



Optimasi Kultur Kalus dan Profil Metabolit Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) Secara *in Vitro*

Optimization of Callus Culture and Metabolite Profile of Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) in Vitro

Aprissilia Taifani Galuh Utomo ¹, Aprizal Zainal ^{*,2}, Yusniwati ²

¹ Program Studi Agronomi Fakultas Pertanian, Universitas Andalas, Padang, Indonesia

² Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian, Universitas Andalas, Padang, Indonesia

*Penulis Korespondensi

Email: ap_zainal@yahoo.com

Abstrak. Kultur jaringan digunakan sebagai metode untuk memproduksi bibit gambir dengan kandungan katekin tinggi secara cepat dan dalam skala besar. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh Thidiazuron (TDZ) dan Naphthalene Acetic Acid (NAA) terhadap perkembangan dan kandungan fitokimia pada kalus organogenik gambir melalui teknik *in vitro*. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pola faktorial dua faktor, yaitu konsentrasi TDZ (0; 0,04; dan 0,08 mg/L) dan NAA (0,5; 1; 1,5; dan 2 mg/L). Hasil penelitian menunjukkan bahwa TDZ secara signifikan memengaruhi kandungan klorofil pada kalus, dengan konsentrasi 0 mg/L dan 0,04 mg/L lebih efektif dibandingkan 0,08 mg/L. Kalus organogenik yang diberi perlakuan TDZ dan NAA menunjukkan aktivitas metabolit sekunder, termasuk terpenoid, flavonoid, alkaloid, tanin, dan fenol, yang teridentifikasi melalui uji histokimia.

Kata kunci: katekin, metabolit sekunder, naphthalene acetic acid, proliferasi, thidiazuron.

Abstract. Tissue culture is utilized as a method for rapidly producing gambir seedlings with high catechin content on a large scale. This study aims to analyze the effect of Thidiazuron (TDZ) and Naphthalene Acetic Acid (NAA) on the development and phytochemical content of organogenic gambir callus through *in vitro* techniques. The experiment employed a Completely Randomized Design (CRD) with a factorial pattern consisting of two factors, namely TDZ concentrations (0, 0.04, and 0.08 mg/L) and NAA concentrations (0.5, 1, 1.5, and 2 mg/L). The results showed that TDZ significantly influenced the chlorophyll content in the callus, with concentrations of 0 mg/L and 0.04 mg/L being more effective than 0.08 mg/L. Organogenic callus treated with TDZ and NAA exhibited secondary metabolite activity, including terpenoids, flavonoids, alkaloids, tannins, and phenols, which were identified through histochemical analysis.

Keywords: catechin, naphthalene acetic acid, proliferation, secondary metabolites, thidiazuron.

1. Pendahuluan

Tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) berkembang di wilayah beriklim tropis dan dimanfaatkan secara luas dalam berbagai sektor industri (Tan *et al.*, 2023). Pada tahun 2021, Provinsi Sumatra Barat mengeksport 16.375.611 kg gambir dengan nilai total mencapai 41.404.929 USD (Badan Pusat Statistik Sumatera Barat, 2023). Gambir mengandung 74% senyawa katekin,

yang berpotensi sebagai agen antibakteri. Ekstrak gambir digunakan sebagai agen bakteriostatik, dengan mekanisme kerja antibakteri yang serupa dengan antibiotik kloramfenikol (Mahdiah *et al.*, 2023). Yunarto *et al.* (2023) juga melaporkan bahwa katekin yang diperoleh dari gambir memiliki sifat antioksidan yang sangat kuat.

Ketidakteragaman sifat dalam populasi tanaman gambir menjadi salah satu kendala utama dalam memperoleh bahan perbanyakan dengan kandungan katekin tinggi (Utomo *et al.*, 2024; Zainal *et al.*, 2022). Kultur *in vitro* diterapkan untuk mendukung produksi bibit unggul dengan sifat yang seragam dan meningkatkan kadar katekin pada tanaman gambir (Zainal & Kasim, 2021). Regenerasi *in vitro* melalui organogenesis tidak langsung (melalui pembentukan kalus) berperan penting dalam memperbanyak genotip dengan cepat, menurunkan sifat induk sehingga menghasilkan populasi anakan yang seragam, terutama tanaman yang sulit diperbanyak secara konvensional, pemenuhan biomassa pada skala industri, serta meningkatkan aktivitas metabolit sekunder eksplan (Gaur *et al.*, 2016; Hesami & Daneshvar, 2018).

Upaya mendapatkan populasi gambir dengan sifat yang seragam dan kadar katekin tinggi dapat dilakukan dengan memodifikasi media kultur sehingga didapatkan pertumbuhan dan perkembangan eksplan secara optimal. Zat pengatur tumbuh (ZPT) memainkan peran signifikan dalam memengaruhi arah pertumbuhan dan perkembangan kalus serta produksi metabolit sekunder secara *in vitro*. Modifikasi ZPT pada media kultur dapat memicu perubahan fisiologis dan biokimia eksplan serta meningkatkan sel atau jaringan yang memproduksi metabolit sekunder (Azadvari *et al.*, 2022; Faramayuda *et al.*, 2016). Thidiazuron (TDZ) memiliki potensi yang sangat besar dalam regenerasi kalus, terutama pada tanaman berkayu karena efektif dalam memacu pertumbuhan tunas pada konsentrasi sangat rendah (Mok *et al.*, 2022; Vinoth & Ravindhran, 2018). Hasil penelitian Li *et al.* (2022) menyatakan bahwa penggunaan 1 mg/L TDZ + 0,2 mg/L NAA mampu menginduksi eksplan *Cotoneaster wilsonii* bertunas dengan jumlah tunas terbanyak. Regenerasi kalus dengan pemberian TDZ (0,1; 0,2; dan 0,3 mg/L) belum berhasil menginduksi pembentukan tunas, melainkan menyebabkan *browning* pada kalus setelah 2 minggu subkultur (Mahmud, 2021). Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji respon pemberian TDZ dan NAA terhadap optimasi kultur kalus serta profil metabolit kalus gambir secara *in vitro*.

