

Efektivitas Konsentrasi Sorbitol dalam Medium Purifikasi dalam Menghasilkan Jumlah Sel Viabel pada Isolasi Sel Mesofil Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban).

Ika Puspitasari I*, Sri Haryanti*, Erma Prihastanti*

**Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Tumbuhan FMIPA UNDIP*

Abstract

Research about used sorbitol on purification media for sum cell viable product and effective sorbitol concentration to highest sum viable cell isolation phase pegagan mesophyl cell. Randomized Complete Design with 6 treatment and 4 block. Sorbitol concentration in purification media was treatment 0 g/L, 25 g/L, 50 g/L, 75 g/L, 100 g/L and 125 g/L. Parameter was sum of total cell, sum of viable cell and cell viability. The result of this experiment indicated that the sorbitol in purification media gave the significant effect on the sum cell viable and cell viability. Effective sorbitol concentration was 25 g/L with obtain sum cell $13,19 \times 10^7$ cell/ml and cell viability 99,39%.

Key words : sorbitol, cell purification, cell viability

Abstrak

Telah dilakukan penelitian mengenai pengaruh penggunaan sorbitol dalam medium purifikasi untuk menghasilkan jumlah sel viabel dan konsentrasi sorbitol yang efektif untuk mendapatkan jumlah sel viabel yang paling tinggi pada tahap isolasi sel mesofil pegagan. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok terdiri dari 6 perlakuan dengan 4 kelompok/blok. Konsentrasi sorbitol dalam medium purifikasi yang digunakan sebagai perlakuan adalah 0 g/L, 25 g/L, 50g/L, 75g/L, 100g/L dan 125g/L. Parameter yang diamati meliputi perolehan jumlah sel total, jumlah sel viabel dan viabilitas sel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sorbitol dalam medium purifikasi mempengaruhi jumlah sel viabel dan viabilitas sel. Konsentrasi sorbitol paling efektif adalah 25 g/L dengan perolehan jumlah sel $13,19 \times 10^7$ sel/mL dan viabilitas sel 99,35%.

Kata kunci : sorbitol, purifikasi sel, viabilitas sel

PENDAHULUAN

Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) merupakan salah satu jenis tumbuhan yang memiliki khasiat sebagai obat. Khasiat obat dalam pegagan ini berasal dari kandungan senyawa kimia hasil metabolisme sekundernya. Menurut Handra (2002) pegagan mengandung

senyawa triterpenoid yaitu asam asiaticat, asam madekasat, asiaticosida dan madekasosida. Kegunaan pegagan antara lain obat sakit perut, luka, obat cacing, kencing batu, demam, pembersih darah, batuk kering dan hidung berdarah.

Senyawa metabolit sekunder dapat diperoleh secara konvensional

yaitu ekstraksi langsung. Cara ini membutuhkan bahan baku tumbuhan dalam jumlah banyak. Sejalan dengan berkembangnya teknik kultur in-vitro maka semakin banyak penelitian yang dilakukan dengan metode tersebut. Selain digunakan untuk metode propagasi tumbuhan, teknik kultur in-vitro juga dapat digunakan untuk memproduksi senyawa metabolit sekunder yaitu dengan cara kultur suspensi sel.

Kultur suspensi sel merupakan sel atau sekumpulan sel yang dikulturkan dalam medium cair tertentu (Bhojwani and Razdan, 1983). Dalam kultur ini biasanya menggunakan eksplan yang berasal dari kalus, tetapi untuk studi tertentu sel mesofil daun lebih sesuai karena kemampuan diferensiasinya lebih baik. Hal ini ditunjukkan dalam sel mesofil adanya keseragaman morfologi dan genetik, tersusun atas sel dalam jumlah banyak serta relatif tanpa mutasi. Untuk melakukan kultur suspensi sel harus melalui tahapan kerja yaitu pemisahan sel dari jaringan, purifikasi sel dan kultur sel (Santoso dan Nursandi, 2003).

