



MULTIPLIKASI TUNAS TEMBAKAU SECARA *IN VITRO* MENGUNAKAN *BENZYL AMINO PURINE* DAN *FURFURYL AMINO PURINE* MELALUI METODE *THIN CELL LAYER*

IN VITRO MULTIPLICATION OF TOBACCO SHOOTS USING BENZYL AMINO PURINE AND FURFURYL AMINO PURINE THROUGH THE THIN CELL LAYER METHOD

Mohammad Nur Khozin^{1*}, Muhammad Dima Say Mona¹, Parawita Dewanti², Widya
Kristiyanti Putri¹, Sigit Soeparjono¹, Didik Pudji Restanto²

¹Program Studi Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember, Jl Kalimantan 37, 68121 Jember

²Center for Development of Advanced Science and Technology (C-DAST), Universitas Jember,
Jl Kalimantan 37, Jember, 68121

*Corresponding author: nurkhozin@unej.ac.id

Naskah Diterima: 31 Juli 2024; Direvisi: 12 November 2024; Disetujui: 27 November 2024

Abstrak

Tembakau sebagai bahan baku pembuatan rokok mempunyai nilai ekonomi dan ekspor yang tinggi, namun permasalahan perbanyakan secara konvensional sering menghasilkan keturunan yang heterogen dan beberapa komoditas introduksi seringkali mengalami pertumbuhan yang tidak normal pada fase pembibitan sehingga pemenuhan kebutuhan bahan tanam yang seragam sering menjadi kendala. Kultur *in vitro* dapat menjadi alternatif dalam perbanyakan bahan tanam yang relatif seragam dan tahan terhadap perubahan lingkungan. Penggunaan zat pengatur tumbuh (ZPT) utamanya golongan sitokinin seperti *benzyl amino purine* (BAP) dan kinetin sangat mendukung pada multiplikasi tunas tembakau. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi BAP dan kinetin yang optimal pada multiplikasi tunas tembakau. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial dengan faktor BAP (0, 2, 3, dan 4 ppm) dan faktor kinetin (0, 3, dan 4 ppm). Hasil penelitian menunjukkan interaksi BAP dan kinetin berpengaruh sangat nyata terhadap kedinian eksplan bertunas, jumlah tunas, dan daun dengan perlakuan terbaik. Konsentrasi BAP 3 ppm + kinetin 4 ppm yang menginduksi tunas pada 8,3 HST; jumlah tunas 81,3; dan jumlah daun 142,3 helai. Penggunaan BAP berpengaruh nyata terhadap kedinian eksplan berkalus dengan perlakuan terbaik pada konsentrasi 3 ppm BAP yang menginduksi kalus pada 10,78 HST. Kinetin berpengaruh sangat nyata terhadap kedinian eksplan bertunas dengan perlakuan terbaik P2M2 yaitu 4 ppm, yang menginduksi tunas pada 8,3 HST. Kesimpulannya perlakuan BAP 3 ppm + 4 ppm kinetin merupakan perlakuan terbaik.

Kata kunci: BAP; Kinetin; Kultur *in vitro*; Sitokinin; Tembakau

Abstract

Tobacco as a raw material for making cigarettes has high economic and export value, but conventional propagation problems often produce heterogeneous offspring and some introduced commodities often experience abnormal growth in the nursery phase so that the fulfillment of the need for uniform planting materials is often an obstacle. In vitro culture can be an alternative in the propagation of relatively uniform planting materials and resistant to environmental changes. The use of plant growth regulators (PGRs), especially the cytokinin group such as *benzyl amino purine* (BAP) and kinetin, greatly supports the multiplication of tobacco shoots. This study aims to determine the optimal concentration of BAP and kinetin in the multiplication of tobacco shoots. The study used a factorial completely randomized design (CRD) with BAP factors (0, 2, 3, and 4 ppm) and kinetin factors (0, 3, and 4 ppm). The results showed that the interaction of BAP and kinetin had a very significant effect on the early explant sprouting, the number of shoots, and leaves with the best treatment. BAP concentration of 3 ppm + kinetin 4 ppm which induced shoots at 8.3 DAP; number of shoots 81.3; and number of leaves 142.3 strands. BAP significantly affected the early explant callus with the best treatment at a concentration of 3 ppm BAP which induced callus at 10.78 DAP. Kinetin had a very significant effect on the early explant sprouting with the best treatment P2M2, namely 4 ppm, which induced shoots at 8.3 DAP. In conclusion, the treatment of 3 ppm BAP + 4 ppm kinetin is the best treatment.

