

ANALISIS FITOKIMIA DAN PENAMPILAN POLAPITA PROTEIN TANAMAN PEGAGAN (*Centella asiatica*) HASIL KONSERVASI *IN VITRO*

Natalini Nova Kristina^{*)}, Edy Djauhari Kusumah^{**)}, dan
Putri Karina Lailani^{**)}

^{*)} Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik

^{**)} Institut Pertanian Bogor

ABSTRAK

Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan salah satu tanaman obat yang digunakan untuk mengatasi pikun dan juga sebagai bahan industri farmasi, kosmetika, suplemen makanan dan minuman. Tanaman ini telah dikonservasi secara *in vitro* dan telah memasuki usia kultur lima tahun. Selama masa periode tersebut terlihat ada perubahan pada penampilan kultur. Untuk itu tanaman hasil konservasi *in vitro* tersebut dikeluarkan dari botol kultur dan di aklimatisasi di rumah kaca. Penelitian bertujuan untuk melihat kandungan fitokimia dan pola pita protein tanaman tersebut dibandingkan dengan tanaman induknya yang berasal dari kebun percobaan Cimanggu. Sampel daun pegagan *in vitro* dan yang tumbuh di lapang diekstrak untuk analisis fitokimia alkaloid, flavanoid, saponin, dan triterpenoid berdasarkan metode Harbone (1987). Kadar protein ditentukan dengan menggunakan metode Lowry dan pola pita protein ditentukan berdasarkan hasil elektroforesis dengan gel poliakrilamida. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan metabolit sekunder pegagan *in vitro* berbeda dengan tanaman induk yang tumbuh di lapang. Pegagan asal *in vitro* menghasilkan tannin dan alkaloid positif (2+) saponin positif kuat (3+) serta ditemukan steroid dengan kandungan positif kuat sekali (4+). Sementara pada tanaman pegagan lapang, kandungan metabolit sekunder tannin, alkaloid, dan flavonoid positif kuat (3+), saponin, tanin, dan triterpenoid kuat sekali (4+), tetapi tidak ditemukan steroid. Konsentrasi protein total pada pegagan asal *in vitro* 17.092 µg/mL lebih tinggi dibandingkan dengan di lapang 8.559 µg/mL. Pola pita protein asal *in vitro* lebih tebal daripada yang di lapang dan menunjuk-

kan adanya 2 pita protein yang dominan dengan masing-masing bobot molekul 53,7 Kda dan 31 Kda.

Kata kunci : *Centella asiatica*, pegagan, konservasi *in vitro*, fitokimia, pola pita protein

ABSTRACT

Phytochemical Analyses and Protein Banding Pattern of Gotuloca (Centella asiatica) from In Vitro Conservation

Gotuloca (Centella asiatica) is one of medicinal plants which is usually applied for Alzheimer disease and raw materials for pharmaceutical, cosmetics, food and drink supplements industries. *Gotuloca* used in this experiment had been conserved and maintained in vitro for about 5 years. During the culture period, the appearance of *gotuloca* culture had changed. Therefore, *gotuloca* plantlets were then acclimatized in the green house. This research was conducted to find out the phytochemical compound and protein banding patterns of conserved *gotuloca* as compared to their mother plant. Phytochemical analysis (alkaloids, flavonoid, saponin, and triterpenoid) was performed according to Harbone (1987). Meanwhile, protein content was determined according to Lowry and the banding patterns were compared depending upon their electrophoresis separation by using polyacrylamide gel. Leaves sample from both of conserved *gotuloca* showed that, secondary metabolites of in vitro conserved *gotuloca* plants were different from their mother plants in order of positive (2+) of tannin and alkaloids contents, strongly positive (3+) of tannin, and positively very strong (4+) for saponin, tannin and triterpenoid, nevertheless no steroid was observed. Concentration of total protein in in

in vitro conserved gotuloca was found to be higher (17.092 $\mu\text{g/mL}$) than that of their mother (8.559 $\mu\text{g/mL}$). Moreover, thicker banding patterns were also found in *in vitro* conserved plants, with two dominant protein banding patterns of 53.7 and 31 Kda molecular weights respectively.

