

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Pemberian Cu^{2+} Terhadap Perkembangan Morfologi (Warna, Tekstur, dan Berat) Kalus Pegagan (*Centella asiatica* L.Urban) Secara *In vitro*

Kultur kalus untuk meningkatkan metabolit sekunder dilakukan dengan 2 tahapan yaitu induksi kalus dan subkultur kalus. Untuk induksi kalus dalam penelitian ini menggunakan Media MS yang ditambahkan zat pengatur tumbuh yaitu 2,4-D dan juga air kelapa. Konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan untuk induksi kalus pegagan yaitu 2,4-D 1 mg/l dan 10% air kelapa. Konsentrasi tersebut diperoleh dari penelitian terdahulu yaitu Nazza (2013), zat pengatur tumbuh 2,4-D 1 mg/l yang dikombinasikan dengan air kelapa 10% pada media MS mampu menghasilkan berat kalus tertinggi pada daun pegagan sebesar 0,81 gram dan persentase kalus sebesar 78,25% dan kalus yang terbentuk berwarna kekuningan dan bertekstur kompak.

Tahapan yang kedua yaitu subkultur kalus. Subkultur kalus dilakukan setelah kalus berumur 1 bulan dimana subkultur kalus disini yaitu dengan melakukan pemindahan kalus pada media baru. Media yang digunakan dalam subkultur yaitu media induksi kalus yang ditambahkan dengan Cu^{2+} . Tujuan ditambahkan Cu^{2+} yaitu untuk meningkatkan kadar metabolit sekunder pada pegagan. Cu^{2+} yang ditambahkan pada media subkultur dengan beberapa konsentrasi yaitu 0 (Tanpa Cu^{2+}), 30 μM , 35 μM dan 40 μM . Subkultur kalus dilakukan selama 4 minggu atau 1 bulan. Setelah subkultur, dilakukan pengujian metabolit sekunder yaitu kadar asiatikosida dan madekasosida pada pegagan

dengan menggunakan *HPLC (High Performance Liquid Chromatography)*. Dengan menggunakan teknik kultur kalus untuk memproduksi metabolit sekunder digunakan beberapa indikator yaitu morfologi kalus yang terdiri dari warna, tekstur dan berat kalus.

Firman Allah dalam surat Al-Ra'd 13:4 adalah :

وَفِي الْأَرْضِ قِطْعٌ مُتَجَاوِرَاتٌ وَجَنَّاتٌ مِّنْ أَعْنَابٍ وَزُرْعٌ وَنَخِيلٌ صِنَوَانٌ وَغَيْرُ صِنَوَانٍ يُسْقَى بِمَاءٍ وَاحِدٍ وَنُفِضَ لِبَعْضِهَا عَلَىٰ بَعْضٍ فِي الْأُكُلِ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ ﴿٤﴾

Artinya : *“Dan dibumi ini terdapat bagian-bagian yang berdampingan, dan kebun-kebun anggur, tanaman-tanaman dan pohon kurma yang bercabang, disirami dengan air yang sama. Kami melebihkan sebahagian tanaman-tanaman itu atas sebahagian yang lain tentang rasanya. Sesungguhnya pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (Kebesaran Allah) bagi kaum yang berpikir.”* (QS Al-Ra'd (13):4).

Ayat diatas menjelaskan bahwa dalam bumi ini terdapat bagian-bagian yang berdampingan sehingga dalam suatu masalah akan ada sebab dan akibatnya masing-masing. Kemudian dalam ayat tersebut juga dijelaskan bahwa Allah menciptakan kebun-kebun anggur, tanaman-tanaman kurma yang disirami dengan air yang sama. Tetapi dengan kesamaan tersebut terdapat suatu perbedaan, karena dalam ayat ini juga dijelaskan bahwa Allah akan melebihkan sebagian tanaman tersebut atas sebagian yang lain yaitu tentang rasanya. Dalam penelitian ini terdapat beberapa faktor kesamaan seperti kalus yang digunakan, faktor lingkungan yang seragam dan juga teknik penelitian yang sama, tetapi di sisi lain terdapat perbedaan yaitu pemberian Cu^{2+} dengan konsentrasi berbeda-beda yang

menyebabkan perubahan pada warna, tekstur dan kandungan metabolit sekunder kalus pegagan.

4.1.1 Warna Kalus

Indikator dalam kultur kalus salah satunya yaitu warna kalus karena dalam teknik kultur jaringan setiap eksplan akan menghasilkan warna kalus yang berbeda – beda dan dapat dipengaruhi oleh laju pertumbuhan kalus pada media tanam. Warna kalus dalam setiap pemberian Cu^{2+} berbeda – beda. Perubahan yang terjadi pada warna kalus menunjukkan perubahan sesuai dengan laju pertumbuhannya, adapun data perubahan warna kalus disajikan dalam tabel 4.1

4.1 Tabel pengaruh pemberian Cu^{2+} terhadap perubahan warna kalus yang disajikan pada awal subkultur hingga akhir minggu ke 4 :

Konsentrasi Cu^{2+}	Warna Kalus	
	Awal	Akhir
0 μM (C0)	HB	PH
30 μM (C1)	HB	CH
35 μM (C2)	HB	C+
40 μM (C3)	HB	C++

Keterangan : HB= Hijau Bening, PH=Putih kehijauan, CH= coklat kehijauan, HK= Hijau Kecoklatan, C= Coklat, + = kepekatan warna sedang, ++= kepekatan warna tinggi)

Warna kalus mengalami perubahan seiring dengan pertambahan umur kalus, yaitu dari berwarna hijau atau hijau keputihan menjadi putih kecoklatan, putih kehijauan, coklat muda, putih kekuningan, putih, kuning kecoklatan hingga coklat. Santoso dan Nursandi (2004) menyatakan bahwa apabila kalus terbentuk dari eksplan yang berwarna hijau adalah putih atau coklat berarti telah terjadi degradasi klorofil. Sedangkan menurut Hendaryono dan Wijayani (1994),

menerangkan bahwa kondisi perubahan warna kalus dapat disebabkan oleh adanya pigmentasi, pengaruh cahaya dan bagian tanaman yang dijadikan sebagai sumber eksplan.

