

Sterilisasi eksplan di sini hanya sebatas pada sterilisasi permukaan atau disinfestasi, bukan menghilangkan infeksi kontaminan dalam eksplan atau disinfeksi. Proses sterilisasi eksplan merupakan tahap pembersihan terhadap debu, cendawan dan bakteri, atau kontaminan dari bagian permukaan eksplan, bukan yang berada di dalam bagian eksplan (Yusnita, 2003).

Bahan kimia yang sering dipakai untuk disinfestasi adalah alkohol seperti etil, metil, atau isopropil alkohol dengan konsentrasi 70-80%; kalsium hipoklorit, atau natrium hipoklorit, seperti yang tersaji pada tabel 01. Kalsium hipoklorit digunakan pada konsentrasi 3,5-10%, sedangkan Natrium hipoklorit (NaOCl) pada kisaran konsentrasi 0,5-2%. Sumber NaOCl yang sering digunakan adalah larutan pemutih

pakaian yang kandungan bahan aktifnya adalah 5,25% NaOCl. Pemutih pakaian ini berbentuk cairan dan diaplikasikan pada konsentrasi 10-40% (setara dengan 0,5-2% NaOCl). Untuk meningkatkan efektivitas sterilisasi, umumnya ditambahkan pula Tween-20, Tween-80, atau deterjen cair yang lunak ( Yusnita, 2003 ).

Bentuk dan konsentrasi sterilan yang digunakan dan waktu yang dibutuhkan untuk kegiatan sterilisasi harus ditentukan secara tepat. Jika belum diketahui secara pasti tentang hal tersebut maka dapat dipilih bentuk dan waktu sterilisasi yang telah digunakan untuk eksplan lain yang kurang lebih mendekati kesamaan.

Tabel. 01 Beberapa bahan sterilisasi yang umum digunakan dalam kegiatan kultur jaringan serta waktu yang digunakan :

No	Nama Sterilan	Konsentrasi	Waktu (menit)
1	Alkohol	70%	0,5-1 menit
2	Kalsium hipoklorit	1-10%	5-30 menit
3	Natrium hipoklorit	1-2%	7-15 menit
4	Hidrogen peroksida	3-10%	5-15 menit
5	Merkuri klorida	0,1-0,2%	10-20 menit

( Santoso & Nursandi, 2003).

NaOCl merupakan cairan bening berwarna sedikit kekuningan, beraroma khas, dan menyengat. Bahan tersebut mudah sekali larut dalam air dengan derajat kelarutan mencapai 100%. Cairan ini sedikit lebih berat dibanding air dengan berat jenis >1 ( Permono, 2003).



## 2.7 Mekanisme pengaruh sterilan terhadap viabilitas sel

Ada beberapa mekanisme yang dapat digunakan untuk menjelaskan pengaruh bahan sterilan terhadap sel antara lain :

(1) mengubah permeabilitas sel. Bahan kimia seperti fenol dan detergen mengubah permeabilitas membran sitoplasma. Substansi ini mengacaukan sistem membran sel dan membiarkan nutrisi penting seperti N dan P keluar dari sel.

(2) menghambat aktivitas enzim. Agen oksidasi, seperti klorin, dapat mengubah susunan kimia enzim dan membuat enzim tersebut menjadi tidak aktif (Anonim, 2004 a).

## 2.8 Hipotesis Penelitian

Isolasi sel merupakan tahap awal dan menentukan keberhasilan kultur suspensi sel. Pelaksanaan kultur suspensi sel memerlukan peralatan dan bahan yang serba steril, termasuk eksplan. Larutan pemutih pakaian yang mengandung Natrium hipoklorit (NaOCl) dapat digunakan sebagai sterilan eksplan dalam kegiatan isolasi sel karena dapat mensterilkan permukaan eksplan dari mikroorganisme. Lama sterilisasi eksplan dan konsentrasi sterilan yang efektif berbeda-beda untuk setiap jenis eksplan dan jenis tumbuhan. Konsentrasi sterilan yang terlalu tinggi ataupun perendaman dalam bahan sterilisasi yang terlalu lama dapat menurunkan viabilitas sel. Maka diasumsikan bahwa dengan konsentrasi sterilan (NaOCl) yang tepat akan diperoleh sel-sel dengan viabilitas yang tinggi pada saat isolasi sel mesofil daun pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban).