

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Pengaruh Pemberian Fe<sup>2+</sup> Terhadap Perkembangan Morfologi (Warna dan Tekstur) Serta Berat Kalus Pegagan (*Centella asiatica* L.Urban) Secara In Vitro

Kalus yang terbentuk pada induksi kalus berwarna hijau dengan tekstur kompak, sedangkan rata-rata berat kalus yang diperoleh pada tahap induksi adalah 0,1-0,16 g. Kalus yang digunakan pada tahap subkultur berusia 46 hari. Hasil kalus dari tahap subkultur diamati perkembangan morfologinya setiap minggunya, yaitu dari minggu pertama hingga minggu terakhir atau kalus berumur 30 hari. Pertumbuhan kalus ditandai dengan adanya perubahan morfologi kalus yaitu warna, tekstur dan berat. Warna dan tekstur menggambarkan secara visual perkembangan kalus sehingga dapat diketahui adanya sel-sel yang aktif membelah atau sel-sel yang telah mati. Sedangkan berat kalus menunjukkan nilai kuantitatif dari pertumbuhan kalus yang ditimbang menggunakan timbangan analitik.

##### 4.1.1 Warna Kalus

Kalus yang diperoleh pada tahap inisiasi secara keseluruhan berwarna putih kehijauan. Kalus yang berwarna hijau mengindikasikan bahwa kalus tersebut sel-selnya masih aktif membelah dan mengandung klorofil. Menurut Fatmawati (2008), warna kalus mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofil.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan warna kalus pada media subkultur dengan penambahan  $\text{Fe}^{2+}$ . Perbedaan warna kalus disebabkan adanya perbedaan perkembangan pada tiap kalus. Jaringan kalus yang dihasilkan dari suatu eksplan biasanya memunculkan warna yang berbeda-beda (Lutviana, 2012). Perbedaan warna kalus dapat disebabkan beberapa hal diantaranya yaitu pigmentasi, intensitas cahaya dan sumber eksplan dari bagian tanaman yang berbeda (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Tabel hasil pengamatan warna kalus dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

Tabel 4.1 Warna kalus pegagan (*C. asiatica*) pada media perlakuan subkultur dari minggu pertama hingga minggu terakhir dengan umur kalus 30 hari.

Konsentrasi $\text{Fe}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	Warna Kalus	
	Awal	Akhir
0	Hijau bening	Putih
90	Hijau bening	Putih kekuningan
100	Hijau bening	Putih kecoklatan
110	Hijau bening	Kuning kecoklatan

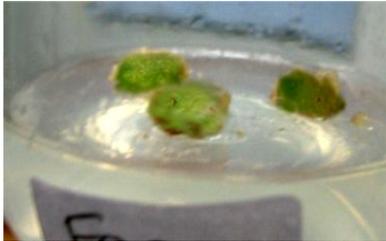
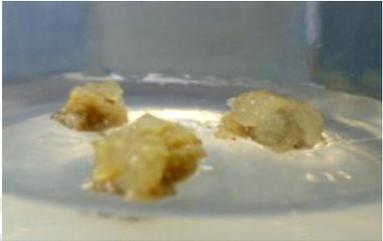
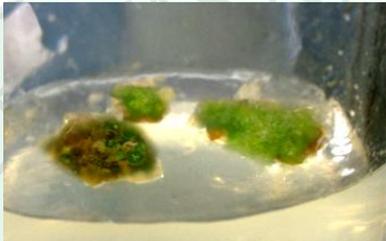
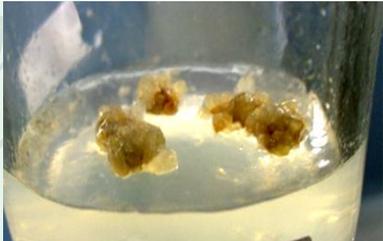
Berdasarkan tabel di atas dapat diketahui bahwa terjadi perubahan warna pada media kontrol atau tanpa penambahan  $\text{Fe}^{2+}$  dari minggu pertama hingga minggu terakhir. Pada awalnya kalus berwarna hijau hingga pada minggu ketiga sampai dengan minggu terakhir kalus berwarna putih. Terbentuknya bagian hijau pada kalus merupakan awal terjadinya morfogenesis (Pishesa, 2008). Wardani, dkk., (2004), warna kalus yang hijau disebabkan peningkatan konsentrasi sitokinin yang tinggi. Sitokinin yang ditambahkan dalam media mampu menghambat perombakan butir-

butir klorofil karena sitokinin mampu mengaktifkan proses metabolisme dan sintesis protein (Wattimena, 1991).

Kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embrionik yang belum mengandung kloroplas, tetapi memiliki kandungan butir pati yang tinggi (Tsuero, 1998). Selain itu, Fatmawati (2008), menjelaskan bahwa kalus yang berwarna putih atau terang mengindikasikan bahwa pertumbuhan kalus dalam keadaan cukup baik. Perubahan warna yang terjadi disebabkan adanya pigmentasi dari klorofil yang mengalami degradasi.

Pengamatan warna kalus minggu terakhir pada media  $\text{Fe}^{2+}$  dengan konsentrasi 90  $\mu\text{M}$  mengalami perubahan warna dari putih kehijauan menjadi putih kekuningan, sedangkan media  $\text{Fe}^{2+}$  dengan konsentrasi 100  $\mu\text{M}$  mengalami perubahan warna dari putih kehijauan menjadi putih kecoklatan, dan pada media  $\text{Fe}^{2+}$  dengan konsentrasi 110  $\mu\text{M}$  mengalami perubahan warna dari hijau menjadi kuning kecoklatan. Berdasarkan uraian di atas dapat disimpulkan bahwa pemberian  $\text{Fe}^{2+}$  dengan konsentrasi yang berbeda berpengaruh terhadap warna kalus yaitu semakin tinggi konsentrasi  $\text{Fe}^{2+}$  maka warna kalus akan semakin pekat atau kecoklatan. Perubahan warna ini diduga karena adanya substitusi antara  $\text{Fe}^{2+}$  pada media. Faktor komposisi media sangat mempengaruhi aktivitas enzim yang mempengaruhi pertumbuhan (Merilon *et al.*, 1986). Besi merupakan nutrisi penting bagi tanaman karena besi berfungsi untuk menerima dan menyumbangkan elektron dan juga memiliki peranan penting sebagai pembawa elektron pada proses fotosintesis dan respirasi (Connolly, 2002).