Kualitas kalus yang baik adalah berwarna hijau karena warna hijau tersebut menandakan keberadaan klorofil. Menurut Fatmawati (2008), warna kalus mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin hijau warna kalus semakin banyak pula klorofilnya. Warna kalus yang hijau juga disebabkan oleh peningkatan konsentrasi sitokinin yang tinggi. Hal ini sesuai pernyataan Wardani (2004), sitokinin yang ditambahkan dalam media kultur mampu menghambat perombakan butir-butir klorofil karena sitokinin mampu mengaktifkan proses metabolisme dan sintesis protein.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa warna kalus setiap minggunya mengalami perubahan. Warna kalus minggu kedua menunjukkan bahwa warna kalus lebih pekat dan pada umumnya kalus berubah menjadi agak kecoklatan seiring dengan pertumbuhan kalus, dan perubahan tersebut terjadi hingga minggu keempat pengamatan atau pengamatan hari ke-30.

Warna kalus yang dihasilkan dari beberapa perlakuan berbeda-beda. Pada minggu ke-empat subkultur, warna kalus yang ditanam di media mengalami perubahan menjadi lebih pekat. Perubahan ini diduga karena adanya substitusi Cu^{2+} pada media terhadap kalus sehingga semakin banyak Cu^{2+} menyebabkan perubahan warna kalus semakin kecoklatan.

Warna kalus pada konsentrasi 35 dan 40 μM pada awal subkultur kalus berwarna hijau bening dan setelah minggu kedua mengalami perubahan warna

lebih hijau pekat kemudian pada minggu ketiga kalus berubah menjadi kecoklatan dengan permukaan sedikit berwarna bening, hal ini dikarenakan terjadinya regenerasi kalus sehingga volume kalus menjadi bertambah. Sedangkan pada konsentrasi 30 μM pada awal subkultur kalus memiliki warna hijau bening yang menandakan kalus masih aktif melakukan pembelahan. Setelah minggu kedua kalus berubah menjadi hijau kuning pekat dan pada minggu keempat kalus berwarna coklat kehijauan. Pada pemberian Cu^{2+} warna kalus berubah menjadi lebih pekat akan tetapi kalus dalam kondisi mengalami pertumbuhan yang ditandai dengan adanya pembesaran sel sehingga ukurannya menjadi lebih besar. Perubahan warna kalus disajikan pada gambar 4.1

Perubahan warna coklat yang terjadi pada kalus bisa disebabkan karena terjadinya sintesis senyawa fenolik. Menurut Yusnita (2003), peristiwa pencoklatan terjadi akibat adanya metabolisme senyawa fenol bersifat toksik, yang sering terangsang akibat proses sterilisasi eksplan, yang menghambat pertumbuhan atau bahkan kematian jaringan, selain menandakan terjadi senyawa fenol, warna coklat disebabkan oleh semakin bertambahnya umur sel atau jaringan kalus.

Menurut Santoso dan Nursandi (2004), mengemukakan bahwa proses perubahan warna kalus merupakan peristiwa alamiah yang terjadi pada sistem biologi sebagai suatu proses adaptif bagian tanaman akibat pengaruh fisik atau biokimia (memar, pematangan, serangan penyakit atau kondisi abnormal lainnya) yang menyebabkan cekaman pada jaringan. Intensitas warna coklat berkorelasi positif dengan hiperaktifitas enzim oksidatif, sedangkan peningkatan aktifitas

enzim tersebut terkait dengan reaksi pertahanan jaringan dari stress oksidatif. Sehingga diasumsikan pencoklatan yang terjadi pada kalus ini diakibatkan stress yang dialami oleh kalus yang dikarenakan adanya cekaman ion Cu^{2+} . Menurut Prawiranata (1995), kondisi kalus berwarna coklat disebabkan oleh akumulasi fenol yang cukup besar pada kalus akibat absorpsi Cu^{2+} yang lebih dari cukup. Hal ini berkaitan dengan peran Cu^{2+} sebagai kofaktor untuk enzim polifenol oksidase yang akan memicu perubahan fenol menjadi kuinon. Adanya Cu^{2+} pada media juga bersifat cekaman. Menurut Ariningsih (2003), cekaman yang diberikan oleh media pada kalus akan berubah warna lebih tua dari kalus segar. Dengan demikian semakin tua perubahan warna kalus pada suatu media menunjukkan adanya aktifitas biosintesis metabolit sekunder lebih tinggi dan lebih besar.

Perubahan yang terjadi pada media tanpa Cu^{2+} (kontrol) setelah disubkultur pada minggu pertama warna kalus hijau bening, hingga minggu keempat subkultur warna kalus menjadi putih kehijauan dan pada bagian permukaan terlihat warna bening yang menandakan kalus melakukan regenerasi atau keadaan dalam aktif membelah. Karena dengan bertambahnya usia kalus perubahan warna akan terus terjadi sebagai tanda laju pertumbuhan sel itu sendiri.