Pada kultur suspensi sel diperlukan banyak sel-sel viabel untuk dijadikan eksplan dan mempunyai viabilitas tinggi. Viabilitas sel ditentukan dari kemampuan sel untuk hidup dan

menjalankan metabolismenya dimana ini merupakan faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur sel, sehingga menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang diinginkan (Prihastanti, 1999).

Dalam proses pemisahan sel (isolasi sel) dan purifikasi sel diperlukan adanya zat yang dapat mempertahankan tekanan osmotik sel, sehingga sel hasil isolasi tidak mudah rusak atau mengalami plasmolisis karena kondisi lingkungan yang tidak sesuai (hipotonis maupun hipertonis). Perbedaan konsentrasi larutan mempengaruhi perpindahan air dari dalam sel maupun ke luar sel. Sel akan tetap viabel apabila diletakkan dalam larutan isotonis, sehingga pada kondisi tersebut tidak ada kecenderungan air untuk masuk sel. Larutan yang digunakan untuk mempertahankan stabilitas tekanan osmotik sel disebut dengan *osmotik stabilizer* (osmotikum). Menurut Bhojwani and Razdan (1983) zat yang digunakan sebagai osmotikum adalah sorbitol, glukosa, mannitol dan sukrosa. Sorbitol merupakan gula alkohol, senyawa yang merupakan fotoasimilat utama dalam banyak spesies familia Rosaceae. Rumus kimianya $C_6H_{14}O_6$. Sorbitol merupakan alditol hasil reaksi reduksi glukosa menggunakan natrium borohidrida ($NaBH_4$), dengan nama lain

D-glucitol yang secara komersial sebagai pemanis (Achmadi,2003)

Pada beberapa penelitian disebutkan penggunaan sorbitol dan mannitol sebagai osmotokum adalah berkisar antara 450 mmol/L – 800 mmol/L (81,9 g/L – 145,6 g/L). Adapula yang menyebutkan penggunaan sorbitol sebesar 13% (130 g/L) untuk isolasi protoplas (Reinert and Bajaj, 1989). Dixon (1987) menyatakan bahwa pada medium purifikasi sel mesofil tumbuhan tomat digunakan sorbitol dengan kisaran antara 54 g/L – 100g/L.

Untuk memperoleh viabilitas sel yang optimal diperlukan konsentrasi sorbitol yang tepat. Perbedaan konsentrasi sorbitol sebagai osmotikum akan mempengaruhi jumlah sel viabel yang dihasilkan dari proses isolasi sel dan purifikasi sel. Diharapkan konsentrasi yang efektif dari sorbitol sebagai osmotikum akan menghasilkan jumlah sel viabel yang tinggi. Trigiano and Gray (2000) menyatakan bahwa viabilitas yang bagus berkisar antara 90% - 95%, sedangkan menurut Prihastanti (1999) dalam penelitiannya mengenai isolasi sel mesofil pegagan diperoleh viabilitas sel yang tinggi berkisar antara 93,5% - 100%. 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 hemositometer (Gamborg and Phillip,1995 dan Barker, 1998)

METODOLOGI

Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 6 perlakuan masing-masing ulangan sebanyak 4 kali. Ulangan dijadikan kelompok (blok) karena dilakukan pada hari yang berbeda. Perlakuan yang dimaksud adalah :

- P0 = Medium purifikasi dengan konsentrasi sorbitol 0 g/L
- P1 = Medium purifikasi dengan konsentrasi sorbitol 25 g/L
- P2 = Medium purifikasi dengan konsentrasi sorbitol 50 g/L
- P3 = Medium purifikasi dengan konsentrasi sorbitol 75 g/L
- P4 = Medium purifikasi dengan konsentrasi sorbitol 100 g/L
- P5 = Medium purifikasi dengan konsentrasi sorbitol 125 g/L

