

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA DAN HIPOTESIS

2.1 Klasifikasi Pegagan

Dalam dunia tumbuhan, pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) diklasifikasi sebagai berikut (Tjitrosoepomo, 1993) :

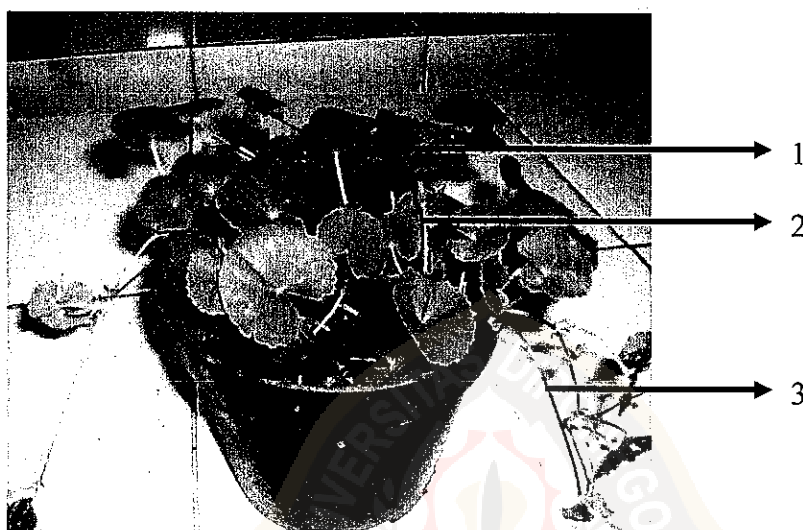
Divisio	: Spermatophyta
Sub Divisio	: Angiospermae
Classis	: Dicotyledonae
Ordo	: Umbeliales
Familia	: Umbelliferae
Genus	: <i>Centella</i>
Spesies	: <i>Centella asiatica</i> (L.) Urban

2.2 Morfologi dan Anatomi Pegagan

Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) merupakan tumbuhan herba yang tumbuh menjalar di atas permukaan tanah dan memiliki banyak sekali manfaat. Tumbuhan ini tumbuh di daerah tropis dan di lingkungan yang sedikit lembab. Pegagan biasa ditemui di pinggiran rawa, pinggiran sungai dan parit. Pegagan dapat tumbuh di dataran rendah sampai ketinggian 2500 meter di atas permukaan laut dan umumnya tidak dibudidayakan (Handra, 2002).

Tumbuhan pegagan merupakan tumbuhan menahun tanpa mempunyai batang, tetapi mempunyai stolon-stolon yang melata, dengan panjang antara

10 cm - 80 cm. Daun tunggal tersusun dalam roset yang terdiri dari 2 sampai 10 daun, kadang-kadang berambut. Helai daunnya berbentuk ginjal, lebar dan bundar dengan garis tengah rata-rata 1 cm - 7 cm, tepi daun beringgit sampai beringgit-bergerigi, terutama ke arah pangkal daun (Anonim, 1992).



Gambar 01. Morfologi Tumbuhan pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)

Keterangan : 1. Daun pegagan
2. Tangkai daun
3. Stolon

Secara anatomi, tumbuhan pegagan memiliki tipe daun dorsiventral. Epidermis atas terdiri dari satu lapis sel berbentuk polygonal, di bagian luar dilapisi kutikula. Epidermis bawah seringkali terdapat rambut-rambut yang berbentuk kerucut terdiri dari dua lapis sel dengan panjang 25 μm - 45 μm . Jaringan bunga karang terdiri dari 5-7 lapis sel. Pada mesofil seringkali terdapat kristal kalsium oksalat dan mempunyai berkas pengangkut tipe kolateral (Anonim, 2000).

2.3 Kandungan Kimia dan Manfaat Pegagan

Pegagan mengandung glikosida asiatikosida dan asam asiatikosida, yang dapat digunakan sebagai diuretik. Selain itu, pegagan juga mengandung senyawa golongan flavonoid yang belum diketahui strukturnya dan terbukti dapat menurunkan tekanan darah pada percobaan anjing yang dianestesi (Anonim, 1992). Menurut Handra (2002), pegagan mengandung senyawa triterpenoid yaitu asam asiatikat, asam madekasat, asiatikosida, madekasosida. Selain itu juga mengandung terpen asetat, kamfor, sineol, kamprasterol, stigmasterol, sitosterol, kamferol, mio-inositol, vellarin, asam amino dan resin.