Warna kalus yang hijau menandakan banyaknya kandungan klorofil dalam kalus tersebut. Menurut Rahayu (2003), dengan berlanjutnya pertumbuhan kalus maka akan diikuti dengan perubahan warna kalus. Kalus muda berwarna putih, kemudian warnanya akan berubah menjadi hijau dengan bertambahnya umur dan menandakan adanya klorofil dan telah terjadi proses fotosintesis. Kalus dengan

warna hijau tidak hanya dimungkinkan mengandung banyak pigmen klorofil akan tetapi, kalus yang terbentuk juga memiliki ukuran cukup besar yang menandakan bahwa kalus beregenerasi dengan baik dan sel-selnya masih aktif membelah.

Konsentrasi	Awal	Akhir
Kontrol	 Kalus berwarna hijau bening	 Kalus berwarna putih kehijauan
Cu 30 μ M	 Kalus berwarna hijau bening	 Kalus berwarna coklat kehijauan
Cu 35 μ M	 Kalus berwarna hijau bening	 Kalus berwarna coklat sedang
Cu 40 μ M	 Kalus berwarna hijau bening	 Kalus berwarna coklat tua

Gambar 4.1. Perubahan Warna Kalus pada media pemberian Cu²⁺ pada usia 4 minggu setelah subkultur

4.1.2 Tekstur Kalus

Indikator lain untuk mengamati pertumbuhan kalus adalah berupa tekstur kalus. Sehingga dapat diketahui kalus yang masih aktif membelah atau mati. Tekstur kalus dapat dibedakan atas kalus yang bertekstur kompak (*non friable*), kalus yang bertekstur remah (*friable*) dan kalus intermediet (perpaduan kalus kompak dan kalus remah).

Berdasarkan tabel 4.2 pada awal subkultur, kalus memiliki tekstur kompak dan setelah pengamatan selama 4 minggu pada semua perlakuan yakni pemberian Cu^{2+} dengan konsentrasi 30, 35 dan 40 μM tekstur kalus menjadi intermediet. Kalus dengan tekstur intermediet terdiri dari sekumpulan sel yang kuat pada bagian dalam dan sekumpulan sel yang mudah lepas pada bagian luar. Adanya sel yang mudah lepas pada bagian luar merupakan sel yang beregenerasi dan memiliki tekstur remah. Tekstur kalus remah adalah tekstur yang mudah dipisahkan sel-selnya. Tekstur kalus intermediet merupakan perpaduan antara tekstur kalus kompak dan tekstur kalus remah.

Tabel.4.2 Tekstur kalus dari awal subkultur dan setelah subkultur 4 minggu

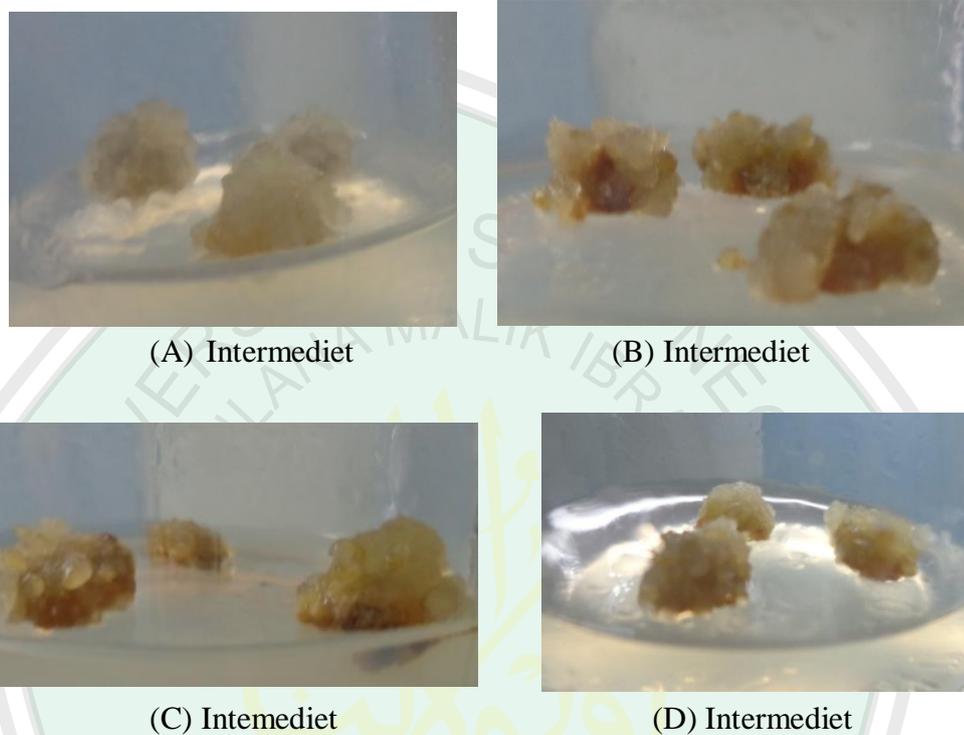
Konsentrasi Cu^{2+}	Tekstur Kalus	
	Awal	Akhir
0 (Kontrol)	Kompak	Intermediet
30 μM	Kompak	Intermediet
35 μM	Kompak	Intermediet
40 μM	Kompak	Intermediet

Tekstur kalus pada semua perlakuan setelah pengamatan 4 minggu menunjukkan tekstur kalus intermediet. Dimana tekstur kalus intermediet merupakan perpaduan antara tekstur kalus kompak dan tekstur kalus remah.