2. Bahan dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni hingga Oktober 2024 di Laboratorium Kultur Jaringan, Fakultas Pertanian, Universitas Andalas. Eksplan yang digunakan berupa kalus hasil inisiasi kultur pada media MS + 0,5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L BAP (Utomo *et al.*, 2024). Bahan-bahan penelitian meliputi TDZ, BAP, NAA, alkohol 96% dan 70%, karet, tisu, plastik kaca, wrapping, agar, sukrosa, Murashige and Skoog Basal Medium with Vitamins®, aseton 80%, hematoksilin,

eosin, CuSO₄ 5%, gliserin, AlCl₃ 10%, etanol 85%, reagen Wagner, FeCl₃ 10%, Na₂CO₃, plastik kaca, kertas label, kertas HVS, plastik wrap, spiritus, detergen, dan aluminium foil. Peralatan yang digunakan meliputi botol kultur, pinset, gunting, scalpel, erlenmeyer, gelas ukur, petridish, timbangan analitik, *hot plate magnetic stirrer*, autoklaf, *Laminar Air Flow Cabinet* (L AFC), pipet tetes, mortar, sentrifus, spektrofotometer, shaker, mikrotom, ember, terpal hitam, rak kultur, kertas pH, dan mikroskop.

Percobaan ini menggunakan desain faktorial dua faktor dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Faktor pertama adalah konsentrasi TDZ dengan tiga tingkatan (0; 0,04; dan 0,08 mg/L), sedangkan faktor kedua adalah konsentrasi NAA dengan empat tingkatan (0,5; 1; 1,5; dan 2 mg/L). Media dasar yang digunakan adalah media MS yang mengandung 5 mg/L BAP, dan setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Setiap botol kultur diisi dengan satu eksplan kalus gambir, yang kemudian diinkubasi dalam ruang kultur dengan kondisi terang pada suhu 22-25°C.

Kalus gambir yang berusia 6 minggu disubkultur pada media MS tanpa penambahan ZPT selama 2 minggu sebelum diberi perlakuan lebih lanjut. Eksplan diambil menggunakan pinset, ditempatkan pada petridish, dan dipotong menjadi sekitar 1 cm dengan *scalpel*. Potongan kalus tersebut kemudian ditanam pada media perlakuan dan diinkubasi selama 12 minggu. Subkultur dilakukan setiap 4 minggu untuk memastikan ketersediaan nutrisi yang dibutuhkan selama proses regenerasi kalus, menggunakan media dengan konsentrasi ZPT yang sama. Kalus yang mengalami *browning* serta akar yang tumbuh pada kalus dihilangkan menggunakan *scalpel*, dan kalus yang masih segar ditanam kembali pada media baru.

Analisis klorofil kalus: Kalus segar ditimbang sebanyak 50 mg dan diekstraksi menggunakan sedikit acetone 80% dengan bantuan mortar. Setelah kalus dihaluskan, acetone 80% ditambahkan hingga mencapai volume total 10 mL. Larutan ekstrak kemudian disentrifugasi selama 15 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 654 nm dan 663 nm menggunakan spektrofotometer. Kandungan klorofil total dihitung dengan menggunakan rumus: $20.2 \times D_{645} + 8.02 \times D_{663}$ (Mackinney, 1941).

Analisis histologi kalus: Preparasi untuk analisis histologi dilakukan menggunakan metode irisan jaringan yang tertanam paraffin. Kalus dan akar dipotong melintang, kemudian diberi pewarnaan dengan *Hematoxylin Eosin* (HE). Setelah preparat histologi disiapkan, sel-sel diamati menggunakan mikroskop dan dideskripsikan.

Analisis histokimia kalus. Analisis histokimia didasarkan pada metode yang dikembangkan oleh Rahayu *et al.* (2021) dengan modifikasi berupa penambahan reagen spesifik untuk mendeteksi metabolit sekunder tertentu. Untuk mendeteksi terpenoid, sampel direndam dalam larutan CuSO₄ 5% selama 24 jam, kemudian ditambahkan gliserin. Perubahan warna menjadi

kuning atau kuning kecoklatan menandakan hasil positif. Deteksi flavonoid dilakukan dengan menambahkan larutan AlCl_3 10% dalam etanol 85%, di mana perubahan warna menjadi kekuningan hingga jingga menunjukkan adanya flavonoid. Alkaloid terdeteksi melalui perendaman sampel dalam reagen Wagner selama 48 jam, dengan perubahan warna menjadi merah kecoklatan atau kuning yang menunjukkan keberadaan alkaloid. Untuk analisis tanin, larutan FeCl_3 10% diteteskan pada sayatan sampel, dan perubahan warna menjadi biru, hijau kehitaman, atau coklat tua menandakan adanya tanin. Fenol dideteksi dengan merendam sampel dalam larutan FeCl_3 10% yang ditambahkan beberapa butir Na_2CO_3 dan dibiarkan pada suhu kamar selama 15 menit, dengan hasil positif ditandai oleh perubahan warna menjadi hijau gelap atau hitam.

