

Konservasi *In Vitro* dan Profiling Metabolit Nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) : Pengaruh Hormon terhadap Kalus dan Pelestarian Minyak Atsiri

(*In Vitro* Conservation and Metabolite Profiling of Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.): Hormonal Effects on Callus and Essential Oil Preservation)

Dewi Sartika Amboupe^{1*}, Jamilatus Sa'diyah², Sri Ayu Anggita³

^{1*,2,3} Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Makassar, Indonesia

ARTICLE INFO

Article history:

Received January 21, 2025;

Revision in revised from February 15, 2025;

Accepted March 20, 2025;

Available Online March 30, 2025.

KEYWORDS :

2,4-D;

BAP;

Callus;

Pogostemon cablin;

Essential oil;

In vitro conservation

ABSTRACT

Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) is a significant tropical bioresource known for its essential oil, which possesses high ethnobiological and economic value but cannot yet be synthetically produced. This study aims to establish an *in vitro* conservation framework and evaluate the preservation of secondary metabolites (essential oil) within callus cultures. Leaf explants were cultured on Murashige and Skoog (MS) media supplemented with various combinations of 2,4-D and BAP: 1 ppm BAP (W1), 1 ppm BAP + 1 ppm 2,4-D (W2), 1 ppm BAP + 2 ppm 2,4-D (W3), 2 ppm BAP + 1 ppm 2,4-D (W4), and 2 ppm BAP + 2 ppm 2,4-D (W5). The results indicated that W1 (1 ppm BAP without 2,4-D) was the most effective treatment for sustainable biomass production, achieving a 75% growth rate, the fastest induction time (6 days), and the highest fresh weight (0.1364 g). Thin Layer Chromatography (TLC) profiling confirmed that the *in vitro* callus successfully preserved essential oil components identical to the mother plant, as evidenced by purple spots at Rf values of 0.75 and 0.95. Although alkaloids and flavonoids were not detected due to the cellular dedifferentiation phase, the consistent presence of essential oils demonstrates the potential of *in vitro* systems for the conservation and sustainable management of tropical aromatic plant metabolites.



Copyright (c) 2025 @author(s).

1. PENDAHULUAN

Nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) merupakan salah satu tanaman aromatik tropis paling penting dalam kekayaan hayati Indonesia, khususnya di wilayah

Sulawesi yang menjadi salah satu pusat produksinya. Secara etnobiologi, minyak nilam telah lama dimanfaatkan sebagai bahan pengikat (*fixative*) dalam industri parfum, kosmetik, hingga pengobatan

*Corresponding Author

e-mail address : dewi.sartika@unm.ac.id

Published by Center for Ecology, Conservation and Ethnobiology Studies

tradisional karena karakteristik aromanya yang unik dan tahan lama (Paul et al., 2010). Keberadaan komponen utama berupa patchouli alcohol memberikan nilai ekonomi yang sangat tinggi pada tanaman ini di pasar internasional. Namun, ketergantungan pada pengambilan sampel langsung dari alam dan metode budidaya konvensional sering kali menghadapi kendala efisiensi dan kerentanan terhadap serangan patogen di ekosistem tropis (Singh et al., 2002).

Eksplorasi yang tidak terkendali serta perubahan iklim mengancam keberlanjutan sumber daya hayati ini, sehingga diperlukan strategi manajemen ekosistem dan metode konservasi yang inovatif (Sari, 2023). Hingga saat ini, minyak nilam asli belum dapat diproduksi secara sintetik melalui proses kimia di laboratorium karena struktur molekulnya yang kompleks (Gershenzon & Dudareva, 2007; Dudareva et al., 2004). Oleh karena itu, menjaga integritas biokimia tanaman nilam menjadi krusial. Pendekatan bioteknologi melalui teknik kultur jaringan muncul sebagai solusi strategis untuk konservasi *ex-situ*, yang memungkinkan pelestarian plasma nutfah sekaligus penyediaan bahan baku metabolit sekunder secara berkelanjutan tanpa harus merusak populasi alami di hutan tropis (Ali et al., 2018; Gonçalves & Romano, 2013).