Key words : *Centella asiatica*, gotuloca, *in vitro* conservation, phytochemistry, protein banding patterns

PENDAHULUAN

Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan salah satu tanaman dari famili Umbeliferae yang sejak dulu telah digunakan sebagai obat kulit dan sebagai lalapan yang dikonsumsi dalam bentuk segar maupun direbus (van Steenis, 1997). Tanaman ini juga digunakan untuk meningkatkan ketahanan tubuh (panjang umur), membersihkan darah, dan memperbaiki gangguan pencernaan. Pegagan mempunyai rasa manis dan bersifat sejuk, dengan kandungan bahan kimia yang terdapat di dalamnya adalah asiatikosida, madekosida, brahmosida, tannin, resin, pectin, gula, vitamin B (Santa dalam Wahjoedi dan Pudjiastuti, 2006), garam mineral seperti kalium, natrium, magnesium, kalsium, besi, fosfor, minyak atsiri, pektin dan asam amino (Santa dan Bambang, 1992 dalam Wahjoedi dan Pudjiastuti, 2006). Efek farmakologis pegagan di antaranya ialah anti infeksi, anti racun, penurun panas, peluruh air seni, anti lepra, dan anti sipilis. Daun pegagan berguna juga sebagai astringensia dan tonikum. Pegagan juga dikenal untuk revitalitas tubuh dan otak yang lelah serta untuk kesuburan wanita. Di Australia, pegagan digunakan sebagai anti pikun dan stress (Januwati dan Yusron, 1994).

Pegagan merupakan tanaman herba tahunan yang tumbuh di daerah tropis dan berbunga sepanjang tahun. Bentuk daunnya bulat seperti ginjal manusia, batangnya lunak dan beruas, serta menjalar hingga mencapai satu meter. Pada tiap ruas tumbuh akar dan daun dengan tangkai daun panjang sekitar 5–15 cm dan akar berwarna putih, dengan rimpang pendek dan stolon yang merayap dengan panjang 10–80 cm (van Steenis, 1997). Tinggi tanaman berkisar antara 5,39–13,3 cm, dengan jumlah daun berkisar antara 5–8,7 untuk tanaman induk dan 2–5 daun pada anaknya (Bermawie *et al.*, 2008).

Perbanyakkan secara *in vitro* pada tanaman pegagan asal Kebun Percobaan Cimanggu Balitro telah berhasil dilakukan dengan menggunakan media tumbuh MS + BA 0,1 mg/l (Kristina *et al.*, 2000) dan telah berhasil dikonservasi secara *in vitro* selama 5 tahun. Memasuki masa tersebut terlihat adanya perubahan penampilan tanaman sehingga dilakukan aklimatisasi plantlet di rumah kaca. Secara morfologi tidak memperlihatkan adanya perubahan penampilan dari plantlet hasil *in vitro* tersebut sehingga dilakukan uji lanjutan untuk melihat kandungan fitokimianya. Pada tanaman daun encok (*Plumbago zeylanica*) hasil konservasi *in vitro*, kandungan kimia alkaloid (4+), flavonoid (1+), dan steroid (3+) tanaman hasil kultur *in vitro* lebih tinggi bila dibandingkan dengan alkaloid (2+), flavonoid (-), dan steroid (-) tanaman induknya (Syahid dan Kristina, 2008).

Kemampuan diferensiasi sel tanaman dan reaksi kimia yang menyertainya (antara lain aktivitas enzim), akan menyebabkan perbedaan metabolit yang terbentuk. Kedua hal tersebut akan membedakan penggolongan senyawa kimia yang ada dalam organisme/tanaman (Darusman, 2003).

Tanaman yang dikonservasi secara *in vitro* secara periodik mendapatkan asupan bahan kimia yang diberikan pada media kultur. Untuk itu dilakukan uji fitokimia, yang dilakukan berdasarkan metode Harbone (1987) dengan mengidentifikasi alkaloid, tannin, flavonoid, saponin, steroid, dan triterpenoid.

Selain penampilan morfologi, dan kandungan bahan aktif, kemungkinan timbulnya perubahan pada tanaman hasil *in vitro* dapat diidentifikasi dengan cara analisis protein. Protein merupakan komponen utama dan berperan penting dalam suatu tanaman. Selain itu, protein dapat digunakan sebagai identifikasi tanaman secara farmakogenetik.

