

Ringkasan

Kencur (*Kaempferia galanga* Linn.) merupakan sumber bahan kimia bioaktif yang biasa digunakan dalam pengobatan tradisional (jamu), fitofarmaka, penyedap makanan dan minuman, rempah-rempah, dan kosmetik. Kandungan utama *K. galanga* berupa senyawa fenolik terutama golongan fenilpropanoid, seperti flavonoid, etil-sinamat dan etil p-metoksisinamat. Dalam bidang kedokteran, *K. galanga* telah dimanfaatkan sebagai antiradang dan analgesik, pengobatan sakit kepala, sakit gigi, rematik, antitumor dan kanker, obat penenang, antimikroba, dan obat caceng.

Produksi *K. galanga* selama ini memiliki beberapa keterbatasan terutama pada lama waktu produksi (9-12 bulan) dan konsistensi kualitas produk. Sebagaimana diketahui secara luas bahwa kualitas produk dipengaruhi oleh kondisi lingkungan. Selain itu, perubahan iklim yang terjadi saat ini juga mempengaruhi produktivitas tanaman dalam berbagai hal, seperti perubahan suhu, curah hujan, kadar karbon dioksida, dan kejadian cuaca ekstrem. Perubahan-perubahan ini dapat mengubah waktu pertumbuhan dan reproduksi tanaman, mengurangi ketersediaan unsur hara, meningkatkan tekanan hama dan penyakit, serta menyebabkan stres air. Perubahan tersebut juga berdampak pada produktivitas dan kualitas tanaman *K. galanga*.

Kultur *in vitro*, khususnya kultur kalus, merupakan salah satu pendekatan alternatif yang dapat digunakan untuk produksi metabolit sekunder. Kultur kalus telah berhasil diterapkan pada produksi metabolit sekunder (*Vitis vinifera* L, *Eurycoma longifolia* Jack, *Jatropha curcas* L dan masih banyak lagi). Namun, produksi metabolit sekunder telah dipengaruhi oleh diferensiasi jaringan pertumbuhan, dan perkembangan tanaman. Selain itu, produksi metabolit sekunder juga dipengaruhi oleh medium, yaitu kandungan sukrosa, jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh, serta kondisi lingkungan yaitu pH, intensitas cahaya, serta fotoperiode. Memang, elisitor telah terbukti sebagai faktor utama untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder.

Salah satu elisitor yang dapat digunakan dalam kultur *in vitro* adalah radiasi UV-B. Penelitian perlakuan radiasi UV-B pada kultur kalus *C. Sinensis* menginduksi peningkatan kadar fenolik, peningkatan produksi trans-resveratrol pada kalus *V. vinifera* sebesar 2,5 kali lipat, dan peningkatan konsentrasi camptothecin pada camptotheca sebesar 11 kali lipat. budaya sel. Perlakuan radiasi UV menghasilkan alkaloid kanton-6-one 3,5 kali lebih banyak dan pirolidin 1,5 kali lebih banyak dibandingkan tanpa perlakuan radiasi UV pada kultur kalus *E. longifolia*. Perlakuan yang sama diterapkan pada kultur suspensi sel *C. roseus*, planlet *Deschampsia Antarctica*, dan pada kalus *J. curcas*. Upaya lain yang dapat dilakukan untuk mengatur produksi metabolit sekunder pada kultur kalus adalah dengan memodifikasi sumber karbon pada media, salah satunya dengan konsentrasi sukrosa. Sukrosa telah dikenal sebagai senyawa yang dapat dimanfaatkan tanaman sebagai sumber karbon yang dapat mempengaruhi metabolisme, perkembangan, pertumbuhan, transduksi sinyal, dan ekspresi gen. Sukrosa terbukti mempengaruhi pertumbuhan dan produksi metabolit sekunder *A. absinthium*, *W. somnifera*, *G. procumbens* Merr, *H. perforatum*, *P. vulgaris* L, dan lainnya yang ditanam secara *in vitro*. Pada kencur pendekatan kultur kalus untuk produksi metabolit sekunder

belum pernah dilaporkan, begitu pula penelitian mengenai penggunaan elisitasi pada kultur kalus kencur belum pernah dilaporkan.

