



Pengaruh Pemberian Beberapa Konsentrasi Elisitor Cu^{2+} Terhadap Kandungan Katekin pada Kalus Tanaman Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) Secara *In Vitro*

The Effect of Cu^{2+} Elicitor Concentration on Catechin Content in Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) Callus *In Vitro*

Yenni Anisah Putri ¹, Aprizal Zainal ^{*,1}, Warnita ¹

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

* Penulis Korespondensi

Email: ap_zainal@yahoo.com

Abstrak. Tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) merupakan komoditi unggulan Sumatera Barat penghasil senyawa polifenol terutama katekin yang memiliki manfaat sebagai antioksidan sehingga digunakan dalam berbagai bahan baku industri seperti farmasi, kosmetik, dan pangan. Prospek pasar ekspor yang tinggi namun mutu gambir yang diekspor masih rendah. Penggunaan kultur suspensi sel dengan penambahan elisitor seperti ion tembaga Cu^{2+} dapat menjadi solusi efektif dengan meningkatkan produksi metabolit sekunder dalam jumlah banyak dan waktu singkat. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi elisitor Cu^{2+} terbaik dalam peningkatan kandungan katekin kalus gambir. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pemberian elisitor Cu^{2+} (0, 2, 4, dan 6 mg/l) sebagai perlakuan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian elisitor Cu^{2+} belum mampu untuk meningkatkan kandungan senyawa katekin pada kalus gambir karena hanya ditemukan pada perlakuan 0 ppm 7 HSS dan terdapat beberapa senyawa bioaktif yang muncul pada kromatogram pengujian HPLC yang tidak dapat teridentifikasi oleh standar katekin yang digunakan. **Kata kunci:** elisitasi, gambir, kalus, katekin, suspensi sel.

Abstract. Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) is West Sumatra's leading commodity producing polyphenolic compounds, especially catechins, which have antioxidant benefits and are used in various industrial raw materials such as pharmaceuticals, cosmetics and food. The export market prospects are high but the quality of gambir exported is still low. The use of cell suspension culture with the addition of elicitors such as copper ions Cu^{2+} can be an effective solution by increasing the production of secondary metabolites in large quantities and in a short time. This study aims to determine the best concentration of Cu^{2+} elicitor for increasing the catechin content of gambir callus. The experiment employed a completely randomized design (CRD) with Cu^{2+} elicitor (0, 2, 4, and 6 mg/l) as treatment. The results showed that the provision of Cu^{2+} elicitors has not been able to increase the content of catechin compounds in gambier callus because it was only found in the treated 0 ppm 7 HSS and there were several bioactive compounds that appeared in the HPLC testing chromatogram that could not be identified by the catechin standard used. **Keywords:** elicitation, gambir, callus, catechin, cell suspension.

1. Pendahuluan

Tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) merupakan salah satu komoditi perkebunan unggulan Sumatera Barat penghasil senyawa polifenol yang diekstrak dari daun dan ranting. Senyawa polifenol yang terkandung pada gambir yaitu katekin, tanin, *epicatechin*, *querselin*, *epigallocatechin* dan senyawa turunan lainnya yang memiliki banyak manfaat. Katekin dapat dimanfaatkan sebagai senyawa antibakteri, antimikroba, antioksidan, zat penyamak kulit dan bahan campuran pelengkap makanan. Selain itu, katekin juga dapat digunakan sebagai bahan baku dalam berbagai industri, seperti industri farmasi, kosmetik, hormon pertumbuhan dan biopestisida (Ermianti, 2004). Potensi tersebut menjadikan gambir memiliki prospek pasar yang cukup baik sehingga mulai diekspor dalam skala besar (Nasrul *et al.*, 2020).

Indonesia merupakan negara pengekspor gambir utama dunia yang mampu mengekspor gambir sebesar 19 ribu ton dengan nilai ekspor mencapai US\$ 57 juta pada tahun 2022 (Ditjenbun, 2024). Namun, gambir yang diekspor Indonesia masih dalam bentuk olahan dengan kadar katekin < 75%, sedangkan pasar ekspor menghendaki kadar katekin > 90%. Kadar katekin menentukan mutu gambir sebagaimana tercantum dalam standar mutu SNI 01 3391-2000 yang menyatakan bahwa gambir pada tingkatan mutu III memiliki katekin sebesar 40%, mutu II besarnya 50% dan mutu I besarnya 60% (BSN, 2000).

Permintaan yang tinggi diikuti mutu yang masih rendah merupakan tantangan dalam pengembangan tanaman gambir. Hal ini terjadi karena produk senyawa bioaktif yang diproduksi secara konvensional sulit dikontrol sebab sangat bergantung pada iklim dan musim. Kultur jaringan menjadi alternatif solusi untuk meningkatkan produk metabolit sekunder melalui kultur suspensi sel dengan memproduksi sel dalam jumlah banyak dalam waktu singkat. Teknik ini dapat dikembangkan untuk produksi biomassa dan metabolit sekunder dalam skala besar menggunakan bioreaktor (Siregar *et al.*, 2006). Namun, jumlah produk yang dihasilkan melalui kultur *in vitro* biasanya lebih rendah jika dibandingkan dengan ekstrak yang berasal dari tumbuhan secara *in vivo*. Oleh karena itu, perlu penambahan elisitor yang berperan sebagai induktor dalam menstimulasi jalur metabolik dalam meningkatkan produksi metabolit sekunder (Ningsih, 2014).