Variabel yang diamati meliputi persentase kelangsungan hidup kalus, morfologi kalus, kandungan klorofil kalus, analisis histologi kalus, dan analisis histokimia kalus. Data pengamatan disajikan secara deskriptif dan dianalisis menggunakan uji F pada tingkat signifikansi 5%. Jika nilai uji F melebihi nilai tabel F, analisis dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5%. Selain itu, data dianalisis menggunakan standar deviasi untuk mengevaluasi distribusi data dalam setiap ulangan, dengan beberapa data ditransformasi setelah dilakukan uji normalitas pada data.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Persentase Eksplan Hidup (%)

Responsivitas eksplan terhadap zat pengatur tumbuh (ZPT) tercermin dari tingginya viabilitas eksplan. Penambahan Thidiazuron (TDZ) dan Naphthalene Acetic Acid (NAA) pada medium kultur gambir menghasilkan tingkat kelangsungan hidup eksplan 100%. TDZ dan NAA terbukti berperan penting sebagai regulator pertumbuhan, memfasilitasi pembelahan sel, morfogenesis kalus, dan inisiasi pertumbuhan tunas ([Restanto et al., 2024](#); [Sari et al., 2014](#))

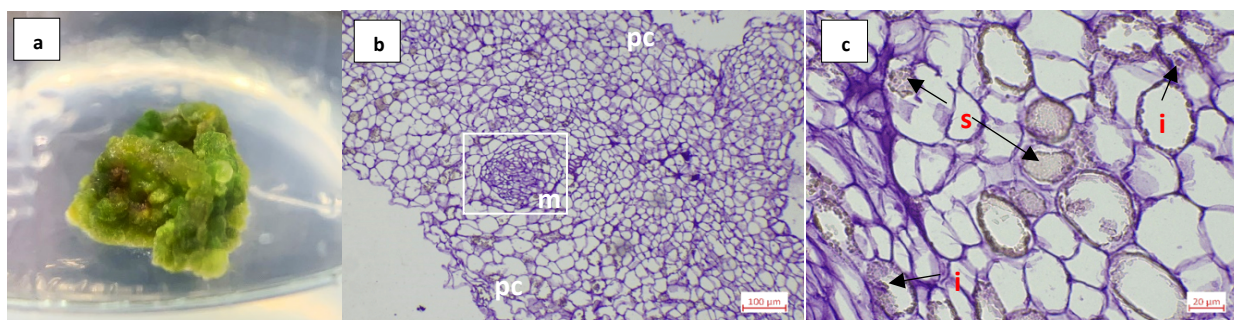
Viabilitas eksplan diindikasikan oleh perubahan pigmentasi kalus, adanya kontaminasi mikroorganisme atau agen pencemar yang dapat menghambat proliferasi kalus, serta terjadinya ekspansi dan elongasi sel. [Lutfiah and Habibah \(2022\)](#) menegaskan bahwa komposisi dan jenis media sangat memengaruhi aksesibilitas nutrisi bagi eksplan, yang secara langsung berdampak pada ketahanan dan viabilitas eksplan dalam medium tersebut.

Karakteristik morfologis kalus, mencakup pigmentasi dan tekstur ([Gambar 1a](#)), juga merupakan indikator krusial pertumbuhan. Perubahan warna kalus gambir dalam medium yang disuplementasi TDZ dan NAA berlangsung dari putih kekuningan menjadi hijau dengan tekstur kompak, mengindikasikan inisiasi proses fisiologis awal dalam kalus yang berkaitan dengan organogenesis.

Selama fase pertumbuhan, kalus gambir mengalami gejala *browning* pada beberapa bagian. Namun, area yang mengalami *browning* mampu kembali berproliferasi membentuk kalus. Fenomena *browning* disebabkan oleh eksudasi senyawa fenolik dari jaringan yang terluka yang mengindikasikan stres jaringan. *Browning* juga dapat terjadi pada jaringan senesen atau yang mengalami defisiensi nutrisi. Enzim seperti *polifenol oksidase* (PPO), *peroksidase* (POD), dan *fenilalanin ammonia-liase* (PAL) berperan dalam oksidasi fenolik yang menghasilkan pigmen melanin, yang bertanggung jawab atas proses *browning* (Nadafzadeh *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2021).

3.2. Histologi Kalus

Analisis histologis menggunakan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) mengungkapkan bahwa kalus organogenik gambir menunjukkan karakteristik tekstur kompak. Struktur kalus ini ditandai oleh kerapatan dan kepadatan sel yang tinggi, dengan dinding sel terlihat jelas dan memiliki ketebalan yang signifikan. Selain itu, observasi mikroskopis memperlihatkan adanya nukleus dan sitoplasma yang terdefinisi dengan baik (Gambar 1b-c). Fenomena ini merupakan hasil proliferasi sel jaringan eksplan yang secara progresif bertransformasi menjadi sel heterogen dengan kapasitas morfogenetik, yang dapat terekspresikan melalui berbagai jalur morfogenesis, termasuk organogenesis (Kruglova *et al.*, 2018).



Ket: pc (sel parenkim); m (mitosis); i (inti sel); s (sitoplasma).

Gambar 1. Kalus organogenik gambir. a) Morfologi kalus b) Anatomi kalus organogenik gambir perbesaran lensa objektif 10x; c) Anatomi kalus organogenik gambir perbesaran lensa objektif 40x.

Kalus didominasi oleh sel-sel parenkim yang tersusun secara kompak, menampilkan morfologi *isodiametrik* (polygonal atau bulat) sebagai respon terhadap tekanan mekanis dari sel dan intensitas pembelahan mitosis yang tinggi. Sel-sel parenkim yang aktif berproliferasi umumnya memiliki dimensi yang lebih kecil dengan rasio nukleus-sitoplasma yang tinggi, mengindikasikan kepadatan sitoplasmik yang kaya akan protein dan organel. Dinding sel yang tipis namun terlihat jelas berfungsi sebagai batas interseluler. Hal ini sejalan dengan temuan Ikeuchi *et al.* (2019); Ramirez and Silva (2018); Zhang *et al.* (2016), yang menunjukkan sifat meristematik sel kalus dengan aktivitas mitosis yang intens, mengindikasikan potensi diferensiasi menjadi tunas.