Pemberian  $\text{Fe}^{2+}$  pada media diduga dapat mengakibatkan adanya cekaman pada kalus sehingga kalus mengalami perubahan warna. Menurut Ariningsih (2003), cekaman yang diberikan oleh media pada kalus mengindikasikan kalus akan berubah warna lebih tua dari kalus segar. Dengan demikian semakin tua, perubahan kalus pada suatu media menunjukkan adanya aktifitas biosintesis metabolit sekunder lebih tinggi dan lebih besar. Perubahan warna kalus juga tergantung pada media perkembangannya. Vickery (2003), menyatakan bahwa sintesis senyawa fenolik dipicu oleh cekaman atau gangguan pada sel tanaman. Cekaman atau gangguan yang terjadi disebabkan karena berkurangnya nutrisi yang ada dalam media. Pencoklatan dapat menurunkan kemampuan regenerasi *in vitro*, dan toksisitas medium (Hutami, 2008). Meskipun berwarna coklat tetapi sel-sel kalus tidak mengalami kematian hal ini dibuktikan adanya aktifitas sel yang membelah sehingga volume sel juga bertambah besar. Adapun perubahan warna kalus disajikan pada gambar 4.1 :

Konsentrasi	Warna Awal	Warna Akhir
Kontrol	 Kalus berwarna hijau bening	 Kalus berwarna putih
Fe <sup>2+</sup> 90μM	 Kalus berwarna hijau bening	 Kalus berwarna putih kekuningan
Fe <sup>2+</sup> 100 μM	 Kalus berwarna hijau bening	 Kalus berwarna putih kecoklatan
Fe <sup>2+</sup> 110 μM	 Kalus berwarna hijau bening	 Kalus berwarna kuning kecoklatan

Gambar 4.1 Pengaruh konsentrasi Fe<sup>2+</sup> terhadap perubahan warna kalus pada minggu pertama hingga minggu terakhir pengamatan (usia kalus 30 hari).

Widayanto (2004), menyatakan bahwa perubahan pada kalus dari putih kekuningan hingga coklat mengindikasikan penurunan pertumbuhan pada sel-sel kalus. Sel-sel tersebut memiliki aktifitas pembelahan yang sangat rendah sehingga daya regenerasinya telah berkurang. Warna kecoklatan pada kalus (*browning*) ini akibat adanya metabolisme senyawa fenol bersifat toksik, yang sering terangsang akibat proses sterilisasi eksplan, yang menghambat pertumbuhan atau bahkan menyebabkan kematian jaringan (Yusnita, 2004).

Dubravina (2005), pencoklatan pada jaringan terkait dengan akumulasi fenol yang berlebihan. Fenol yang teroksidasi akan membentuk kuinon dan kuinon adalah senyawa yang menyebabkan adanya warna coklat pada kultur kalus. Intensitas warna coklat berkorelasi positif dengan hiperaktivitas enzim oksidatif (Naz, 2008), sedangkan peningkatan aktivitas enzim tersebut terkait dengan reaksi pertahanan jaringan dari stress oksidatif.

Santoso dan Nursadi (2004), menyatakan bahwa peristiwa pencoklatan tersebut sesungguhnya merupakan suatu peristiwa alamiah dan proses perubahan adaptif bagian tanaman akibat adanya pengaruh fisik seperti pengupasan, dan pemotongan. Gejala pencoklatan merupakan tanda-tanda terjadinya kemunduran fisiologis eksplan. Selain menandakan sintesis senyawa fenol, warna coklat disebabkan oleh semakin bertambahnya umur sel atau jaringan kalus. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Palupi *et al* (2004), bahwa kalus yang berwarna coklat merupakan kalus yang mengalami proses penuan (*senescensi*).

#### 4.1.2 Tekstur Kalus

Tipe kalus merupakan suatu penanda yang digunakan untuk menentukan kualitas kalus yang dihasilkan (Rasud, 2012). Turhan (2004), menyatakan bahwa secara visual kalus dapat dibedakan menjadi tiga tipe kalus, yaitu kompak, intermediet, dan remah. Kalus yang memiliki tekstur yang remah mudah memisahkan diri menjadi sel-sel tunggal. Kalus remah sangat cocok digunakan untuk pertumbuhan sebagai kalus suspensi (Alitalia, 2008). Kalus remah merupakan kalus yang tersusun atas sel-sel tubular dimana struktur sel-selnya renggang, tidak teratur dan mudah rapuh (Manuhara 2001).

Kalus yang digunakan pada subkultur merupakan kalus yang berstruktur kompak. Kalus kompak merupakan kalus yang tersusun atas sel-sel berbentuk nodular, dengan struktur yang padat dan mengandung banyak air Manuhara (2001). Dodd (1993), menyatakan kalus yang memiliki tekstur kompak umumnya memiliki ukuran sel kecil dengan sitoplasma padat, inti besar dan banyak memiliki pati gandum (karbohidrat).