Elisitor merupakan agen aktif yang akan memicu terbentuknya metabolit sekunder dengan menginduksi respon perlindungan diri tanaman terhadap cekaman (Caldentey & Bars, 2002). Senyawa kimia dalam bentuk ion logam Cu^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} dan Fe^{2+} dapat dijadikan sebagai elisitor abiotik. Ion tembaga Cu^{2+} merupakan mikronutrien esensial bagi seluruh makhluk hidup yang berperan penting dalam transport elektron, reaksi reduksi-oksidasi (redoks) dan berbagai jalur metabolisme. Jumlah unsur Cu^{2+} yang berlebihan akan menyebabkan terjadinya cekaman logam pada tanaman sehingga tanaman akan menyerap dan mengakumulasinya untuk meningkatkan

pembentukan metabolit sekunder (Nurchayati, 2017). Oleh sebab itu, penambahan elisitor Cu^{2+} pada kultur suspensi sel perlu dilakukan untuk meningkatkan kandungan katekin pada tanaman gambir.

Beberapa studi melaporkan bahwa penambahan ion logam Cu^{2+} sebanyak 5 ppm mampu meningkatkan kadar senyawa *flavan-3-ol* sebesar 12,5% pada kalus *Camellia sinensis* L (Sutini *et al.*, 2008). Selain itu, hasil penelitian Retnaningati *et al.* (2021), menunjukkan bahwa kombinasi elisitor Ca^{2+} (176 g/L) dan Cu^{2+} (1 g/L) dapat meningkatkan kadar *Epicatechin gallate* (ECG) pada kalus teh hingga 298,37 ppm, namun masih sedikit dibandingkan dengan kadar katekin pada daun teh segar. Oleh sebab itu, penggunaan elisitor Cu^{2+} perlu diteliti lebih lanjut untuk meningkatkan kandungan katekin pada kalus tanaman gambir. Penelitian bertujuan untuk mengetahui untuk mengetahui konsentrasi elisitor Cu^{2+} terbaik yang mampu meningkatkan kandungan katekin pada kalus tanaman gambir secara *in vitro*.

2. Bahan dan Metode

Penelitian dilakukan bulan Juli - Oktober 2024 bertempat di Laboratorium Kultur Jaringan, Fakultas Pertanian, Laboratorium Sentral Universitas Andalas dan Labotarorium Vahana. Bahan penelitian adalah kalus gambir berumur 4 MST, detergen cair dengan bahan aktif surfaktan, media MS (*Murashige & Skoog*) instan (4,43 g/L), ZPT BAP (*Benzyl Amino Purin*), 2,4-D (*2,4-Dichlorophenoxyacetic acid*), agar 8 mg/L, sukrosa 30 g/L, alkohol 70%, alkohol 96%, KOH 1 N, HCl 1 N, disinfektan (bahan aktif NaOCl 5,25%), CuSO_4 , *aluminium foil*, kertas label, kertas HVS, *plastic wrap*, karet gelang, tisu, sarung tangan, masker, plastik kaca, plastik hitam, spiritus, aquades steril, kertas saring whatman No. 1, metanol 70%, kolom C-18 ($250 \times 4,6$ mm, 5 μm), 0,2% asam format, asetonitril dan standar katekin gambir. Alat penelitian adalah autoklaf, timbangan analitik, timbangan digital, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), *hotplate*, *magnetic stirrer*, kulkas, oven, botol kultur induksi kalus (botol asi), erlenmeyer 100 ml (botol kultur elisitasi), *petridish*, labu semprot, tabung ukur, gelas piala, gelas ukur, *shaker*, spatula, pipet tetes, pH meter, pinset, *scalpel*, gunting, *handsprayer*, bunsen, rak kultur, korek api, ember, sonikator (*Ultrasonic water bath*), PTFE syringe 0,22 μm , vial 1,5 mL, syringe HPLC 1,0 μL , HPLC, kamera, alat tulis dan *software* STAR Version: 2.0.1.

Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) terdiri dari 4 perlakuan dan 4 ulangan sehingga terdapat 16 satuan percobaan. Adapun perlakuan elisitor Cu^{2+} yang diberikan yakni : 0 ppm Cu^{2+} (P1); 2 ppm Cu^{2+} (P2); 4 ppm Cu^{2+} (P3); 6 ppm Cu^{2+} (P4).

Pembuatan media tanam dilakukan dengan memasukan 300 ml aquades, 4,43 g/L *Murashiige and Skoog*, 30 mg/L sukrosa, 1 mg/L BAP dan 1,5 mg/L 2,4-D ke dalam erlenmeyer. Selanjutnya ditambahkan 8 g/L ke dalam larutan dan volume larutan dicukupkan 500 ml.

Kemudian larutan dihomogenkan hingga mendidih menggunakan *hotplate magnetic stirrer* kecepatan 700 rpm. Larutan sebanyak 10 ml dipindahkan ke dalam botol kultur, kemudian ditutup rapat. Media di sterilisasi selama 15 menit menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 Psi.

Penanaman dilakukan di dalam LAFC yang sudah disterilisasikan menggunakan alkohol 70%. Daun muda diambil menggunakan pinset dan bagian ujung daun digunting dengan ukuran 1x1 cm. Potongan eksplan ditanam dengan posisi daun abaxial menyentuh media. Eksplan diamati hingga menjadi kalus berumur 4 MST. Kalus yang terbentuk ditimbang sebanyak 50 mg lalu disubkultur ke media elisitasi dengan proses pembuatan media yg sama dengan pembuatan media industri namun tidak ditambahkan agar melainkan ditambahkan CuSO₄ dengan konsentrasi 0, 2, 4, 6 ppm dan diinkubasi selama 7 dan 14 HSS menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Pemanenan kalus dilakukan sebanyak 2 kali pada 7 dan 14 HSS menggunakan kertas saring whatman No. 1 lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C selama 3 hari. Metode ekstraksi mengacu pada [Azwanida \(2015\)](#) dengan modifikasi. Kalus ditimbang sebanyak 10 mg lalu dilarutkan menggunakan *methanol p.a* sebanyak 0,5 mL dengan perbandingan antara massa gambir dan pelarut 1:50. Kemudian diekstraksi menggunakan metode sonikasi (*Ultrasonic water bath*) dengan suhu 55°C selama 60 menit dengan kekuatan 37 kHz. Setelah ekstraksi selesai, larutan disaring menggunakan PTFE *syringe* 0,22 µm dan dimasukkan ke dalam vial 1,5 mL. Larutan tersebut kemudian diinjeksi ke dalam sistem HPLC yang digunakan sebagai sampel untuk analisis kadar katekin secara kuantitatif.