Penelitian ini merupakan rangkaian penelitian seri melalui empat tahap penelitian. Dilaksanakan dari bulan November 2018 sampai dengan Agustus 2022, bertempat di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Laboratorium Kimia Analisis Terpadu, Universitas Muhammadiyah Purwokerto dan Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto. Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial. Versi 6.400 dari program perangkat lunak Costat digunakan untuk memproses data. Dengan menggunakan uji Anova, data yang berdistribusi normal dan homogen diperiksa. Analisis Kruskal-Wallis digunakan untuk analisis data jika data tidak sesuai dengan kondisi. Uji Jarak Berganda Duncan (DMRT) dan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) digunakan pada pengujian selanjutnya, dengan tingkat kepercayaan 95%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kalus berhasil diinduksi dari eksplan mata tunas *K. galanga* dengan perlakuan kombinasi 2,4-D dan BAP, dimana perlakuan 1 mg.L^{-1} 2,4-D memberikan hasil terbaik untuk parameter waktu induksi kalus, persentase kalus tumbuh dan bobot segar kalus masing-masing sebesar $29,78 \pm 2,03$ hari, $74,08 \pm 22,21$ % dan $0,20 \pm 0,07$ g dengan tekstur kalus yang terbentuk remah dan berwarna putih kecoklatan. Konsentrasi zat pengatur tumbuh auksin dan fotoperiode berpengaruh terhadap pertumbuhan dan produksi senyawa fenol pada kalus *K. galanga*. Perlakuan fotoperiode 16/8 jam (terang/gelap) yang dikombinasikan dengan perlakuan auksin 2,4-D 1 mg.L^{-1} menghasilkan bobot segar maksimum $5,52 \pm 0,29$ g, tidak berbeda nyata dengan kombinasi penyinaran 16/8 jam (terang/gelap) dan perlakuan NAA $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Bobot kering kalus terbaik yaitu $0,26 \pm 0,05$ g diperoleh setelah perlakuan penyinaran 16/8 jam (terang/gelap). Perlakuan 2,4-D menghasilkan kalus yang remah berwarna putih hingga putih kecoklatan, sedangkan auksin NAA menghasilkan kalus dengan warna kehijauan dan kompak (terdiferensiasi). Kajian fitokimia ekstrak kalus *K. galanga* menunjukkan akumulasi fenol dan flavonoid tertinggi pada fotoperiode 16/8 jam (terang/gelap), masing-masing $0,483 \pm 0,065$ mg GAE.g⁻¹ BK kalus dan $0,108 \pm 0,07$ mg QE.g⁻¹ BK kalus. Senyawa etil para-metoksisinamat (EPMS) terbentuk di hampir pada semua perlakuan. Kadar EPMS tertinggi terbentuk pada perlakuan NAA 2 mg.L^{-1} dengan fotoperiode 12/12 jam (terang/gelap) sebesar $0,37 \text{ mg.g}^{-1}$ BK kalus. Profil metabolit sekunder pada ekstrak etanol kalus didominasi senyawa aldehida, hidrokarbon jenuh, asam lemak, dan turunannya.

Perlakuan jenis auksin dan radiasi UV-B berpengaruh terhadap karakteristik pertumbuhan, morfologi, fitokimia dan fisiologi kalus. Perlakuan auksin dan radiasi UV-B berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus diantaranya bobot segar, bobot kering kalus, dan morfologi kalus yang terbentuk. NAA tanpa radiasi UV-B memberikan bobot kalus segar dan bobot kalus kering terbaik yaitu masing-masing sebesar $5,58 \pm 0,36$ g dan $0,38 \pm 0,01$ g. Terhadap karakteristik fitokimia, perlakuan auksin berpengaruh nyata terhadap parameter total fenol, total flavonoid, aktivitas antioksidan dan aktivitas enzim PAL. Perlakuan auksin NAA memberikan nilai parameter produksi metabolit sekunder lebih baik dibandingkan perlakuan 2,4-D dengan rerata nilai total fenol sebesar $0,96 \pm 0,18$ mgGAE.g⁻¹ BK kalus, aktivitas antioksidan sebesar $61,28 \pm 3,79$ % dan aktivitas enzim PAL sebesar $1,57 \pm 1,02$ unit.mg⁻¹ protein. Radiasi UV-B tidak berpengaruh nyata terhadap produksi senyawa metabolit sekunder kalus kencur, kecuali pada kadar total flavonoid.