Kultur kalus sebagai bagian dari teknologi *in vitro* menawarkan potensi besar dalam bidang bioprospeksi molekuler. Melalui induksi sel-sel somatik menjadi massa kalus, peneliti dapat memanipulasi lingkungan pertumbuhan untuk mengoptimalkan sintesis metabolit sekunder (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002; Verpoorte et al.,

2002). Penggunaan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT), khususnya kombinasi golongan Auksin seperti asam 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan golongan Sitokinin seperti Benzyl Amino Purin (BAP), berperan vital dalam meregulasi pembelahan sel dan diferensiasi biokimia (George et al., 2008; Smetanska, 2008; Isah, 2019). Keberhasilan pembentukan kalus yang mampu mempertahankan profil kimia tanaman induknya merupakan indikator penting dalam stabilitas genetik dan fungsional sistem konservasi *in vitro* tersebut (George et al., 2008).

Penelitian ini difokuskan pada upaya profil metabolit sekunder, khususnya deteksi minyak atsiri pada kalus daun nilam yang diinduksi dengan berbagai kombinasi hormon 2,4-D dan BAP. Dengan membandingkan profil kromatografi kalus terhadap tanaman induk, penelitian ini bertujuan untuk membuktikan apakah sistem kultur *in vitro* dapat mempertahankan karakter biokimia spesifik spesies *Pogostemon cablin* (Ncube et al., 2012). Hasil dari studi ini diharapkan dapat memberikan kontribusi ilmiah dalam pengembangan teknologi produksi metabolit sekunder yang ramah lingkungan serta mendukung upaya pelestarian keanekaragaman hayati tropis melalui manajemen sumber daya hayati berbasis laboratorium yang efisien (Karuppusamy, 2009).

2. BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan secara intensif di Laboratorium Kultur Jaringan, Pusat Kegiatan Penelitian, Universitas Hasanuddin. Fokus utama penelitian adalah pada optimasi media untuk

konservasi eks-situ dan analisis profil metabolit sekunder pada tanaman tropis

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan meliputi unit Laminar Air Flow Cabinet (LAFC), autoklaf digital, timbangan analitik dengan ketelitian 0,0001 g, botol kultur (vial), alat-alat gelas (beaker, erlenmeyer, pipet volume), serta perangkat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang mencakup lempeng silika dan chamber elusi.

Bahan utama adalah eksplan daun muda Nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) dari populasi budidaya lokal di Kabupaten Luwu, Sulawesi Selatan. Bahan kimia untuk media kultur meliputi garam mineral Murashige dan Skoog (MS), sukrosa (30 g/L), agar-agar batang (7 g/L), serta zat pengatur tumbuh (ZPT) murni berupa Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan Benzyl Amino Purin (BAP) (Murashige & Skoog, 1962). Bahan analisis kimia meliputi kloroform, n-heksana, etil asetat, reagen Vanilin-Sulfat, reagen Meyer, Dragendorff, dan Liebermann-Burchard (Murashige & Skoog, 1962).

Persiapan Media Tanam (Media Dasar MS)

Tahap awal yang paling krusial adalah pembuatan media Murashige dan Skoog (MS) yang mengandung nutrisi lengkap bagi pertumbuhan sel. Komposisi media ini meliputi hara makro, hara mikro, dan vitamin yang dilarutkan dalam akuades steril hingga homogen. Sukrosa ditambahkan sebanyak 30.000 mg/L sebagai sumber energi karbon utama karena jaringan eksplan yang ditanam dalam kondisi in vitro bersifat heterotrof dan belum mampu melakukan fotosintesis secara mandiri (George et al.,

2008). Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) berupa kombinasi hormon 2,4-D dan BAP dicampurkan sesuai dengan variasi konsentrasi perlakuan (W1-W5) untuk memicu proses dediferensiasi sel. Sebelum pemadatan, derajat keasaman (pH) media diatur dengan presisi pada rentang 5,7 - 5,8 menggunakan larutan NaOH atau HCl 0,1 N, karena pH yang tidak sesuai dapat menghambat penyerapan nutrisi oleh sel tanaman. Terakhir, media dipadatkan dengan agar sebanyak 7.000 mg/L dan dipanaskan hingga mendidih sebelum dimasukkan ke dalam botol kultur.