Perubahan yang terjadi pada kultur dapat juga dilihat dari struktur protein tanaman. Analisis ini lebih murah bila dibandingkan dengan analisis DNA. Oleh karena itu elektroforesis dengan metode gel poliakrilamid dengan buffer sodium dedosil sulfat (Sodium Dedocyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis/SDS-PAGE) merupakan salah satu teknik yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi pola pita protein tanaman. Teknik ini dinilai lebih menguntungkan daripada elektroforesis kertas dan gel pati, karena media penyangga yang digunakan dalam SDS-PAGE yaitu gel

poli-akrilamid yang bersifat transparan dan dapat dipindai pada daerah sinar tampak maupun UV, juga dapat diper-oleh resolusi yang lebih baik dan ukuran pori medium dapat diatur berdasarkan perbandingan konsentrasi akrilamid yang digunakan. Pada medium poliakrilamid pengaruh arus konveksi dapat dikurangi sehingga pemisahan komponen menjadi sempurna dan pita-pita yang terbentuk menjadi lebih jelas. Poliakrilamid merupakan medium yang bersifat inert sehingga tidak bereaksi dengan sampel dan tidak terjadi ikatan antara sampel dan matrik (Andrews, 1986).

Pada tanaman gandarusa (*Justicia gendarussa* Burm. F) yang diberi pupuk kandang dan humus, hasil analisis protein (dengan menggunakan SDS-PAGE), menunjukkan bahwa sampel (yang diberi pupuk kandang, humus, dan pupuk anorganik) memperlihatkan terlihat pola pita protein dengan berat molekul $\pm 56,05$ kDa dan $\pm 15,70$ kDa, dan pada sampel tanpa pupuk, pita protein dengan berat molekul $\pm 27,0$ kDa (Aryanti, 2007). Penelitian ini bertujuan untuk melihat kandungan fitokimia dan penampilan pola pita protein pegagan hasil konservasi *in vitro* yang telah diaklimatisasikan dan dibandingkan dengan induknya yang tumbuh di lapang.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan mulai Juni - November 2007 di rumah kaca Plasma Nutfah dan Pemuliaan, Laboratorium Terakreditasi Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik serta di Laboratorium Bioteknologi LRPI Bogor. Bahan yang digunakan

adalah daun segar tanaman pegagan hasil konservasi *in vitro* selama lima tahun dan telah ditumbuhkan di rumah kaca pada media tanah + pupuk kandang. Sebagai pembanding digunakan daun segar dari tanaman induk yang tumbuh di Kebun Percobaan Cimanggu, Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik.

Tahapan penelitian meliputi : uji fitokimia, penentuan kadar protein dan analisis pola pita menggunakan SDS-PAGE. Uji fitokimia meliputi uji alkaloid, saponin, triterpenoid, steroid, dan kandungan asiaticosid.

Analisis fitokimia

Analisis fitokimia dilakukan berdasarkan Harbone (1987). Identifikasi yang dilakukan adalah uji alkaloid, tannin, flavonoid, saponin, steroid, dan triterpenoid. Pada uji alkaloid, satu gram daun digerus dan ditambahkan 1,5 ml kloroform dan 3 tetes amoniak. Fraksi kloroform dipisahkan dan diasamkan dengan 5 tetes H_2SO_4 2M. Fraksi asam dibagi menjadi 3 tabung kemudian masing-masing ditambahkan pereaksi Dragendorf, Meyer dan Wagner. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih pada pereaksi Meyer, endapan merah pada pereaksi Dragendorf, dan endapan coklat pada pereaksi Wagner. Uji flavonoid : 0,5 g daun ditambahkan dengan metanol sampai terendam lalu dipanaskan. Filtrat ditambahkan dengan 5 tetes H_2SO_4 . Terbentuknya warna merah karena penambahan H_2SO_4 menunjukkan adanya senyawa flavonoid. Uji saponin : 0,5 g daun ditambahkan air secukupnya dan dipanaskan selama lima menit. Larutan