Senyawa EPMS terbentuk pada semua perlakuan auksin NAA yang dikombinasi dengan radiasi UV-B dimana kadar EPMS tertinggi terdapat pada perlakuan NAA dengan radiasi UV-B $140 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ selama 4 jam yaitu sebesar $1,1 \pm 0,59 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ BK kalus.

Perlakuan jenis auksin, radiasi UV-B dan konsentrasi sukrosa berpengaruh terhadap karakteristik pertumbuhan, morfologi, fitokimia dan fisiologi kalus kalus kencur. Perlakuan sukrosa $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ memberikan bobot kalus tertinggi, tidak berbeda nyata dengan perlakuan sukrosa $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ yaitu masing-masing sebesar $7,39 \pm 1,67$ dan $7,36 \pm 0,5$ g, sampai pada tingkat optimum konsentrasi sukrosa ($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) peningkatan konsentrasi sukrosa menyebabkan penurunan bobot kalus segar. Perlakuan tanpa sukrosa pada kalus kompak menunjukkan hasil tertinggi untuk parameter TPC, TFC, kadar EPMS dan aktivitas antioksidan masing-masing sebesar $1,52 \pm 0,16 \text{ mg GAE}\cdot\text{g}^{-1}$ bobot kering kalus; $2,12 \pm 0,77 \text{ mg QE}\cdot\text{g}^{-1}$ bobot kering kalus; $0,57 \pm 0,23 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ bobot kering kalus dan $76,62 \pm 4,05\%$. Hasil tersebut lebih tinggi dibandingkan pada semua parameter pertumbuhan dan fitokimia yang terbentuk pada kalus remah. Radiasi UV-B menyebabkan peningkatan kandungan fenol total dan kandungan flavonoid total, namun tidak berpengaruh nyata pada kapasitas antioksidan dan pembentukan EPMS pada kalus *K. galanga*. Perlakuan radiasi UV-B mampu meningkatkan nilai TPC dan TFC kalus masing-masing sebesar 1,13 dan 1,7 kali lipat dibandingkan tanpa radiasi UV-B. Perlakuan radiasi UV-B dan konsentrasi sukrosa tidak berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim PAL.

Diambil kesimpulan bahwa kalus dapat diinduksi dari eksplan mata tunas kencur dengan perlakuan 2,4-D dan BAP, dimana kalus yang dihasilkan memiliki tekstur remah dengan warna putih kecoklatan. Pengkondisian faktor lingkungan khususnya lingkungan cahaya (fotoperiode) dan kesesuaian zat pengatur tumbuh auksin yang digunakan menunjukkan bahwa fotoperiode berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus dan morfologi kalus yang terbentuk. Fotoperiod 16/8 jam terang dan gelap secara umum menghasilkan pertumbuhan kalus yang cukup baik dan kalus yang dihasilkan mampu memproduksi senyawa fenol. Karakteristik morfologi kalus dengan penggunaan auksin 2,4-D menghasilkan kalus yang bertekstur remah dan berwarna putih kecoklatan, sedangkan perlakuan auksin NAA menghasilkan kalus bertekstur kompak dan berwarna hijau. Perlakuan elisitasi radiasi UV-B mampu meningkatkan kapasitas produksi senyawa fenol dalam kalus, dan pemiskinan sukrosa (tanpa sukrosa) dalam media menginduksi produksi senyawa fenol lebih tinggi dibandingkan jika kalus ditumbuhkan dalam kondisi konsentrasi sukrosa diatas konsentrasi optimumnya ($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Kalus bertekstur kompak memiliki kapasitas produksi fenol lebih tinggi dibandingkan kalus remah pada semua perlakuan elisitasi radiasi UV-B maupun sukrosa.

Kata kunci: Auksin, Kultur kalus *K. galanga* L, Pertumbuhan kalus, Radiasi UV-B, Sukrosa, Senyawa fenol.

Summary

Aromatic ginger (*Kaempferia galanga* Linn.) is a source of bioactive chemicals commonly used in traditional medicine (herbal medicine), phytopharmaca, food and beverage flavoring, spices, and cosmetics. The main content of *K. galanga* as phenolic compounds as especially phenylpropanoid group, such as flavonoid, ethyl-cinnamic and ethyl p-methoxycinnamate. In medicine, *K. galanga* has been use as an anti-inflammatory and analgesic, treatment of headache, toothache, rheumatism, anti-tumor and cancer, sedative activity, anti-microbial, and anthelmintic.