3.3. Kandungan Klorofil Kalus

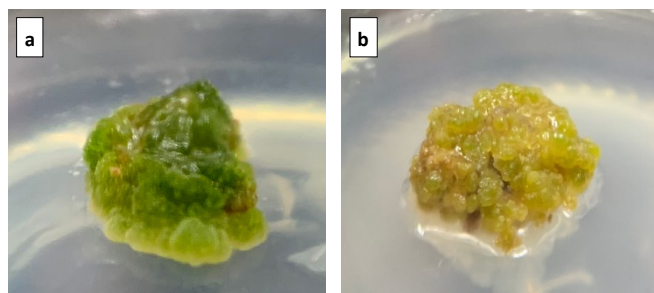
Kalus berwarna hijau dengan tekstur padat menandakan adanya proses pembentukan klorofil di dalam sel-selnya (Tabel 1). Dalam organogenesis tidak langsung, perkembangan eksplan melalui dua tahap berbeda: dediferensiasi dan rediferensiasi (Ikeuchi *et al.*, 2013). Dediferensiasi terjadi ketika sel-sel tanaman yang terisolasi mulai membelah, membentuk kalus - sekumpulan sel yang belum terspesialisasi. Kalus yang mampu beregenerasi menjadi organ tertentu disebut kalus kompeten. Setelah kalus terbentuk, tahap rediferensiasi dimulai, di mana sel-sel meristem dalam kalus dapat berkembang menjadi tunas atau akar (Magyar-Tabori *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2018).

Tabel 1. Kandungan kalus gambir pada pemberian beberapa konsentrasi ZPT TDZ dan NAA pada umur 12 MST.

NAA (mg/L)	Thidiazuron (mg/L)		
	0,00	0,04	0,08
	----- mg/g -----		
0,50	$0,76 \pm 0,40$	$1,06 \pm 0,16$	$0,64 \pm 0,27$
1,00	$0,96 \pm 0,37$	$0,94 \pm 0,53$	$0,41 \pm 0,14$
1,50	$1,58 \pm 1,97$	$0,93 \pm 0,06$	$0,56 \pm 0,26$
2,00	$1,73 \pm 0,55$	$0,62 \pm 0,84$	$0,65 \pm 0,06$
Rata-rata	$1,26 \pm 0,99$ a	$0,89 \pm 0,32$ ab	$0,57 \pm 0,20$ b

KK: 14,94%

Angka – angka pada baris yang diikuti huruf yang sama berbeda tidak nyata pada uji DMRT taraf 5%. Data yang ditampilkan adalah data asli. Data ditransformasi dengan transformasi $\sqrt{x+1}$



Gambar 2. Morfologi kalus organogenik. a) Kalus dengan kadar klorofil tinggi pada kombinasi 0 mg/L TDZ + 2 mg/L NAA; b) Kalus dengan kadar klorofil rendah pada kombinasi 0,08 mg/L TDZ + 1 mg/L NAA

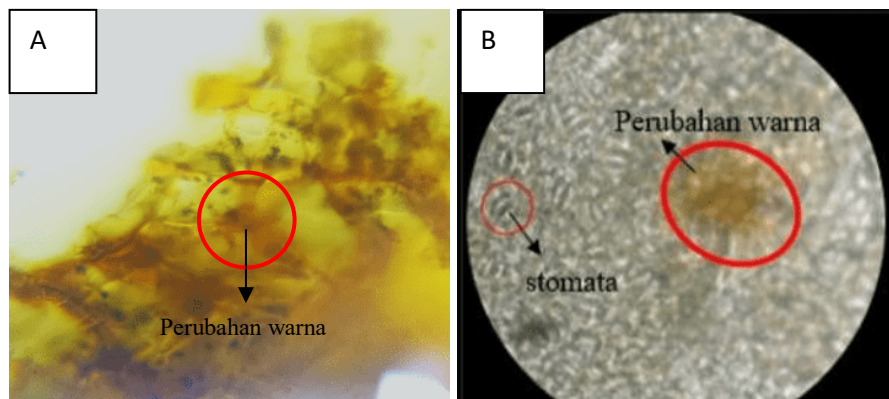
Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa penggunaan TDZ 0 mg/L dan 0,04 mg/L tidak berbeda nyata, namun berbeda signifikan dengan 0,08 mg/L TDZ. Kombinasi 0 mg/L TDZ + 2 mg/L NAA menghasilkan klorofil total tertinggi sebesar 1,73 mg g⁻¹. Penelitian ini mengindikasikan bahwa semakin rendah konsentrasi TDZ dalam media regenerasi, semakin tinggi kandungan klorofil kalus gambir (Gambar 2). Hal ini sesuai dengan pernyataan Mok *et al.* (1982) bahwa Thidiazuron (TDZ) pada konsentrasi yang sangat rendah memiliki kemampuan memacu pertumbuhan dalam kultur sel tanaman karena kestabilannya dalam menahan degradasi oleh oksidasi sitokinin, Namun pada konsentrasi yang terlalu tinggi dapat menyebabkan hiperhidrasi dan menghambat perkembangan eksplan (Hesami & Daneshvar, 2018). Peningkatan klorofil total berhubungan erat dengan pembentukan dan perkembangan meristem tunas. Penambahan sitokinin

dengan konsentrasi yang tepat pada media kultur mendorong pertumbuhan dan produksi klorofil pada eksplan (Nulfitriani *et al.*, 2017).