Bagian pegagan yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah seluruh bagian tumbuhan. Menurut Anonim (2000) khasiat dari pegagan antara lain dapat menyembuhkan : infeksi hepatitis, campak, demam, radang amandel, sakit tenggorokan, *bronchitis*, infeksi dan batu ginjal, muntah darah, batuk darah, mimisan, mata merah, wasir, sakit perut, cacangan, lepra serta menambah nafsu makan. Ditambahkan oleh Handra (2002), pegagan juga dapat digunakan sebagai pengganti *Ginkgo biloba* terutama untuk mengatasi kepikunan dini dan meningkatkan kecerdasan.

2.4 Sel Tumbuhan dan Viabilitas sel

2.4.1. Sel

Sel merupakan satuan struktural dan fungsional suatu makhluk hidup (Raven *et al.*, 1986). Kata sel berasal dari bahasa latin *Cella* yang berarti ruang kosong. Dalam perkembangannya, sel didefinisikan sebagai suatu unit biologi

yang dibatasi oleh membran semi permeabel dan mempunyai kemampuan untuk bereproduksi di dalam suatu medium yang bebas dari mikrobia patogen. Kemampuan sel untuk tumbuh dan berkembang menjadi suatu individu yang lengkap apabila ditempatkan pada lingkungan yang sesuai disebut dengan totipotensi. Hal ini merupakan dasar dari perkembangan teknologi tingkat seluler, misalnya kultur sel, fusi sel, rekayasa genetika dan lain-lain (Santoso dan Nursandi, 2003).

Sel tumbuhan terdiri dari dua komponen penting yaitu dinding sel dan protoplas. Protoplas adalah sel hidup tanpa dinding sel. Protoplas terdiri dari dua komponen yaitu sitoplasma dan nukleus (Raven *et al.*, 1986).

A. Dinding sel dan Membran sel

Dinding sel terdapat pada sel tumbuhan dan terletak di sebelah luar protoplas. Dinding sel disusun oleh selulosa yang tergolong polisakarida yang keras (Santoso dan Nursandi, 2003). Berdasarkan perkembangan dan struktur jaringan tumbuhan, dinding sel dibedakan dalam tiga bagian pokok yaitu lamela tengah atau lapisan antar sel, dinding primer dan dinding sekunder. Lamela tengah merupakan lapisan perekat yang mengikat sel-sel secara bersama-sama untuk membentuk jaringan. Lapisan ini sebagian besar tersusun atas air dan zat-zat pektin bersifat koloid, sehingga memungkinkan terjadinya gerakan-gerakan antar sel. Dinding primer adalah dinding sel sejati pertama yang dibentuk oleh sebuah sel baru. Lapisan ini sebagian besar terdiri atas selulosa dan hemiselulosa. Sedangkan dinding sel sekunder

adalah dinding sel yang terbentuk setelah sel berhenti membesar. Lapisan ini tersusun atas selulosa dan umumnya penuh dengan lignin atau zat kayu (Fahn, 1991).

Membran sel disebut pula dengan membran plasma atau plasma lemma. Membran sel mempunyai ketebalan kurang lebih 95 \AA (Santoso dan Nursandi, 2003). Membran plasma mempunyai beberapa fungsi penting, yaitu : sebagai media transportasi substansi untuk keluar maupun masuk dalam protoplas, mengkoordinasi sintesa dan penyusunan mikrofibril dari dinding sel, serta menterjemahkan hormon dan sinyal lingkungan dalam mengontrol pertumbuhan dan diferensiasi sel (Raven *et al.*, 1986).

B. Sitoplasma

Sitoplasma adalah substansi homogen yang tidak berbentuk dan jernih (Subowo, 1989). Komponen utama dari sitoplasma berupa air (85% - 90%). Istilah sitoplasma secara lebih luas diartikan sebagai seluruh zat protoplasma yang mengelilingi nukleus. Dalam sitoplasma terdapat retikulum endoplasma, aparatus Golgi, mitokondria, plastida, mikro tubulus, ribosom, sferosom, vakuola dan zat-zat ergastik (Fahn, 1991).

Selain itu, dalam sitoplasma juga terdapat berbagai bangunan atau struktur, dimana struktur tersebut ada yang belum diketahui fungsi dan asalnya. Struktur yang telah diketahui dengan jelas fungsi dan asalnya dikelompokkan dalam dua kategori, yaitu organella dan inklusio (Subowo, 1989).