tersebut didinginkan kemudian dikocok selama ± 10 menit dan bila menimbulkan busa menunjukkan adanya saponin. Uji triterpenoid dan steroid satu gram daun ditambahkan 2 ml etanol lalu dipanaskan dan disaring. Filtratnya diuapkan kemudian ditambahkan dengan eter. Lapisan eter ditambahkan dengan pereaksi Liebermen Burchard (3 tetes asetat anhidrat dan 1 tetes H_2SO_4 pekat). Warna merah atau ungu yang terbentuk menunjukkan adanya triterpenoid dan warna hijau menunjukkan adanya steroid. Uji tannin : lima gram daun ditambahkan air kemudian dididihkan selama beberapa menit. Disaring dan filtrat ditambahkan dengan 3 tetes $FeCl_3$. Warna biru tua atau hitam kehijauan yang terbentuk menunjukkan adanya tanin.

Daun sampel diambil dari tanaman pegagan hasil konservasi *in vitro* yang diperbanyak dalam 100 polibag berukuran 25 x 25 cm di rumah kaca.

Analisis kandungan protein

Analisis kandungan protein dilakukan berdasarkan metode Lowry (Kennison, 1990), menggunakan sampel dari daun pegagan yang telah diekstraksi. Sampel daun berasal dari 5 tanaman pegagan hasil konservasi *in vitro* yang telah diperbanyak di rumah kaca. Ekstraksi protein : daun pegagan hasil kultur *in vitro* dan dari lapang ditimbang berturut-turut sebanyak 1,027 g dan 1,096 g. Daun tersebut digerus dengan penambahan nitrogen cair pada mortar. Pasta dari kedua sampel daun tersebut dimasukkan ke dalam tabung sentrifuse yang telah

berisi 5 ml buffer pH 7,00 dan 10 μ L merkaptoetanol. Buffer pH terdiri dari 0,1 M Tris HCl pH 7,6, 4 mM EDTA, dan 0,7% (v/v) merkaptoetanol. Larutan dihomogenkan sebelum disentrifuse pada kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit dengan suhu 4°C. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 750 nm dan konsentrasi protein dihitung berdasarkan kurva standar.

Elektroforesis SDS-PAGE

Tahapan yang dilakukan untuk analisis protein adalah ekstraksi protein daun pegagan, pembuatan gel, dan elektroforesis.

Larutan *separating gel* dibuat dengan menggunakan bahan pereaksi 3,35 ml Aquades (H_2O); 2,5 ml Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 0,1 ml SDS 10%; 4 ml akrilamid; 0,05 ml Amonium Per-sulfat (APS) 10%, dan 0,008 ml TEMED. Larutan *stacking gel* dibuat dengan menggunakan 2,95 ml Aquades (H_2O); 1,25 ml Tris HCl 1,5 M pH 8,8; 9,05 ml SDS 10%; 0,05 ml APS 10%, dan 0,008 ml TEMED.

Elektroforesis protein dilakukan menurut metode Andrews (1986). Masing-masing sampel sebanyak 30 μ L dengan konsentrasi 1.000, 5.000, dan 8.000 μ L dimasukkan ke dalam sumur. Deteksi protein pada gel dilakukan dengan pewarnaan *coomasie blue* selama semalam dan digoyang menggunakan shaker. Larutan pewarna terdiri dari Metanol 45,5%; H_2O 45,5%, asam asetat 9%, dan 0,09% *Coomasie Blue R 250*. Penyimpanan gel dilakukan dengan merendam gel pada larutan asam asetat 7% dan pengeringan serta pengawetan gel dilakukan dengan selofan dan dibiarkan semalam di ruang dingin.

Identifikasi dan analisis pola protein hasil SDS-PAGE dilakukan dengan pengamatan pemisahan pita proteinnya. Protein target ditentukan Rf-nya, kemudian bobot molekul dari protein tersebut ditentukan berdasarkan kurva standar log Berat Molekul terhadap Rf dari protein standar.

