

Anjarsari, I.R.D · E. Suminar · Murgayanti

Studi pendahuluan regenerasi eksplan teh sebagai upaya percepatan penyediaan bibit unggul secara *in vitro*

Sari. Pembiakan generatif tanaman teh yang dilakukan dengan biji, sementara secara vegetatif dengan setek tunas yang mempunyai kelemahan, antara lain jumlah bibit yang dihasilkan terbatas, perlu waktu lama untuk menyeleksi pohon induk, dan bibit yang dihasilkan kurang optimal dalam penyerapan air dan unsur hara karena perakarannya dangkal sehingga kurang toleran terhadap kekeringan. Kultur jaringan menjadi salah satu alternatif dalam perbanyakan teh memperoleh klon teh unggul, seperti klon Seri Gambung 1-11, dalam jumlah banyak dan sifatnya yang seragam. Penelitian pendahuluan ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Departemen Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian UNPAD, mulai bulan Juni hingga Desember 2021. Penelitian terdiri dari dua tahap, yaitu (i) metode deskriptif untuk menginduksi eksplan organ teh (pucuk + ruas batang serta daun), dan (ii) metode eksperimen dengan menguji eksplan yang ditumbuhkan pada berbagai media. Metode percobaan yang digunakan untuk penelitian ke-2 adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan 6 kombinasi perlakuan Benzyl Amino Purine (BAP) (0 dan 0,5 ppm) dan 2,4-D (0,05; 0,1; dan 0,2 ppm). Hasil pengamatan pendahuluan menunjukkan masih banyak eksplan yang mengalami kematian, namun beberapa eksplan potongan daun menunjukkan respon yang baik dengan mampu membentuk kalus berwarna hijau. Kombinasi 0,5 ppm BAP + 0,05 ppm 2,4-D memberikan pengaruh lebih baik terhadap bobot kalus, sedangkan kombinasi 0,5 ppm BAP + 0,2 ppm 2,4D memberikan pengaruh baik terhadap diameter kalus.

Kata kunci : Eksplan teh · *In vitro* · Klon unggul

Preliminary study of tea explant regeneration as an effort to accelerate the supply of superior seeds by *in vitro*

Abstract. Generative propagation of tea plants is done by seed, while the vegetative method is by shoot cuttings which have weaknesses, including the limited number of seedlings produced, it takes a long time to select the mother tree, and the resulting seedlings are not optimal in absorbing water and nutrients because their roots are shallow making it less tolerant of drought. Tissue culture is an alternative in tea propagation to obtain superior tea clones, such as the Gambung Series 1-11 clones, in large quantities and with uniform characteristics. This preliminary research was carried out at the Tissue Culture Laboratory of the Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, UNPAD, from June to December 2021. The research consisted of two stages, namely (i) a descriptive method to induce tea organ explants (shoots + stem segments and leaves), and (ii) an experimental method by testing explants grown on various media. The experimental method used for the second study was a completely randomized design (CRD) with 6 treatment combinations of Benzyl Amino Purine (BAP) (0 and 0.5 ppm) and 2.4 D (0.05; 0.1; and 0.2 ppm). Preliminary observations showed that there were still many death explants observed, however, some explants in form of cut leaves showed a good response by being able to form green callus. The combination of 0.5 ppm BAP + 0.05 ppm 2.4 D had a better effect on callus weight, while the combination 0.5 ppm BAP + 0.2 ppm 2.4D had a good effect on callus diameter.

Keywords: *In vitro* · Tea explants · Superior clones

Diterima : 15 November 2022, Disetujui : 21 Desember 2022, Dipublikasikan : 21 Desember 2022

DOI: <http://dx.doi.org/10.24198/kultivasi.v21i3.36607>

Anjarsari, I.R.D. · E. Suminar · Murgayanti
Jurusan Budidaya Pertanian Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran Jl. Raya Bandung
Sumedang Km. 21 Jatinangor, Sumedang 45363
Korespondensi: intan.ratna@unpad.ac.id

Pendahuluan

Teh (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) merupakan salah satu komoditas yang memiliki nilai ekonomis dan strategis dalam pembangunan agribisnis perkebunan di Indonesia, karena merupakan sumber devisa negara dan pendapatan rakyat serta penyedia lapangan kerja bagi masyarakat. Namun selama kurun waktu 10 tahun terakhir (2009-2018) telah terjadi laju penurunan produksi daun kering per tahunnya sebesar 1,15%, yang kemungkinan disebabkan diantaranya karena kondisi pertanaman teh di Indonesia (Zikria, 2017). Begitupun dengan produktivitas perkebunan teh rakyat hanya sebesar 1,4 ton/ha, lebih kecil jika dibandingkan dengan perkebunan milik negara (1,8 ton/ha) maupun swasta (1,52 ton/ha), sehingga produktivitas teh secara nasional (1,59 ton/ha) pun masih dibawah potensi produksinya (diatas 3 ton/ha). Oleh karena itu, salah satu upaya Direktorat Jenderal Perkebunan untuk meningkatkan produksi dan produktivitas tanaman perkebunan diawali dengan penggunaan benih unggul.