Metode kuantifikasi kadar katekin dengan menggunakan HPLC mengacu pada [Yunarto et al. \(2023\)](#) dengan modifikasi. Larutan standar katekin dibuat dengan menimbang 10 mg katekin standar dan kemudian melarutkannya dalam 0,2% asam format hingga 10 mL (1000 µg/mL). Larutan standar diencerkan dengan asetonitril untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan (3, 4, 5, 6 dan 7 ppm). Fase diam yang digunakan dalam analisis HPLC adalah kolom C-18 (250 × 4,6 mm, 5 µm). Fase gerak yang digunakan adalah asetonitril (A) dan 0,2% asam format (B). Pompa kondisi fase gerak yang digunakan gradien. Suhu kolom dipertahankan pada 30°C, laju alir 1 mL/menit, dan deteksi UV pada 278 nm menggunakan detektor DAD. Larutan sampel kemudian diinjeksi menggunakan *syringe* HPLC dengan volume injeksi sebanyak 1,0 µL. Selanjutnya diperoleh kurva kalibrasi hubungan konsentrasi dengan densitas sehingga didapatkan persamaan garis $Y = ax \pm b$, dengan y adalah densitas dan x merupakan konsentrasi. Persamaan garis tersebut digunakan sebagai rumus untuk menghitung kadar senyawa katekin dari berbagai perlakuan yang telah didapatkan.

Perkembangan kalus diamati dengan mengumpulkan data bobot basah kalus (mg), bobot kering kalus (mg), umur panen kalus (HSS) dan analisis pengujian kandungan katekin dengan metode HPLC. Uji F digunakan untuk menganalisis data pada taraf nyata 5%. Apabila nilai P_r ($>F$) kurang dari 5%, analisis dilanjutkan menggunakan uji DNMRT dengan taraf 5%.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Bobot Basah Kalus (mg)

Bobot basah kalus adalah salah satu indikator keberhasilan pertumbuhan kalus dalam produksi metabolit sekunder. Bobot basah kalus diamati pada 7 dan 14 HSS. Data rata-rata bobot basah kalus dapat dilihat pada [Tabel 1](#).

Tabel 1. Bobot basah kalus pada beberapa konsentrasi elisitor Cu^{2+} selama 7 dan 14 HSS

Perlakuan	Bobot Segar Kalus	
	7 HSS (mg)	14 HSS (mg)
0 ppm (Kontrol)	6,65 b	7,59
2 ppm	8,80 b	6,27
4 ppm	18,51 a	8,62
6 ppm	22,56 a	7,42
KK =	14,03%	10,92%

Angka-angka pada kolom yang diikuti huruf kecil yang sama, tidak berbeda nyata menurut uji DNMRT pada taraf nyata 5%. Data analisis menggunakan transformasi $\sqrt{(x+0,5)}$

Kalus gambir yang diberi perlakuan elisitor Cu^{2+} memiliki bobot basah lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan kontrol pada 7 HSS terutama pada konsentrasi 4 ppm dan 6 ppm yang berpengaruh nyata terhadap bobot basah kalus pada umur panen 7 HSS ([Tabel 1](#)). Hal ini disebabkan oleh meningkatnya konsentrasi ion logam Cu^{2+} yang memengaruhi tekanan osmotik sel pada kalus karena meningkatnya jumlah total partikel terlarut dalam larutan sehingga pada konsentrasi tertentu dapat memengaruhi keseimbangan udara di dalam sel ([Nabila *et al.*, 2023](#)). [Supardi \(1999\)](#) menyatakan bahwa pemberian ion logam Cu^{2+} dengan konsentrasi tinggi menyebabkan perubahan struktur sel pada vakuola yang lebih besar.

Mekanisme penyerapan logam berat Cu menurut [Yulianto \(2006\)](#), masuknya logam berat Cu ke dalam dinding sel dan diikat oleh protein serta polisakarida sehingga logam Cu^{2+} berubah menjadi Cu^+ . Logam berat Cu^+ tersebut masuk ke dalam sitoplasma kemudian ditransportasi dan disimpan di medula. Akumulasi logam berat Cu pada dinding sel dapat mengubah dinding sel dari semi permeabel menjadi permeabel sehingga berdampak pada penyerapan zat hara yang terganggu. [Prasad \(2008\)](#) menyatakan bahwa kebutuhan Cu^{2+} pada taraf normal umumnya bagi tanaman adalah sebesar 5-20 ppm. Jika konsentrasinya melebihi angka tersebut maka Cu^{2+} dapat menyebabkan stres oksidatif akibat perlambatan siklus sel atau bahkan kematian pada sel.

Selain logam berat Cu, tekanan osmotik juga dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh dalam media. Auksin dan sitokinin dapat memengaruhi potensial air dalam sel. Auksin seperti 2,4-D

mampu merubah susunan matrix dinding sel yang menyebabkan pengenduran akibat air dapat masuk secara osmosis ke dalam sel sehingga sel membesar (Campbell & Reece, 2002). Sedangkan sitokinin seperti BAP mampu meningkatkan laju pembelahan sel yang esensial untuk proliferasi sel dalam kultur jaringan dan berkontribusi pada diferensiasi sel menjadi berbagai jenis jaringan. Sitokinin dapat memengaruhi pertambahan jumlah sel yang ditandai dengan kecepatan sel dalam membelah (Lestari *et al.*, 2013). Kombinasi antara 2,4-D dengan BAP jika berada dalam konsentrasi yang tepat akan memengaruhi tekanan osmotik agar dapat merangsang proliferasi sel sehingga mampu meningkatkan bobot basah kalus.