Keywords: BAP; Cytokinin; In vitro culture; Kinetin; Tobacco

Permalink/DOI: <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v18i2.40649>

PENDAHULUAN

Tembakau dimanfaatkan sebagai bahan dasar dalam pembuatan rokok dan cerutu. Tembakau memiliki nilai ekonomi yang tinggi diimbangi dengan peningkatan produksi dan penyebarannya yang luas. Produktivitas tembakau di Indonesia memiliki nilai yang tinggi dan ekspor yang besar sehingga masih menjadi sumber devisa bagi negara. Berdasarkan Badan Pusat Statistik (BPS) (2024) Indonesia memiliki berat ekspor tembakau sebesar 13.790,2 ton dan mengalami penurunan pada tahun 2023 sebanyak 37,13% menjadi 8.670,4 ton. Tembakau dapat berpotensi memiliki harga yang rendah apabila produksi tembakau domestik meningkat, sehingga nilai eksportnya menurun. Hal itu terjadi akibat kualitas dan jenis dari tembakau kurang dapat bersaing dalam pasar internasional, sehingga bisa memengaruhi permintaan ekspor tembakau yang ada di Indonesia (Nolla et al., 2020).

Salah satu sentra produksi tembakau dengan kualitas tinggi yang ada di Indonesia adalah Jember. Menurut Badan Pusat Statistik (BPS) Provinsi Jawa Timur (2023) berdasarkan data tahun 2021 mengatakan bahwa, jumlah produksi tembakau tertinggi di wilayah Jawa Timur adalah Jember yang memiliki total produksi 24.285 ton dan meningkat sampai 27.251 ton pada tahun 2023. Kualitas daun tembakau berdasarkan komposisi cerutu yang dibutuhkan adalah warna, bentuk, aroma, ketebalan, dan kehalusan (Wardhono et al., 2019). Berdasarkan kualitas bahan yang diperlukan dalam proses pembuatan cerutu dan rokok maka sangat dibutuhkan metode budi daya tembakau untuk memperoleh bibit tanaman yang berkualitas dan seragam.

Saat ini budi daya tembakau masih menggunakan metode konvensional, yaitu dengan melakukan persemaian menggunakan biji. Melihat dari sifat tembakau yang dapat melakukan penyerbukan silang, pembibitan yang dilakukan dengan biji cenderung menghasilkan tanaman yang heterogen, dan tidak identik dengan induknya (Anindiyati & Erawati, 2020). Akibatnya, bahan tanam yang digunakan pada generasi berikutnya memiliki kualitas yang bervariasi dan kurang seragam. Beberapa varietas yang ditanam menggunakan biji, terutama varietas introduksi dari luar negeri tidak menunjukkan pertumbuhan optimal dan morfologi yang baik karena perbedaan iklim asalnya (Dewi, 2016). Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa tembakau, terutama varietas introduksi seperti Virginia dan Burley, membutuhkan adaptasi terhadap faktor lokal agar pertumbuhan maksimal. Tembakau Virginia lebih cocok di daerah dengan curah hujan sedang dan tanah yang kaya bahan organik. Namun, ketika ditanam di wilayah yang tidak sesuai, seperti area dengan kelembapan tinggi dan tanah asam, pertumbuhan tanaman dapat terganggu, yang mengurangi nilai ekonominya bagi petani tembakau di Indonesia (Tobacconomics, 2023). Tembakau varietas introduksi yang berasal dari daerah subtropis seringkali mengalami masalah adaptasi di Indonesia, mengingat perbedaan lingkungan, seperti suhu, kelembapan, dan kondisi tanah yang tidak sama. Hal ini dapat menyebabkan pertumbuhan yang tidak optimal, seperti pertumbuhan tembakau pada fase bibit ukuran tanaman yang kerdil, daun yang kurang lebar, serta pembungaan yang tidak maksimal. Kondisi ini terjadi karena varietas yang diintroduksi mungkin tidak sepenuhnya cocok dengan iklim tropis basah di Indonesia, yang berbeda dengan lingkungan asal varietas tersebut (Djajadi, 2015). Oleh karena itu, teknik budi daya tembakau secara konvensional belum mampu memenuhi kebutuhan bibit secara memadai. Tidak hanya karena heterogenitas adaptasi, tapi karena pengaruh lingkungan baru juga memengaruhi pertumbuhan tanaman utamanya pada fase pembibitan. Salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah melalui kultur *in vitro*. Kultur *in vitro* memiliki potensi untuk menghasilkan bibit tembakau dalam jumlah besar, dalam waktu yang relatif singkat, seragam, tidak terpengaruh oleh iklim dan faktor lingkungan lainnya.