Penggunaan bahan tanaman teh monoklonal dalam satu kebun memiliki risiko besar jika terjadi ledakan hama atau penyakit dan perubahan lingkungan yang sulit diprediksikan. Untuk mengurangi kerugian yang akan muncul, diperlukan klon-klon teh *sinensis* baru yang potensial agar dapat menambah keragaman genetik sehingga pertanaman memiliki penyangga individu (*individual buffering*) dan penyangga populasi (*population buffering*) (Sriyadi, 2012). Secara konvensional, tanaman teh dapat diperbanyak secara generatif maupun vegetatif. Pembiakan generatif dilakukan dengan biji, namun pembiakan dengan cara ini sering menghasilkan tanaman yang berbeda dengan induknya. Pembiakan secara vegetatif dapat dilakukan dengan setek tunas. Namun, cara perbanyakan ini juga mempunyai kelemahan, antara lain jumlah bibit yang dihasilkan terbatas, perlu waktu lama untuk menyeleksi pohon induk, dan bibit yang dihasilkan kurang toleran terhadap kekeringan karena perakarannya dangkal sehingga penyerapan air dan unsur hara kurang optimal. Metode kultur in vitro, khususnya teknik biak sel, berpotensi untuk mengatasi masalah tersebut.

Budidaya jaringan teh menjadi salah satu alternatif dalam perbanyakan teh yang dapat

digunakan sebagai pijakan untuk memperoleh klon teh unggul dalam jumlah banyak dan sifatnya yang seragam. Dengan berkembangnya bioteknologi tanaman, khususnya teknologi kultur in vitro, teknik perbanyakan tanaman makin luas dan dapat dilakukan dalam waktu lebih singkat. Teknik kultur in vitro merupakan dasar pengetahuan yang mendorong berkembangnya teknik kultur sel, jaringan dan organ tanaman secara in vitro dalam kondisi aseptik dan steril dalam laboratorium. Teknik ini merupakan terobosan dalam program penyediaan bibit tanaman dapat ditingkatkan baik kuantitas maupun kualitasnya (Sriyadi, 2015).

Pada perbanyakan tanaman secara in vitro, eksplan kotiledon membutuhkan waktu yang lama hingga tanaman menghasilkan biji yang akan digunakan sebagai eksplan dalam perbanyakan tanaman. Induksi kalus juga membutuhkan waktu sekitar enam bulan sejak penanaman kotiledon hingga pembentukan kalus. Penelitian tentang perbanyakan tanaman teh melalui kultur jaringan menggunakan eksplan bagian tanaman muda pada tanaman teh yang ditanam di lapangan dapat dilakukan untuk mendapatkan metode perbanyakan tanaman yang lebih cepat (Widhianata dan Taryono, 2019). Keberhasilan budidaya jaringan teh dipengaruhi oleh faktor endogen dan eksogen. Pemilihan sumber dan jenis eksplan serta media tanam dan ZPT yang tepat, dan juga penanganan terhadap kontaminan, diharapkan dapat meningkatkan keberhasilan dalam memperbanyak teh melalui budidaya jaringan (Eskundari, 2020).

Dasar-dasar pembentukan kultur in vitro adalah jenis, asal, dan ketersediaan eksplan sepanjang tahun. Umumnya, ujung pucuk dan segmen nodal dengan tunas ketiak dorman baik yang berasal dari remaja atau dewasa dari pertumbuhan tahun ini biasanya digunakan sebagai eksplan untuk tanaman teh (Singh *et al.*, 2019). Komposisi medium yang paling sesuai harus dioptimalkan untuk mendapatkan produk yang lebih tinggi serta laju pertumbuhan yang lebih tinggi. Mikropropagasi umumnya melibatkan empat tahap berbeda: inisiasi kultur, perbanyakan tunas, perakaran tunas tumbuh in vitro, dan aklimatisasi (Widhianata dan Taryono, 2019).

Klon unggul teh seri Gambung (GMB1 - 11) adalah klon unggul teh dari varietas Assamica yang memiliki karakter diantaranya: daun atau

pucuk besar dan lebar, permukaan daun bergelombang sangat jelas dan terdapat lapisan lilin, tulang daun antara 8-13 pasang, percabangan tanaman baik, persentase pucuk peko tinggi, bentuk batang silinder, warna batang coklat keabu-abuan, warna daun antara hijau agak tua, hijau terang, hijau kekuningan, hijau agak muda, hijau sedikit gelap, dan perakaran baik sekali. Klon ini memiliki potensi produksi tinggi 4.021 kg – 5800 kg teh kering/ ha/tahun, kandungan antioksidan (katekin) sangat tinggi 13,9% - 17,1% dari berat kering, tahan OPT utama pada tanaman teh terutama penyakit cacar daun teh (blister blight) (Sriyadi, 2012). Klon-klon ini berpotensi dikembangkan melalui kultur in vitro berdasarkan sifat-sifat unggulnya.

Bahan dan Metode

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Departemen Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian UNPAD, mulai bulan Januari hingga Juni 2022. Bahan yang digunakan adalah eksplan teh berasal dari pucuk teh klon GMB 7, bahan sterilisasi berupa fungisida, bakterisida, NaHOCl 2%, HgCl 0.01%. Alat yang digunakan antara lain *laminar air flow cabinet*, *petridish*, pinset, *scalpel*, *blade*.