Bobot segar kalus pada umur 7 HSS memberikan pengaruh dibandingkan dengan umur 14 HSS (Tabel 1). Hal ini dipengaruhi oleh fase pertumbuhan sel pada kalus. Kalus umur 7 HSS berada pada fase adaptasi menuju fase eksponensial. Pada fase ini, sel-sel kalus aktif membelah dan mengalami peningkatan metabolisme sehingga mampu menyerap air dan nutrisi dengan baik serta berfungsi secara optimal (Mata, 2021). Sedangkan pada umur 14 HSS, kalus berada pada akhir fase eksponensial menuju fase stationer yang ditandai dengan pertumbuhan kalus mulai melambat dan tidak menunjukkan peningkatan signifikan dalam bobot segar. Hal ini disebabkan oleh keterbatasan nutrisi yang tersedia dalam media kultur, sehingga biomassa tidak mengalami pertambahan (Ramulifho *et al.*, 2019).

3.2 Bobot Kering Kalus (mg)

Bobot kering kalus merupakan salah satu indeks pertumbuhan kalus yang penting dalam produksi metabolit sekunder. Bobot kering kalus diamati pada 7 dan 14 HSS. Data rata-rata bobot kering kalus dapat dilihat pada Tabel 2.

Kalus gambir yang diberi perlakuan elisitor Cu^{2+} memiliki bobot kering lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan 0 ppm 7 HSS terutama pada konsentrasi 4 ppm dan 6 ppm yang berpengaruh nyata terhadap bobot kering kalus pada umur panen 7 HSS (Tabel 2). Hal ini dipengaruhi oleh aktivitas sel pada kalus. Aktivitas sel yang terus membelah dapat menyebabkan bertambahnya ukuran dan biomassa pada kalus (Merthaningsih *et al.*, 2018).

Tabel 2. Bobot kering kalus pada beberapa konsentrasi elisitor Cu^{2+} selama 7 dan 14 HSS

Perlakuan	Bobot Kering Kalus	
	7 HSS (mg)	14 HSS (mg)
0 ppm (Kontrol)	0,60 b	0,88
2 ppm	0,74 b	0,78
4 ppm	1,58 a	0,97
6 ppm	1,61 a	1,06
KK =	2,75%	1,84%

Angka-angka pada kolom yang diikuti huruf kecil yang sama, tidak berbeda nyata menurut uji DNMRD pada taraf nyata 5%. Data analisis menggunakan transformasi $\sqrt{(x+0,5)}$

Ion logam Cu berfungsi sebagai kofaktor dalam berbagai reaksi enzimatik yang terlibat dalam metabolisme sel. Logam Cu dapat meningkatkan aktivitas enzim seperti *superoxide*

dismutase (SOD) yang berperan dalam mengurangi stres oksidatif. Aktivasi jalur metabolisme ini berkontribusi pada peningkatan pertumbuhan dan pembelahan sel yang esensial untuk pembentukan biomassa kalus (Nurchayati, 2017). Proses pembentukan biomassa kalus dimulai dengan masuknya ion logam Cu ke dalam sel melalui reseptor pada membran sel kemudian masuk ke dalam sistem *messenger intracellular* melalui aktivasi fosfolipase sel sehingga memicu transduksi sinyal yang mengarah pada perubahan ekspresi gen yang dapat mengaktifkan transkripsi gen-gen yang terlibat dalam pembentukan biomassa kalus (Sholikhah, 2014). Jika konsentrasi yang diberikan lebih tinggi dari taraf normal maka unsur Cu akan menyebabkan toksisitas bagi tanaman sehingga dapat menghambat proses metabolisme tanaman.

Bobot kering kalus pada umur 7 HSS memberikan pengaruh dibandingkan dengan umur 14 HSS (Tabel 2). Hal ini dipengaruhi oleh fase pertumbuhan sel pada kalus. Hal ini sesuai dengan pendapat Hardiyanto *et al.* (2004) yang menyatakan bahwa bobot segar kalus dan bobot kering kalus merupakan dua faktor yang berkorelasi positif.

3.3 Umur Panen Kalus (HSS)

Umur panen kalus merupakan salah satu faktor pertumbuhan kalus dalam optimasi produksi metabolit sekunder. Umur panen kalus diamati pada 7 dan 14 HSS. Umur panen kalus dapat dilihat pada Gambar 1.

Berdasarkan Gambar 1, umur panen kalus gambir pada 7 dan 14 HSS yang diberi perlakuan elisitor Cu^{2+} berpengaruh terhadap morfologi kalus terutama pada perubahan warna dibandingkan dengan sebelum pemberian elisitor Cu^{2+} . Kalus sebelum pemberian Cu^{2+} (Gambar 1.a) merupakan hasil induksi kalus selama 4 MST menghasilkan kalus berwarna kuning cerah yang mengindikasikan bahwa kondisi kalus masih cukup baik selama induksi kalus dan belum terpengaruh oleh stres dari elisitor Cu^{2+} . Hal ini disebabkan karena kalus mengalami pembelahan sel berulang secara berkelanjutan yang mengakibatkan hilangnya kloroplas (Retnaningati *et al.*, 2021).