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan pita protein dari awal (cm)}}{\text{Jarak pergerakan pewarna protein standar dari tempat awal (cm)}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis fitokimia

Hasil analisis fitokimia menunjukkan bahwa kandungan alkaloid, saponin, tanin, flavonoid dan triterpenoid pegagan di lapang lebih kuat daripada tanaman pegagan hasil *in vitro*. Tetapi pegagan hasil kultur *in vitro* menghasilkan steroid yang positif kuat sekali yang tidak dihasilkan dari pegagan yang tumbuh di lapang (Tabel 1). Tingginya kadar saponin, tanin, dan glikosida pada tanaman pegagan hasil penelitian ini sama dengan hasil penelitian Bermawie *et al.* (2008), yang juga mendapatkan kadar 4+ untuk alkaloid, saponin, tanin, dan glikosida dari 16 aksesi pegagan koleksi Balitro. Perbedaan terlihat pada kandungan fenolik, flavonoid, steroid dan triterpenoid. Diduga karena aksesi pegagan yang digunakan berbeda. Pada hasil penelitian Bermawie *et al.* (2008) tidak menemukan adanya fenolik, sementara hasil penelitian ini menunjukkan adanya fenolik baik tanaman hasil *in vitro* maupun yang tumbuh di lapang. Pramono (1992) menyatakan kandungan fenolik pada tanaman pegagan merupakan penyusun tanin.

Tabel 1. Kandungan fitokimia tanaman pegagan hasil *in vitro* dan yang tumbuh di lapang

Table 1. Phytochemical contents of *Centella asiatica* derived from *in vitro* and the field

No	Senyawa	Pegagan <i>in vitro</i>	Pegagan di lapang
1	Alkaloid	2+	3+
2	Saponin	3+	4+
3	Tanin	2+	4+
4	Fenolik	1+	2+
5	Flavonoid	3+	3+
6	Steroid	4+	-
7	Triterpenoid	1+	4+
8	Glikosida	4+	4+
9	Asiaticosid (%)	0,99	*)

Keterangan/Note : - = Negatif/negative

+ = Positif/weak positive

*) = Tidak dianalisis/not analysed

Triterpenoid yang memiliki efek terapeutik pada tanaman pegagan yang tumbuh di lapang memiliki kadar 4+, tetapi pada tanaman pegagan hasil kultur jaringan 1+. Tingginya kandungan triterpenoid sejalan dengan hasil penelitian Rachmawaty (2005), yang mendapatkan kandungan triterpenoid pegagan 4+. Menurut Mantell dan Smith (1983), pada umumnya kandungan metabolit sekunder tanaman hasil kultur *in vitro* lebih rendah. Hal ini terjadi karena banyak faktor yang mempengaruhi produksi metabolit sekunder melalui kultur jaringan, antara lain ekspresi metabolit sekunder dipengaruhi oleh asal eksplan, komposisi media, jenis kultur, macam dan konsentrasi zat pengatur tumbuh (Santoso dan Nursandi, 2001).

Pegagan hasil konservasi *in vitro* mengandung steroid 4+, sementara pegagan di lapang tidak menghasilkan steroid. Tingginya kadar steroid diduga karena sampel pegagan *in vitro* yang digunakan telah dikulturkan selama lima tahun, sehingga mendapatkan asupan unsur hara, zat pengatur tumbuh, intensitas cahaya, dan kelembapan yang jauh berbeda dengan tanaman induknya yang tumbuh di lapang. Selain itu pegagan hasil *in vitro* ditumbuhkan pada kondisi rumah kaca yang tidak mendapatkan intensitas cahaya penuh karena mendapatkan naungan 50%. Hal ini sejalan dengan pernyataan Vickery and Vickery (1981) bahwa steroid pada pegagan merupakan glikosida triterpenoid. Pembentukan steroid memerlukan kecukupan hara dan intensitas cahaya yang lebih rendah.

Uji lanjutan perlu dilakukan untuk melihat apakah perubahan ini menetap pada tanaman hasil kultur *in vitro*, dengan cara penanaman kembali di lapang berulang-ulang. Bila perubahan ini menetap, maka perbanyak tanaman pegagan hasil kultur *in vitro* akan diarahkan pada tanaman penghasil kadar steroid tinggi bukan pada penghasil kadar triterpenoid (asiaticosid).