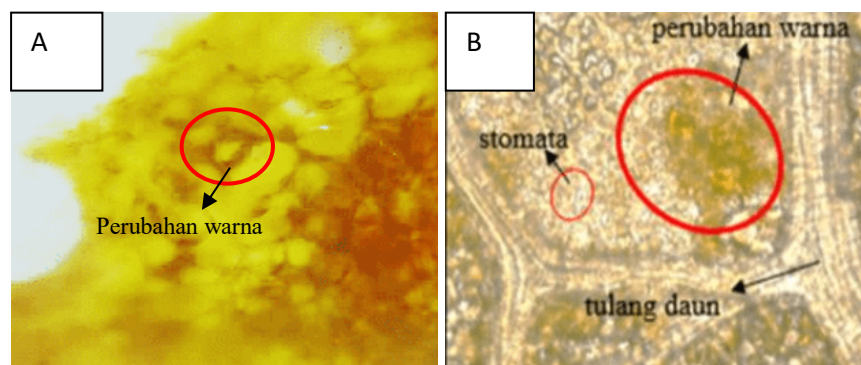
Proses pembentukan klorofil pada kalus *in vitro* dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk cahaya, ketersediaan nutrisi, dan keseimbangan hormon dalam media (Ling *et al.*, 2012). TDZ merangsang produksi klorofil dengan meningkatkan ekspresi gen-gen yang berperan dalam tahap awal pembentukan klorofil dan mendorong sintesis asam 5-aminolevulinic (ALA), komponen penting dalam pembuatan klorofil (Pourebadi *et al.*, 2015; Wang & Grimm, 2021). Selain sitokinin, auksin juga memengaruhi kandungan klorofil. Auksin dapat meningkatkan produksi metabolit primer seperti karbohidrat, protein, klorofil, karotenoid, dan gula sederhana pada tanaman. Jika metabolisme karbohidrat terganggu, proses pembentukan klorofil juga akan terhambat (Sion *et al.*, 2024).

3.4. Histokimia Kalus

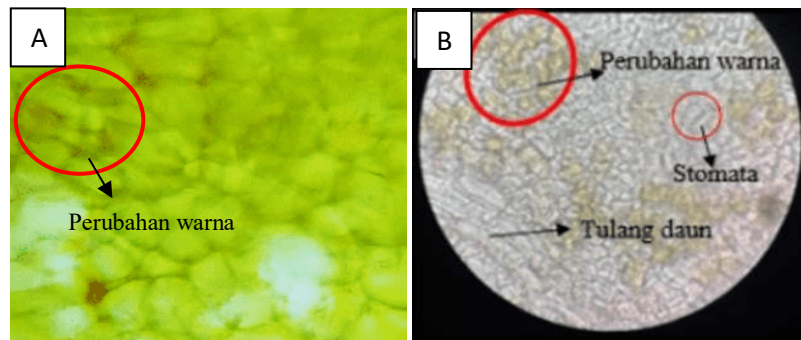
Pengujian histokimia pada kalus gambir menghasilkan perubahan warna pada irisan kalus setelah diberi berbagai reagen uji. Perubahan warna ini mengindikasikan bahwa kalus gambir mengandung beragam senyawa metabolit sekunder, termasuk terpenoid, flavonoid, alkaloid, tanin, dan fenol (Gambar 3-7).



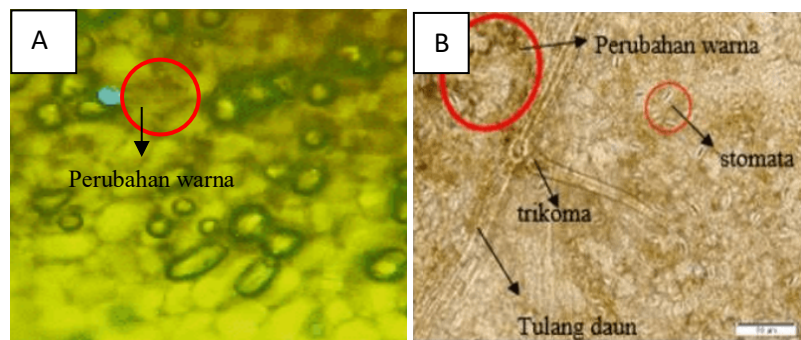
Keterangan : Sumber gambar histokimia daun kesambi berdasarkan hasil penelitian Rahayu *et al.* (2021).
Gambar 3. Hasil uji senyawa Alkaloid. a) Kalus gambir perbesaran 400x; b) daun kesambi perbesaran 400x.



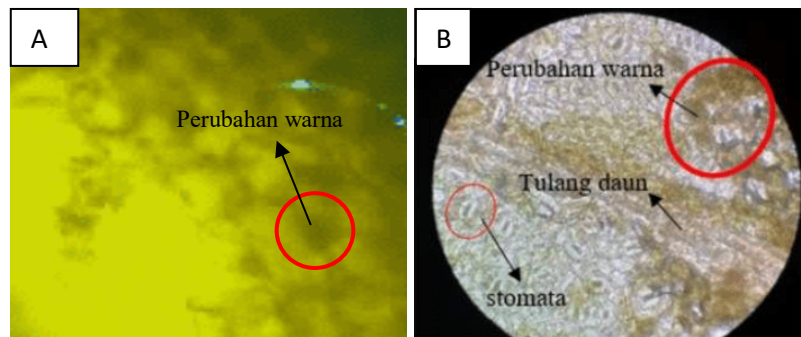
Keterangan : Sumber gambar histokimia daun kesambi berdasarkan hasil penelitian Rahayu *et al.* (2021).
Gambar 4. Hasil uji senyawa Terpenoid. a) Kalus gambir perbesaran 400x; b) daun kesambi perbesaran 400x.



Keterangan : Sumber gambar histokimia daun kesambi berdasarkan hasil penelitian [Rahayu et al. \(2021\)](#).
Gambar 5. Hasil uji senyawa Flavonoid. a) Kalus gambir perbesaran 400x; b) daun kesambi perbesaran 400x.