Tekstur kalus di setiap perlakuan bisa dilihat pada gambar 4.2. Menurut Dwi (2012), menyatakan bahwa tekstur kalus juga dipengaruhi oleh adanya zat pengatur tumbuh, kalus yang diinduksi dengan penambahan sitokinin memiliki tekstur yang lebih kompak daripada kalus yang dihasilkan tanpa induksi sitokinin. Tekstur kalus yang kompak merupakan efek dari sitokinin dan auksin yang mempengaruhi potensial air dalam sel. Hal ini menyebabkan penyerapan air dari medium ke dalam sel meningkat sehingga sel menjadi lebih kaku. Ariati (2012), juga menyatakan bahwa kalus yang memiliki tekstur kompak umumnya memiliki ukuran sel kecil dengan sitoplasma padat, inti besar dan memiliki banyak pati gandum (karbohidrat). Sedangkan tekstur remah biasanya mudah dalam hal pemisahan sel-selnya menjadi sel tunggal. Menurut Andaryani (2010), mengatakan bahwa kalus yang baik diasumsikan memiliki tekstur remah karena memudahkan dalam pemisahan menjadi sel-sel tunggal pada kultur suspensi, disamping itu akan meningkatkan aerasi oksigen antar sel.

Kalus yang baik untuk digunakan sebagai bahan penghasil metabolit sekunder yaitu memiliki tekstur kompak (*non friable*). Tekstur kalus yang kompak dianggap baik karena dapat mengakumulasi metabolit sekunder lebih banyak. Hal ini sesuai penelitian Harahap (2005), bahwa dari hasil analisis KCKT kalus bertekstur kompak mempunyai kadar asiatikosida yang lebih tinggi daripada kadar asiatikosida kalus yang bertekstur remah. Menurut penelitian Lindsey dan Yeoman (1983), kalus yang bertekstur remah umumnya akan mengakumulasi senyawa metabolit sekunder dalam jumlah sedikit dibanding dengan kalus yang bertekstur kompak. Sehingga pada kalus kompak dapat dihasilkan metabolit

sekunder lebih tinggi daripada kalus remah, dan kalus yang remah merupakan kalus yang baik untuk upaya dilakukannya subkultur dalam perbanyakkan tanaman.



Gambar 4.2 Perkembangan tekstur kalus pada media pemberian ion Cu^{2+} setelah berumur 4 minggu setelah subkultur. (A)kontrol, (B) Cu^{2+} $30\mu\text{M}$, (C) Cu^{2+} $35\mu\text{M}$, (D) Cu^{2+} $40\mu\text{M}$

4.1.3. Berat Kalus

Pertumbuhan adalah peningkatan permanen ukuran organisme atau bagian dari tumbuhan yang merupakan hasil dari peningkatan jumlah dan ukuran sel. Berat segar kalus yang besar disebabkan karena kandungan airnya yang tinggi. Berat basah yang dihasilkan sangat tergantung pada kecepatan sel-sel membelah diri, memperbanyak diri dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus (Rahayu *et al*, 2003). Menurut Santoso dan Nursandi (2002), laju pertumbuhan kalus yang nilainya lebih tinggi dimungkinkan karena adanya pengaktifan gen yang berarti

terjadi proses penguatan terhadap aktivitas replikasi DNA dan transkripsi berulang DNA menjadi mRNA yang diikuti oleh translasi mRNA menjadi protein. Zat pengatur tumbuh dalam media juga berperan dalam proses tersebut sehingga proses proliferasi sel dan morfogenesis dapat berjalan.

Berdasarkan hasil ANOVA *one way* pada berat kalus menunjukkan tidak adanya pengaruh Cu^{2+} terhadap berat kalus pegangan dan tidak dilanjutkan uji lanjut DMRT (*Duncan multiple range test*) (Lampiran 5 Tabel.2). Sehingga dari semua perlakuan untuk berat kalus tidak beda nyata. Penimbangan berat kalus pada penelitian ini dilakukan dua kali, yang pertama dilakukan sebelum subkultur dan beratnya harus sama yaitu 0,1 g. sedangkan yang kedua dilakukan pada minggu keempat atau pengamatan hari ke-30 subkultur. Adapun berat kalus yang diperoleh di akhir subkultur atau minggu ke-empat dapat diketahui pada tabel 4.3

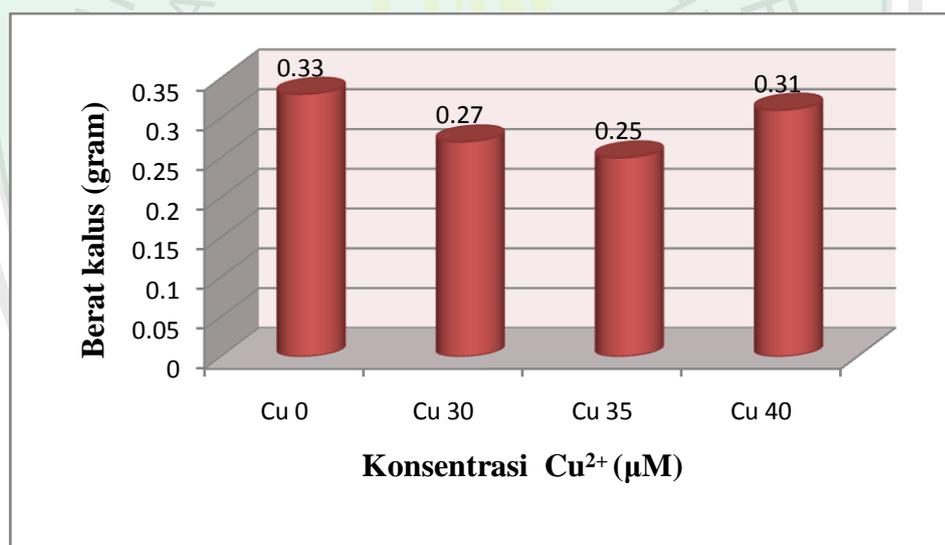
Tabel 4.3 Tabel pengaruh Cu^{2+} terhadap berat kalus yang disajikan pada awal subkultur hingga akhir minggu keempat