Teknik kultur *in vitro* memiliki kemampuan untuk menghasilkan tanaman dengan cepat melalui eksplan berupa daun, akar, tunas pucuk, potongan batang, dan bunga (Rananda & Khozin, 2023). Keberhasilan teknik ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, termasuk zat pengatur tumbuh, lingkungan, dan faktor endogen eksplan (Purba, 2017). Penggunaan zat pengatur tumbuh seperti auksin dan sitokinin seringkali diterapkan dalam mikropropagasi.

Sitokinin *benzyl amino purine* (BAP) dan kinetin merupakan golongan zat pengatur tumbuh yang digunakan dalam teknik kultur *in vitro* untuk induksi tunas secara langsung maupun tidak langsung. Penggunaan BAP memiliki efektivitas tinggi dalam merangsang pembentukan tunas pada tanaman, lebih stabil untuk digunakan, dan memiliki ketahanan terhadap oksidasi (Arafah et al., 2021). Aplikasi

BAP pada tunas meningkatkan proliferasi sel sehingga menghasilkan jumlah tunas yang lebih banyak, sedangkan kinetin merupakan salah satu jenis sitokinin yang berperan dalam merangsang pembelahan sel, memperbanyak jumlah tunas, dan memengaruhi diferensiasi jaringan dalam kultur jaringan, terutama dalam produksi tunas baru (Pendong et al., 2020). Dalam kultur *in vitro*, kombinasi pemberian BAP dan kinetin sering digunakan untuk mencapai hasil yang optimal dalam induksi tunas dan diferensiasi sel. Interaksi antara kedua hormon ini dapat memberikan efek sinergis yang signifikan dalam memengaruhi pertumbuhan dan perkembangan tanaman terutama pada metode multiplikasi tunas. Kombinasi BAP dan kinetin merangsang pembelahan sel dengan meningkatkan ekspresi gen yang terkait dengan siklus sel, khususnya gen yang mengkode siklin dan kinase siklin-dependent (CDK). Aktivasi ini mempercepat pembelahan sel, mendukung pembentukan tunas baru dengan lebih cepat. BAP dan kinetin berikatan dengan reseptor sitokinin di membran plasma, mengaktifkan jalur sinyal yang meningkatkan sintesis protein untuk pertumbuhan dan diferensiasi. Ini memicu biosintesis isopenteniladenin (iP), yang merupakan salah satu bentuk aktif dari sitokinin, berperan dalam memperpanjang tunas dan mempercepat pembelahan DNA dan RNA, mendukung pertumbuhan sel yang pesat (Mok & Mok, 2001).

Multiplikasi tunas merupakan salah satu teknik dalam kultur jaringan yang dimanfaatkan untuk memperbanyak bibit tembakau secara cepat. Beberapa peneliti telah menggunakan metode multiplikasi tunas pada tembakau untuk mengoptimalkan induksi tunas. Menurut Isnandza (2015), multiplikasi tunas pada eksplan tembakau diperlukan konsentrasi 1 ppm BAP untuk menghasilkan 27–28 tunas. Penelitian yang sama oleh Erawati et al. (2017), pemberian BAP 2 ppm pada eksplan tembakau dapat menginduksi tunas sebanyak 28,375, konsentrasi BAP 3 ppm menginduksi tunas 15,75 hari setelah kultur, dan konsentrasi 4 ppm mampu menghasilkan tunas sepanjang 18 cm. Upaya memperoleh jumlah tunas yang maksimal salah satu yang mendukung adalah metode pemotongan yang optimal untuk meningkatkan jumlah tunas yang dihasilkan. Salah satu metode pemotongan yang digunakan untuk memaksimalkan eksplan adalah *Thin Cell Layer* (TCL) (Lee & Park, 2022).