Gambar 1. Umur panen kalus gambir (a) Sebelum pemberian elisitor Cu^{2+} ; (b) Pemberian elisitor Cu^{2+} 4 ppm pada 7 HSS; (c) Pemberian elisitor Cu^{2+} 4 ppm pada 14 HSS

Kalus setelah pemberian elisitor 4 ppm pada 7 HSS dan 14 HSS menghasilkan warna kalus coklat hingga coklat kehitaman. Kalus setelah pemberian elisitor 4 ppm pada 7 HSS (Gambar 1.b), mulai mengalami perubahan warna menjadi kecoklatan. Hal ini menunjukkan adanya respons dari

kalus terhadap elisitor Cu^{2+} melalui mekanisme pertahanan diri dengan memproduksi senyawa-senyawa tertentu. [Lizawati \(2012\)](#) juga menyatakan bahwa perubahan warna kalus diduga sebagai respons stres pada kalus sehingga kalus mampu memicu enzim tertentu untuk membentuk senyawa fenol sebagai upaya pertahanan diri yang mengakibatkan terjadinya degradasi klorofil pada sel-sel kalus.

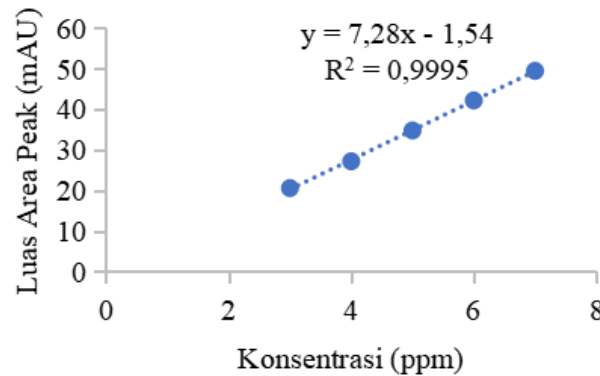
Kalus setelah pemberian elisitor 4 ppm pada 14 HSS ([Gambar 1.c](#)), menghasilkan warna kalus menjadi coklat tua. Hal ini menunjukkan bahwa kalus semakin merespons stres dari elisitor Cu^{2+} . Pemberian elisitor Cu^{2+} dalam jangka waktu yang lama menyebabkan stres oksidatif yang berlebihan sehingga kalus mengakumulasi senyawa-senyawa metabolit sekunder seperti senyawa fenolik. [Syabana et al. \(2015\)](#) menyatakan bahwa semakin tua perubahan warna kalus pada suatu media, semakin tinggi dan besar pula aktifitas biosintesis metabolit sekunder dalam menghasilkan senyawa fenolik.

Kalus setelah pemberian elisitor 4 ppm pada 7 HSS dan 14 HSS menghasilkan warna kalus coklat hingga coklat kehitaman. Hal ini dipengaruhi oleh respon kalus terhadap media kultur. Kalus yang mengalami cekaman akibat media akan menunjukkan warna yang lebih tua dibandingkan kalus segar. [Syabana et al. \(2015\)](#) menyatakan bahwa semakin tua perubahan warna kalus pada suatu media, semakin tinggi dan besar pula aktifitas biosintesis metabolit sekunder dalam menghasilkan senyawa fenolik.

Kandungan senyawa fenolik dapat diidentifikasi melalui perubahan warna kalus segar menjadi kecoklatan atau coklat. [Rasud and Bustaman \(2020\)](#) menyatakan bahwa pembentukan senyawa fenolik mampu menstimulasi perubahan warna pada kalus. Menurut [Pratama et al. \(2022\)](#), fenol yang teroksidasi akan membentuk kuinon berupa senyawa yang memicu warna coklat pada kultur kalus. Intensitas warna coklat ini berkorelasi positif dengan hiperaktivitas enzim oksidatif. *polifenol oksidase* (PPO), peroksidase (POD), dan *fenilalanin ammonia-liase* (PAL) merupakan enzim yang terlibat dalam oksidasi fenolik untuk menghasilkan pigmen melanin pada proses pencoklatan ([Liang et al., 2021](#)). Produksi fenol yang berlebihan, diikuti oksidasi oleh enzim oksidase dan polimerisasi sehingga dapat membahayakan kalus karena menghambat pertumbuhan bahkan memicu kematian jaringan ([Wahyuni et al., 2020](#)).

3.4 Analisis Pengujian Kandungan Katekin dengan Metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Katekin merupakan senyawa yang paling banyak dihasilkan pada tanaman gambir dan dimanfaatkan pada skala industri. Analisis pengujian kandungan katekin pada kalus gambir menggunakan metode HPLC. Analisis HPLC menggunakan kurva kalibrasi untuk menunjukkan linearitas antara konsentrasi senyawa standar (x) dan area puncak (y) yang dihasilkan pada kromatogram. Kurva kalibrasi standar katekin dapat dilihat pada [Gambar 2](#).



Gambar 2. Kurva Kalibrasi Standar Katekin

Berdasarkan grafik kurva kalibrasi standar katekin pada [Gambar 2](#), didapatkan persamaan regresi linier pada elisitor Cu^{2+} diketahui $y = 7,28x - 1,54$. Hal ini membuktikan bahwa semakin tinggi konsentrasi katekin, maka semakin besar luas area peak yang dihasilkan. Berdasarkan persamaan tersebut, diperoleh nilai $R^2 = 0,9995$. [Sugiyono \(2014\)](#) menyatakan bahwa analisis dikatakan akurat jika nilai R^2 mendekati 1 sehingga dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi katekin dalam sampel yang belum teridentifikasi.