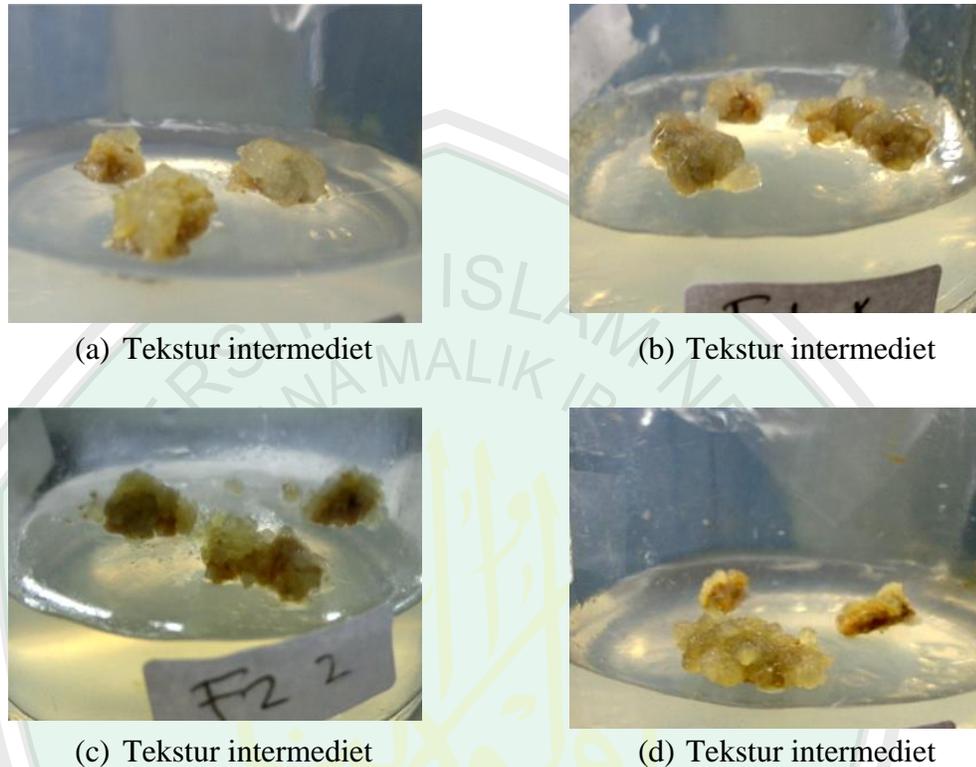
Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tekstur kalus pada media kontrol dan media perlakuan adalah intermediet. Pada permukaan bawah eksplan yang tumbuh menjadi kalus terlihat kondisi jaringan yang berair. Kalus intermediate merupakan perpaduan antara kalus kompak dengan kalus remah. Hal ini diduga karena pengaruh hormon 2,4-D yang disubsitusikan ke dalam media bekerja secara sinergis dengan hormon endogen yang ada pada eksplan sehingga hormon tersebut dapat merangsang perubahan kalus menjadi semi remah atau intermediet. Berdasarkan hasil tersebut

dapat dikatakan bahwa pemberian ion logam  $\text{Fe}^{2+}$  tidak berpengaruh terhadap tekstur kalus. Widiarso (2010) kalus tipe intermediet merupakan massa kalus yang terdiri dari kelompok sel-sel yang sebagian kompak dan sebagian lainnya remah. Adapun perubahan tekstur kalus dapat dilihat pada tabel 4.2 :

Tabel 4.2 Tekstur kalus pegagan (*C. asiatica*) pada media perlakuan subkultur dari minggu pertama hingga minggu terakhir dengan umur kalus 30 hari.

Konsentrasi $\text{Fe}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	Warna Kalus	
	Awal	Akhir
0	Kompak	Intermediet
90	Kompak	Intermediet
100	Kompak	Intermediet
110	Kompak	Intermediet

Pierik (1987) menyatakan tekstur pada kalus dapat bervariasi dari kompak hingga meremah, tergantung pada jenis tanaman yang digunakan, komposisi nutrisi media, zat pengatur tumbuh dan kondisi lingkungan kultur. Adapun tekstur kalus pada pengamatan minggu terakhir dapat dilihat pada gambar 4.2 :



Gambar 4.2 Tekstur kalus pada media perlakuan dengan penambahan  $\text{Fe}^{2+}$  setelah kalus berumur 4 minggu setelah subkultur. (a) kontrol, (b)  $\text{Fe}^{2+}$  90  $\mu\text{M}$ , (c)  $\text{Fe}^{2+}$  100  $\mu\text{M}$ , (d)  $\text{Fe}^{2+}$  110  $\mu\text{M}$

Kalus yang baik untuk digunakan sebagai bahan penghasil metabolit sekunder yaitu memiliki tekstur kompak. Tekstur kalus kompak dianggap baik karena dapat mengakumulasi metabolit sekunder lebih banyak (Indah dan Dini, 2013). Ramawat (1999), menyatakan bahwa kalus akan menghasilkan senyawa metabolit sekunder pada saat sel-sel mengalami penurunan aktifitas pembelahan dan penurunan. Kalus kompak merupakan tekstur kalus yang mengalami pembelahan pada fase stasioner sehingga kalus kompak cenderung mengalami pembelahan yang lambat jika dibandingkan dengan kalus remah yang memiliki daya poliferasi lebih cepat.

Sehingga pada kalus kompak dapat dihasilkan produksi metabolit sekunder yang lebih tinggi.

Pedroso dan Pais (1995), menyatakan tekstur kalus yang remah pada umumnya menunjukkan potensi embriogenik artinya apabila kalus tersebut terus dipelihara akan diperoleh embrio somatik, sedangkan tekstur kalus yang kompak menunjukkan adanya potensi organogenik.

#### **4.1.3 Berat Kalus**

Berat kalus yang digunakan pada tahap subkultur terlebih dahulu diseragamkan beratnya yaitu sebesar 0,1 g yang ditimbang menggunakan timbangan analitik. Hal ini bertujuan untuk mengetahui perubahan volume sel pada tiap perlakuan dengan pemberian  $Fe^{2+}$ .