Cara Kerja

a. Pemilihan dan Sterilisasi Eksplan

Sumber ekplan berupa daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) diambil dari daerah Tembalang. Daun sebagai eksplan dipilih yang bagus dan segar tanpa serangan penyakit. Daun yang digunakan adalah urutan ke 2, lalu

ditimbang 1 g kemudian dicuci dengan deterjen selama 2 menit dan dibilas air mengalir Eksplan dimasukkan dalam larutan pemutih pakaian 5% selama 2 menit lalu dibilas akuades 3 kali. Eksplan yang telah steril dutaruh dalam cawan petri yang dialasi tisu basah lalu disimpan di almari pendingin besuhu 20⁰C selama 24 jam.

b. Isolasi Sel

Ekplan diambil lalu dicuci akuades dan diletakkan dalam cawan petri. Kemudian secara hati-hati epidermis bawah daun dibuang dan juga tulang daunnya, lalu dipotong ± 1 mm, lalu masukkan ke labu Erlenmeyer 25 mL yang berisi medium maserasi sebanyak 10 mL lalu diinkubasi 15 menit dengan *magnetis stirer* berkecepatan 300 rpm.

c. Purifikasi Sel

Setelah mencapai masa inkubasi sel disaring dengan *nylon mesh* untuk membuang sisa jaringan yang tidak tercerna. Filtrat yang diperoleh dicuci dengan medium purifikasi sebanyak 10 mL dan disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm 5 menit. Supernatan pada lapisan pertama dan ke 2 diambil dengan pipet kemudian pelet yang tersisa dicuci kembali dengan medium purifikasi dan disentrifugasi. Perlakuan tersebut diulang 3 kali. Pada akhir purifikasi akan diperoleh 1 - 3

lapisan sel dalam tabung sentrifus. Supernatan pada permukaan dan lapisan bawahnya dibuang. Sel pada bagian dasar tabung sentrifus diambil sebanyak 1 mL, ditetesi larutan safranin 1% lalu dihitung jumlahnya dengan hemositometer, diamati viabilitasnya serta diukur selnya menggunakan mikrometer.

d. Parameter

1. Jumlah sel (sel/mL) l dihitung menggunakan hemositometer di bawah mikroskop. Rumus = $5n \times 10^4$ per mL, dimana n = jumlah sel pada triple line square (Dixon dan Gonzales, 1994).

Sel diamati dengan menggunakan larutan safranin 1%, sel yang viabel tidak akan terwarnai, sedangkan sel yang mati berwarna merah

2. Viabilitas sel (%) .Rumus = $n/m \times 100\%$, dimana n = jumlah sel viabel dan m = jumlah sel total.

Data yang diperoleh dianalisis dengan anova pada taraf 95%, dan hasil yang berbeda nyata antar perlakuan dilanjutkan uji DMRT taraf kepercayaan 95% (Sastrosupadi,2000)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Rerata jumlah sel, viabilitas sel dan ukuran sel mesofil pegagan (*Centella asiatica* (L.)Urban) setelah perlakuan perbedaan konsentrasi sorbitol dalam medium purifikasi

Perlakuan (g/L)	Jumlah sel Total (sel/mL)	Jumlah sel Viabel (sel/mL)	Viabilitas sel (%)	Ukuran Sel (µm)
P0	$2,89 \times 10^{7c}$	$2,87 \times 10^{7c}$	98,88 ^c	13,32 – 28,86
P1	$13,28 \times 10^{7a}$	$13,9 \times 10^{7a}$	99,35 ^{ab}	13,32 – 28,86
P2	$9,76 \times 10^{7b}$	$9,70 \times 10^{7b}$	99,42 ^a	13,32 – 28,86
P3	$7,68 \times 10^{7c}$	$7,62 \times 10^{7c}$	99,08 ^{abc}	13,32 – 28,86
P4	$6,34 \times 10^{7d}$	$6,18 \times 10^{7d}$	98,97 ^{bc}	13,32 – 28,86
P5	$0,53 \times 10^{7f}$	$0,51 \times 10^{7f}$	96,47 ^d	13,32 – 28,86