Keterangan : Sumber gambar histokimia daun kesambi berdasarkan hasil penelitian [Rahayu et al. \(2021\)](#).
Gambar 6. Hasil uji senyawa Tanin. a) Kalus gambir perbesaran 400x; b) daun kesambi perbesaran 400x.



Keterangan : Sumber gambar histokimia daun kesambi berdasarkan hasil penelitian [Rahayu et al. \(2021\)](#).
Gambar 7. Hasil uji senyawa Fenol. a) Kalus gambir perbesaran 400x; b) daun kesambi perbesaran 400x.

Auksin dan sitokinin memainkan peran penting dalam mengatur berbagai proses fisiologis dan biokimia. Penambahan nutrisi dan zat pengatur tumbuh seperti TDZ, BAP, dan NAA ke dalam media kultur tidak hanya mengendalikan pertumbuhan dan perkembangan eksplan, tetapi juga dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder. Kedua jenis zat pengatur tumbuh ini memengaruhi metabolisme primer dan sekunder tanaman, yang berdampak signifikan pada produksi senyawa bioaktif dalam kultur sel dan jaringan tanaman ([Prashariska et al., 2021](#)). Penelitian menunjukkan bahwa manipulasi rasio auksin terhadap sitokinin efektif dalam meningkatkan produksi metabolit sekunder, seperti alkaloid, terpenoid, dan flavonoid, dalam

kultur kalus dan suspensi sel berbagai jenis tanaman obat (Chandran *et al.*, 2020). Dengan demikian, pengaturan konsentrasi dan kombinasi zat pengatur tumbuh dapat menjadi strategi penting dalam optimalisasi produksi senyawa bioaktif dalam kultur in vitro.

3.5. Kandungan Katekin pada Kalus

Analisis kromatogram menunjukkan munculnya senyawa pada waktu retensi 9,6 menit di semua perlakuan. Pola ini berbeda dari standar katekin yang muncul pada 8,3 menit, *Epigallocatechin gallate* (ECGC) pada 8,4 menit, dan *Epicatechin gallate* (ECG) pada 10,6 menit (Tabel 2). Tinggi puncak senyawa bervariasi antar perlakuan, dengan puncak tertinggi diamati pada perlakuan TDZ 0,04 mg/L + NAA 2 mg/L, mencapai 157,132 mAU.

Tabel 2. Waktu retensi dan ketinggian puncak senyawa yang terkandung pada kalus gambir pada pemberian beberapa konsentrasi NAA dan TDZ berdasarkan uji HPLC

Perlakuan	Waktu Retensi (min)	Peak Height (mAU)
Standar katekin	8,315	8,016
Standar ECGC	8,468	158,627
Standar ECG	10,622	1164,283
TDZ 0 mg/L + NAA 0,5 mg/L	9,622	37,089
TDZ 0 mg/L + NAA 1 mg/L	9,621	34,967
TDZ 0 mg/L + NAA 1,5 mg/L	9,610	29,881
TDZ 0 mg/L + NAA 2 mg/L	9,620	86,878
TDZ 0,04 mg/L + NAA 0,5 mg/L	9,630	8,925
TDZ 0,04 mg/L + NAA 1 mg/L	9,634	48,141
TDZ 0,04 mg/L + NAA 1,5 mg/L	9,621	26,303
TDZ 0,04 mg/L + NAA 2 mg/L	9,646	157,132
TDZ 0,08 mg/L + NAA 0,5 mg/L	9,638	35,555
TDZ 0,08 mg/L + NAA 1 mg/L	9,594	85,482
TDZ 0,08 mg/L + NAA 1,5 mg/L	9,626	9,788
TDZ 0,08 mg/L + NAA 2 mg/L	9,636	24,436

Konsentrasi senyawa bioaktif dalam kultur sel seringkali lebih rendah dibandingkan dengan tanaman utuh, meskipun dalam beberapa kasus dapat melebihinya (Babich *et al.*, 2020). Sebagai perbandingan, Yunarto *et al.* (2023) melaporkan kandungan katekin pada daun gambir utuh mencapai 98,75% berdasarkan analisis HPLC. Perbedaan waktu retensi antara senyawa yang terdeteksi dalam kultur kalus dan standar katekin menunjukkan kemungkinan adanya variasi struktural atau metabolit baru yang terbentuk selama proses kultur in vitro. Hal ini menegaskan potensi kultur jaringan dalam menghasilkan senyawa bioaktif yang mungkin berbeda dari tanaman induknya, membuka peluang untuk eksplorasi lebih lanjut terhadap senyawa-senyawa baru dengan potensi farmakologis.

4. Kesimpulan

Penelitian ini mengungkapkan bahwa TDZ secara tunggal memiliki pengaruh signifikan terhadap kadar klorofil dalam kalus. Konsentrasi TDZ 0 mg/L dan 0,04 mg/L lebih efektif dibandingkan dengan konsentrasi TDZ yang lebih tinggi (0,08 mg/L) dalam meningkatkan sintesis klorofil dan perkembangan kalus secara keseluruhan. Analisis histokimia berhasil

mengidentifikasi keberadaan berbagai metabolit sekunder dalam kalus, termasuk terpenoid, flavonoid, alkaloid, tanin, dan senyawa fenolik. Penelitian selanjutnya diharapkan dapat mengeksplorasi berbagai kombinasi dan konsentrasi ZPT TDZ dan NAA untuk menemukan formulasi optimal yang mendukung pembentukan tunas dari kalus gambir.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didukung oleh Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi Indonesia melalui Direktorat Riset, Teknologi dan Pengabdian Kepada Masyarakat (DRTPM) berdasarkan Surat Keputusan Nomor 0459/E5/PG.02.00/2024 dengan Nomor Kontrak Induk 041/E5/PG.02.00.PL/2024 dan Kontrak Turunan 202/UN16.19/PT.01.03/PL/2024.