Berdasarkan ANOVA, diketahui bahwa perlakuan pemberian  $Fe^{2+}$  dengan berbagai konsentrasi tidak memberikan pengaruh yang nyata. Hal ini ditandai dengan nilai signifikansi 0,79 ( $P > 0,05$ ). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada minggu terakhir pengamatan kalus pada media perlakuan mengalami penambahan volume karena terjadi pembesaran sel. Secara keseluruhan ukuran kalus menjadi dua kali ukuran semula, yang ditunjukkan dengan peningkatan berat basah kalus awal. Adapun pertumbuhan kalus dapat dilihat pada tabel dibawah ini (Tabel 4.3) :

4.3 Data pengaruh pemberian  $\text{Fe}^{2+}$  terhadap berat kalus yang disajikan pada awal subkultur hingga minggu terakhir pengamatan atau umur kalus 30 hari:

Konsentrasi $\text{Fe}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	Berat Kalus (g)	
	Awal	Akhir
0	0,1	0,183 a
90	0,1	0,24 a
100	0,1	0,283 a
110	0,1	0,268 a

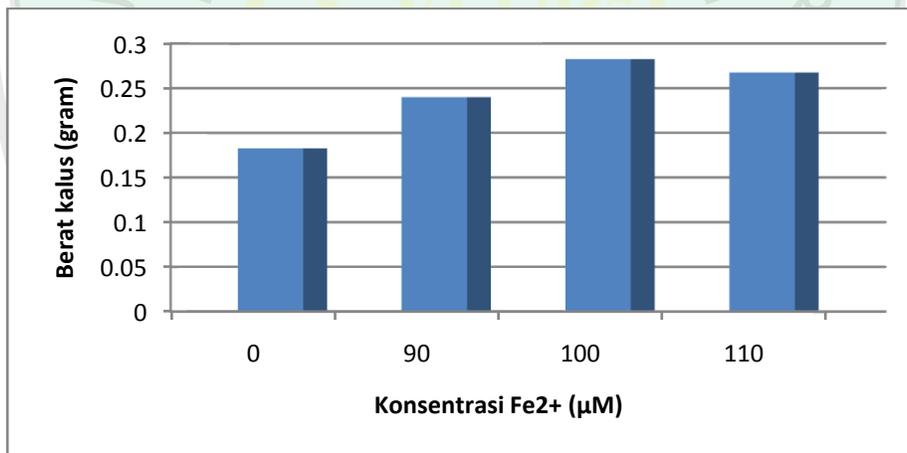
Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT  $\alpha$  0,05.

Tabel di atas menunjukkan berat rata-rata kalus yang didapatkan pada pengamatan terakhir. Berat kalus pada media kontrol atau F0 sebesar 1,83 g. Berat kalus pada media perlakuan F1 atau 90  $\mu\text{M}$  sebesar 0,24 g. Berat kalus pada media F2 atau 100  $\mu\text{M}$  sebesar 0,283 g. Berat kalus pada media perlakuan F3 atau 110  $\mu\text{M}$  sebesar 0,268 g. Berdasarkan data di atas dapat diketahui bahwa berat kalus terkecil adalah berat kalus pada media kontrol tanpa pemberian  $\text{Fe}^{2+}$  sedangkan berat kalus tertinggi adalah berat kalus pada media perlakuan F2 atau pemberian  $\text{Fe}^{2+}$  dengan konsentrasi 100  $\mu\text{M}$  sebesar 0,283 g.

Perbedaan berat kalus diduga karena eksplan daun pegagan yang dikulturkan tidak sama kondisi fisiologinya meski sama-sama diambil dari daun pertama sehingga memiliki kepekaan dan daya serap terhadap media yang berbeda serta adanya pengaruh dari zat pengatur tumbuh yang diberikan. Hal ini dibuktikan pada media dengan penambahan  $\text{Fe}^{2+}$  sebesar 100  $\mu\text{M}$  diperoleh berat kalus tertinggi. Kecepatan sel dalam membelah akan mempengaruhi volume sel. Rahayu *et al.*, (2003), menyatakan bahwa berat segar kalus yang besar disebabkan karena kandungan airnya

tinggi, selain itu berat basah yang dihasilkan juga tergantung pada morfologi kalus, kecepatan sel-sel membelah diri, memperbanyak diri dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus.

Berbeda pada kalus yang ditambahkan  $\text{Fe}^{2+}$  dengan konsentrasi 110  $\mu\text{M}$  berat kalus mengalami penurunan, hal ini disebabkan karena konsentrasi  $\text{Fe}^{2+}$  yang diberikan cukup tinggi sehingga mengakibatkan kalus mengalami cekaman. Kalus yang mengalami cekaman akan mengeluarkan metabolit sekunder yang tinggi untuk mempertahankan hidupnya. Adapun data pertumbuhan kalus dapat dilihat pada gambar 4.3:



Gambar 4.3 Diagram rata-rata berat akhir kalus pegagan (*Centella asiatica* L. Urban) pada pengamatan terakhir subkultur

Berdasarkan diagram diatas dapat diketahui bahwa pertumbuhan kalus mengalami peningkatan dengan penambahan  $\text{Fe}^{2+}$  tetapi pada konsentrsi 110  $\mu\text{M}$  kalus mengalami penurunan berat. Indsey & Yeoman (1983) menyatakan bahwa terhambatnya pertumbuhan pada kultur yang menghasilkan metabolit sekunder

kemungkinan disebabkan terjadinya kompetisi antara metabolisme primer dengan sekunder untuk merebutkan prazat yang sama. Kalus yang mengalami cekaman akan mengalami gangguan metabolisme (Biswas, Chowdurry, Bhattacharya dan Mandal 2002).

Pertumbuhan kalus pada media elisitasi tergolong memiliki pertumbuhan yang lambat hal ini diduga adanya penghambatan pada tahapan siklus sel untuk membelah dan memperbanyak diri. Salah satunya adalah pada tahap G1 yang berlangsung cukup lama karena pada tahap ini sel mulai membentuk anakan yang akan terus berkembang menjadi sel dewasa untuk menuju tahap selanjutnya (Ariningsih, 2003).

Siklus sel berpengaruh terhadap proses pembelahan sel dan sintesis protein, hal ini akan mempengaruhi laju pertumbuhan kalus. Lakitan (1996), setiap sel dapat memiliki siklus sel yang berbeda tidak hanya antar spesies tetapi juga antar individu dari spesies yang sama, hal tersebut dipengaruhi oleh lingkungan atau perlakuan saat perkembangan pada pohon induknya dan saat perkembangan pada pohon induknya. sehingga perlakuan variasi konsentrasi  $Fe^{2+}$  yang ditambahkan ke dalam media menunjukkan laju pertumbuhan yang berbeda.