Perlu pengujian lanjutan untuk mengetahui jenis steroid yang dihasilkan oleh tanaman pegagan hasil *in vitro*. Asiaticosid yang merupakan glikosida triterpenoid, pada tanaman pegagan hasil *in vitro* terdeteksi dengan kadar 0,99% (Tabel 1). Bermawie *et al.* (2005), menyatakan pegagan asal Cimanggu yang ditanam secara konvensional mengandung 1,76% asiaticosid. Lebih lanjut Bermawie *et al.* (2008), menyatakan kadar asiaticosid 16 aksesi pegagan koleksi Balitro berkisar antara 0,15–1,49%. Lebih jauh dinyatakan budidaya, kondisi lingkungan tumbuh, varietas pegagan, dan teknik analisis kemungkinan berperan terhadap terdeteksi tidaknya senyawa kimia pada pegagan.

Bila dilihat dari syarat bahan baku pegagan untuk industri obat tradisional menurut Musyarofah (2006), minimal harus mengandung tanin 3+, flavonoid 2+, steroid 1+, triterpenoid 2+; maka pegagan hasil kultur *in vitro* dapat memenuhi persyaratan tersebut, bila ditanam sesuai dengan SOP pegagan, karena pegagan hasil *in vitro* yang digunakan dalam penelitian ini ditanam belum mengikuti SOP yang baku.

Kandungan protein

Kandungan protein hasil kultur *in vitro* lebih tinggi dibandingkan dengan yang dari lapang (Tabel 2). Menurut Pramono (1992), kandungan nutrisi tiap 100 g daun pegagan adalah 34 kalori; 89,3 g air; 1,6 g protein; 0,6 g lemak; 6,9 g karbohidrat; 2,0 g serat; 1,6 g abu; 170 mg kalsium; 30 mg fosfor; 3,1 mg besi; 414 mg kalium; 6580 µg beta-karoten; 0,15 mg tiamina; 0,14 mg riboflavin; 1,2 mg niasin, dan 4 mg asam askorbat.

Tabel 2. Kadar protein total tanaman pegagan asal *in vitro* dan lapang umur panen 9 bulan

Table 2. Total protein contents of *Centella asiatica* derived from *in vitro* and the field, 9 months harvested

Jenis sampel/ Sample	Kadar protein/ Protein content (µg/ml)
<i>In vitro</i>	17,092
Lapang	8,559

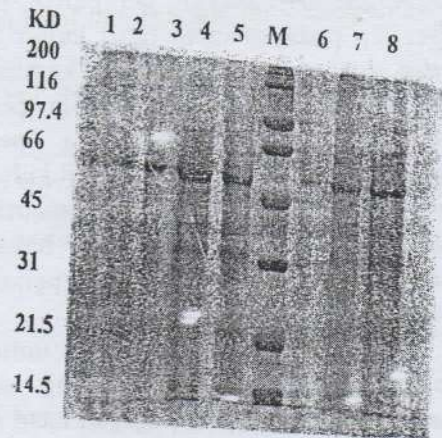
Tingginya kadar protein pada sampel daun pegagan hasil kultur *in vitro* diduga karena, selama masa lima tahun periode kultur setiap kali subkultur eksplan mendapat asupan unsur hara pada media. Menurut Bajaj (1992 dalam Rostiana, 2007), berbagai perubahan dapat terjadi selama kultur *in vitro*, mulai dari penampilan morfologi, sifat genetik, atau epigenetik, kariotik, fisiologis, biokimia, dan tingkat molekuler lainnya, sehingga menimbulkan perubahan biokimia tanaman.

Unsur hara makro (N, K, S, P, Ca dan Mg), mikro (Fe, Mo, Zn, Mn, Cl), vitamin (thiamin, piridoksin, biotin, dan lain-lain), asam amino dan karbohidrat yang secara rutin diberikan pada media untuk konservasi pegagan. Unsur-unsur tersebut pada proses fotosintesis membentuk protein dan asupan protein ini cukup tinggi karena setiap tahunnya, eksplan pegagan mengalami 2-3 kali subkultur dan hal ini terus berlangsung selama lima tahun.