Keterangan : Angka-angka pada kolom yang sama diikuti dengan abjad yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan Uji Duncan Multiple Range Test pada taraf kepercayaan 95%

Perolehan jumlah sel viabel berdasarkan Hasil Uji Sidik Ragam dengan Rancangan Acak Kelompok (RAK) menunjukkan ada pengaruh perlakuan terhadap jumlah sel viabel, karena F hitung lebih besar dari F tabel. Sedangkan untuk kelompok tidak menunjukkan pengaruh terhadap perolehan jumlah sel viabel karena F hitung lebih kecil daripada F tabel. Setelah dilakukan uji lanjut dengan Uji DMRT (Duncan's Multiple Range Test) pada taraf kepercayaan 95% seluruh perlakuan P1 (0 g/L), P2 (25 g/L), P3 (50 g/L), P4 (75 g/L), P5 (100 g/L), dan P6

(125 g/L) menunjukkan beda nyata. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi sorbitol dalam medium purifikasi mempengaruhi perolehan jumlah sel viabel.

Data pada tabel 01 menunjukkan bahwa perolehan jumlah sel viabel tertinggi diperoleh pada konsentrasi sorbitol 25 g/L, diikuti dengan konsentrasi 50 g/L, 75 g/L, 100 g/L, 0 g/L dan 125 g/L. Sedangkan untuk viabilitas sel, konsentrasi sorbitol 50 g/L menunjukkan viabilitas yang paling tinggi, namun untuk seluruh perlakuan

menunjukkan viabilitas sel yang cenderung sama/ seragam.

Perlakuan konsentrasi 0 g/L menunjukkan jumlah sel viabel dan viabilitas sel yang lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi 25 g/L, 50 g/L, 75 g/L, dan 100 g/L, karena kemungkinan medium purifikasi masih bersifat hipotonis. Apabila sel diletakkan dalam medium yang bersifat hipotonis secara terus-menerus maka sel akan pecah akibat masuknya air dari medium ke dalam sel. Hal tersebut disebabkan karena belum ada zat yang berperan sebagai osmotikum untuk mempertahankan stabilitas tekanan osmotik sel. Sel-sel yang telah terisolasi memiliki sifat peka terhadap lingkungan luar, sehingga diperlukan adanya zat terbaik serta konsentrasi yang paling tepat untuk mengatasi sel agar tidak pecah. Zat tersebut dikenal dengan osmotic stabilizer (osmotikum). Menurut Bhojwani and Radzan (1983) zat yang digunakan sebagai osmotikum adalah sorbitol.

Jumlah sel viabel mengalami peningkatan yang sangat tajam dari perlakuan P1 (0 g/L) ke perlakuan P2 (25 g/L). Perlakuan konsentrasi sorbitol P2 (25 g/L) menunjukkan hasil perolehan jumlah sel viabel yang paling tinggi dan viabilitas yang tinggi pula, karena kemungkinan medium purifikasi mulai

bersifat isotonis, dimana tekanan osmotik di dalam sel dan diluar sel adalah sama, sehingga kemungkinan hanya sedikit atau bahkan tidak terjadi perpindahan air kedalam maupun keluar sel. Sorbitol mempertahankan tekanan osmotik sel dengan cara mempertahankan tekanan osmotik lingkungan luar sel. Konsentrasi sorbitol yang tepat pada medium purifikasi akan menghasilkan jumlah sel viabel dan viabilitas sel yang tinggi. Dalam penelitian tentang kultur suspensi sel *Ipomoea batata*, Wang *et al* (1999) menyebutkan sorbitol dalam media kultur tidak masuk dan dimetabolisme dalam sel melainkan hanya sebagai osmotikum.