Sterilisasi Media dan Alat Laboratorium

Seluruh media tanam yang telah dimasukkan ke dalam botol kultur, beserta alat-alat diseksi seperti pinset, skapel, petri dish, dan gunting, harus melalui proses sterilisasi panas basah. Sterilisasi dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi (1 atm) selama 20 menit (Hendaryono & Wijayani, 1994). Suhu dan tekanan tinggi ini bertujuan untuk memastikan kematian seluruh spora mikroorganisme, bakteri, maupun jamur yang dapat mengontaminasi kultur. Keberhasilan sterilisasi media sangat menentukan keberlanjutan konservasi in vitro, karena media yang kaya nutrisi sangat rentan terhadap pertumbuhan mikroba yang dapat mematikan eksplan nilam dalam waktu singkat.

Sterilisasi Eksplan Daun Nilam

Eksplan daun nilam (*Pogostemon cablin*) memerlukan perlakuan sterilisasi permukaan yang sangat ketat karena berasal dari lingkungan luar (lapangan) yang kaya akan mikroba endofit maupun epifit. Prosedur diawali dengan mencuci

daun di bawah air mengalir menggunakan deterjen cair untuk meluruhkan kotoran fisik. Di dalam Laminar Air Flow Cabinet (LAFC), sterilisasi dilanjutkan secara kimiawi dengan merendam eksplan dalam larutan fungisida dan bakterisida (10%) selama 10 menit untuk menekan pertumbuhan jamur dan bakteri. Setelah itu, eksplan direndam dalam larutan natrium hipoklorit (10% sodium hypochlorite solution) sebagai agen pengoksidasi mikroba selama 5 menit. Tahap akhir yang sangat penting adalah pembilasan dengan akuades steril sebanyak tiga kali untuk memastikan tidak ada sisa bahan kimia yang tertinggal, karena residu sterilan bersifat toksik dan dapat menyebabkan nekrosis pada jaringan daun.

Inokulasi (Penanaman) Eksplan

Proses inokulasi dilakukan di atas petri dish steril di dalam area kerja LAFC yang aseptik. Eksplan daun nilam yang telah steril dipotong secara hati-hati menggunakan skapel menjadi bagian-bagian kecil berukuran $\pm 1 \text{ cm}^2$. Pematangan ini bertujuan untuk melukai jaringan tanaman, yang secara fisiologis akan merangsang sel-sel di area luka untuk melakukan pembelahan cepat guna menutupi luka, yang kemudian akan berkembang menjadi kalus. Potongan eksplan tersebut kemudian ditanam pada permukaan media MS perlakuan dengan posisi bagian bawah daun (abaksial) bersentuhan langsung dengan media untuk mengoptimalkan penyerapan hormon 2,4-D dan BAP. Setiap botol kultur ditutup rapat menggunakan aluminium foil dan parafilm agar kelembapan udara di dalam botol tetap terjaga.

Inkubasi dan Pengamatan Perkembangan Kalus

Botol kultur yang telah berisi eksplan disimpan di rak pertumbuhan dalam ruang inkubasi dengan suhu yang dijaga stabil pada rentang $22^\circ\text{C} - 25^\circ\text{C}$. Kondisi ruang dibuat gelap total (tanpa cahaya) untuk mendukung efektivitas hormon 2,4-D. Paparan cahaya matahari atau lampu dapat menyebabkan fotooksidasi pada auksin, yang mengakibatkan penurunan efektivitas hormon dalam merangsang pembelahan sel. Pengamatan dilakukan secara periodik setiap minggu untuk mencatat waktu induksi (hari ke berapa kalus muncul), persentase eksplan yang tumbuh, serta berat basah total kalus pada akhir masa kultur. Selain data kuantitatif, dilakukan pengamatan kualitatif terhadap morfologi kalus, seperti tekstur (remah atau kompak) dan perubahan warna dari putih bening menjadi hijau atau cokelat, yang memberikan informasi mengenai tingkat diferensiasi sel (Ali et al., 2018).

Ekstraksi Profil Metabolit Sekunder

Setelah kalus mencapai pertumbuhan maksimal (stasioner), kalus dipanen dari botol kultur dan dipisahkan dari sisa media agar. Kalus kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada suhu ruang untuk mengurangi kadar air tanpa merusak senyawa termolabil. Proses ekstraksi dilakukan melalui metode maserasi, yaitu merendam kalus kering dalam pelarut kloroform selama 24 jam. Kloroform dipilih karena kemampuannya yang sangat baik dalam melarutkan senyawa non-polar seperti komponen minyak atsiri. Hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring Whatman untuk mendapatkan filtrat jernih, yang kemudian diuapkan hingga diperoleh

ekstrak kental yang siap untuk dianalisis lebih lanjut (Giri & Narasu, 2000).