Penelitian tahap ke-1 merupakan percobaan awal melalui metode deskriptif untuk menginduksi eksplan organ teh dengan menggunakan media MS + 1 mg L⁻¹ BAP + 0.05 mg L⁻¹ yang biasa digunakan untuk induksi kalus pada eksplan anggrek (Suminar *et al.* 2010). Percobaan yang dilakukan terdiri dari 2 set, yaitu: set I menanam eksplan pucuk dan ruas batang, sedangkan percobaan set II menggunakan eksplan potongan daun. Kultur menggunakan 25 botol, masing-masing botol ditanam 2 eksplan sehingga eksplan potongan daun yang digunakan berjumlah 50 potongan. Proses penanaman eksplan pucuk dan ruas batang melalui proses tahapan sterilisasi sebagai berikut: merendam dengan larutan deterjen selama 5 menit, fungisida dan bakterisida selama 15 menit, perendaman NaHOCl 2% selama 20 menit, perendaman dengan NaHOCl 1% selama 10 menit, selanjutnya diberikan larutan HgCl 0,01% dengan mencelupkan eksplan ke dalam larutan tersebut. Eksplan

ditanam dalam media MS + 1 mg L⁻¹ BAP + 0,05 mg L⁻¹ 2,4-D. Pengamatan penelitian tahap ke-1 dilakukan secara visual terhadap pertumbuhan eksplan pucuk dan ruas batang tanaman teh, pertumbuhan eksplan potongan daun, dan pertumbuhan kalus.

Penelitian tahap ke-2 adalah metode eksperimen dengan menguji eksplan yang ditumbuhkan pada berbagai media untuk mendapatkan media yang tepat guna menunjang eksplan daun tumbuh menjadi kalus. Eksplan daun disiapkan melalui tahapan sterilisasi sebagai berikut: merendam dengan larutan deterjen selama 5 menit, fungisida dan bakterisida selama 15 menit, perendaman NaHOCl 2% selama 20 menit, perendaman dengan NaHOCl 1% selama 10 menit, selanjutnya diberikan larutan HgCl 0,01% dengan mencelupkan eksplan ke dalam larutan tersebut. Eksplan daun tanaman teh ditanam dalam media MS ditambah ZPT BAP dan 2,4-D sesuai perlakuan.

Metode percobaan yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap (RAL) dengan 6 kombinasi perlakuan. Setiap perlakuan diulang 4 kali sehingga terdapat 24 satuan percobaan.

Adapun perlakuan disusun sebagai berikut:

- A : 0 ppm BAP + 0,05 ppm 2,4-D
- B : 0 ppm BAP + 0,1 ppm 2,4-D
- C : 0 ppm BAP + 0,2 ppm 2,4-D
- D : 0,5 ppm BAP + 0,05 ppm 2,4-D
- E : 0,5 ppm BAP + 0,1 ppm 2,4-D
- F : 0,5 ppm BAP + 0,2 ppm 2,4-D

Pengamatan penelitian tahap ke-2 dilakukan terhadap bobot kalus, diameter kalus, dan warna kalus. Bobot kalus (g) dihitung dengan cara destruksi pada akhir percobaan, yaitu 12 minggu setelah tanam (MST). Destruksi dilakukan dengan hati-hati dan kalus dibersihkan dari sisa media yang menempel untuk selanjutnya ditimbang menggunakan timbangan analitik. Diameter kalus (mm) diamati pada akhir pengamatan, yaitu pada 12 MST. Diameter kalus dihitung dengan mengukur diameter terpanjang kalus menggunakan milimeter blok. Pengamatan warna dan tekstur kalus pada percobaan ini dilakukan pada 4 MST. Warna kalus diamati dengan menggunakan *color chart* dari *The Royal Horticultural Society*.

Hasil dan Pembahasan

Pengujian Eksplan Organ Teh

Pertumbuhan Eksplan Pucuk dan Ruas Batang Tanaman Teh. Hasil pengamatan pada 4 minggu setelah tanam menunjukkan beberapa eksplan mengalami perubahan warna menjadi kecoklatan, hal ini diduga adanya senyawa fenol yang menyebabkan kematian eksplan, media kultur berupa MS, Sitokinin BAP dan 2,4-D.

Adanya senyawa fenol yang keluar dari potongan jaringan menyebabkan pencoklatan dan eksplan gagal beregenerasi dan pada umumnya muncul lalu terakumulasi saat ada pelukaan pada eksplan yang diinisiasi oleh aktivitas enzim polyphenol oksidase. Menurut Ru *et al.* (2013), browning dipicu oleh ketidakseimbangan metabolisme dari *Reactive Oxygen Species*, yang menyebabkan enzim peroksidase bekerja pada membran lipid sehingga integritas dari membran sel hilang lalu mendorong akumulasi yang berlebihan dari senyawa fenolik. Adanya perubahan permeabilitas dari membran sel menyebabkan pelepasan enzim dan substrat pada sitosol sehingga menginisiasi terjadinya pigmentasi atau pencoklatan (Mellidou *et al.*, 2014) Solusi untuk meminimalisasi *browning* pada kalus adalah dengan menambahkan senyawa antifenol berupa polivinyl pirolidon ke dalam media perlakuan untuk penanaman eksplan organ berupa pucuk dan ruas batang serta harus segera dilakukan subkultur agar tidak terjadi pencoklatan yang dapat menyebabkan kematian.

Pertumbuhan Eksplan Potongan Daun.