Penggunaan metode TCL dapat mempercepat proses difusi media ke dalam jaringan karena menghasilkan lebih banyak luka dibandingkan dengan metode pemotongan eksplan konvensional (Karamina et al., 2022). Umumnya, pemotongan TCL dilakukan pada tepi batang dengan irisan setebal 1–2 mm (Hidayah & Dewanti, 2023). Namun, metode pemotongan TCL eksplan daun memiliki bentuk berbeda dari yang diterapkan pada eksplan batang. Menurut Phong et al. (2023), pemotongan daun menggunakan metode *leaf-TCL explants* dapat mengoptimalkan pertumbuhan tunas dan sangat mendukung regenerasi pada eksplan (Zhang et al., 2023). Pemotongan *leaf-TCL* dilakukan pada bagian tengah daun yang terdapat tulang daun dengan ukuran tinggi 0,5 dan lebar 1 cm. Berdasarkan latar belakang tersebut penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh konsentrasi BAP dan kinetin terhadap multiplikasi tunas tembakau secara *in vitro* melalui metode *thin cell layer*.

MATERIAL DAN METODE

Alat dan Bahan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, Program Studi Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember, pada Januari hingga Maret 2024. Peralatan yang digunakan mencakup *Laminar Air Flow Cabinet* (L AFC), berbagai alat ukur seperti gelas ukur dan pipet, serta mikroskop stereo dan SEM. Media kultur yang dipakai adalah Murashige & Skoog (MS), dengan tambahan agar, sukrosa, dan air suling steril. Bahan kimia yang digunakan meliputi alkohol 70%, HCl 0,1 M, NaOH 0,1 M, natrium hipoklorit (NaClO), serta sitokinin *benzyl amino purine* (BAP) dan kinetin. Eksplan berupa tunas pucuk tembakau varietas *Broadleaf One-Sucker* berumur 45 hari setelah tanam, dengan tambahan nanopartikel perak (AgNs), fungisida, bakterisida, dan antibiotik.

Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial yang terdiri atas dua faktor zat pengatur tumbuh, yaitu BAP dan kinetin. Faktor BAP terdiri dari empat taraf: 0, 2, 3, dan 4 ppm. Faktor kinetin terdiri dari tiga taraf: 0, 3, dan 4 ppm. Kombinasi dari kedua faktor tersebut menghasilkan 12 perlakuan yang masing-masing diulang sebanyak tiga kali, sehingga terdapat total 36 unit percobaan. Dalam setiap botol terisi tiga eksplan.

Prosedur Penelitian

Pembuatan Media Perlakuan

Media perlakuan yang digunakan adalah media MS basal 4,43 g/L dengan penambahan sukrosa 30 g/L, agar 8 g/L, dan hormon BAP serta kinetin sesuai dosis perlakuan. Pembuatan media dimulai dengan menimbang bahan-bahan padat seperti MS basal dan sukrosa menggunakan neraca analitik dengan ketelitian 0,01 g. Bahan cair seperti BAP dan kinetin diencerkan dan diukur menggunakan pipet gondok kemudian dimasukkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan akuades steril ditambahkan hingga mencapai volume 1 L. Media dilarutkan menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen. Nilai pH media diatur pada kisaran 6–6,2 menggunakan larutan NaOH 0,1 N atau HCl 0,1 N jika diperlukan. Media kemudian dipanaskan hingga mendidih, setelah itu agar ditambahkan dan diaduk hingga merata. Larutan media dituang ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan aluminium foil. Erlenmeyer yang berisi media disterilkan dalam autoklaf selama 90 menit pada suhu 121 °C dan tekanan 15 psi. Setelah sterilisasi, media dituang ke dalam cawan petri di ruang inokulasi.

Sterilisasi Eksplan

Eksplan dicuci sebanyak tiga kali menggunakan deterjen dengan air mengalir. Selanjutnya, eksplan direndam dalam fungisida (1 g/100 mL) dan bakterisida (1 g/100 mL) selama 60 menit secara terpisah. Setelah itu, eksplan dicuci bersih menggunakan akuades, kemudian dimasukkan ke dalam botol yang berisi antibiotik (50 mg/L) dan direndam selama 60 menit sebelum dipindahkan ke dalam *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC). Sterilisasi di dalam LAFC dilakukan menggunakan larutan natrium hipoklorit 1% yang diulang dua kali, kemudian dicuci dengan akuades sebanyak tiga kali selama 5 menit. Setelah itu, eksplan dipindahkan ke dalam botol yang berisi nanopartikel perak dengan konsentrasi 500 ppm dan digojlok selama 10 menit, kemudian ditiriskan.