Viabilitas sel pada perlakuan P3 (50 g/L) menunjukkan persentase yang paling tinggi, namun jumlah sel viabelnya lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan P2 (25 g/L). Kemungkinan dengan konsentrasi tersebut kondisi medium purifikasi sudah mulai bersifat hipertonis. Karena semakin bertambahnya sorbitol pada medium purifikasi akan menyebabkan konsentrasi medium semakin hipertonis.

Viabilitas sel berdasarkan Hasil Uji DMRT (Duncan's Multiple Range Test) pada taraf kepercayaan 95% menunjukkan adanya beda nyata antar perlakuan. Hal ini berarti bahwa perbedaan perlakuan konsentrasi sorbitol

berpengaruh terhadap perolehan viabilitas sel. Perlakuan P1 (0 g/L) tidak beda nyata dengan P4 (75 g/L) dan P5 (100 g/L), dimana ketiga perlakuan tersebut mempunyai viabilitas sel yang cenderung sama. Perlakuan P2 (25 g/L), P3 (50 g/L), dan P4 (75 g/L) juga tidak menunjukkan beda nyata, karena memiliki persentase viabilitas sel yang tidak jauh berbeda, artinya perbedaan perlakuan konsentrasi tersebut memiliki persentase viabilitas sel yang cenderung seragam. Tetapi perlakuan P6 (125 g/L) berbeda nyata dengan P1 (0 g/L), P2 (25 g/L), P3 (50 g/L), P4 (75 g/L) dan P5 (100 g/L). Perlakuan P6 (125 g/L) menghasilkan viabilitas sel yang paling rendah diantara perlakuan yang lainnya, karena kemungkinan sudah banyak sel yang mati karena plasmolisis. Konsentrasi sorbitol 125 g/L mungkin telah menyebabkan kondisi medium purifikasi bersifat hipertonis.

Perlakuan konsentrasi sorbitol 125 g/L menunjukkan perolehan jumlah sel viabel dan viabilitas sel yang paling rendah dibandingkan dengan perlakuan konsentrasi sorbitol yang lain. Kemungkinan hal ini disebabkan sel sudah banyak yang mati dan pecah karena medium purifikasi bersifat hipertonis. Menurut Wang *et al.* (1999) dalam penelitiannya mengenai kultur suspensi sel *Ipomoea batatas*

menyebutkan bahwa sorbitol yang dapat menyebabkan stress osmotik dan plasmolisis adalah sorbitol dengan konsentrasi 0,6 M (109,2 g/L). Menurut Raven *et al.* (1986) apabila sel tumbuhan ditempatkan dilarutan yang hipertonis, maka akan terjadi peristiwa kehilangan air dalam sel melalui proses osmosis, hal ini menyebabkan membran plasma terlepas dari dinding sel (plasmolisis). Meskipun tekanan osmotik medium purifikasi telah hipertonis, tidak menyebabkan seluruh sel mati pada proses isolasi sel, karena kemungkinan masih ada sel yang dapat beradaptasi dengan konsentrasi tersebut. Menurut Street (1974) banyak sel mengalami kematian ketika suspensi sel ditransfer ke dalam medium yang memiliki tekanan osmotik tinggi, tetapi masih ada sel yang memperlihatkan adaptasi secara berangsur-angsur untuk tumbuh di bawah tekanan osmotik yang tinggi tersebut.