Tabel 3. Hasil Analisis Kandungan Katekin Pada Kalus Gambir Menggunakan Metode HPLC

Kode sampel	Uji Duplo	Bobot Sampel (mg)	Kadar Katekin (%)	Kadar Katekin (%)
0 ppm 7 HSS	Injeksi 1	10,9	0,0226	0,0228 $\pm$ 0,0002
	Injeksi 2	11,1	0,0229	

Kandungan senyawa katekin pada kalus gambir hanya ditemukan pada perlakuan kontrol (0 ppm) 7 HSS dengan bobot 0,01 gram diperoleh kadar katekin sebanyak 0,02 % ([Tabel 3](#)). [Yunarto et al. \(2023\)](#) juga melakukan penelitian pada daun tanaman gambir dengan bobot 0,1 gram memperoleh senyawa katekin sebanyak 98,75% berdasarkan hasil uji HPLC. Perbedaan ini disebabkan oleh sampel yang digunakan dalam pengujian HPLC dimana pada penelitian ini menggunakan sampel kalus (sel-sel muda yang belum terdiferensiasi) sehingga senyawa-senyawa yang dihasilkan masih merupakan senyawa sederhana. [Fadilah \(2023\)](#) membuktikan bahwa kalus dapat menjadi sumber alternatif untuk produksi senyawa bioaktif namun kadarnya tidak sebanding dengan daun yang berasal dari tanaman utuh. Penelitian yang dilakukan oleh [Retnaningati et al. \(2021\)](#) menunjukkan bahwa kombinasi elisitor Ca^{2+} (176 g/L) dan Cu^{2+} (1 g/L) dapat meningkatkan kadar *epikatekin galat* pada kalus teh hingga 298,37 ppm, namun masih sedikit dibandingkan dengan kadar katekin pada daun teh segar.

Tabel 4. Hasil Analisis Kromatogram Kalus Gambir pada Metode HPLC

Perlakuan	Rt (min)	PH (mAU)	Area
Standar Katekin	8,298	2,214	34,8413
P1Y1	8,486	2,399	34,2896
P1Y1	6,693	3,460	49,2596
	9,577	111,655	1403,7709
P2Y1	6,666	7,147	115,1187
	9,591	58,207	754,8191
P2Y2	6,696	3,137	48,5688
	9,533	28,446	382,4608
P3Y1	6,652	27,425	422,7745
	9,555	38,685	498,4108
P3Y2	6,687	2,377	34,0216
	9,498	14,142	188,8134
P4Y1	6,612	16,746	258,4132
	9,519	34,629	457,5862
P4Y2	6,662	15,594	207,8632
	9,478	8,574	112,8887

P1Y1 = 0 ppm (7 HSS); P1Y2 = 0 ppm (14 HSS); P2Y1 = 2 ppm (7 HSS); P2Y2 = 2 ppm (14 HSS); P3Y1 = 4 ppm (7 HSS); P3Y2 = 4 ppm (14 HSS); P4Y1 = 6 ppm (7 HSS); P4Y2 = 6 ppm (14 HSS); Rt = Retention time; PH = Peak High

Berdasarkan Tabel 4, analisis kromatogram menunjukkan bahwa pada perlakuan kontrol (0 ppm) 7 HSS teridentifikasi munculnya senyawa katekin pada waktu retensi 8,4 menit. Hal tersebut teridentifikasi senyawa yang akurat berdasarkan perbandingan dengan retensi waktu larutan standar katekin yang digunakan muncul pada 8,3 menit. Sedangkan pada perlakuan lainnya, rata-rata waktu retensi kemunculan senyawa yang teridentifikasi oleh kromatogram terletak pada durasi 6,6 menit dan 9,5 menit yakni berada pada waktu retensi senyawa *Epigallocatechin* (EGC) dan *Gallocatechin gallate* (GCG).

Berdasarkan pengujian yang telah dilakukan, senyawa katekin hanya dapat ditemukan pada kalus gambir dengan perlakuan kontrol (0 ppm) pada 7 HSS. Hal tersebut terjadi karena biotransformasi senyawa katekin dalam membentuk senyawa turunannya melalui respon akibat cekaman Cu^{2+} . Kalus pada kondisi tercekam dapat mengaktifkan enzim untuk mensintesis senyawa turunan katekin. Turunan katekin yang muncul pada kromatogram dapat disebabkan oleh meningkatnya akumulasi Cu^{2+} yang berujung pada stres fisiologis yang ditandai dengan peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS) sehingga tanaman mengaktifkan sistem pertahanan seluler melalui aktifitas enzim seperti *superoxide dismutase* (SOD) sebagai penangkal stres. Akibatnya, tanaman beradaptasi melalui perubahan sintesis metabolit sekunder untuk memproduksi senyawa turunan katekin dan metabolit lainnya sebagai upaya dalam melindungi sel dari kerusakan oksidatif. Konsentrasi elisitor, durasi elisitasi, tahap pertumbuhan eksplan dan

komposisi nutrisi dapat mengoptimasi penggunaan elisitor dalam meningkatkan produksi metabolit sekunder (Naik & Al-Khayri, 2016).

4. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa pemberian elisitor Cu^{2+} tidak efektif untuk meningkatkan kandungan senyawa katekin pada kalus gambir karena hanya ditemukan pada perlakuan kontrol (0 ppm) 7 HSS. Namun, terdapat beberapa senyawa bioaktif yang muncul pada kromatogram pengujian HPLC yang tidak dapat teridentifikasi oleh standar katekin yang digunakan.

Singkatan yang Digunakan

HSS hari setelah subkultur

Kontribusi Para Penulis

Aprizal Zainal: pengawasan, perolehan dana, administrasi proyek, kurasi data, analisis formal dan sumber daya. **Warnita:** pengawasan, analisis formal, kurasi data, dan sumber daya. **Yenni Anisah Putri:** konseptualisasi, persiapan, metodologi, validasi, investigasi, perangkat lunak, sumber daya, kurasi data, penulisan - draft awal, penulisan – tinjauan dan penyuntingan.

Pernyataan Konflik Kepentingan

Para penulis menyatakan tidak memiliki konflik kepentingan atau kepentingan yang bersaing.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didukung oleh Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi Indonesia melalui Lembaga Penelitian Dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Andalas (LPPM) pada tanggal 17 Juli 2024 dengan Nomor Kontrak 112/UN16.19/PT.01.03/PSS/2024.