Hasil pengamatan menunjukkan masih banyak potongan daun yang mengalami kematian. Hal ini dapat dilihat dengan terjadinya perubahan warna eksplan menjadi coklat dan menyebabkan kematian eksplan. Namun beberapa eksplan potongan daun menunjukkan respon yang baik mampu membentuk kalus berwarna hijau pada 3 MST, diduga bersifat embrionik memiliki kemampuan untuk tumbuh (Gambar 1).

Menurut Nurwahyuni *et al.* (2020), eksplan daun yang lebih produktif dalam induksi kalus dan multiplikasi tunas terbentuk karena daun memiliki tulang daun. Pada kondisi demikian, eksplan yang berasal dari potongan daun memiliki luka potongan pada berkas

pengangkut (xylem dan floem) cukup banyak. Dengan demikian kalus akan terus terbentuk sehingga luka yang ada tertutup.



Gambar 1. Pertumbuhan eksplan potongan daun dalam media MS + 0.5 mg L⁻¹ BAP + 0.05 mg L⁻¹ 2,4-D

Salah satu media tanam yang paling banyak digunakan untuk budidaya jaringan adalah media MS. Media ini juga dilaporkan cocok untuk budidaya jaringan teh. Media MS cocok untuk budidaya jaringan melalui embriogenesis somatik teh klon Yabukita dan secara spesifik menggunakan pengenceran ½ terhadap media tanam tersebut untuk semua tahap perkembangan eksplan (Tahardi *et al.*, 2016)

Beberapa ZPT yang digunakan untuk budidaya jaringan meliputi auksin, sitokinin, dan asam giberelin (GA3). Ardiyani *et al.* (2020) melaporkan keberhasilan dalam induksi embriogenesis somatik menggunakan sitokinin berupa Benzyl Amino Purine (BAP). Konsentrasi BAP sebesar 2 mg.L⁻¹ memberikan hasil tertinggi dalam induksi embriogenesis somatik yaitu sekitar 57 %, disusul dengan konsentrasi sebesar 1 mg.L⁻¹ dan tanpa penambahan BAP, masing-masing memberikan hasil sebesar sekitar 40 dan 30 %. Eskundari (2020) melaporkan bahwa penggunaan BAP dengan konsentrasi sebesar 2 mg.L⁻¹ berhasil menginduksi organogenesis eksplan *embryonic axis* teh klon TRI2025 dengan persentase 100%, baik menggunakan media MS, ½ MS, 1/3 MS, ¼ MS, ataupun 1/8 MS. Zat Pengatur Tumbuh yang dapat menggantikan hormone auksin salah satunya adalah senyawa 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), merupakan herbisida daun lebar sistemik pasca kemunculan yang digunakan untuk kontrol selektif tanaman berdaun lebar dan sebagai pengatur pertumbuhan tanaman (auxin) yang kuat pada konsentrasi rendah (Truta *et al.*, 2011).

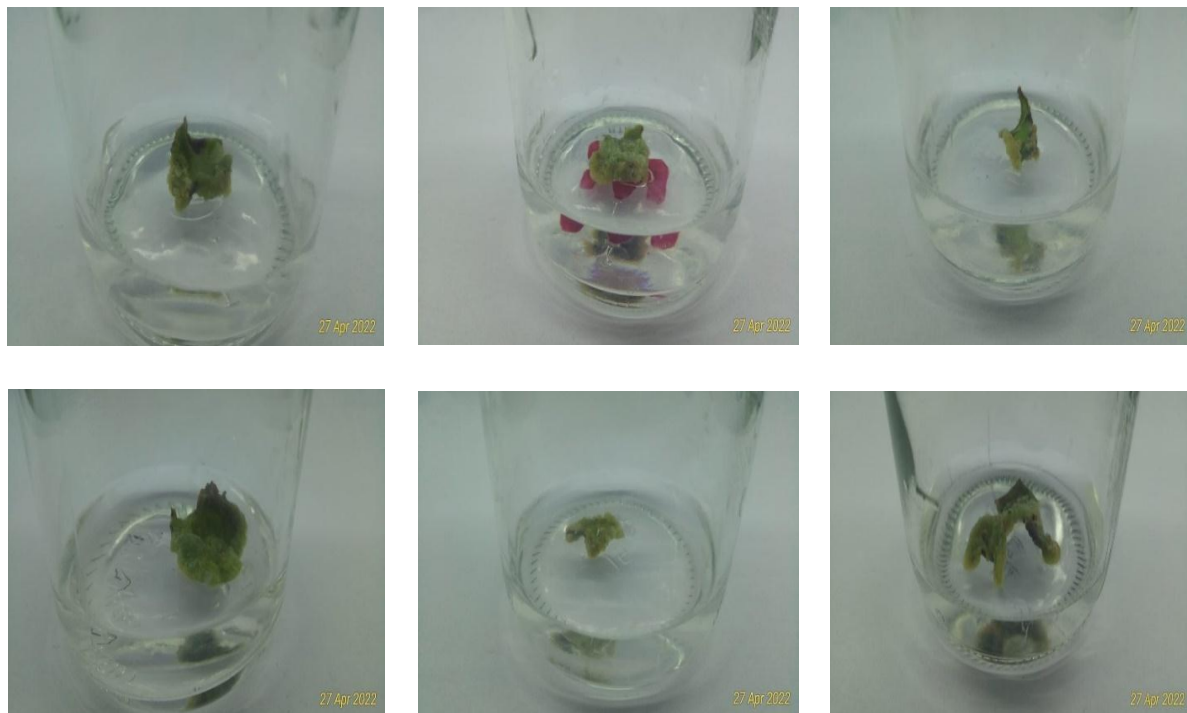
Keseimbangan ZPT endogen dan eksogen, kondisi fisiologis eksplan, dan kemampuan

eksplan menyerap hara dan komposisi media tanam mempengaruhi pertumbuhan eksplan. Dalam perkembangan eksplan ini, sitokinin mendorong pembelahan sel dalam biakan jaringan dengan cara meningkatkan peralihan dalam daur sel, yaitu dari G₂ (masa sesudah replikasi DNA, sel bersiap untuk membelah) ke fase mitosis (pembelahan sel), hal itu dapat terjadi karena sitokinin meningkatkan laju sintesis protein (Takahashi *and* Umeda, 2014).