#### **4.2 Pengaruh Pemberian $Fe^{2+}$ Terhadap Kandungan Metabolit Sekunder Asiatikosida dan Madekasosida Kalus Pegagan (*Centella asiatica* L. Urban) Secara In Vitro**

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). Elisitasi juga merupakan metode yang mengacu pada fenomena alam dalam mekanisme pertahanan inang terhadap patogennya. Interaksi antara patogen dengan tumbuhan inang yang menginduksi pembentukan fitoaleksin pada tumbuhan merupakan respon terhadap serangan mikroba patogen (Vanconsuelo & Boland 2007, Yoshikawa & Sugimoto 1993).

Elisitasi merupakan salah satu cara yang digunakan dalam kultur jaringan tanaman untuk mendapatkan metabolit sekunder. Tujuan dari elisitasi adalah untuk mendapatkan kandungan metabolit yang lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman yang ada di lapang. Elisitasi dapat dilakukan dengan penambahan elisitor abiotik maupun biotik. Penelitian ini menggunakan elisitor abiotik yang berupa ion logam  $Fe^{2+}$  yang ditambahkan pada media subkultur.  $Fe^{2+}$  yang ditambahkan pada media subkultur terdiri dari beberapa konsentrasi yaitu 0, 90  $\mu M$ , 100  $\mu M$ , dan 110  $\mu M$ . Penambahan  $Fe^{2+}$  dengan konsentrasi yang bertingkat bertujuan untuk mengetahui konsentrasi yang optimum dalam menghasilkan kandungan metabolit sekunder. Kandungan metabolit sekunder diukur dengan menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dengan standart asitikosida yang berasal dari bahan alam.

Pegagan mengandung banyak metabolit sekunder penting, terutama asiatikosida dan madekasosida golongan triterpenoid. Turunan asiatikosida dapat digunakan untuk terapi obat penyakit Alzheimer karena turunan ini telah terbukti berpotensi melindungi sel terhadap kematian sel  $\beta$ -amyloid. Asiatikosida juga memiliki aktivitas antidepresan dan meningkatkan produksi granulosit untuk

memperbaiki luka dan luka bakar (Kimura, 2008). Asitikosida dan medekasosida merupakan senyawa golongan glikosida triterterpenoid sebagai senyawa khas yang dimiliki oleh pegagan. Asiatikosida dan medekasosida berfungsi sebagai antinflamsi untuk mempercepat pertumbuhan luka dan sebagai antidepresan.

Berdasarkan ANOVA, dapat diketahui bahwa pemberian  $\text{Fe}^{2+}$  pada media subkultur berpengaruh nyata terhadap kandungan asiatikosida. Hal ini dibuktikan dengan nilai signifikan sebesar 0,00 ( $P < 0,05$ ). Hasil tersebut kemudian diuji lanjut dengan DMRT 5 %. Berdasarkan uji DMRT 5% terdapat perbedaan antar perlakuan. Adapun hasil uji lanjut tersebut dapat dilihat pada tabel 4.4 sebagai berikut :

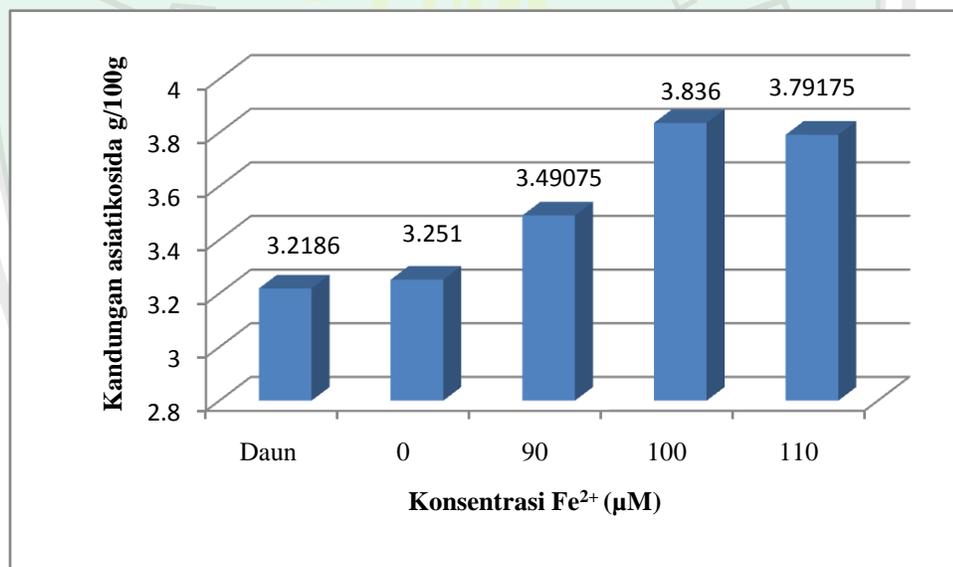
4.4 Tabel pengaruh pemberian  $\text{Fe}^{2+}$  terhadap kandungan metabolit sekunder asiatikosida kalus pegagan

Konsentrasi $\text{Fe}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	Kandungan Asiatikosida (g/100g)
0	3,251 a
90	3,491 b
110	3,792 c
100	3,836 c

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT  $\alpha$  0,05.

Hasil uji DMRT 5% menunjukkan bahwa media yang ditambahkan dengan 100  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  merupakan media terbaik untuk menghasilkan kandungan asiatikosida tertinggi yaitu 3,836 (g/100g) . Namun media yang ditambahkan dengan konsentrasi  $\text{Fe}^{2+}$  sebesar 110  $\mu\text{M}$  (3,792 g/100 g) tidak berbeda nyata dengan media yang ditambahkan dengan konsentrasi  $\text{Fe}^{2+}$  sebesar 110  $\mu\text{M}$ .