C. Nukleus

Nukleus dibatasi oleh sepasang membran. Selubung atau membran ini mengandung pori-pori, sehingga memungkinkan bahan-bahan untuk keluar maupun masuk dalam nukleus. Nukleus dikelilingi berisi matrik nukleoplasma dan satu atau lebih nukleolus. Fungsi dari nukleus adalah sebagai pusat pengendali seluruh aktifitas dalam sel (Kimball, 1998).

2.4.2. Viabilitas Sel

Viabilitas sel merupakan kemampuan sel untuk tetap hidup dan menjalankan metabolisme dalam sel. Viabilitas sel dapat diamati dengan berbagai cara. Sel hidup dapat diamati secara langsung menggunakan mikroskop dengan melihat aliran sitoplasma serta adanya inti sel yang utuh. Selain itu dapat diketahui dengan mengamatinya menggunakan pewarnaan seperti Evans' Blue 0,025% (w/v), fluorecein diasetat atau garam tetrazolium (Dixon, 1987). Untuk mengetahui persentase viabilitas sel dilakukan dengan cara membandingkan jumlah sel viabel dengan seluruh sel yang diperoleh dari hasil isolasi sel. Penghitungan jumlah sel viabel menggunakan hemocytometer (Gamborg and Phillip, 1995 dan Barker, 1998).

Salah satu syarat sel untuk dapat dijadikan sebagai eksplan dalam kultur suspensi sel adalah sel-sel tersebut harus mempunyai jumlah sel viabel dan viabilitas sel yang tinggi (Prihastanti, 1999). Adapun faktor yang mempengaruhi jumlah dan viabilitas sel adalah sumber eksplan, sterilan, perlakuan enzim dan osmotikum (Bhojwani and Razdan, 1983). Trigiano and Gray (2000) menyatakan bahwa viabilitas yang bagus berkisar antara 90 %-95 %. Menurut Prihastanti

(1999) dalam penelitiannya mengenai isolasi sel mesofil pegagan diperoleh viabilitas sel yang tinggi yaitu berkisar antara 93,54%-100%.

2.5 Isolasi Sel dan Purifikasi Sel

Vasil dalam Prihastanti (1999) menyatakan bahwa untuk kultur suspensi sel mesofil daun perlu ditempuh beberapa tahapan kerja, yaitu : isolasi dari mesofil daun, purifikasi sel dan kultur sel. Proses isolasi dan purifikasi sel ditujukan untuk mendapatkan sejumlah sel tertentu yang nantinya akan digunakan sebagai eksplan dalam kultur suspensi sel.

2.5.1 Isolasi Sel

Isolasi sel merupakan proses pemisahan sel satu dengan sel lainnya dalam suatu jaringan, yang biasanya dilakukan secara mekanis maupun enzimatis (Santoso dan Nursandi, 2003).

a. Metode Mekanis

Metode ini dilakukan dengan cara mengupas jaringan epidermis (dapat juga diblender), jaringan tanpa epidermis disikat, kemudian hasil sikatan tersebut dimasukkan ke dalam larutan osmotikum (manitol, sorbitol, sukrosa dan $MgCl_2$, $CaCl_2$) dengan pH 3 sehingga sel tetap terjaga dari kerusakan (Santoso dan Nursandi, 2003).

b. Metode Enzimatis

Metode enzimatis ini dilakukan dengan cara merendam jaringan di dalam larutan maserasi yang berisi senyawa-senyawa kimia. Enzim yang digunakan untuk memisahkan sel adalah *enzim pektinase* atau *enzim*

poligalacturonase yang dapat melarutkan senyawa pektat sehingga lamela tengah lunak dan akhirnya sel dapat terpisah (Santoso dan Nursandi, 2003).

Faktor yang mempengaruhi keberhasilan isolasi sel adalah sumber eksplan, jenis dan konsentrasi enzim pektinase, osmotikum, lama waktu inkubasi, metode inkubasi dan pH larutan enzim (Prihastanti, 1999).

2.5.2. Purifikasi Sel

Purifikasi sel adalah proses untuk mendapatkan sejumlah sel tertentu yang betul-betul murni, biasanya dilakukan dengan sentrifugasi maupun gradasi dengan sukrosa. Setelah sel diisolasi, langkah selanjutnya adalah memisahkan sel yang mengumpul dengan cara sentrifugasi, sehingga akan diperoleh suspensi sel saja (Santoso dan Nursandi, 2003). Pemisahan sel dengan pemusingan (sentrifugasi) merupakan salah satu cara untuk memisahkan sel dari suatu suspensi sel dengan memanfaatkan perbedaan-perbedaan sifat fisik sel (Albert, 1994).