Pertumbuhan Kalus. Hasil pengamatan pertumbuhan kalus pada minggu ke-1 hingga minggu ke-3 menunjukkan bahwa pertumbuhan kalus cukup baik ditandai dengan warna kalus berwarna hijau umumnya namun ada beberapa yang terkontaminasi (Gambar 2). Kalus merupakan sekumpulan masa sel yang belum terorganisasi (amorphous) yang terjadi dari sel-sel jaringan yang membelah diri secara terus menerus. Kalus dapat terbentuk pada bekas-bekas luka irisan karena sebagian sel pada permukaan irisan tersebut akan mengalami proliferasi (Bano *et al.*, 2022) yang terbentuk secara *in vitro*. Terdapat beberapa tipe-tipe kalus menurut (Budisantoso *et al.*, 2017), yaitu: kalus embriogenik, kalus proliferaatif, dan kalus senesen.

Induksi kalus diawali dengan penebalan eksplan pada bagian potongan dan di daerah yang mengalami pelukaan. Penebalan tersebut

merupakan interaksi antara eksplan dengan media tumbuh, zat pengatur tumbuh, dan lingkungan tumbuh sehingga eksplan bertambah besar (Yelnitis, 2012). Pada perlakuan 2,4-D dengan konsentrasi yang lebih rendah, eksplan hanya memperlihatkan penebalan dan tidak berkembang menjadi kalus walaupun dikulturkan dalam jangka waktu yang lama. Menurut Ogunyale (2014) konsentrasi zat pengatur tumbuh yang berbeda memberikan respon yang berbeda terhadap induksi kalus. Senyawa 2,4-D yang diberikan pada media merupakan jenis auksin yang berperan dalam merangsang perbesaran dan pembelahan sel untuk membentuk kalus. Selanjutnya, Dwipayana *et al.* (2016) menyatakan bahwa munculnya pembengkakan pada eksplan diakibatkan adanya pengaruh pemberian 2,4-D yang menginisiasi pembelahan dan perbanyakan sel akibat penyerapan air, nutrisi dan zat pengatur tumbuh dari media. Perbesaran sel disebabkan oleh meningkatnya daya plastisitas dinding sel dan terbentuknya enzim selulase yang dapat melarutkan selulosa pada dinding sel, sehingga menyebabkan membran dinding sel lebih mudah dilalui oleh oksigen, air, dan garam mineral untuk proses pertumbuhan dan perbesaran sel (Fauziyyah *et al.*, 2012).



Gambar 2. Urutan model kalus teh

Pengujian Media Tumbuh Eksplan

Bobot Kalus. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pemberian BAP dan 2,4-D dapat meningkatkan bobot kalus (Tabel 1). Pemberian 0,5 ppm BAP dengan 0,05 ppm 2,4-D memberikan pengaruh nyata terhadap bobot kalus namun tidak berbeda nyata dengan 0,5 ppm BAP dengan 0,1 ppm 2,4-D serta 0,5 ppm BAP dengan 0,2 ppm 2,4-D. Keberhasilan induksi kalus pada beberapa perlakuan di atas mengindikasikan bahwa kombinasi BAP dan 2,4-D pada konsentrasi tersebut mampu mendorong terjadinya pembelahan dan pembentangan sel sehingga mampu menginduksi kalus. Sesuai dengan Ikeuchi *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa dalam pembentukan kalus, auksin berperan dalam pembentangan sel, sementara sitokinin berperan dalam pembelahan sel. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian BAP dan 2,4-D berpengaruh positif terhadap bobot kalus.

Tabel 1. Pengaruh pemberian BAP dan 2,4-D terhadap bobot kalus

Perlakuan	Bobot Kalus (g)
A 0 ppm BAP + 0,05 ppm 2,4-D	0,25 a
B 0 ppm BAP + 0,1 ppm 2,4-D	0,53 bc
C 0 ppm BAP + 0,2 ppm 2,4-D	0,33 ab
D 0,5 ppm BAP + 0,05 ppm 2,4-D	0,61 c
E 0,5 ppm BAP + 0,1 ppm 2,4-D	0,69 c
F 0,5 ppm BAP + 0,2 ppm 2,4-D	0,79 c

Media yang sesuai untuk pertumbuhan kalus yang umum digunakan untuk tanaman budidaya adalah media MS (Murashige & Skoog) dengan tambahan zat pengatur tumbuh. Zat pengatur tumbuh sintetis perlu ditambahkan karena zat pengatur tumbuh yang terbentuk secara alami seringkali tidak mencukupi pertumbuhan jaringan eksplan (Handayani *et al.*, 2022). Zat pengatur tumbuh yang umum digunakan untuk induksi kalus adalah auksin dan sitokinin.