Deteksi Minyak Atsiri dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis Metabolite Profiling dilakukan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mengidentifikasi keberadaan komponen minyak atsiri. Lempeng silika gel GF254 digunakan sebagai fase diam, sementara fase gerak yang digunakan adalah campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan volume 85:15. Perbandingan ini dipilih untuk memberikan pemisahan yang optimal bagi senyawa terpenoid (Murashige & Skoog, 1962). Ekstrak kalus dan minyak atsiri nilam murni (kontrol) ditotolkan pada garis dasar plat menggunakan pipa kapiler. Setelah proses elusi selesai, plat diamati di bawah lampu UV (254 nm dan 366 nm) untuk melihat bercak yang berfluoresensi. Selanjutnya, plat disemprot dengan pereaksi Vanilin-Sulfat dan dipanaskan pada suhu 110°C; munculnya warna ungu spesifik dengan nilai Rf tertentu merupakan bukti autentik adanya kandungan minyak atsiri di dalam kalus (Ali et al., 2018).

Skrining Fitokimia Kualitatif dan Analisis Data

Sebagai tahap akhir untuk memetakan keragaman hayati biokimia hasil kultur in vitro, dilakukan skrining fitokimia kualitatif. Uji ini meliputi uji alkaloid dengan reagen Meyer dan Dragendorff, uji terpenoid dengan metode Liebermann-Burchard, serta uji flavonoid (Murashige & Skoog, 1962). Data yang diperoleh, baik dari parameter pertumbuhan kalus maupun hasil analisis kimia, dikumpulkan dan dianalisis secara deskriptif. Hasil analisis ini digunakan

untuk menentukan sejauh mana kombinasi hormon 2,4-D dan BAP mampu mempertahankan integritas kimiawi tanaman nilam, yang menjadi kontribusi penting dalam strategi manajemen sumber daya hayati tropis secara berkelanjutan.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi Kalus dan Parameter Pertumbuhan

Waktu pertumbuhan kalus diamati setiap pekan setelah tanam (PST). Keberhasilan pertumbuhan kalus dinyatakan dengan persentase banyaknya eksplan dalam membentuk kalus pada pengamatan 4 pekan setelah tanam. Data pengamatan persentase kalus nilam dapat dilihat pada Tabel 1 berikut.

Tabel 1. Rata-rata berat basah kalus nilam

No	Perlakuan	Rata-rata Berat Basah Kalus (g)
1	0 ppm 2,4D + 1 ppm BAP	0,1364 ^b
2	1 ppm 2,4D + 1 ppm BAP	0,0259 ^a
3	1 ppm 2,4D + 2 ppm BAP	0 ^a
4	2 ppm 2,4D + 1 ppm BAP	0,01003 ^a
5	2 ppm 2,4D + 2 ppm BAP	0 ^a

Konsentrasi hormon yang paling cepat dalam menginduksi kalus yaitu pada pekan pertama tepatnya 6 hari setelah tanam adalah 1 ppm BAP tanpa penambahan hormon 2,4D dan kombinasi 1 ppm 2,4 D dengan 1 ppm BAP. Persentase eksplan yang tumbuh paling besar yaitu 75 % adalah eksplan yang ditanam dengan konsentrasi hormon 1 ppm BAP tanpa penambahan 2,4 D. Kombinasi 1 ppm 2,4 D dengan 2 ppm BAP dan 2 pm 2,4 D dengan 2 ppm BAP tidak memunculkan kalus hingga akhir pekan keempat. Hal ini mungkin terjadi disebabkan karena eksplan daun nilam sudah mengandung sitokinin endogen sehingga

penambahan sitokinin membuat kombinasi hormon tidak seimbang sehingga tidak terbentuk kalus.

Pengaruh Hormon 2,4-D dan BAP terhadap Berat Basah Kalus Nilam Pogostemon cablin Benth. Data pengamatan berat basah kalus nilam dilihat pada Tabel 2 di bawah ini.