2.6 Sorbitol sebagai Osmotikum

Osmotikum merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi proses isolasi sel, purifikasi sel dan kultur sel. Osmotikum adalah larutan untuk mempertahankan stabilitas tekanan osmotik sel, dan disebut juga dengan *osmotik stabilizer*. Sel-sel yang telah terpisah dari jaringan bersifat peka terhadap lingkungan luar, sehingga perlu larutan tertentu untuk menjaga sel tersebut dari tekanan osmotik yang berlebihan. Menurut Bhojwani and Razdan (1983), zat yang digunakan sebagai osmotikum adalah sorbitol. Konsentrasi osmotikum yang

tinggi akan menyebabkan sel mengalami plasmolisis sedangkan konsentrasi osmotikum yang rendah dapat menyebabkan sel pecah. Plasmolisis adalah peristiwa hilangnya cairan plasma dari dinding sel yang disebabkan oleh kondisi lingkungan yang hipertonis. Oleh karena itu diperlukan konsentrasi osmotikum yang tepat untuk menghasilkan sel viabel.

Perbedaan konsentrasi larutan mempengaruhi perpindahan air dari dalam sel maupun keluar sel. Hipertonis adalah larutan dengan konsentrasi zat terlarut tinggi, sedangkan hipotonis merupakan kondisi larutan dengan konsentrasi zat terlarut rendah. Air akan berdifusi dari lingkungan yang hipotonis ke hipertonis melalui membran selektif permeabel yang disebut dengan peristiwa osmosis. Sel akan tetap viabel apabila diletakkan pada larutan yang mempunyai konsentrasi zat terlarut sama (isotonis). Pada kondisi tersebut tidak ada kecenderungan air untuk masuk dalam sel (Campbell *et al.*, 1999).

Sorbitol merupakan sebuah gula alkohol yang banyak ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi. Senyawa ini merupakan fotoasimilat utama dalam banyak spesies dari familia *Rosaceae*. Sorbitol memiliki rumus kimia $C_6H_{14}O_6$ (Anonim, 1999). Sorbitol adalah alditol (gula alkohol) yang dihasilkan dari reaksi reduksi glukosa menggunakan Natrium borohidrida ($NaBH_4$). Nama lain dari sorbitol adalah *D-glucitol* yang secara komersial digunakan sebagai pemanis dan pengganti gula (Achmadi, 2003, Wade, 1987, dan Meislich, 1986).

Pada beberapa penelitian disebutkan penggunaan sorbitol dan mannitol sebagai osmotikum dapat digunakan secara bersamaan yaitu dengan kisaran 450 mmol/L -800 mmol/L (81,9 g/L – 145,6 g/L) (Bhojwani dan Razdan, 1983).

Adapula yang menyebutkan penggunaan osmotikum berupa sorbitol sebesar 13 % (130 g/L) untuk isolasi protoplas (Reinert and Bajaj, 1989). Sedangkan menurut Dixon (1987), pada medium maserasi digunakan sorbitol dengan konsentrasi 100 g/L dan pada medium purifikasi digunakan sorbitol dengan konsentrasi 54 g/L - 100 g/L.

2.7 Hipotesis

Kultur suspensi sel yang menggunakan eksplan dari sel akan memerlukan sejumlah sel yang viabel. Dalam proses isolasi dan purifikasi sel dari jaringan dapat menyebabkan kerusakan sel, karena sel dapat pecah sehingga tidak dapat dijadikan sebagai eksplan. Oleh karena itu diperlukan zat dengan konsentrasi yang tepat untuk dapat mempertahankan tekanan osmotik sel sehingga sel tidak pecah dan tetap viabel. Zat yang dapat mempertahankan stabilitas tekanan osmotik sel adalah sorbitol. Berdasarkan informasi tersebut maka diduga bahwa:

1. Perbedaan konsentrasi sorbitol dalam medium purifikasi sel dapat mempengaruhi perolehan jumlah sel yang viabel.
2. Konsentrasi yang efektif dari penggunaan sorbitol dalam medium purifikasi akan menghasilkan jumlah sel viabel dan viabilitas sel paling tinggi.