Pemberian auksin sangat efektif untuk menginduksi pembentukan kalus. Kadar auksin yang lebih tinggi dari sitokinin memacu pembentukan akar, sementara kadar auksin

yang lebih rendah dibanding sitokinin memacu pembentukan tunas, dan bila kadar keduanya yang seimbang akan mengarahkan eksplan pada pembentukan kalus. Kecepatan pembentukan kalus ditentukan oleh daya kerja dari zat pengatur tumbuh yang diberikan dan fitohormon yang terdapat pada eksplan. Indah dan Ermavitalini (2013) menyatakan bahwa penambahan zat pengatur tumbuh eksogen akan mengubah gradien fitohormon dalam sel-sel eksplan. Menurut Purwitasari *et al.* (2012), penambahan 2,4-D dalam media akan mendorong pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan yang kemudian akan memicu pembentukan dan pertumbuhan kalus. Zat pengatur tumbuh 2,4-D merupakan jenis auksin sintetis yang efektif mendorong pembelahan sel-sel yang telah mengalami diferensiasi untuk kembali menjadi terdiferensiasi.

Diameter kalus. Kalus yang tumbuh dengan baik ditandai adanya pertumbuhan diameter, setiap milimeter pertumbuhan kalus menjadikan jumlah sel-sel meningkat sebagai materi genetik yang terus tumbuh dan berkembang, yang selanjutnya memiliki potensi untuk beregenerasi menjadi tunas (Latief *et al.*, 2018). Berdasarkan Tabel 2, terlihat bahwa perlakuan E (0,5 ppm BAP + 0,2 ppm 2,4 D) menunjukkan diameter kalus lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya, walaupun tidak berbeda nyata dengan perlakuan D (0,5 ppm BAP + 0,05 ppm 2,4 D) dan perlakuan E (0,5 ppm BAP + 0,1 ppm 2,4 D). Secara umum, perlakuan 0,5 ppm BAP dan 0,05 - 0,2 ppm 2,4 D berpengaruh terhadap pertumbuhan diameter kalus. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ZPT secara eksogen dapat menunjukkan efek positif pada pertumbuhan vegetatif kalus. Zat pengatur tumbuh 2,4 D memiliki efek fisiologis terhadap pertumbuhan kalus yang secara positif mempengaruhi sel, pembesaran, pembentukan tunas dan inisiasi akar. Pemberian BAP dan 2,4 D dalam konsentrasi yang rendah mampu meningkatkan diameter kalus. Pemberian ZPT eksogen ini menginisiasi produksi hormon lain, dan dalam hubungannya dengan sitokinin (BAP) mengontrol pertumbuhan batang, serta diameter dan pertumbuhan akar (Ogunyale *et al.*, 2014).

Tabel 2. Pengaruh pemberian BAP dan 2,4-D terhadap diameter kalus

	Perlakuan	Rata-rata
A	0 ppm BAP + 0,05 ppm 2,4-D	1,50 a
B	0 ppm BAP + 0,1 ppm 2,4-D	1,78 ab
C	0 ppm BAP + 0,2 ppm 2,4-D	1,63 a
D	0,5 ppm BAP + 0,05 ppm 2,4-D	2,30 bc
E	0,5 ppm BAP + 0,1 ppm 2,4-D	1,90 abc
F	0,5 ppm BAP + 0,2 ppm 2,4-D	2,25 c

Warna Kalus. Warna dan tekstur kalus merupakan salah satu indikator dalam menentukan kalus tersebut masuk kategori kalus embrionik atau non-embrionik. Indikator pertumbuhan eksplan pada budidaya in vitro berupa warna kalus menggambarkan penampilan visual kalus sehingga dapat diketahui apakah suatu kalus masih memiliki sel-sel yang aktif membelah atau telah mati. Jaringan kalus yang dihasilkan dari suatu eksplan biasanya memunculkan warna yang berbeda-beda. Kualitas kalus yang baik memiliki warna yang hijau. Menurut Rasud and Bustaman (2020), warna kalus mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan. Semakin hijau warna kalus maka semakin banyak pula kandungan klorofilnya. Warna terang atau putih dapat mengindikasikan bahwa kondisi kalus masih cukup baik.

Tabel 3. Pengaruh pemberian BAP dan 2,4-D terhadap warna kalus

Perlakuan	I	II	Ulangan
0 ppm BAP + 0,05 ppm 2,4-D	GG 143 C	GG 143 B	GG 143 B
0 ppm BAP + 0,1 ppm 2,4-D	GG 143 C	GG 143 B	GG 143 B
0 ppm BAP + 0,2 ppm 2,4-D	GG 143 A	GG 143 B	GG 143 B
0,5 ppm BAP + 0,05 ppm 2,4-D	GG 141 D	GG 143 B	GG 143 B
0,5 ppm BAP + 0,1 ppm 2,4-D	YGC 144 B	YGC 144 A	YGC 144 A
0,5 ppm BAP + 0,2 ppm 2,4-D	GG 143 A	GG 143 C	GG 143 C

Keterangan : G.G. = *green group*; Y.G.G. = *yellow green group*; Y.G.C. = *yellow green* ;