Tabel 2. Persentase Tumbuh kalus nilam

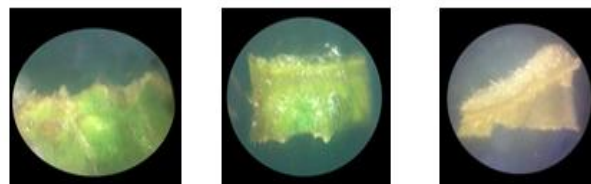
No	Perlakuan	Rata-rata Persentase Eksplan yang Tumbuh (%)
1	0 ppm 2,4D + 1 ppm BAP	75
2	1 ppm 2,4D + 1 ppm BAP	50
3	1 ppm 2,4D + 2 ppm BAP	0
4	2 ppm 2,4D + 1 ppm BAP	25
5	2 ppm 2,4D + 2 ppm BAP	0

Berdasarkan hasil uji lanjut DMRT 5% diketahui bahwa medium W1 yakni 1 ppm BAP tanpa penambahan hormon 2,4 D merupakan media terbaik untuk mendapatkan berat basah kalus nilam yang tinggi. Hal ini terbukti bahwa berat basah kalus pada media tersebut sebesar 0,1364 gram. Sedangkan berat basah kalus paling rendah yaitu 0 gram yakni pada media W3 dengan kombinasi 1 ppm 2,4-D + 2 ppm BAP dan W5 dengan kombinasi 2 ppm 2,4-D + 2 ppm BAP yang menunjukkan kalus nilam tidak dapat mengalami pertumbuhan sampai pengamatan terakhir (4 PST).

Karakteristik Morfologi Kalus

Pengamatan tekstur kalus dilakukan pada akhir pengamatan (4 PST) dengan menggunakan mikroskop perbesaran 40x. Tekstur kalus diamati pada saat penimbangan. Pada kombinasi 1 ppm 2,4D + 1 ppm BAP dan 2 ppm 2,4D + 1 ppm BAP Kalus yang terbentuk memiliki

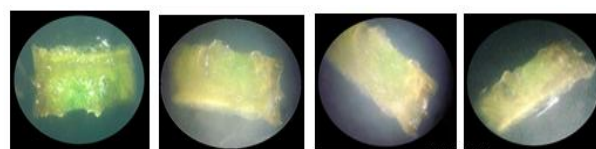
tekstur kalus remah. Sedangkan pada konsentrasi 1 ppm BAP tanpa penambahan hormon 2,4 D, kalus yang terbentuk merupakan kalus kompak (Gambar 1)



(a) (b) (c)

Gambar 1. Struktur kalus dilihat menggunakan mikroskop perbesaran 40x. pada perlakuan : (a) 0 ppm 2,4D + 1 ppm BAP; (b) 1 ppm 2,4D + 1 ppm BAP; (c) 2 ppm 2,4D + 1 ppm BAP.

Pada pekan pertama setelah tanam, kalus yang muncul berwarna hijau kekuningan dengan tekstur remah. Kemudian pada pekan kedua hingga pekan ketiga, kalus berubah warna menjadi kuning. Kemudian pada pekan keempat, kalus berubah warna menjadi kuning kecoklatan. Perubahan terhadap warna kalus dapat dilihat pada Gambar 2.

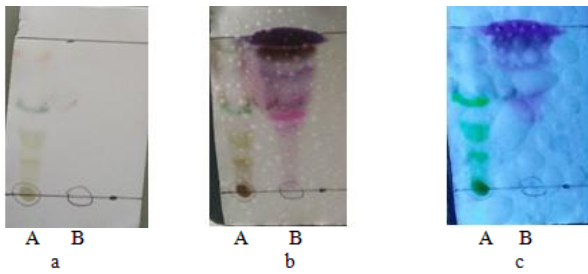


(a) (b) (c) (d)

Gambar 2. Perubahan warna kalus pada perlakuan 1 ppm 2,4D + 1 ppm BAP (a) 1 (PST); (b) 2 (PST); (c) 3 (PST); (d) 4 (PST).

Deteksi Minyak Atsiri Dari Kalus Nilam Pogostemon cablin Benth.

Hasil KLT dapat dilihat pada Gambar 3. Dari hasil KLT setelah dikeringkan, terlihat pada plat KLT timbul 4 bercak dari ekstrak kalus dan belum terlihat bercak dari minyak atsiri. Setelah disemprot menggunakan vanilin-sulfat, timbul 5 bercak pada ekstrak kalus dan 5 bercak pada minyak atsiri.