Hasil analisis kandungan asiatikosida pada daun segar pegagan 3,2186 g/100g, sedangkan kalus pada media kontrol kandungan asiatikosida yaitu 3.251 g/100g (Lampiran 8). Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa kandungan metabolit sekunder asiatikosida pada kalus pegagan lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan metabolit sekunder pada daun pegagan segar. Kandungan asiatikosida mengalami peningkatan setelah dielisasi menggunakan ion logam  $\text{Fe}^{2+}$ . Adapun perbandingan kandungan metabolit sekunder asiatikosida kalus dengan daun segar pegagan dapat dilihat pada gambar di bawah ini :



Gambar 4.4 Perbandingan kandungan metabolit sekunder asiatikosida pada daun dengan kalus pegagan yang telah di elisitasi menggunakan ion logam  $\text{Fe}^{2+}$

Perlakuan penambahan konsentrasi  $\text{Fe}^{2+}$  pada media subkultur juga memberikan pengaruh nyata terhadap kandungan metabolit sekunder madekasosida berdasarkan ANOVA. Perlakuan tersebut menunjukkan nilai signifikansi 0,004

( $P < 0,05$ ). Uji lanjut DMRT 5% dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan antar perlakuan. Hasil uji DMRT 5% dapat dilihat pada Tabel 4.5:

4.5 Tabel pengaruh pemberian  $Fe^{2+}$  terhadap kandungan metabolit sekunder madekasosida kalus pegagan

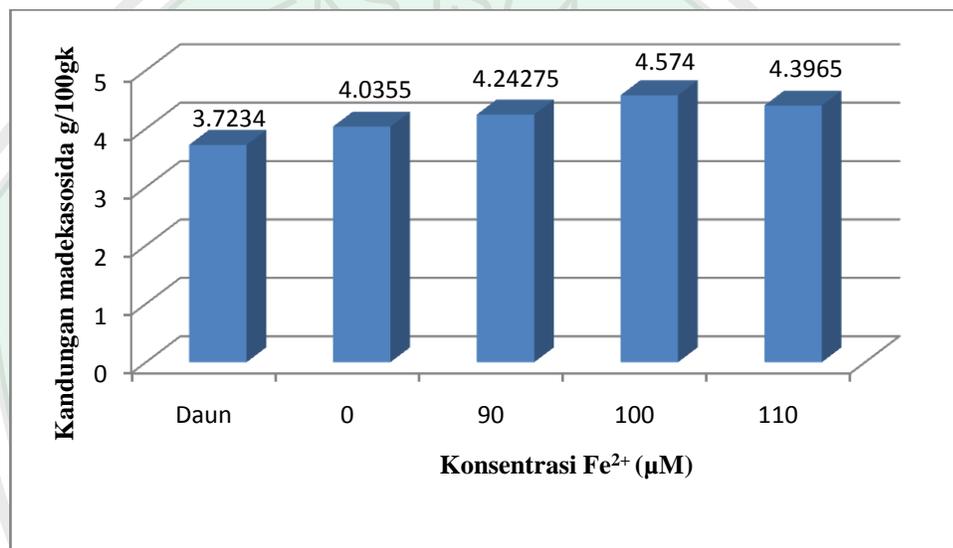
Konsentrasi $Fe^{2+}$ ( $\mu M$ )	Kandungan Madekasosida (g/100g)
0	4,036 a
90	4,161 a
110	4,420 b
100	4,423 b

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT  $\alpha 0,05$ .

Berdasarkan Tabel 4.4 dapat diketahui bahwa perlakuan terbaik adalah pada media dengan penambahan  $Fe^{2+}$  sebesar 100  $\mu M$  yaitu 4.423 g/100 g, tetapi hasil tersebut tidak berbeda nyata dengan perlakuan pemberian  $Fe^{2+}$  sebesar 110  $\mu M$  (4,420 g/100 g). . Kandungan madekasosida mengalami peningkatan setelah dielisitasi menggunakan ion logam  $Fe^{2+}$ . Pemberian ion logam  $Fe^{2+}$  dapat dikatakan meningkatkan kandungan madekasosida lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan asiaticosida yaitu pada media kontrol kandungan madekasosida 4,036g/100g, pada konsentrasi 90  $\mu M$  sebesar 4,161 g/100g, kemudian pada konsentrasi 100  $\mu M$  4,420 g/100g, dan pada konsentrasi 110  $\mu M$  4,423 g/100g.

Berdasarkan hasil analisis dapat diketahui bahwa kandunagan metabolit sekunder madekasosida pada kalus pegagan lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan metabolit sekunder pada daun pegagan segar. Hasil analisis kandungan madekasosida pada daun segar pegagan 3,7234 g/100g, sedangkan kalus pada media

kontrol kandungan madekasosida yaitu 4,036g/100g (Lampiran 8). Balandrin dkk., (1985), menerangkan bahwa ada lebih dari 30 metabolit sekunder dapat dihasilkan melalui kultur sel dengan tingkat konsentrasi yang jauh lebih tinggi dari tumbuhan induknya. Adapun perbandingan kandungan metabolit sekunder madekasosida kalus dengan daun segar pegagan dapat dilihat pada gambar di bawah ini :



Gambar 4.5 Perbandingan kandungan metabolit sekunder madekasosida pada daun dengan kalus pegagan yang telah di elistasi menggunakan ion logam Fe<sup>2+</sup>

Hasil penelitian Kying (2008), menunjukkan bahwa secara *in vitro* tanaman pegagan mengandung total flavonoid tinggi yaitu (4456,9± 287,5 µg/g) dibandingkan dengan tanaman hidroponik yaitu (2401,0 ± 148,4 µg/g) dan tanaman di lapang yaitu (2323,5±376,8 µg/g). Roostika (2007), juga melaporkan bahwa kandungan stigmasterol pada purwoceng secara *in vitro* lebih tinggi sekitar 10-100 kali lipat daripada akar tanaman dari lapangan yaitu sebesar (0,0356 ppm).

Terjadinya peningkatan metabolit sekunder yang terkandung dalam kalus pegagan dapat dipengaruhi oleh adanya cekaman yang berasal dari  $\text{Fe}^{2+}$  sebagai elisitor. Ion logam seperti  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{2+}$ , semua merangsang biosintesis metabolit sekunder pada berbagai macam tanaman (Neill *et al.*, 1994; Tumova *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2001)

Unsur mikro besi merupakan salah satu hara yang sangat penting bagi tanaman karena Fe diperlukan dalam sintesis khlorofil, memegang peranan penting dalam transfer energi, merupakan bagian dari beberapa enzim dan protein serta berfungsi dalam respirasi dan metabolisme tanaman juga terlibat dalam fiksasi nitrogen (Marschner, 1995). Besi juga dianggap sebagai kofaktor dari beberapa enzim. Fungsi lain besi (Fe) adalah mengaktifkan enzim hidrogenase fumarat, oksidase dan sitokrom.