Warna kalus pada 4 MST masih pada kelas *yellow green group* (YGG) (Tabel 3), hal ini dikarenakan kalus pada 4 MST masih diinkubasi pada ruangan tanpa cahaya, sehingga menyebabkan belum terbentuknya klorofil pada kalus. Padaminggu ke-5 dan ke-6

kalus kemudian diinkubasi dalam ruangan dengan cahaya sehingga kalus yang awalnya berwarna *yellow green group* menjadi lebih hijau. Penambahan 2,4-D pada media mempengaruhi peningkatan konsentrasi auksin endogen pada eksplan yang berhubungan dengan potensial air dalam sel (Ariati, 2012). Pengaruh penambahan auksin dari luar dan kandungan hormon auksin endogen pada eksplan yang diproduksi secara internal juga sangat besar pengaruhnya dalam pembentukan kalus tersebut (Lizawati, 2012). Untuk kalus yang teksturnya kompak, diduga disebabkan penurunan aktivitas (Fadhilah *et al.*, 2015) atau meningkatnya penyerapan air oleh medium dari dalam sel akibat adanya perbedaan konsentrasi larutan antara ZPT dengan hormon endogen eksplan (Robbiani *et al.*, 2010), Hubungan antara media dasar MS, jenis eksplan, dan zat pengatur tumbuh 2,4-D, jenis gula dan konsentrasi gula juga mempengaruhi tekstur dan warna kalus. Zat pengatur tumbuh 2,4-D berkontribusi terhadap pembentukan warna hijau. Keberhasilan pembentukan warna hijau merupakan awal dari regenerasi tanaman, dimana regenerasi diinisiasi oleh pembentukan akar yang diikuti oleh pembentukan spot hijau. Keberhasilan regenerasi dipengaruhi oleh kombinasi jenis auksin dalam media regenerasi. Interaksi zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin dalam tanaman akan mempengaruhi diferensiasi sel dan morfogenesis sel tanaman (Artadana *et al.*, 2017).

Kesimpulan

Eksplan organ tanaman teh berupa pucuk dan ruas batang masih mengalami pencoklatan dan gagal regenerasi, sedangkan eksplan daun berhasil membentuk kalus pada media yang diduga bersifat embrionik. Kombinasi 0,5 ppm BAP + 0,05 ppm 2,4-D memberikan pengaruh lebih baik terhadap bobot kalus, sedangkan kombinasi 0,5 ppm BAP + 0,2 ppm 2,4D memberikan pengaruh baik terhadap diameter dan warna kalus.

Daftar Pustaka

Ardiyani, F., E.S.W. Utami, H. Purnobasuki, and S.A. Paramita. 2020. Development and

- regeneration of somatic embryos from leaves-derived Calli of *Coffea Liberica*. *Biodiversitas*, 21(12): 5829-5834. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d211246>
- Ariati. 2012. Pengaruh Perimbangan Konsentrasi NAA dan Kinetin Terhadap Pertumbuhan Tiga Varietas Anggrek Pada Media Greener Melalui Teknik Kultur Jaringan. [Skripsi]. Universitas Jember.
- Artadana, I.B.M., G.B.F. Suhono, P.H. Hardjo, M. Purwanto, Y.B. Wang, and K. Supaibulwatana. 2017. Plant regeneration induced from mature embryo-derived callus of Balinese red rice (*Oryza sativa* Cv. Barak Cenana). *Bali Medical Journal*, 6(3): 12. <https://doi.org/10.15562/bmj.v6i3.710>
- Bano, A.S., A.M. Khattak, A. Basit, M. Alam, S.T. Shah, N. Ahmad, S.A.Q. Gilani, I. Ullah, S. Anwar, and H.I. Mohamed. 2022. Callus induction, proliferation, enhanced secondary metabolites production and anti-oxidants activity of *Salvia moorcroftiana* L. as influenced by combinations of auxin, cytokinin and melatonin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 65: 1-16. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2022210200>
- Budisantoso, I., N. Amalia, and K. Kamsinah. 2017. In vitro callus induction from leaf explants of *Vanda* sp stimulated by 2,4-D. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 9(3): 492. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v9i3.11018>
- Dwipayana, G., H. Yuswanti, dan I. Mayun. 2016. Induksi kalus stroberi (*Fragaria* Spp.) melalui aplikasi asam 2,4-Diklorofenoksiasetat secara in vitro. *E-Jurnal Agroteknologi Tropika (Journal of Tropical Agroecotechnology)*, 5(3): 310-321.
- Eskundari, R.D. 2020. Budidaya jaringan tanaman teh di Indonesia. *BIOMA: Jurnal Biologi Makasar*, 5(1): 121-130.
- Fadhilah, N., Z.A. Noli, dan S. Suwirmen. 2015. Induksi kalus *Artemisia vulgaris* L. dengan pemberian beberapa konsentrasi 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). *Jurnal Biologi Unand*, 4(4): 216. <https://doi.org/10.25077/jbioua.4.4.216-222.2015>
- Fauziyyah, D., T. Hardiyati, dan Kamsinah. 2012. Upaya memacu pembentukan kalus eksplan embrio kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) dengan pemberian kombinasi 2,4-D dan sukrosa secara kultur in vitro. *Jurnal Pembangunan Pedesaan*, 12(1): 30-37.
- Handayani, E., M.B. Irsyadi, R.L.M.N. Alawiyah, and I. Aris. 2022. Effect of explants sterilization and plant growth regulators on embryo culture of kepel (*Stelechocarpus burahol*). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 985(1): 0-7. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/985/1/012016>
- Ikeuchi, M., K. Sugimoto, and A. Iwase. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *Plant Cell*, 25(9): 3159-3173. doi: 10.1105/tpc.113.116053.
- Indah, P.N. dan D. Ermavitalini. 2013. Induksi kalus daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) pada beberapa kombinasi konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). *Jurnal Sains Dan Seni Pomits*, 2(1): 1-6.
- Latief, M.F., P. Karti, dan I. Prihantoro. 2018. Daya tumbuh kalus lamtoro varietas Tarramba hasil iradiasi sinar Gamma 40 Gray yang toleran asam pada media 2,4-D. *Buletin Makanan Ternak*, 16(1): 36-46. <https://doi.org/https://journal.ipb.ac.id/index.php/bulmater/issue/view/issue/1985/85>
- Lizawati. 2012. Induksi kalus embriogenik dari eksplan tunas apikal tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) dengan penggunaan 2,4 D dan TDZ. *Bioplantae*, 1(2): 75-87. <https://online-journal.unja.ac.id/bioplante/article/view/1808>
- Mellidou, I., K. Buts, D. Hatoum, Q.T. Ho, J.W. Johnston, C.B. Watkins, R.J. Schaffer, N.E. Gapper, J.J. Giovannoni, D.R. Rudell, M.L.A.T.M. Hertog, and B.M. Nicolai. 2014. Transcriptomic events associated with internal browning of apple during postharvest storage. *BMC Plant Biology*, 14(1): 1-17. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0328-x>
- Nurwahyuni, I., M. Situmorang, and R. Sinaga. 2020. Plant regeneration through callus cultures from leaf explant of Sumatra Benzoin (*Styrax benzoin*). *International Journal of Forestry Research*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8860178>
- Ogunyale, O.G., O.O. Fawibe, A.A. Ajiboye, and D.A. Agboola. 2014. A review of plant growth substances: Their forms, structures, synthesis and functions. *Journal of*