Gambar 3. Hasil KLT minyak atsiri dan ekstrak kalus nilam ,A: ekstrak kalus, B: minyak atsiri, a:setelah dikeringkan, b:setelah disemprot menggunakan vanilin-sulfat, c:diamati di bawah UV

Saat diamati di bawah sinar UV, 3 bercak terlihat jelas dari ekstrak kalus dan minyak atsiri (Tabel 3 & Tabel 4). Bercak ketiga pada ekstrak kalus sejajar dengan bercak pertama pada minyak atsiri sehingga memiliki nilai Rf yang sama. Pada bercak yang memiliki nilai Rf sama diduga mengandung senyawa yang sama. Pada bercak yang memiliki nilai Rf yang berbeda diduga mengandung senyawa yang berbeda. Terdapat persamaan dan perbedaan baik warna maupun jarak pada bercak yang ditimbulkan dari ekstrak kalus dan minyak atsiri.

Tabel 3. Data Nilai Rf Hasil KLT Ekstrak Kalus

No	Ekstrak Kalus		
	Sebelum disemprot	Setelah disemprot	Diamati di bawah UV
1	0,125	0,125	0,125
2	0,425	0,425	0,425
3	0,5	0,5	0,5
4	0,75	0,75	-
5	-	0,95	-

Tabel 4. Data Nilai Rf Hasil KLT Minyak Atsiri

No	Minyak Atsiri		
	Sebelum disemprot	Setelah disemprot	Diamati di bawah UV
1	-	0,375	-
2	-	0,425	-
3	-	0,5	0,5
4	-	0,75	0,75
5	-	0,875	0,875

Dari hasil kromatogram dari sampel berupa ekstrak kalus dan minyak atsiri yang telah ditotolkan pada plat KLT dan dielusi menggunakan campuran pelarut organik kemudian disemprot dengan larutan pereaksi vanilin-sulfat, dapat dilihat bahwa terdapat persamaan dan perbedaan baik warna maupun nilai Rf dari bercak ekstrak kalus dan minyak atsiri. Persamaan hasil kromatogram minyak atsiri dan ekstrak kalus adalah terdapat tiga bercak yang memiliki nilai Rf sama. Namun, Ketiga bercak tersebut memiliki warna yang berbeda. Selain itu, persamaan lain adalah terdapat satu bercak yang berwarna sama, namun memiliki nilai Rf yang berbeda.

Hasil Skrining Fitokimia

Dari hasil uji fitokimia dapat diamati bahwa minyak atsiri positif mengandung terpenoid dengan respon positif berupa perubahan warna dari kuning menjadi merah dan negatif mengandung alkaloid dan flavonoid karena tidak terbentuk endapan dan tidak terjadi perubahan warna (Gambar 4). Sedangkan ekstrak kalus negatif mengandung senyawa terpenoid, alkaloid dan flavonoid karena tidak terjadi perubahan warna dan tidak terbentuk endapan.



Gambar 4. Hasil Uji Fitokimia, A: Minyak Atsiri, B: Ekstrak kalus

Skrining fitokimia yang dilakukan tidak hanya diujikan pada ekstrak kalus nilam, tetapi juga diujikan pada minyak

atsiri nilam sebagai pembanding. Pada kedua sampel baik ekstrak kalus maupun minyak atsiri nilam tidak mengandung senyawa alkaloid dan flavonoid setelah diuji menggunakan pereaksi Wagner dan Dragendorf untuk alkaloid dan bubuk Mg serta H₂SO₄ untuk flavonoid. Sedangkan sampel minyak atsiri positif mengandung terpenoid dengan respon positif berupa perubahan warna dari bening menjadi merah muda.

Pembahasan

Nilai berat basah kalus yang diperoleh menunjukkan bahwa kombinasi media yang digunakan memberikan pengaruh yang nyata terhadap tinggi rendahnya berat basah kalus, ditandai dengan notasi huruf yang berbeda. Sehingga, dari penelitian ini diketahui bahwa penggunaan media kombinasi yang efektif adalah W1 dengan konsentrasi 1 ppm BAP tanpa penambahan hormon 2,4 D karena dengan konsentrasi media tersebut sudah mampu mendapatkan berat basah yang tertinggi yaitu sebesar 0,1364 gram. Secara fisiologis, respon cepat pada W1 menunjukkan bahwa eksplan daun nilam memiliki kandungan auksin endogen yang cukup tinggi, sehingga penambahan Sitokinin (BAP) saja sudah mampu mencapai keseimbangan hormonal yang diperlukan untuk memicu pembelahan sel somatik (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002; Verpoorte et al., 2002). Hal ini sejalan dengan prinsip manajemen sumber daya hayati yang mengedepankan efisiensi penggunaan input kimia dalam sistem perbanyakan *ex-situ*.