Elektroforesis/SDS-PAGE

Dari hasil analisis SDS-PAGE, tidak terlihat adanya perbedaan pola pita protein pegagan hasil *in vitro* ataupun dari tanaman induk yang di lapang. Hasil ini sejalan dengan pengamatan morfologi tanaman pegagan hasil *in vitro* yang tidak memperlihatkan perubahan bentuk daun bila dibandingkan dengan tanaman induknya (Kristina dan Surachman, 2008). Hal ini menunjukkan bahwa penyimpanan pegagan secara *in vitro* sampai periode kultur lima tahun, tidak memperlihatkan adanya perbedaan pola pita, sehingga teknik konservasi secara *in vitro* dapat tetap dilanjutkan walaupun secara visual terlihat perubahan bentuk eksplan.

Penebalan pita protein dari tanaman hasil kultur *in vitro* nampak jelas dan berbeda dengan tanaman yang tumbuh di lapang. Penebalan pita dominan terlihat pada bobot molekul 53,7 dan 31 Kda (Gambar 1).



Gambar 1. Pola pita protein pegagan asal *in vitro* dan lapang berdasarkan hasil elektroforesis menggunakan gel poliakrilamid (SDS-PAGE)

Figure 1. Protein banding patterns of Centella asiatica from in vitro and field based on SDS-PAGE electrophoresis

Keterangan/Note :

- M = Protein standar/standard protein
- 1,2, 3 = *in vitro* dengan konsentrasi sampel 1,000 µg/ml/in vitro with 1.000 µg/ml sample concentrations
- 3 = *in vitro* dengan konsentrasi sampel 5,000 µg/ml/in vitro with 5.000 µg/ml sample concentrations
- 4 = *in vitro* dengan konsentrasi sampel 8,000 µg/ml/in vitro with 8.000 µg/ml sample concentrations
- 5 = lapang dengan konsentrasi sampel 1,000 µg/ml/in the field with 1.000 µg/ml sample concentrations
- 6 = lapang dengan konsentrasi sampel 5,000 µg/ml/in the field with 5.000 µg/ml sample concentrations
- 7 = lapang dengan konsentrasi sampel 8,000 µg/ml/in the field with 1.000 µg/ml sample concentrations

KESIMPULAN DAN SARAN

Penyimpanan pegagan secara *in vitro* selama 5 tahun menimbulkan perubahan kandungan kimia, yang didukung dengan perbedaan kadar protein serta adanya 2 pita yang mengalami penebalan. Kandungan metabolit sekunder pegagan *in vitro* berbeda dengan tanaman induk yang tumbuh di lapang. Pegagan *in vitro* menghasilkan kadar tanin, saponin, alkaloid dan triterpenoid kuat (2+) dan positif kuat (3+) serta steroid positif kuat sekali (4+). Sementara pada tanaman pegagan lapang baik kandungan tannin, saponin, alkaloid dan triterpenoid positif kuat (3+) dan positif kuat sekali (4+), tetapi steroid tidak ditemukan (-). Kadar protein total pada pegagan asal *in vitro* (17,092 µg/mL), lebih tinggi dibandingkan dengan di lapang (8,559 µg/mL), namun pola pita proteinnya tidak berbeda tetapi terjadi penebalan pada 2 pita protein dominan dengan bobot molekul masing-masing 53,7 Kda dan 31 Kda pada tanaman asal *in vitro*. Perlu dilakukan uji lanjutan untuk mengklarifikasi apakah perubahan kandungan metabolit sekunder menetap pada tanaman pegagan asal *in vitro*, dengan marka DNA dan analisis komponen kimia.

DAFTAR PUSTAKA

Andrews, AT. 1986. Electrophoresis : Theory, Techniques, and Biochemical, and Clinical Application. 2nd ed. New York Oxford University Press. pp. 20 and 126.

Aryanti, N. 2007. Pengaruh jenis pupuk terhadap profil protein daun *Justicia gendarussa* Burm. F. : Analisis dengan Metode Elektroforesis.

Undergraduate Thesis dari
JIPTUNAIR/2007-01-09 10:26:40.
<http://adln.lib.unair.ac.id/>, 10 Juni
2008.