Konsentrasi Cu^{2+}	Berat Kalus (Gram)	
	Awal	Akhir
Cu^{2+} 0 μM	0,1	0,33a
Cu^{2+} 30 μM	0,1	0,27a
Cu^{2+} 35 μM	0,1	0,25a
Cu^{2+} 40 μM	0,1	0,31a

Keterangan: Nilai yang ditulis dengan huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata dalam setiap perlakuan

Berdasarkan tabel 4.3, Cu^{2+} tidak berpengaruh nyata terhadap berat kalus pegangan. Sehingga bisa dikatakan bahwa laju pertumbuhan pada kalus dari beberapa perlakuan konsentrasi Cu^{2+} sama. Karena dengan berat kalus bisa mengindikasikan sel-sel yang aktif membelah atau tidak. Pertumbuhan kalus dalam media perlakuan ini tergolong memiliki pertumbuhan yang agak lambat hal

ini dikarenakan laju pada media diduga adanya hambatan pada tahapan-tahapan siklus sel untuk membelah dan memperbanyak diri. Menurut Sutini (2008), mengatakan bahwa perlambatan pertumbuhan kalus pada media elisitasi dapat dikarenakan kalus menyesuaikan diri pada media baru. Selain itu kondisi kalus masih berada dalam fase lag menuju fase linear pertumbuhan. Dan pada fase linier pembentukan metabolit sekunder mulai terjadi. Selain itu menurut Srivastava dan Gupta (1996), ion-ion logam memiliki sifat antagonis didalam sel yaitu dengan adanya penghambatan penyerapan salah satu ion apabila ion lain yang didalamnya dalam kondisi berlebih. Diagram berat akhir kalus dapat dilihat pada gambar 4.3



Gambar 4.3. Diagram berat akhir kalus pegagan (*Centella asiatica* L. Urban) berumur 4 minggu setelah subkultur

Terhambatnya laju pertumbuhan kalus dapat juga dikarenakan kondisi kalus pada saat tahap inisiasi, yang artinya jika pada tahap inisiasi kalus dalam keadaan tidak baik dengan warna yang agak kecoklatan atau berwarna hijau lebih pekat dan kurang menunjukkan adanya proliferasi sel, maka dapat diasumsikan pada saat dilakukan subkultur dengan media perlakuan menggunakan ion-ion logam akan

mengalami perhambatan yang lebih besar dari pada kalus yang baik yang menunjukkan laju pertumbuhan dan pembelahan yang lebih baik. Ariningsih (2003), mengatakan bahwa laju pertumbuhan kalus baik pada media inisiasi maupun media perlakuan dapat diduga karena adanya kondisi internal pada kalus baik secara anatomi maupun secara morfologi. Lambatnya laju pertumbuhan kalus diduga disebabkan oleh adanya substitusi dalam absorpsi ion-ion yang mempunyai fungsi sama, sehingga laju pertumbuhan kalus tetap terjaga kestabilannya. Selain itu juga karena lamanya waktu di media perlakuan yang pendek menyebabkan stres ion metal kurang berpengaruh terhadap sel-sel kalus yang dikulturkan.

4.2 Pengaruh Pemberian Cu^{2+} Terhadap Kadar Senyawa Asiatikosida dan Madekasosida Kalus Pegagan (*Centella asiatica* L.Urban) Secara *In vitro*

Metabolit sekunder sangat diperlukan bagi tumbuhan beberapa diantaranya bermanfaat sebagai mekanisme pertahanan dalam melawan serangan bakteri, virus, dan jamur sehingga dapat dianalogikan seperti sistem kekebalan tubuh (Vickery dan Vickery 1981). Metabolit sekunder merupakan senyawa yang disintesis tanaman. Senyawa – senyawa tersebut bermanfaat bagi tanaman itu sendiri maupun bagi hewan atau manusia. Untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder digunakan teknik kultur jaringan. Dalam teknik kultur jaringan terdapat metode penambahan ion logam yang dikenal dengan elisitasi. Elisitasi adalah teknik pemberian materi abiotik maupun biotik kedalam sel tumbuhan sehingga produksi metabolit sekunder tumbuhan dapat meningkat, sebagai respon tumbuhan dalam mempertahankan diri (Buitelaar, 1991). Dalam penelitian ini digunakan Cu^{2+}

yang ditambahkan dalam media subkultur kalus, sehingga adanya Cu^{2+} diharapkan bisa meningkatkan produksi metabolit sekunder pada kalus pegagan.

Pengujian senyawa asiatikosida dan madekasosida pada kalus pegagan dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau HPLC (*high performance liquid chromatography*). Menurut Macrae (1998) keuntungan utama dari HPLC adalah kemampuannya untuk menangkap komponen dengan stabilitas panas yang terbatas ataupun yang bersifat volatile. HPLC adalah metode yang sangat selektif, dan memiliki tingkat otomatisasi yang tinggi, sehingga lebih sederhana dalam pengoperasian. Di samping itu, HPLC banyak digunakan untuk analisis karena kemudahan injeksi, deteksi dan pengolahan data serta dapat digunakan untuk berbagai macam sampel seperti sampel cairan, padatan yang dilarutkan, maupun sampel yang labil terhadap pemanasan. Setelah dilakukan pengujian kadar senyawa asiatikosida dan madekasosida dengan menggunakan HPLC maka akan didapatkan data kadar senyawa asiatikosida dan madekasosida serta kurva hasil HPLC pada kalus pegagan (Lampiran 8.)