Morfologi kalus yang terbentuk pada semua perlakuan umumnya menunjukkan warna putih bening hingga putih kecokelatan. Namun, terdapat

perbedaan signifikan pada tekstur kalus. Perlakuan W1 menghasilkan kalus dengan tekstur kompak, sedangkan perlakuan yang mengandung 2,4-D (W2-W5) cenderung menghasilkan kalus yang lebih remah (*friable*). Tekstur kompak pada W1 mengindikasikan ikatan antar sel yang kuat, yang sering kali dikaitkan dengan kemampuan jaringan dalam mengakumulasi metabolit sekunder secara lebih stabil dibandingkan jaringan yang remah (George et al., 2008). Dalam konteks biologi evolusioner, kemampuan sel untuk tetap terorganisir dalam kondisi *in vitro* menunjukkan daya adaptasi genetik yang baik terhadap lingkungan buatan.

Adanya tiga noda yang tampak jelas pada hasil KLT dapat disimpulkan bahwa dalam minyak atsiri dan ekstrak kalus nilam terdapat 3 tiga kelompok senyawa yang mempunyai tingkat kepolaran yang berbeda. Berdasarkan teori "like dissolve like", dengan fase diam yang bersifat polar dan fasa gerak yang cenderung non polar, maka noda paling atas adalah kelompok senyawa-senyawa non polar sedangkan noda paling bawah adalah kelompok senyawa-senyawa polar (Smetanska, 2008).

Berdasarkan hasil kromatogram, diamati bahwa pada ekstrak kalus nilam terdapat bercak berwarna ungu setelah disemprot dengan pereaksi vanilin-sulfat. Hal ini menandakan bahwa ekstrak kalus nilam mengandung minyak atsiri, sebagaimana (Gershenzon & Dudareva, 2007) menyatakan bahwa minyak atsiri ditunjukkan oleh adanya bercak biru sampai ungu pada sinar tampak dengan deteksi vanilin. Komponen minyak atsiri pada kalus daun lavender sama seperti pada minyak atsiri tanaman asal. Hal ini dapat terlihat dari warna dan nilai hRF bercak yang muncul sama. Jadi, dalam

penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kalus daun lavender mengandung minyak atsiri seperti pada tanaman asal.

Komponen yang terdapat dalam ekstrak kalus nilam dianalisis golongan senyawanya dengan tes uji warna dengan beberapa pereaksi untuk golongan senyawa alkaloid, flavonoid, dan terpenoid. Pereaksi-pereaksi spesifik yang digunakan kebanyakan bersifat polar sehingga bisa berinteraksi dengan sampel berdasarkan prinsip 'like dissolve like' (Paul et al., 2010; Misra et al., 2016).

Terdapatnya perbedaan antara senyawa yang dikandung minyak atsiri dan ekstrak kalus disebabkan karena pada proses pembentukan kalus senyawa-senyawa belum sepenuhnya terbentuk (Isah, 2019). Hal ini disebabkan kalus telah mengalami dediferensiasi dan belum mengalami diferensiasi menjadi organ tanaman yang utuh. Sehingga metabolit sekunder seperti terpenoid belum terbentuk. Hal ini memperkuat pernyataan dari Naim (2005), bahwa setiap tanaman memiliki suatu kemampuan yang hampir terbatas untuk mensintesis substansi aromatik.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa kombinasi zat pengatur tumbuh berpengaruh signifikan terhadap induksi dan pertumbuhan kalus nilam (*Pogostemon cablin* Benth.). Perlakuan terbaik diperoleh pada media dengan penambahan 1 ppm BAP tanpa 2,4-D, yang mampu menghasilkan persentase pertumbuhan kalus tertinggi (75%), waktu induksi tercepat (6 hari), serta berat basah terbesar (0,1364 g). Hal ini menunjukkan bahwa keseimbangan

hormon endogen dan eksogen menjadi faktor kunci dalam keberhasilan kultur in vitro. Selain itu, hasil analisis KLT menunjukkan bahwa kalus mampu mempertahankan komponen minyak atsiri yang serupa dengan tanaman induk, ditandai dengan nilai Rf yang identik. Temuan ini menegaskan bahwa teknik kultur jaringan berpotensi sebagai metode konservasi ex-situ yang efektif sekaligus sebagai alternatif produksi metabolit sekunder secara berkelanjutan tanpa merusak populasi alami (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002; Canter et al., 2005; Smetanska, 2008; Bulawan et al., 2022).