Daftar Pustaka

- Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medical plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants*, 4(3), 1-6. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
https://www.researchgate.net/profile/Arvind_Singh56/post/What_are_the_best_extraction_methods_for_herbal_plants/attachment/5bf2ff2dcfe4a764550348f1/AS%3A694745709936640%401542651693022/download/1.pdf
- Badan Standarisasi Nasional. (2000). *Standar Nasional Indonesia SNI 01-3391-2000. Syarat mutu gambir*. Jakarta, Indonesia: BSN. https://teknologihutan.fkt.ugm.ac.id/wp-content/uploads/sites/68/2019/01/SNI_01-3391-2000_-_Gambir-1.pdf
- Caldentey, K. M. O., & Barz, W. H. (2002). *Plant biotechnology and transgenic plants*. Marcel Dekker. New York. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.05.004>

- Campbell, N. A., Reece, J. B., & Mitchell, L. G. (2002). Biologi. Edisi Kelima Jilid I. Eds Lestari, R., Adil, M. I. L., & Anita, N. In *Erlangga*. Jakarta. 438 hal. http://202.65.121.165/lib/index.php?p=show_detail&id=5716
- Direktorat Jenderal Perkebunan Departemen Pertanian [Ditjenbun]. (2024). *Statistik Perkebunan Non Unggulan Nasional 2020-2022*. Jakarta (ID): Ditjenbun Deptan RI. <https://ditjenbun.pertanian.go.id/template/uploads/2022/11/BUKU-STATISIK-NON-UNGGULAN-2020-2022.pdf>
- Ermiaati. (2004). Budidaya, Pengolahan Hasil dan Kelayakan Usaha Tani Gambir (*Uncaria gambir* Roxb.) di Kabupaten 50 Kota. *Buletin TRO*, 15(1), 50-63. <https://repository.pertanian.go.id/server/api/core/bitstreams/d92a243a-e536-4817-80b3-64c4686dc07c/content>
- Fadilah. (2023). Pengaruh Elisitor CuSO₄.5H₂O Terhadap Pertumbuhan serta Produksi Flavonoid dan Fenolik Kultur Kalus Tanaman Insulin (*Tithonia diversifolia*). *Skripsi*. http://digilib.uinsa.ac.id/64104/2/Fadilah_H71219023.pdf
- Hardiyanto, Solichatun, A., & Mudyantini, W. (2004). Pengaruh variasi konsentrasi asam naftalenasetat terhadap pertumbuhan dan kandungan flavonoid kalus daun dewa *Gynura procumbens* (Lour) Merr. *Jurnal Biofarmasi*, 2(2) 69-74. <https://doi.org/10.13057/biofar/f020205>.
- Lestari, E., Nurhidayati, T., & Nurfadilah, S. (2013). Pengaruh Konsentrasi ZPT 2,4 D dan BAP terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Biji *Dendrobium laxiflorum* J.J Smith secara *In Vitro*. *Jurnal Sains dan Semi Pomits*, 2(1), 43-47. <https://www.neliti.com/id/publications/15940/pengaruh-konsentrasi-zpt-24-d-dan-bap-terhadap-pertumbuhan-dan-perkembangan-biji>
- Liang, Y., Chen, Y., Zhao, Y., Zhang, Y., Yang, S., Zhou, Y., & Wang, X. (2021). Overexpression of OsARP6 increases heat tolerance in rice by modulating histone modification. *Plant Biotechnology Journal*, 19(7), 1388–1401. <https://doi.org/10.3390/plants13172494>
- Lizawati. (2012). Induksi Kalus Embriogenik dari Eksplan Tunas Apikal Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) dengan Penggunaan 2,4 D dan TDZ. *Jurnal Fakultas Pertanian*, 1(2), 75-87. <https://journal.ipb.ac.id/index.php/jurnalagronomi/article/download/1398/496/>
- Mata, M. H. (2021). Akumulasi α -Tokoferol pada organ tanaman dan kultur suspensi sel *Jatropha gossypifolia* Linn dari Nusa Tenggara Timur. *Jurnal Saintek Lahan Kering*, 1(1), 12–15. <https://media.neliti.com/media/publications/486188-accumulation-of-%CE%B1-tocopherol-in-plant-or-e81f26b6.pdf>
- Merthaningsih, N. P., Yuswanti, H., & Astiningsih, A. A. M. (2018). Induksi Kalus pada Kultur Pollen Phalaenopsis dengan Menggunakan Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat. *Agrotrop*, 8(1), 47–55. <https://jurnal.harianregional.com/agrotrop/full-44324>
- Nabila, S., Afifudin, A. F. M., & Irawanto, R. (2023). Pengaruh Pencemaran Linear *Alkylbenzene Sulfonate* (LAS) dan Tembaga (Cu) terhadap Produksi Klorofil pada Tanaman Daun Tombak (*Sagittaria lancifolia*). *Spizaetus: Jurnal Biologi Dan Pendidikan Biologi*, 4(2), 176–182. <https://doi.org/10.55241/spibio.v4i2.162>
- Naik, P. M., & Al-Khayri, J. M. (2016). Somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) through cell suspension culture. *New York: Springer*, 13(91), 357-366. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3332-7_25
- Nasrul, W., Zulmardi., & Indrayani, T. I. (2020). Strengthening Gambier Market Through Optimizing Local Institutions in Indonesia. *Natural and Social Sciences*, 7(1), 5-9. <http://eprints.umsb.ac.id/id/eprint/44>
- Ningsih, I. Y. (2014). Pengaruh Elisitor Biotik dan Abiotik pada Produksi Flavonoid Melalui Kultur Jaringan Tanaman. *Pharmacy*, 11(02), 118-132. <https://media.neliti.com/media/publications/160332-ID-pengaruh-elisitor-biotik-dan-abiotik-pad.pdf>