Pengujian kalus setelah perlakuan dilakukan setelah berumur 4 minggu setelah subkultur dengan pertimbangan pada hari ke-30 setelah subkultur kalus mengalami fase pertumbuhan linier yang artinya pembelahan sel mulai menurun dan terjadi penurunan kecepatan tumbuh. Hal ini dikarenakan fase linier merupakan fase yang dekat dengan fase stasioner. Pada fase stasioner adalah fase konstan yang menyebabkan produksi metabolit sekunder mengalami peningkatan. Menurut Ramawat (1999), pada fase stasioner produksi metabolit primer dan

pertumbuhan kalus berhenti, proliferasi sel berhenti karena nutrisi didalam media telah habis. Pada fase ini terjadi peningkatan sintesis metabolit sekunder. Jika pada ini kalus tidak dipanen, maka akan terjadi degradasi metabolit sekunder.

Menurut Phillips (1995), pertumbuhan kalus dapat digambarkan dalam bentuk kurva sigmoid, dan membagi menjadi lima fase pertumbuhan kalus yaitu fase lag, dimana sel-sel mulai membelah, fase eksponensial, dimana laju pertumbuhan sel berada pada puncaknya, fase linier yaitu pembelahan sel mengalami perlambatan tetapi laju ekspansi sel meningkat, fase deselerasi, laju pembelahan dan pemanjangan sel menurun dan fase stasioner, dimana jumlah dan ukuran tetap.

Berdasarkan hasil uji statistik ANOVA *one way* menunjukkan adanya pengaruh pemberian Cu^{2+} terhadap kadar senyawa asiaticosida dan madecacosida pada kalus pegagan (*Centella asiatica* L. Urban) karena $\text{sig} < 0.05$. Untuk mengetahui perlakuan yang terbaik dilakukan uji lanjut DMRT (*Duncan multiple range test*) (Lampiran 5 tabel.5 dan tabel.7). Hasil uji lanjut disajikan pada tabel 4.4 dan tabel 4.5 sebagai berikut :

Tabel 4.4 Hasil Uji Jarak Duncan Mengenai Perbedaan konsentrasi Cu^{2+} terhadap kadar senyawa asiaticosida pada kalus pegagan (*Centella asiatica* L. Urban)

Konsentrasi perlakuan	Kandungan Asiaticosida (g/100g)
Cu 0 (Kontrol)	3,6235 a
Cu 1 (30 μM)	3,8236 b
Cu 2 (35 μM)	4,0435 c
Cu 3 (40 μM)	4,1595 d

Keterangan : Nilai yang ditulis dengan huruf yang berbeda menunjukkan potensi hasil yang berbeda nyata pada taraf 5%

Berdasarkan tabel 4.4 pemberian Cu^{2+} dengan konsentrasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata (signifikan). Perlakuan dengan pemberian Cu^{2+} 40 μM memiliki kadar senyawa asiaticosida tertinggi yaitu 4,1595 g/100g. Dari tabel tersebut kadar senyawa asiaticosida terendah yaitu pada kontrol (tanpa Cu^{2+}) yaitu 3,6235 g/100g. Sehingga dapat dikatakan bahwa dengan pemberian Cu^{2+} pada media subkultur kalus dapat meningkatkan kandungan senyawa asiaticosida pada kalus pegagan (*Centella asiatica* L.Urban). Dari perbedaan konsentrasi tersebut, dapat dikatakan bahwa konsentrasi Cu^{2+} 40 μM memiliki kandungan senyawa asiaticosida tinggi. Hal ini sesuai dalam Al-Qur'an surat Al-Qamar ayat 49:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٤٩﴾

Artinya : “*Sesungguhnya kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran*”.
(QS.Al-Qamar,13 :49)

Dalam ayat diatas dijelaskan bahwa “Allah telah menciptakan segala sesuatu menurut ukurannya”. Sehingga dalam penelitian ini, dengan konsentrasi Cu^{2+} yang berbeda akan menghasilkan kadar senyawa asiaticosida yang berbeda pula. Dan pada ayat ini Allah mengisyaratkan bahwa terdapat rahasia dibalik kata “Ukuran” yang harus dikaji dan dipelajari lebih dalam.

Tabel 4.5 Hasil Uji Jarak Duncan Mengenai Perbedaan konsentrasi Cu^{2+} terhadap kadar senyawa madekasosida pada kalus pegagan (*Centella asiatica* L.Urban)

Konsentrasi perlakuan	Kandungan Madekasosida (g/100g)
Cu 0 (Kontrol)	4,2207 a
Cu 1 (30 μM)	4,4122 b
Cu 2 (35 μM)	4,6075 c
Cu 3 (40 μM)	4,7185 d

Keterangan : Nilai yang ditulis dengan huruf yang berbeda menunjukkan potensi hasil yang berbeda nyata pada taraf 5%

Berdasarkan tabel 4.5 pemberian Cu^{2+} dengan konsentrasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata (signifikan). Perlakuan dengan pemberian Cu^{2+} 40 μM memiliki kadar senyawa madekasosida tertinggi yaitu 4,7185 g/100g. Dari tabel tersebut kadar senyawa madekasosida terendah yaitu pada kontrol (tanpa Cu^{2+}) yaitu 4,2207 g/100g. Sehingga dapat dikatakan bahwa dengan pemberian Cu^{2+} pada media subkultur kalus dapat meningkatkan kandungan senyawa madekasosida pada kalus pegagan (*Centella asiatica* L.Urban).