Penanaman Eksplan

Eksplan tunas yang telah disterilisasi ditiriskan pada *petri dish* yang telah dilapisi aluminium foil steril dan kemudian dipotong menggunakan pisau scalpel. Pemotongan dilakukan dengan membuang bagian sisi eksplan yang nekrosis akibat larutan steril menggunakan metode *leaf-TCL explants*. Potongan eksplan kemudian ditempatkan dalam *petri dish* steril yang berisi media kultur dengan dua eksplan per petri. *Petri dish* yang berisi eksplan kemudian ditutup dengan plastik *wrap* steril dan diberi label. Selanjutnya *petri dish* ditempatkan di ruang inkubasi selama ± 3 –5 hari untuk memantau adanya kontaminasi pada media.

Pengamatan dan Analisis Data

Pengamatan dilakukan selama 60 hari terhadap parameter kedinian eksplan bertunas, jumlah tunas, dan jumlah daun. Data hasil penelitian dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA. Apabila terdapat perbedaan yang signifikan, dilakukan uji DMRT pada taraf kepercayaan 95%. Data pendukung secara kualitatif berupa gambar kenampakan visual eksplan bertunas baik secara langsung, menggunakan mikroskop stereo, dan *scanning electron microscope* (SEM).

HASIL

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam ANOVA didapatkan nilai F-hitung untuk mengetahui signifikansi faktor perlakuan BAP dan kinetin terhadap parameter hasil penelitian (Tabel 1). Hasil analisis sidik ragam menunjukkan faktor perlakuan BAP (P) memberikan pengaruh nyata terhadap kedinian eksplan bertunas dan berpengaruh sangat nyata pada kedinian eksplan bertunas, jumlah tunas, dan jumlah daun. Faktor konsentrasi kinetin (M) berpengaruh sangat nyata terhadap variabel kedinian tunas dan tidak berpengaruh terhadap variabel lainnya. Sedangkan interaksi keduanya berpengaruh sangat nyata pada variabel pengamatan kedinian eksplan bertunas, jumlah tunas, dan jumlah daun. Berdasarkan tabel F-hitung tersebut terdapat beberapa variabel yang berbeda nyata sehingga perlu dilanjutkan analisis menggunakan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) untuk mengetahui seberapa besar pengaruh BAP dan kinetin terhadap multiplikasi tunas tembakau.

Table 1. Hasil analisis sidik ragam (ANOVA) multiplikasi tunas

Variabel	Nilai F-Hitung		
	BAP (P)	Kinetin (M)	P × M
Kedinian eksplan bertunas	38,50 ^{ns}	8,32 ^{**}	2,64 [*]
Jumlah tunas	12,880 ^{**}	1,801 ^{ns}	6,013 ^{**}
Jumlah daun	11,356 ^{**}	0,074 ^{ns}	6,488 ^{**}

Keterangan: (P) BAP, (M) Kinetin, (ns) tidak berbeda nyata, (*) berbeda nyata, dan (**) berbeda sangat nyata

Pengaruh Konsentrasi *Benzyl Amino Purine* (BAP) dan Kinetin Terhadap Kedinian Eksplan Bertunas, Jumlah Tunas, dan Jumlah Daun Tembakau Secara *In Vitro*

Kedinian Eksplan Bertunas

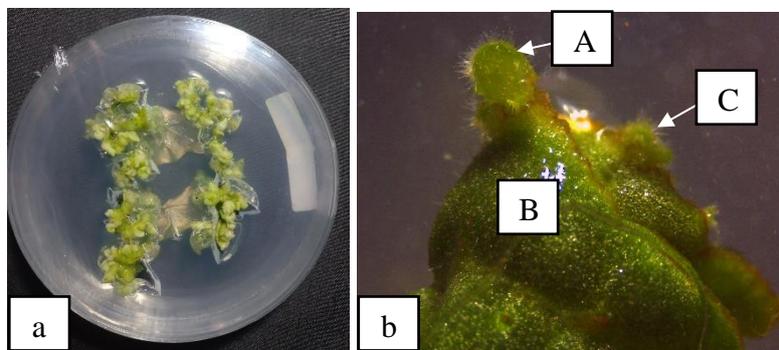
Berdasarkan hasil analisis sidik ragam (ANOVA) didapatkan bahwa perlakuan interaksi memiliki pengaruh nyata terhadap kedinian eksplan bertunas. Adapun hasil analisis uji lanjut DMRT $\alpha = 5\%$ pada kedinian eksplan bertunas dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh interaksi konsentrasi BAP dan kinetin terhadap kedinian eksplan bertunas