Sutini (2008), menyatakan bahwa elisitasi perlu adanya optimalisasi konsentrasi, waktu elisitasi dan dosis. Penambahan  $\text{Fe}^{2+}$  dengan konsentrasi 100  $\mu\text{M}$  merupakan konsentrasi yang optimum karena konsentrasi di atas 100  $\mu\text{M}$  mengakibatkan kandungan metabolit sekunder menurun. Hal ini dibuktikan dengan data pengujian menggunakan HPLC kandungan metabolit sekunder pada konsentrasi 110  $\mu\text{M}$  menurunkan kandungan metabolit sekunder asiatikosida dan madekasosida.

Menurunnya kandungan metabolit sekunder pada kalus pegagan diduga adanya cekaman yang berlebihan sehingga menyebabkan sel-sel mengalami kematian. Bhojwani (1983), menyatakan pertumbuhan sel yang menurun dapat disebabkan oleh akumulasi metabolit yang bersifat racun bagi sel dan terjadinya lisis atau kematian

sel. Berdasarkan hal tersebut dapat diketahui bahwa pemberian konsentrasi  $\text{Fe}^{2+}$  pada taraf yang optimal akan meningkatkan kandungan metabolit sekunder tetapi konsentrasi yang terlalu tinggi akan menurunkan kandungan metabolit sekunder dari tanaman tersebut karena  $\text{Fe}^{2+}$  menyebabkan cekaman yang berlebihan sehingga metabolit sekunder yang dihasilkan berubah menjadi senyawa beracun.

Pertumbuhan kalus dapat digambarkan dalam bentuk kurva sigmoid, biasanya terdiri dari lima fase yaitu (1) Fase lag, sel siap untuk membelah. (2) Periode pertumbuhan eksponensial, pembelahan sel secara maksimal. (3) Periode pertumbuhan linier, pembelahan sel menurun dan pembesaran sel. (4) Periode penurunan kecepatan tumbuh. (5) Stasioner atau periode tidak ada pertumbuhan, jumlah sel konstan (Smith, 2000). Metabolit sekunder pada umumnya meningkat pada fase stasioner. Hal ini diasumsikan karena adanya peningkatan vakuola sel atau akumulasi. Pada fase stasioner pertumbuhan terhenti dan terjadi kematian sel, hal ini karena sejumlah nutrisi telah berkurang atau terjadi akumulasi senyawa toksik yang dikeluarkan kalus ke dalam medium. Pembentukan metabolit sekunder cenderung meningkat pada akhir tahap eksponensial atau menjelang tahapan stasioner (Norbert *et al*, 2007).

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Chen (2010), menggunakan  $\text{Fe}^{2+}$  untuk meningkatkan metabolit sekunder tashinones yang merupakan salah satu metabolit sekunder yang dihasilkan pada tanaman *Salvia miltiorrhiza*. Dari penelitian tersebut dengan konsentrasi  $\text{Fe}^{2+}$  sebanyak 100  $\mu\text{M}$  telah meningkatkan produksi tanshinones.

Ali *et al.*, (2006), menyatakan mekanisme peranan elisitor ion logam dapat melalui dua jalur. Pertama yaitu mengakibatkan terjadinya stress oksidatif pada kalus dan yang kedua yaitu sebagai kofaktor enzimatis pada proses pembentukan senyawa metabolit sekunder. Dalam kondisi stress ion logam berperan dalam pengaturan respon pertahanan diri pada tanaman dengan cara menginduksi gen dan meningkatkan jalur pembentukan metabolit sekunder.

Secara umum pemberian elisitasi sebagai induksi produksi fitoaleksin dan senyawa metabolit sekunder lainnya dapat diduga secara langsung berkaitan dengan DNA yang terdapat pada inti sel tumbuhan dengan cara elisitor masuk kedalam sel melalui reseptor yang terdapat pada membran sel kemudian dihantarkan kedalam system *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 membrane sel yang kemudian menjadi signal dalam sel tumbuhan melalui  $Ca^{2+}$  yang bertindak sebagai *second messenger*. Proses ini mengacu respon seluler pada sel terhadap rangsangan eksternal untuk kemudian sel mengubah ekspresi gennya (Oku, 1994).

Secara garis besar penggunaan elisitor abiotik pada kultur jaringan tumbuhan dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder. Adanya elisitor akan berpengaruh terhadap biosintesis metabolit sekunder dalam sel tanaman karena akan mengaktifkan gen yang mengkode enzim dalam jalur biosintesis metabolit sekunder (Jing Wu, 2009). Dilihat dari cekaman abiotik yang terjadi maka elisitasi ion  $Fe^{2+}$  akan

mengaktifkan signal sistem pertahanan diri tumbuhan yang selanjutnya berfungsi sebagai penginduksi gen-gen yang berperan dalam produksi senyawa jenis terpenoid dalam jalur biosintesa deoksiselulosa difosfat. Gen-gen yang terlibat dalam proses ini salah satunya adalah enzim DXP reduktoisomerase yang disandi oleh gen *dxr*.

Peranan  $Fe^{2+}$  pada metabolisme terpenoid dapat memacu proses enzimatik. Awalnya ion logam ini akan dapat menembus membran sel. Kemudian elisitor ini akan masuk dalam reaksi metabolisme tumbuhan dan membentuk metabolit primer dan sekunder. Di dalam proses pembentukan metabolit sekunder  $Fe^{2+}$  akan menstimulasi mRNA melalui suatu peningkatan dalam transkripsi gen-gen yang terlibat dalam pembentukan fitoaleksin dan senyawa metabolit lainnya (Hudoyono, 2004). Elisitor  $Fe^{2+}$  juga berperan sebagai kofaktor yang akan menempel pada sisi non protein pada enzim pemacu metabolisme metabolit sekunder jenis terpenoid dari jalur isoprene (Gambar 2.7). Enzim yang dapat memacu pembentukan senyawa triterpenoid *C. asiatica* antara lain Farnesil Difosfat Sintase (FPS), Isopentil Difosfat (IPP), Dimetilallil (DMAPP), Difosfat Farnesil (FPP), Sintase Squalena (SQS), Squalena Epoxidase (SQS), Oksidosqualena Siklase (OSC) dan  $\alpha/\beta$ -Amarin Sintase ( $\alpha/\beta$ -AS)(Gambar 2.7) (James, 2009).