Daftar Pustaka

- Azadvari, E., Hagh, Z. G., Ebrahimi, A., & Bodaghi, H. (2022). Expression of CrMPK3 and alkaloid synthesis genes with antioxidants in callus of *Catharanthus roseus* in response to polyethylene glycol. *Industrial Crops and Products*, 178(January), 114634. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114634>
- Babich, O., Sukhikh, S., Pungin, A., Ivanova, S., Asyakina, L., & Prosekov, A. (2020). Modern Trends in the In Vitro Production and Use of Callus, Suspension Cells and Root Cultures of Medicinal Plants. *Molecules*, 25(24), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules25245805>
- Badan Pusat Statistik Sumatera Barat. (2023). *Volume dan Nilai Ekspor Gambir Sumatera Barat 2019-2021*. <https://sumbar.bps.go.id>
- Chandran, H., Meena, M., Barupal, T., & Sharma, K. (2020). Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology Reports*, 26, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00450>
- Faramayuda, F., Elfahmi, & Ramelan, R. S. (2016). Optimasi induksi kalus tanaman cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl) dengan berbagai variasi zat penatur tumbuh. *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi*, 4(2), 21–25. <https://doi.org/10.26874/kjif.v4i2.62>
- Gaur, A., Kumar, P., Thakur, A. K., & Srivastava, D. K. (2016). In vitro plant regeneration studies and their potential applications in *Populus* spp.: a review. *Israel Journal of Plant Sciences*, 63(2), 77–84. <https://doi.org/10.1080/07929978.2015.1076982>
- Hesami, M., & Daneshvar, M. H. (2018). Indirect organogenesis through seedling-derived leaf segments of *Ficus religiosa* - a multipurpose woody medicinal plant. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 21(2), 129–136. <https://doi.org/10.1007/s12892-018-0024-0>
- Ikeuchi, M., Favero, D. S., Sakamoto, Y., Iwase, A., Coleman, D., Rymen, B., & Sugimoto, K. (2019). Molecular mechanisms of plant regeneration. *Annual Review of Plant Biology*, 70, 377–406. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100434>
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant callus: Mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell*, 25(9), 3159–3173. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>
- Kruglova, N. N., Titova, G. E., & Seldimirova, O. A. (2018). Callusogenesis as an in vitro Morphogenesis Pathway in Cereals. *Russian Journal of Developmental Biology*, 49(5), 245–259. <https://doi.org/10.1134/S106236041805003X>
- Kumar, N., Bhatt, V. D., Mastan, S. G., & Reddy, M. P. (2018). TDZ-induced plant regeneration in *Jatropha curcas*: A promising biofuel plant. In *Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator* (pp. 419–428). https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3_23
- Li, Y., Xiao, J., & Jeong, B. R. (2022). Regeneration of *Cotoneaster wilsonii* Nakai through Indirect Organogenesis. *Horticulturae*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/horticulturae8090795>
- Ling, Q., Huang, W., Baldwin, A., & Jarvis, P. (2012). Chloroplast biogenesis is regulated by

- direct action of the ubiquitin-proteasome system. *Plant Signaling & Behavior*, 338(6107), 655–659. <https://doi.org/10.1126/science.1225053>
- Lutfiah, A., & Habibah, N. A. (2022). Pengaruh pemberian elisitor ekstrak khamir pada pertumbuhan kultur kalus gambili dengan penambahan ZPT 2,4-D dan kinetin. *Indonesian Journal of Mathematics and Natural Sciences*, 45(2), 77–83. <https://doi.org/10.15294/ijmns.v45i2.39728>
- Mackinney, G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal of Biological Chemistry*, 140(2), 315–322. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)51320-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)51320-X)
- Magyar-Tabori, K., Debranszki, J., da Silva, J. A. T., Bulley, S. M., & Hudak, I. (2010). The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 101(3), 251–267. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9696-6>
- Mahdiyah, D., Theana, M., J, R., Sari, A., & Mukti, B. H. (2023). The antibacterial activity of gambir extract (*Uncaria gambir* (hunter) Roxb) against *Salmonella typhi*. *KnE Social Sciences*, 2023, 747–757. <https://doi.org/10.18502/kss.v8i9.13389>
- Mahmud, S. (2021). *Induksi tunas dari eksplan tanaman gambir (Uncaria gambir (Hunter) Roxb) pada beberapa konsentrasi BAP secara in vitro* [Skripsi]. <http://scholar.unand.ac.id/92918/>
- Mok, M. C., Mok, D. W. S., Armstrong, D. J., Shudo, K., Isogai, Y., & Okamoto, T. (1982). Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1, 2,3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). *Phytochemistry*, 21(7), 1509–1511. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(82\)85007-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(82)85007-3)
- Mok, M. C., Mok, D. W. S., Turner, J. E., & Mujer, C. V. (2022). Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *HortScience*, 22(6), 1194–1197. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.22.6.1194>
- Nadafzadeh, M., Mehdizadeh, S. A., & Soltanikazemi, M. (2018). Development of a computer vision system to predict peroxidase and polyphenol oxidase enzymes to evaluate the process of banana peel browning using genetic programming modeling. *Scientia Horticulturae*, 231, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.047>
- Nulfitriani, Basri, Z., & Suwastika, I. N. (2017). Induksi kalus dan inisiasi tunas bawang merah (*Allium ascalonicum* L.) lokal palu. *Mitra Sains*, 5(2), 11–18. <https://jurnal.pasca.untad.ac.id/index.php/MitraSains/article/view/63>
- Pourebah, N., Motafakkerazad, R., Kosari-Nasab, M., Akhtar, N. F., & Movafeghi, A. (2015). The influence of TDZ concentrations on in vitro growth and production of secondary metabolites by the shoot and callus culture of *Lallemantia iberica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122(2), 331–339. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0769-4>
- Prashariska, K., Pitoyo, A., & Solichatun. (2021). Pengaruh indole-3-acetic acid (IAA) dan benzyl amino purine (BAP) terhadap induksi dan deteksi alkaloid kalus kamilen (*Matricaria chamomilla* L.). *Jurnal Inovasi Pertanian*, 23(2), 104–114. <https://doi.org/10.33061/innofarm.v23i2.5916>
- Rahayu, T., Pratiwi, R. I. A., & Mubarakati, N. J. (2021). Profil metabolit daun kesambi (*Schleichera oleosa*) berdasarkan analisis histokimia dan in silico. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*, 8(1), 156–165. <https://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa/article/download/69735/39036>
- Ramirez, M. D. A., & Da Silva, R. F. (2018). Morpho-anatomical characterization of secondary somatic embryogenesis in *Azadirachta indica* (Meliaceae). *Acta Botanica Mexicana*, 122, 7–20. <https://doi.org/10.21829/abm122.2018.1242>
- Restanto, D. P., Gumelar, B. S., Handoyo, T., Ubaidillah, M., & Prayoga, M. C. (2024). Pembentukan organogenesis tanaman porang (*Amorphophallus muelleri* B.) pada beberapa konsentrasi TDZ (Thidiazuron). *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*, 24(1), 1–7. <http://dx.doi.org/10.25181/jppt.v24i1.2882>
- Sari, N., R, E. S., & Sumadi. (2014). Optimasi jenis dan konsentrasi ZPT dalam induksi kalus embriogenik dan regenerasi menjadi planlet pada *Carica pubescens* (Lenne & K.Koch). *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 6(1), 51–59.