- Nurchayati, Y. (2017). *Penyerapan dan Akumulasi Tembaga (Cu^{2+}) Pada Kultur Datura metel L. In Vitro Serta Pengaruhnya Pada Profil Metabolit*. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v8i2.5177>
- Prasad, M. N. V. (2008). *Trace Elements as Contaminant and Nutrients: Consequent in Ecosystem and Human Health*. John Wiley and Son, USA. <https://doi.org/10.1002/9780470370124.ch11>
- Pratama, A. W., Lestari, S. R., Gofur, A., & Rakhmawati, Y. (2022). Skrining Fitokimia, Total Fenol, dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Tangkai Sisir Buah Pisang Agung. *Jurnal Pangan dan Gizi*, 12(2), 14-21. <https://jurnal.unimus.ac.id/index.php/JPDG/article/view/10806>
- Ramulifho, E., Goche, T., Van As, J., Tsilo, T. J., Chivasa, S., & Ngara, R. (2019). Establishment and characterization of callus and cell suspension cultures of selected *Sorghum bicolor* (L.) Moench varieties: a resource for gene discovery in plant Stress Biology. *Agronomy*, 9(5), 218. <https://doi.org/10.3390/agronomy9050218>
- Rasud, Y., & Bustaman, B. (2020). Induksi Kalus Secara *In vitro* dari Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) dalam Media Dengan Berbagai Konsentrasi Auksin. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 25(1), 67-72. <https://doi.org/10.18343/jipi.25.1.67>
- Retnaningati, D., Hermanto, H., Purwijantiningsih, E., & Solle, H. R. L. (2021). Pertumbuhan Kalus dan Produksi Katekin pada Kultur *In Vitro* Kalus Teh (*Camelia Sinensis* L.) dengan Penambahan Elisitor Ca^{2+} dan Cu^{2+} . *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*, 6(9), 192–202. <https://doi.org/10.24002/biota.v6i3.5278>
- Sholikhah, L. L. (2014). *Pengaruh Fe^{2+} pada media MS dengan penambahan 2,4-D yang dikombinasikan dengan air kelapa terhadap perkembangan dan kandungan metabolit sekunder asiatikosida dan madekasosida kalus pegagan (Centella asiatica L. Urban)* [Skripsi]. <http://etheses.uin-malang.ac.id/id/eprint/495>
- Siregar, L. A. M., Keng, C. L., & Lim, B. P. (2006). Pertumbuhan dan akumulasi alkaloid dalam kalus dan suspensi sel *Eurycoma longifolia* Jack. *Jurnal Ilmiah Pertanian, Kultura*, 1(1). <http://repository.usu.ac.id/handle/123456789/19950>
- Sugiyono. (2014). *Metode Penelitian Pendidikan Pendekatan Kuantitatif, Kualitatif, dan R & D*. Bandung: Alfabeta. https://digilib.stekom.ac.id/assets/dokumen/ebook/feb_35efe6a47227d6031a75569c2f3f39d44fe2db43_1652079047.pdf
- Supardi, M. S. (1999). *Pengaruh Konsentrasi Ion Logam Cu^{2+} Terhadap Pertumbuhan dan Kandungan Fitosteroid pada Kultur Kalus Solanum Laciniatum Ait. (SL-7)* [Thesis]. <http://repository.unair.ac.id/id/eprint/56301>
- Sutini, B., Tatik, W., Wahyu, W., & Sutiman, B.S. (2008). Meningkatkan Produksi Flavan-3-ol Melalui Kalus *Camelia sinensis* L. Dengan Elisitor Cu^{2+} . *Jurnal Berk. Panel. Hayati*, (14), 39-44. <https://www.berkalahayati.org/index.php/jurnal/article/view/297>
- Syabana, M. A., Imas, R., & Endah, P. N. (2015). Pertumbuhan Tanaman Marasi (*Curculigo latifolia*) dengan Perbedaan Konsentrasi NAA (*Naphthalena Acetic Acid*) dan BAP (*Benzyl Amino Purine*) Secara *In Vitro*. *Jurnal Agroekotek*, 7(1), 6-15. <https://jurnal.untirta.ac.id/index.php/jav/article/view/510/0>
- Wahyuni, A., Satria, B., & Zainal, A. (2020). Induksi Kalus Gaharu dengan NAA dan BAP Secara *In Vitro*. *Agrosains: Jurnal Penelitian Agronomi*, 22(1), 39–44. <https://doi.org/10.20961/agsjpa.v22i1.36007>
- Yulianto, B. (2006). Daya Serap Rumput Laut (*Gracillaria* sp.) terhadap Logam Berat Tembaga (Cu) sebagai Biofilter. *Ilmu Kelautan: Indonesian Journal of Marine Sciences*, 11(2), 72-78. <https://download.garuda.kemdikbud.go.id/article.php?article=1384771&val=1242&title=Daya%20Serap%20Rumput%20Laut%20Gracilaria%20sp%20Terhadap%20Logam%20Berat%20Tembaga%20Cu%20Sebagai%20Biofilter>

- Yunarto, N., Calvin, C. C., Sulistyowati, I., Oktoberia, I. S., Reswandaru, U. N., Elya, B., ..., & Miardja, L. K. (2023). Development and Validation of a High-Performance Liquid Chromatography-Based Method for Catechin Isolated from the Leaves of Gambir (*Uncaria gambir* Roxb). *Trop J Nat Prod Res.*, 7(3), 2569-2573. <https://openurl.ebsco.com/EPDB%3A5%3A27399141/detailv2?sid=ebsco%3Aplink%3Ascholar&id=ebsco%3A5%3A163682108&crl=c>