Up to now, the production of *K. galanga* have several limitation mainly on the length periode of production (9-12 monts) and in consistention of the product quality. As has been widely known that the quality of product is affected by environmental conditions. In addition, the current climate change also affects plant productivity in various ways, such as changes in temperature, precipitation, carbon dioxide levels, and extreme weather events. These changes can alter plant growth and reproduction timing, reduce nutrient availability, increase pest and disease pressure, and cause water stress. These changes also impact the productivity and quality of *K. galanga* plants.

In vitro culture, especially callus culture, is an alternative approach that can be used for secondary metabolites production. Callus culture has been successfully applied on secondary methabolite production of (*Vitis vinifera* L, *Eurycoma longifolia* Jack, *Jatropha curcas* L and many more). However, the production of secondary metabolite has been affected by growth tissue differentiation, and plant development. Moreover, the secondary metabolite production has been also affected by medium, *i.e.* sucrose content, type and concentration of plant growth regulators, and environment condition *i.e.* pH, light intencity, and photoperiode. Indeed, elicitor has been proved as main factors to increas the production of secondary metabolite.

One of the elicitors that can be used in *in vitro* culture is UV-B radiation. Research on the treatment of UV-B radiation in callus culture of *C. Sinensis*, induces increased levels of phenolics, a 2.5 times increase in trans-resveratrol production in *V. vinifera* callus, and an 11 times rise in the concentration of camptothecin in camptotheca cell culture. UV radiation treatment produced 3.5 times more canthin-6-one alkaloids and 1.5 times more pyrrolidine than without UV radiation treatment in *E. longifolia* callus culture. The same treatment was applied to the cell suspension culture of *C. roseus*, *Deschampsia Antarctica* plantlets, and to the callus of *J. curcas*. Another effort that can be made to regulate the production of secondary metabolites in callus culture is by modifying the carbon source in the media, one with sucrose concentration. Sucrose has been known as a compound that plants can utilize as a carbon source that can affect metabolism, development, growth, signal transduction, and gene expression. It is proven that sucrose affects the growth and production of secondary metabolites of *A. absinthium*, *W. somnifera*, *G. procumbens* Merr, *H. perforatum*, *P. vulgaris* L, and others grown *in vitro*. In aromatic ginger a callus culture approach for the production of secondary metabolites has never been reported, as well as research on the use of elicitation in kencur callus culture has never been reported.

This research is a series of research series through four stages of research. The research was conducted from November 2018 to August 2022, taking place at the Plant Tissue Culture Laboratory, Integrated Analysis Chemistry Laboratory,

Universitas Muhammadiyah Purwokerto, and the Research Laboratory of the Faculty of Medicine, Jenderal Soedirman University, Purwokerto. The research method used was an experimental method using a completely randomized design (CRD) factorial. Version 6.400 of the Costat software program was used to process the data. Using the Anova test, normally distributed and homogeneous data is examined. Kruskal-Wallis analysis is used if the data does not match the conditions. Duncan's Multiple Range Test (DMRT) and Least Significant Difference Test (LSD) were used in the next test, with a confidence level of 95%.

Research results show that callus was successfully induced from *K. galanga* bud explants with the combined treatment of 2,4-D and BAP, where 1 mg.L⁻¹ 2,4-D treatment gave the best results for parameters of callus induction time, percentage of growing callus, and callus fresh weight respectively 29.78 ± 2.03 days, 74.08±22.21 % and 0.20±0.07 g with a callus texture that formed friable and was brownish white. The concentration of growth regulators auxin and photoperiod affect the growth and production of phenolic compounds in *K. galanga* callus. Photoperiod treatment of 16/8 hours (light/dark) combined with auxin 2,4-D 1 mg.L⁻¹ treatment resulted in a maximum fresh weight of 5.52±0.29 g, not significantly different from the combination of 16/8 hours of irradiation (light /dark) and NAA treatment 1.5 mg.L⁻¹. The best callus dry weight of 0.26±0.05 g was obtained after 16/8 hours of irradiation treatment (light/dark). The 2,4-D treatment produced callus with creamy and friable, while the NAA auxin produced a greenish and compact (differentiated) callus. The phytochemical study of *K. galanga* callus extract showed the highest accumulation of phenols and flavonoids in the 16/8 hour photoperiod (light/dark) , respectively 0.483±0.065 mg GAE.g⁻¹ DW callus and 0.108±0.07 mg QE.g⁻¹ DW callus. Ethyl para-methoxycinnamate (EPMC) was formed in almost all treatments. The highest EPMS levels were included in the 2 mg.L⁻¹ NAA treatment with a 12/12 hour photoperiod (light/dark) of 0.37 mg.g⁻¹ DW callus. The secondary metabolites profile in the callus ethanol extract is dominated by aldehydes, saturated hydrocarbons, fatty acids, and their derivatives.