- <https://journal.unnes.ac.id/nju/biosaintifika/article/view/3785>
- Sion, R., Agustiansyah, & Timotiwu, P. B. (2024). Pengaruh nutrimpriming pada benih dengan zinc (Zn) terhadap pertumbuhan vegetatif tanaman jagung ungu hibrida. *Jurnal Agrotek Tropika*, 12(1), 189–197. <http://dx.doi.org/10.23960/jat.v12i1.8199>
- Tan, B. C., Mahyuddin, A., Sockalingam, S. N. M. P., & Zakaria, A. S. I. (2023). Preliminary in vitro cytotoxic evaluation of *Uncaria gambier* (Hunt) Roxb extract as a potential herbal-based pulpotomy medicament. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 23(331), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12906-023-04163-w>
- Utomo, A. T. G., Zainal, A., & Yusniwati. (2024). Induksi kalus tanaman gambir (*Uncaria gambier* (Hunter) Roxb.) pada beberapa konsentrasi 2,4-D secara in vitro. *Agroteknika*, 7(2), 164–174. <https://doi.org/10.55043/agroteknika.v7i2.263>
- Vinoth, A., & Ravindhran, R. (2018). Thidiazuron: From urea derivative to plant growth regulator. In *Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator* (pp. 1–491). https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3_10
- Wang, P., & Grimm, B. (2021). Connecting chlorophyll metabolism with accumulation of the photosynthetic apparatus. *Trends in Plant Science*, 26(5), 484–495. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.12.005>
- Xu, C., Zeng, B., Huang, J., Huang, W., & Liu, Y. (2015). Genome-wide transcriptome and expression profile analysis of *Phalaenopsis* during explant browning. *PLOS ONE*, 10(4), 39–45. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123356>
- Yunarto, N., Calvin, C. C., Sulistyowati, I., Oktoberia, I. S., Reswandar, U. N., Elya, B., ..., & Miharja, L. K. (2023). Development and Validation of a High-Performance Liquid Chromatography-Based Method for Catechin Isolated from the Leaves of Gambir (*Uncaria gambier* Roxb). *Tropical Journal of Natural Product Research*, 7(3), 2569–2573. <https://openurl.ebsco.com/EPDB%3Aagd%3A5%3A27399141/detailv2?sid=ebsco%3Aplink%3Aascholar&id=ebsco%3Aagd%3A163682108&crl=c>
- Zainal, A., Ferita, I., Gustian, & Warnita. (2022). *Kajian Karakterisasi Terkait Potensi Kadar Katekin Pada Tanaman Gambir (Uncaria gambier (Hunt) Roxb)*. Media Sains Indonesia. http://repo.unand.ac.id/49587/1/Buku-Gambir-Katekin-Aprizal-Zainal-2022_compressed.pdf
- Zainal, A., & Kasim, M. (2021). Aplikasi Thidiazuron secara In Vitro terhadap Multiplikasi Tunas Gambir (*Uncaria gambier* (Hunter) Roxb). *Komisi Nasional Sumber Daya Genetik "Peran Bioteknologi Dan SDG Dalam Mendukung Pertanian Maju, Mandiri, Dan Modern"*, 555–568. <https://repository.pertanian.go.id/handle/123456789/14468>
- Zhang, J., Gai, M. Z., Li, X. Y., Li, T. L., & Sun, H. M. (2016). Somatic embryogenesis and direct as well as indirect organogenesis in *Lilium pumilum* DC. Fisch., an endangered ornamental and medicinal plant. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80(10), 1898–1906. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1194178>
- Zhao, S., Wang, H., Liu, K., Li, L., Yang, J., An, X., ..., & Zhang, Z. (2021). The role of JrPPOs in the browning of walnut explants. *BMC Plant Biology*, 21(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02768-8>