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Kultur Jaringan, Pusat Kegiatan Penelitian Universitas Hasanuddin atas fasilitas dan dukungan teknis yang diberikan selama pelaksanaan penelitian. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Makassar, atas dukungan akademik dan administratif. Selain itu, penulis menghargai kontribusi semua pihak yang telah membantu dalam proses penelitian, baik secara langsung maupun tidak langsung, sehingga penelitian ini dapat diselesaikan dengan baik.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Ali, M., Abbasi, B. H., & Ahmad, N. (2018). Plant tissue culture: Current status and opportunities. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 134(1), 1-16.
<https://doi.org/10.1007/s11240-018-1407-6>

- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. *Plant Science*, 161(5), 839-851. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3)
- Bulawan, F. T., Sunardi, Wardani, W., Trias Jaya, M. R., & Liana, A. (2022). Identifikasi Jenis Tumbuhan Paku Di Kawasan Air Terjun Gunung Mambulilling Kabupaten Mamasa Sulawesi Barat. *Jurnal Biosense*, 5(01), 100-111. <https://doi.org/10.36526/biosens.e.v5i01.1959>
- Canter, P. H., Thomas, H., & Ernst, E. (2005). Bringing medicinal plants into cultivation: Opportunities and challenges. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 11(1-2), 1-18. https://doi.org/10.1300/J044v11n01_01
- Dudareva, N., Pichersky, E., & Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*, 135(4), 1893-1902. <https://doi.org/10.1104/pp.104.049981>
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2008). *Plant propagation by tissue culture* (3rd ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>
- Gershenzon, J., & Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, 3(7), 408-414. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.5>
- Giri, A., & Narasu, M. L. (2000). Transgenic hairy roots: Recent trends and applications. *Biotechnology Advances*, 18(1), 1-22. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00016-6](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00016-6)
- Gonçalves, S., & Romano, A. (2013). In vitro culture of medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 114(1), 1-22. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0298-0>
- Isah, T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research*, 52, 39. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>
- Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue culture technique. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13), 1222-1239. <https://doi.org/10.5897/JMPR.900100>
- Kim, Y. S., et al. (2013). In vitro propagation of medicinal and aromatic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 113, 325-335. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0278-7>
- Misra, P., et al. (2016). Patchouli alcohol biosynthesis and regulation in *Pogostemon cablin*. *Plant Cell Reports*, 35(1), 203-215. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1897-5>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

- Ncube, B., Van Staden, J., & Tilney, P. M. (2012). Medicinal plant conservation and management: Importance of tissue culture. *South African Journal of Botany*, 82, 62-66.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.07.004>
- Paul, A., et al. (2010). Essential oil composition of patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.). *Industrial Crops and Products*, 32(3), 541-545.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.06.011>
- Ramachandra Rao, S., & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2), 101-153.
[https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00007-1)
- Rao, S. R., & Ravishankar, G. A. (2010). Biotechnological production of phytochemicals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(2), 181-188.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.3808>
- Sari, A. P., Rahman, S. R., Sanawiah, S., & Nurdin, M. R. T. J. P. (2023). Identifikasi dan karakterisasi tumbuhan famili Zingiberaceae di Desa Budong-Budong, Kabupaten Mamuju Tengah. *Jurnal Celebes Biodiversitas*, 6(1), 1-23.
- Singh, G., Maurya, S., De Lampasona, M. P., & Catalan, C. (2002). Chemical constituents, antimicrobial investigations of patchouli oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(6), 466-469.
<https://doi.org/10.1002/ffj.1127>
- Smetanska, I. (2008). Production of secondary metabolites using plant cell cultures. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 111, 187-228.
https://doi.org/10.1007/10_2008_103
- Verpoorte, R., Contin, A., & Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1(1), 13-25.
<https://doi.org/10.1023/A:1015871916833>