- Bermawie, N., M. Ibrahim, SD dan Ma'mun. 2005. Karakteristik mutu aksesori pegagan (*Centella asiatica* L.). Prosiding Seminar Nasional TOI XXVII, Surabaya, 15-16 Maret 2005. Balai Materia Medica. Dinkes Prop. Jatim. hal. 259-264.
- Bermawie, N., S. Purwiyanti, dan Mardiana. 2008. Keragaan sifat morfologi, hasil dan mutu plasma nutfah pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban.). Bul. Littro. XIX (1): 1-17.
- Darusman, L. K. 2003. Good agricultural practices (GAP) dalam budidaya tanaman obat sebagai upaya menghasilkan simplisia terstandar. Prosiding Seminar dan Pameran Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXVIII. Fak. Farmasi Univ. Pancasila. Jakarta 25-26 Maret. hal. 21-35.
- Harbone, IB. 1987. Metode Fitokimia. Penerjemah : ITB Bandung, terjemahan dari Dictionary of Natural Product. 354 hal.
- Januwati, M. dan M. Yusron. 2004. Standard Operasional, Budidaya Pegagan, Lidah Buaya, Sambiloto dan Kumis Kucing. Circular No. 9. Bogor. Balitro. hal. 1-6.
- Kennison, J.A. 1990. Methods is Enzymology. Vol. 182. Guide to protein purification. (Ed.) M.P. Deutscher. Academic Press, San Diego. 894 p.

- Kristina, N.N., N. Sirait dan D. Surachman. 2000. Multiplikasi tunas dan penyimpanan tanaman obat pegagan secara *in vitro*. Jurnal Ilmiah Pertanian Gakuryoku. VI (1) : 20-22.
- Kristina, N.N. dan D. Surachman. 2008. Multiplikasi tunas dan aklimatisasi pegagan (*Centella asiatica* L.) periode kultur lima tahun. Jurnal Litri 14 (1) : 30-35.
- Musyarofah, N. 2006. Respon Tanaman Pegagan (*Centella asiatica* L. Urban), Terhadap Pemberian Pupuk Alami di Bawah Naungan. Tesis Fakultas Pasca Sarjana, IPB. 83 hal.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In Vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Pub. 344 p.
- Pramono, S. 1992. Profil kromatogram ekstrak herba pegagan yang berefek antihipertensi. 1992. Warta TOI Vol 1 (2) : 37-38.
- Racmawaty, R.Y. 2005. Pengaruh Naungan dan Jenis Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban.) Terhadap Pertumbuhan Produksi dan Kandungan Triterpenoidnya sebagai Bahan Obat. Skripsi Jurusan Budidaya Pertanian, IPB, 58 hal.
- Rostiana, O. 2007. Peluang pengembangan bahan tanaman jahe unggul untuk penanggulangan penyakit layu bakteri. Perkembangan Teknologi Tanaman Rempah dan Obat, XIX (2) : 77-100.
- Santoso, U. dan F. Nursandi. 1998. Induksi kalus & embriosomatik Phalaenopsis amboinensis J.J. Smith dari akar dan daun melalui kultur *in vitro*. Tropika : v. 6 (2), 1998. pp. 142-149.
- Syahid, S.F. dan N.N. Kristina. 2007. Induksi dan regenerasi kalus keladi tikus (*Typonium flagelliformae* Lodd.) secara *in vitro*. Jurnal Litri 13 (4) : 142-146.
- Syahid, S.F. dan N.N. Kristina. 2008. Multiplikasi tunas, aklimatisasi dan analisis mutu simplisia daun encok (*Plumbago zeylanica* L.) asal kultur *in vitro* periode panjang. Buletin Littro XIX (2) : 117-128.
- Van Steenis, C.G.G.J. 1997. Flora. Moeso Surjowinoto, Penerjemah. Jakarta. Pradnya Paramitha. hal. 324.
- Vickery, M.L. and B. Vickery. 1981. Secondary plant metabolism. The Macmillan Press LTD. 335 p.
- Wahjoedi, B. dan Pudjiastuti. 2006. Review hasil penelitian pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban. Makalah pada POKJANAS TOI XXV, 10 hal.