- Advanced Laboratory Research in Biology, 5(4): 152-168.
- Purwitasari, A.T., M. Amin, B. Setya, dan U. Airlangga. 2012. Pengaruh konsentrasi zat pengatur tumbuh (asam-2,4- diklorofenoksiasetat) terhadap pertumbuhan. *Journal of Marine and Coastal Science*, 1(2): 61-70.
- Rasud, Y. and B. Bustaman. 2020. In Vitro Callus Induction from Clove (*Syzygium aromaticum* L.) Leaves on Medium Containing Various Auxin Concentrations. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 25(1), 67-72. <https://doi.org/10.18343/jipi.25.1.67>
- Robbiani, D., N. Tutik, dan N. Jadid. 2010. Pengaruh Kombinasi Naphthalene Acetic Acid (NAA) dan Kinetin pada Kultur In Vitro Eksplan Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L. var. Prancak 95). 1-13.
- Ru, Z., Y. Lai, C. Xu, and L. Li. 2013. Polyphenol Oxidase (PPO) in early stage of browning of phalaenopsis leaf explants. *Journal of Agricultural Science*, 5(9): 57-64. <https://doi.org/10.5539/jas.v5n9p57>
- Singh, A.K., G.K. Rai, S. Bagati, and S. Kumar. 2019. Tissue cultures. *Monographs on Atherosclerosis*, 1(July): 1-143. <https://doi.org/10.1201/b21441-193>
- Sriyadi, B. 2012. Seleksi klon teh assamica unggul berpotensi hasil dan kadar katekin tinggi. *Jurnal Penelitian Teh Dan Kina*, 15(1): 1-10.
- Sriyadi, B. 2015. Penilaian hubungan genetik klon teh berdasarkan komponen senyawa kimia Utama Dan Potensi Hasil. *Jurnal Penelitian Teh Dan Kina*, 18(1): 1-10.
- Tahardi, J.S., T. Raisawati, I. Riyadi, dan W.A. Dodd. 2016. Embriogenesis somatik langsung dan regenerasi tanaman teh melalui perendaman sesaat. *E-Journal Menara Perkebunan*, 68(1). <https://doi.org/10.22302/ppbbi.jur.mp.v68i1.133>
- Takahashi, N. and M. Umeda. 2014. Cytokinins promote onset of endoreplication by controlling cell cycle machinery. *Plant Signaling and Behavior*, 9(8): 11-13. <https://doi.org/10.4161/psb.29396>
- Truta, E., M. Zamfirache, M., C. Rosu, Z. Olteanu, C. Mihai, and D. Ghergel. 2011. Cytogenetic effects induced by 2,4-D and kinetin in radish and common bean root meristems. *Rom Agric Res.*, 28: 207-215.
- Widhianata, H. and Taryono. 2019. Organogenesis responses of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) var. assamica and sinensis. *AIP Conference Proceedings*, 2099(April). <https://doi.org/10.1063/1.5098431>
- Yelnititis. 2012. Pembentukan kalus remah dari eksplan daun ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq) Kurz.). *Jurnal Pemuliaan Tanaman*, 6(3): 181-194.
- Zikria, R. 2017. Outlook Teh 2017: Komoditas Pertanian Subsektor Perkebunan. Pusat Data Dan Sistem Informasi Pertanian Sekretariat Jenderal Kementerian Pertanian. Jakarta.