Berdasarkan hasil penelitian isolasi sel menggunakan urutan daun kedua diperoleh sel dengan ukuran yang hampir seragam yaitu berkisar antara 13,32 μm – 28,86 μm . Menurut Santosa dan Nursandi (2003) sel-sel penyusun mesofil memiliki ukuran 15 μm – 100 μm dan masih mengalami pertumbuhan. Sedangkan menurut Fahn (1991) jaringan mesofil disusun oleh sel-sel parenkim palisade dan spongiosa yang ukuran 10

μm – 100 μm . Sel mesofil hasil isolasi pada penelitian ini memiliki ukuran yang relatif kecil karena diduga masih mengalami pertumbuhan. Hal ini sesuai pendapat Prihastanti (1999) bahwa daun urutan kedua memiliki viabilitas lebih tinggi dibandingkan urutan daun lain serta memiliki ukuran sel yang relatif kecil, seragam dan jumlahnya banyak, karena daun tersebut masih mengalami pertumbuhan

Pengamatan sel dilakukan dengan menggunakan pewarna safranin 1% dimana sel yang mati akan berwarna merah dan sel yang viabel tidak akan terwarnai. Menurut Suntoro (1983) safranin adalah suatu klorida dan merupakan zat warna basa yang kuat. Safranin dapat masuk dalam sel karena dinding sel dan membran sel telah rusak karena plasmolisis.

KESIMPULAN

1. Perbedaan konsentrasi sorbitol dalam medium purifikasi sel mempengaruhi perolehan jumlah sel viabel
2. Konsentrasi efektif dan penggunaan sorbitol dalam medium purifikasi adalah 25 g/L. Perolehan jumlah sel viabel tertinggi yaitu $13,19 \times 10^7$ sel/mL dengan viabilitas sel sebesar 99,35%

DAFTAR PUSTAKA

- Achmadi, S.S. 2003. Kimia Organik Suatu Kuliah Singkat. Edisi kesebelas. Erlangga. Jakarta.
- Barker, K. 1998. At The Bench A Laboratory Navigator. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Bhojwani, S.S and Razdan. 1983. Plant Tissue Culture: Theory and Practice. Elsevier Science Publisher. Amsterdam.
- Dixon, R.A. 1987. Plant Cell Culture a Practical Approach. IRL Press. Oxford. Washington DC.
- Dixon, R.A and R.A Gonzales. 1994. Plant Cell Culture A Practical Approach. Secon edition. Oxford University Press. New York.
- Fahn. A. 1991. Anatomi Tumbuhan. Edisi 3. Universitas Gadjah Mada Press. Yogyakarta.
- Gamborg and G.C. Phillips. 1995. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer – Verlag Berlin Heidelberg. New York.
- Handra, H. 2002. Pegagan, Tumbuhan Terlupakan kaya Manfaat Anti Cellulite. http://www.kompas/kompas_cetak/0404/02/ilpeng/html.
- Prihastanti, E. 1999. Isolasi Sel Mesofil Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban). Sellula, Vol 7 No 2 Oktober 1999. MIPA UNDIP Semarang.
- Raven, P.H ; R.F. Evert; S.E. Eichorn. 1986. Biology of Plants. Fourth Edition Hort Publiser, Inc. New York
- Reinert, J and Y.P.S. Bajaj. 1989. Aspect of applied and Fundamental Plant cell, Tissue and Organ Culture. Narosa Publishing House. New Delhi
- Santoso, U dan F. Nursandi. 2003. Kultur Jaringan Tanaman. Universitas Muhammadiyah Malang Press, Malang

- Sastrosupadi, A. 2000. rancangan percobaan Praktis Bidang Pertanian. Kanisius. Yogyakarta.
- Street, H.E. 1974. Tissue Culture and Plant Science. Botanical laboratorie University of Leicester. England.
- Suntoro. H. 1983. Metode pewarnaan. Penerbit Bhatara Karya Aksara. Jakarta.
- Trigiano. N.R and D.J Gray. 2000 Plant Tissue Culture and Laboratory 2 nd. CRC Press Washington DC
- Wang, Heng-Long; Ping-Du Lie; Li -Fei Liu; Jong-ching Su. L999. Effect of Sorbitol Induced Osmotic Stress On The Change of Carbohydrate and Free Amino Acid Poll in Sweet Potato (*ipomoea batatas*) Cell Suspention Culture.http://www.osti.gov/energy/citations/product.Biblib.Jsp?osti_id=6550115