The type of auxin and UV-B radiation treatment affected the callus's growth characteristics, morphology, phytochemistry, and physiology. The auxin treatment and UV-B radiation affected callus growth, including fresh weight, dry weight of the callus, and formed callus morphology. NAA without UV-B radiation gave the best fresh and dry callus weights of 5.58 ± 0.36 g and 0.38 ± 0.01 g, respectively. Regarding the phytochemical characteristics, the auxin treatment significantly affected the parameters of total phenols, total flavonoids, antioxidant activity, and PAL enzyme activity. The NAA auxin treatment provided better secondary metabolite production parameter values than the 2,4-D treatment with an average total phenol value of 0.96 ± 0.18 mgGAE.g⁻¹ DW callus, antioxidant activity of 61.283.79% and antioxidant activity of 61.28±3.79% and PAL enzymes of 1.57±1.02 units.mg⁻¹ proteins. UV-B radiation did not significantly affect the production of secondary metabolites of callus kencur, except for the total levels of flavonoids. The EPMC compound was formed in all NAA auxin treatments combined with UV-B radiation, where the highest EPMC levels were found in the NAA treatment with 140 μW.cm⁻² UV-B radiation for 4 hours, which was 1.1±0.59 mg.g⁻¹ DW callus.

Treatment of auxin type, UV-B radiation, and sucrose concentration affected aromatic ginger callus's growth characteristics, morphology, phytochemistry, and physiology. The 30 g.L⁻¹ sucrose treatment gave the highest callus weight, not

significantly different from the 15 g.L⁻¹ sucrose treatment, namely 7.39±1.67 and 7.36 ± 0.5 g respectively, to at the optimum level of sucrose concentration (30 g.L⁻¹) fresh callus weight decreased. Treatment without sucrose on compact callus showed the highest results for the parameters TPC, TFC, EPMC levels, and antioxidant activity each of 1.52±0.16 mg GAE.g⁻¹ callus dry weight; 2.12±.77 mg QE.g⁻¹ callus dry weight; 0,57±0,23 mg. g⁻¹ dry weight of callus and 76.62±4.05 %. These results exceeded all growth parameters and phytochemicals formed friable callus. UV-B radiation caused an increase in total phenol content and total flavonoid content but had no significant effect on antioxidant capacity and EPMC formation in *K. galanga* callus. UV-B radiation treatment increased callus TPC and TFC values respectively by 1.13 and 1.7 times compared to without UV-B radiation. UV-B radiation treatment and sucrose concentration did not significantly affect PAL enzyme activity.

It was concluded that callus could be induced from bud *K. galanga* explants with 2,4-D and BAP treatment, where the callus produced had a friable texture with a brownish-white color. Conditioning of environmental factors, especially the light environment (photoperiod) and the auxin, showed that the photoperiod affected callus growth and callus morphology formed. A photoperiod of 16/8 hours of light and dark generally produced good callus growth, and the resulting callus could produce phenolic compounds. The morphological characteristics of the callus using 2,4-D auxin produced a friable textured callus and brownish white, while the NAA auxin treatment produced a compact textured callus green in color. UV-B radiation elicitation treatment was able to increase the production capacity of phenolic compounds in the callus, and depletion of sucrose (without sucrose) in the media-induced higher production of phenolic compounds compared to when the callus was grown under conditions of sucrose concentration above its optimum concentration (30 g.L⁻¹). Compact textured callus had a higher phenol production capacity than friable callus in all UV-B and sucrose elicitation treatments.

Keywords: Auxin, Callus growth, Callus culture of *K. galanga* L, Phenol compounds, Sucrose, UV-B radiation.