Pemberian Cu^{2+} pada kalus pegagan berpengaruh terhadap kadar metabolit sekunder, hal ini juga dibuktikan dengan perbedaan kadar metabolit sekunder pada daun segar pegagan, dimana kadar senyawa asiatikosida dan madekasosida pada daun segar pegagan yaitu 3,2186 g/100g untuk asiatikosida dan 3,7234 g/100g untuk madekasosida. Di bandingkan dengan kultur kalus, hasil tersebut memiliki kadar yang lebih rendah. Kadar senyawa asiatikosida dan dengan pemberian Cu^{2+} yaitu konsentrasi Cu^{2+} 30 μM memiliki kadar senyawa asiatikosida 3,8236 g/100g, konsentrasi Cu^{2+} 35 μM yaitu 4,0435 g/100g dan konsentrasi Cu^{2+} 40 μM yaitu 4,1595 g/100g. Dibandingkan dengan kontrol, kandungan daun segar

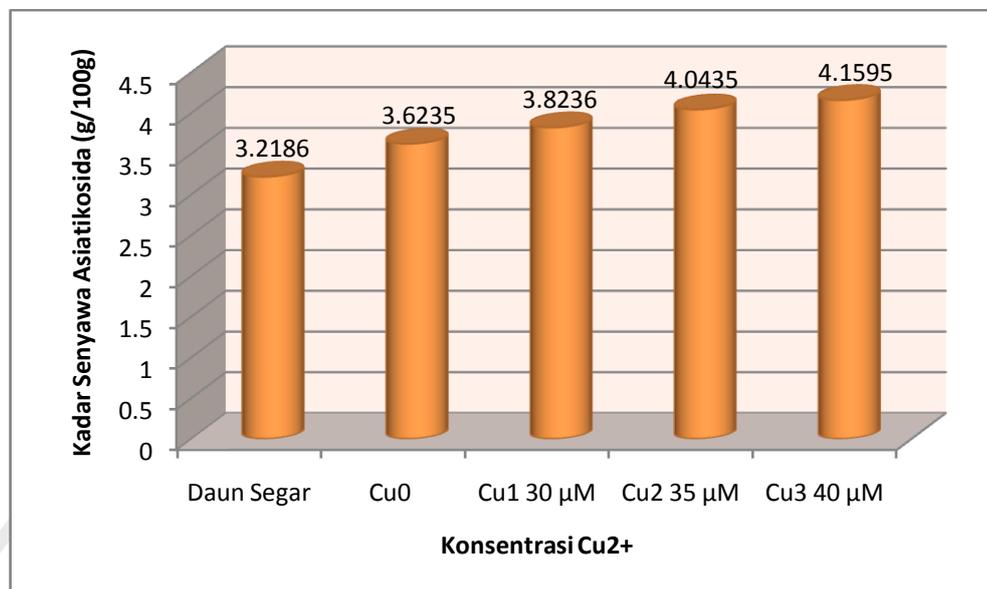
pegagan juga memiliki kadar senyawa asiaticosida lebih rendah, dimana kadar senyawa pada kontrol yaitu 3,6235 g/100g.

Untuk kadar senyawa madekasosida dengan pemberian Cu^{2+} dengan konsentrasi $30\mu\text{M}$ memiliki kadar senyawa madekasosida 4,4122 g/100g, konsentrasi Cu^{2+} $35\mu\text{M}$ yaitu 4,6075 g/100g dan konsentrasi Cu^{2+} $40\mu\text{M}$ yaitu 4,7185 g/100g. Dibandingkan dengan kontrol, kandungan daun segar pegagan juga memiliki kadar senyawa madekasosida lebih rendah, dimana kadar senyawa pada kontrol yaitu 4,2207 g/100g. Hal ini sesuai penelitian Kying (2008), dimana kandungan flavonoid planlet pegagan secara *in vitro* lebih tinggi yaitu $4456,9 + 287,5 \mu\text{g/g}$ dibandingkan tumbuhan dengan media hidroponik yaitu $2401,0 + 148,4 \mu\text{g/g}$ dan juga tanaman langsung dari lapang yaitu $2323,5 + 376,8 \mu\text{g/g}$. Dari uraian tersebut dapat dikatakan bahwa kultur kalus mampu meningkatkan kandungan metabolit sekunder lebih tinggi dibandingkan dengan daun segar. Menurut Hardiyanto (2004) telah dijelaskan bahwa teknik kultur *in vitro* untuk mendapatkan metabolit sekunder dari kalus mempunyai keuntungan diantaranya menghemat waktu, tenaga, dapat diproduksi dalam jumlah yang cukup banyak dengan kondisi yang terkontrol dan dapat diproduksi sesuai dengan kebutuhan. Adapun peningkatan kadar senyawa asiaticosida dan madekasosida dapat dilihat pada gambar 4.4 dan gambar 4.5

Adanya Cu^{2+} berperan dalam peningkatan metabolit sekunder karena Cu^{2+} berperan sebagai elisitor. Menurut Eilert *et al.* (1986), Elisitor mengaktifkan gen dalam tumbuhan yang mengkode enzim yang diperlukan untuk sintesis fitoaleksin. Elisitor selain menginduksi pembentukan fitoaleksin juga

meningkatkan berbagai metabolit sekunder dan enzim lain. Pada kultur kalus dan kultur sel penambahan elisitor juga dapat menginduksi senyawa metabolit sekunder yang bukan fitoaleksin.