#### **4.3 Perlakuan terhadap Pertumbuhan Tanaman dalam Pandangan Islam**

Allah SWT mampu menumbuhkan berbagai macam tumbuhan dimuka bumi ini dengan kekuasaan-NYA baik yang berasal dari suatu yang hidup ataupun yang mati, akan tetapi dari setiap ciptaan yang Allah SWT ciptakan dibutuhkan sebuah

proses dalam pembentukannya, seperti halnya tumbuhan yang membutuhkan media berupa tanah dan unsur hara untuk mendukung pertumbuhan sehingga tumbuhan bisa tumbuh dengan normal dan maksimal.

Perkembangan dari bagian tanaman menjadi tanaman lengkap merupakan salah satu bentuk dari kekuasaan Allah SWT. Kultur jaringan tanaman adalah suatu teknik isolasi bagian-bagian tanaman, seperti jaringan, organ ataupun embrio yang ditumbuhkan pada media agar sehingga bagian-bagian tanaman tersebut mampu berdiferensiasi dan beregenerasi menjadi tanaman yang lengkap. Media kultur berperan penting dalam perkembangan kalus. Hal ini sesuai dengan firman Allah Surat Al-A'raaf ayat 58 berikut ini :

وَالْبَلَدُ الطَّيِّبُ يَخْرُجُ نَبَاتُهُ بِإِذْنِ رَبِّهِ ۗ وَالَّذِي خَبثَ لَا يَخْرُجُ إِلَّا نَكْدًا ۗ كَذَٰلِكَ نُنزِّلُ الْآيَاتِ لِقَوْمٍ يَشْكُرُونَ ﴿٥٨﴾

Artinya : “Dan tanah yang baik, tanaman-tanamannya tumbuh subur dengan seizin Allah; dan tanah yang tidak subur, tanaman-tanamannya hanya tumbuh merana. Demikianlah Kami mengulangi tanda-tanda kebesaran (Kami) bagi orang-orang yang bersyukur.” (Al-A'raaf:58)

Ayat di atas menunjukkan bahwa tanah yang baik dapat menghasilkan tumbuhan yang baik. Sedangkan tanah yang kurang baik, dapat menyebabkan pertumbuhan tanaman terganggu bahkan mungkin sampai menyebabkan kematian bagi tanaman tersebut. Pegagan (*Centella asiatica* L. Urban) merupakan salah satu tanaman herba yang tidak mempunyai batang. Pegagan memiliki daun yang berbentuk seperti ginjal. Bagian dari daun pegagan dapat dijadikan eksplan. Eksplan adalah organ atau

jaringan yang digunakan untuk memulai kultur. Eksplan yang ditanam pada media kultur akan berkembang membentuk kalus. Kalus merupakan masa sel yang belum berdiferensiasi menjadi jaringan yang terorganisir. Allah menumbuhkan dan mengembangkan eksplan menjadi kalus pada media selain tanah yaitu media agar. Meskipun bukan media tanah tetapi media agar mampu menghasilkan tanaman yang lengkap.

Pertumbuhan dan perkembangan kalus pegagan ditandai dengan bertambahnya berat basah kalus. Sel-sel terus melakukan pembelahan sehingga berat basah kalus bertambah. Sel-sel terus melakukan pembelahan sehingga berat basah kalus bertambah. Selain terus membelah, sel-sel dapat berubah warna menjadi putih, putih kekuningan, maupun kecoklatan. Ini adalah tanda-tanda bahwa sel-sel kalus terus tumbuh.

Sama halnya pada ayat di atas, media kultur sebagai tempat hidup eksplan mengandung unsur hara mikro dan makro yang sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus. Adapun unsur hara mikro yang dibutuhkan tumbuhan salah satunya adalah besi (Fe). Besi merupakan salah satu unsur hara mikro dalam tumbuhan. Besi berperan dalam proses pembentukan klorofil, pembawa elektron dalam proses fotosintesis dan respirasi, serta menjadi aktivator beberapa enzim (Agromedia,2007). Fungsi besi (Fe) yaitu mengaktifkan enzim hidrogenase fumarat, oksidasi, sitokrom, katalase, peroksidase dan sebagainya yang memiliki peranan penting sebagai katalisator reduksi–oksidasi. Kekurangan besi (Fe) menyebabkan

terhambatnya pembentukan klorofil dan akhirnya juga penyusunan protein menjadi tidak sempurna.

Berdasarkan penelitian ini dapat diketahui bahwa ion logam  $Fe^{2+}$  yang merupakan unsur hara mikro tumbuhan sangat dibutuhkan dalam perkembangan kalus pegagan juga dapat digunakan untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder dari pegagan. Berdasarkan penelitian juga dapat diketahui bahwa dengan penambahan ion logam  $Fe^{2+}$  pada media kultur pada konsentrasi  $100\mu M$  dapat meningkatkan kandungan asiatikosida sebesar 3,836 g/100 g dan madekasosida sebesar 4,423 g/100 g. Namun dengan pemberian ion logam  $Fe^{2+}$  dengan konsentrasi diatas  $100\mu M$  dapat menurunkan kandungan metabolit sekunder asiatikosida dan madekasosida. Allah menurunkan segala sesuatu berdasarkan ukuran tertentu. Ukuran di sini adalah konsentrasi ion logam  $Fe^{2+}$  yang digunakan untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder.

Firman Allah :

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٤٩﴾

Artinya: “*Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran.*”  
(Al-Qamar:49).