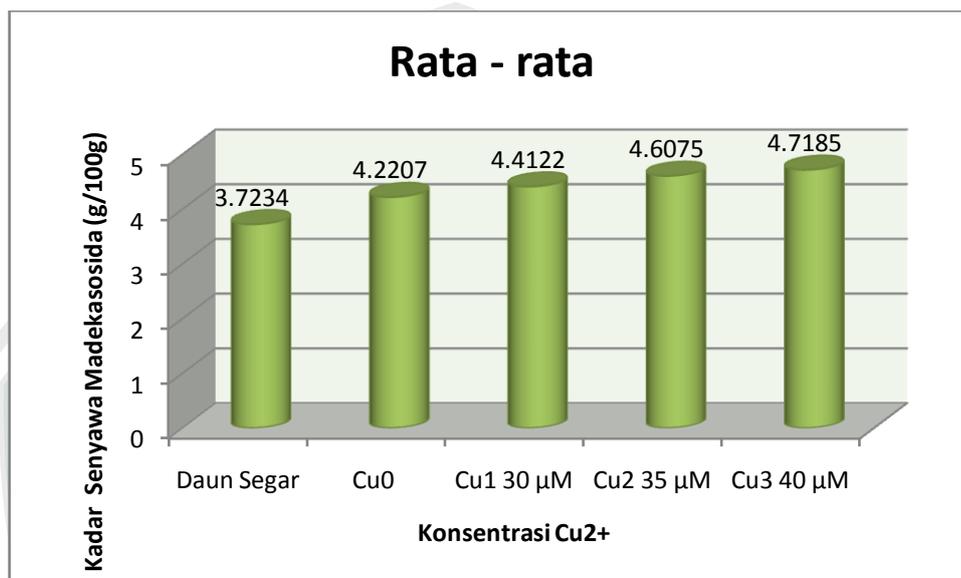
Penggunaan elisitor untuk meningkatkan metabolit sekunder harus diperhatikan. Menurut Sutini (2008), mengatakan bahwa elisitasi perlu akan adanya optimasi antara lain yaitu konsentrasi, waktu elisitasi dan dosis. Penambahan Cu^{2+} dalam kultur jaringan sampai dosis tertentu mampu mempengaruhi akumulasi metabolit sekunder, hal ini disebabkan karena Cu^{2+} dapat berfungsi sebagai pemacu terhadap aktivitas enzim, membran sel dan Ca^{2+} sehingga berpengaruh terhadap metabolisme, hasil metabolisme dan pertumbuhan sel. Menurut Fitriani (1999), mengemukakan bahwa elisitor merupakan efektor yang akan berinteraksi dengan reseptor yang ada pada sel tumbuhan, antara lain pada membran plasma. Pengenalan antara efektor dengan reseptor akan menginduksi serangkaian proses yang melibatkan transkripsi dan translasi gen-gen tertentu, yang kemudian menginduksi sintesis enzim yang diperlukan dalam biosintesis metabolit sekunder.



Gambar 4.4 Diagram pengaruh pemberian Cu^{2+} terhadap kadar asiatikosida pada kalus pegagan (*Centella asiatica* L.Urban) setelah berumur 4 minggu

Secara umum pengaruh pemberian elisitasi sebagai induksi produksi fitoaleksin dan senyawa metabolit lainnya dapat diduga secara langsung berkaitan dengan DNA yang terdapat pada intisel tumbuhan dengan cara elisitor masuk kedalam sel melalui reseptor yang terdapat pada membran sel yang kemudian dihantarkan kedalam sistem *messenger intracellular* melalui aktivasi fosfolipase dalam sel kemudian elisitor dapat mengubah ekspresi gen yang dapat mengaktifkan transkripsi gen-gen untuk biosintesa metabolit sekunder. Asumsi yang kedua yaitu elisitor masuk kedalam membran sel yang kemudian menjadi signal dalam sel tumbuhan melalui Ca^{2+} yang bertindak sebagai *second messenger*. Proses ini akan memacu respon seluler pada sel terhadap rangsangan eksternal untuk kemudian sel mengubah ekspresi gennya (Oku, 1994). Menurut

Sitinjak (2000), naiknya Ca^{2+} dalam sitosol mengaktifkan beberapa enzim. Termasuk protein kinase. Protein kinase memfosforilasi enzim yang mengatur metabolisme termasuk produksi metabolit sekunder.



Gambar 4.5 Diagram pengaruh pemberian Cu^{2+} terhadap kadar madekasosida pada kalus pegangan (*Centella asiatica* L.Urban) setelah berumur 4 minggu

Menurut Endt *et al* (2002), pengaturan jalur biosintesis metabolit sekunder dilakukan oleh faktor transkripsi spesifik. Faktor transkripsi ini berupa sekuen *DNA-binding protein* yang mengatur inisiasi mRNA dan yang berhubungan dengan daerah promotor gen target. Protein tersebut mengatur transkripsi gen berdasarkan tipe jaringan atau dalam hal respon terhadap sinyal internal (hormon tanaman), dan sinyal eksternal (elisitor). Proses secara garis besar Cu^{2+} akan mengaktifkan sinyal yang berfungsi menginduksi gen-gen yang berperan dalam produksi senyawa terpenoid yang terjadi melalui dua jalur biosintesis yaitu jalur asam mevalonat dan jalur deoksiselulosa difosfat.

Peranan Cu^{2+} pada metabolisme senyawa terpenoid dapat memacu proses enzimatis yang berlangsung melalui lintasan asam mevalonat seperti pada gambar 2.7. Menurut Hudoyono (2004), elisitor Cu^{2+} juga berperan sebagai kofaktor yang akan menempel pada sisi non protein pada enzim pemacu metabolisme metabolit sekunder jenis terpenoid. Enzim yang dapat memacu pembentukan senyawa terpenoid antara lain enzim IPP isomerase, GPP sintetase, FPP sintetase, skualena sintetase, dan skualena epoksidase yang dapat berlalu pada jalur asam mevalonat (gambar 2.7).