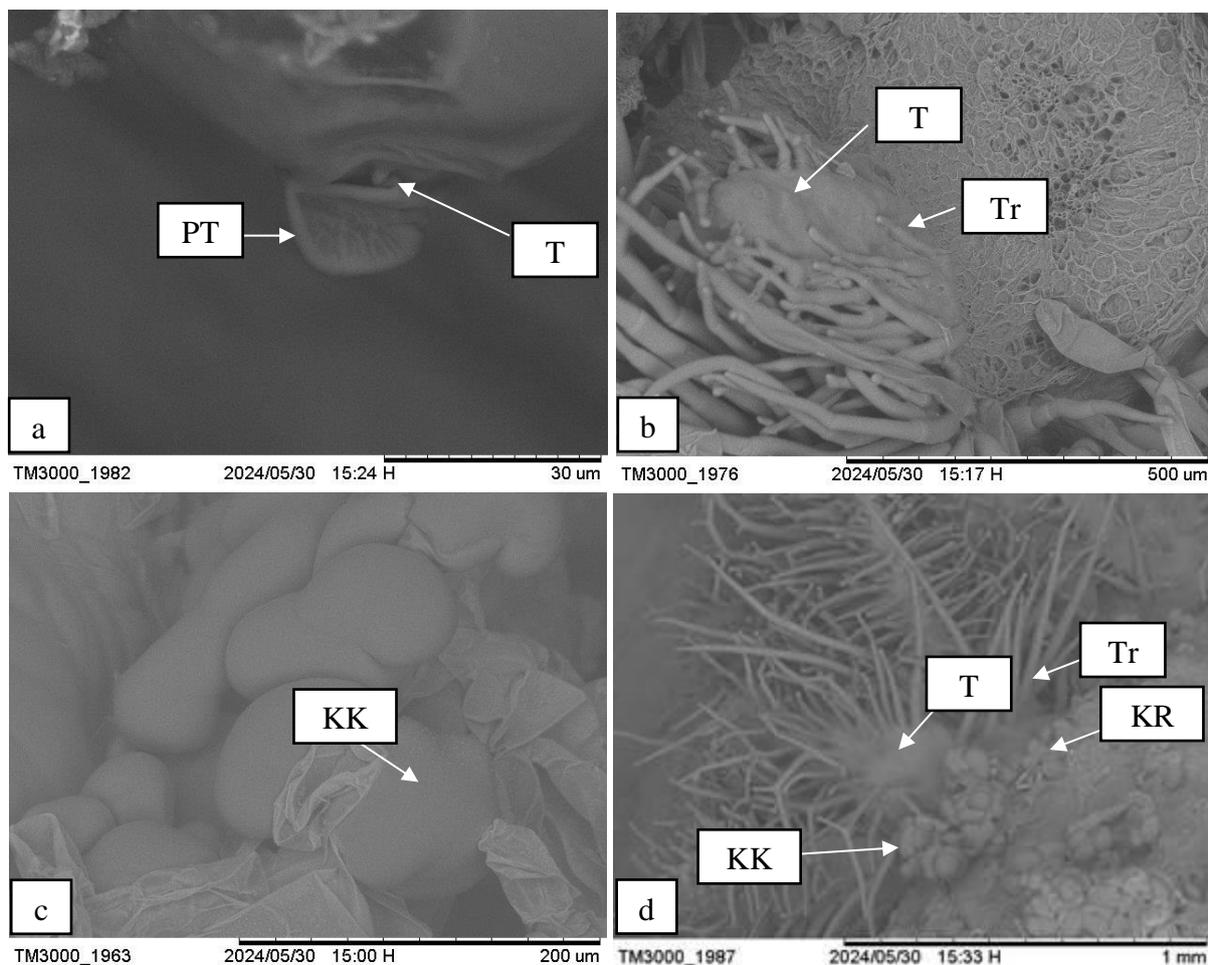
Konsentrasi <i>benzyl amino purine</i> (BAP)	Konsentrasi kinetin		
	M0 (0 ppm)	M1 (3 ppm)	M2 (4 ppm)
P0 (0 ppm)	NA	13 ± 5,6 (a) A	15,67 ± 2,9 (a) A
P1 (2 ppm)	9,67 ± 1,5 (a) A	13 ± 2,6 (a) A	9,67 ± 1,2 (a) A
P2 (3 ppm)	10,3 ± 0,6 (ab) A	12,3 ± 2,1 (b) A	8,3 ± 0,6 (a) A
P3 (4 ppm)	9 ± 1 (a) A	19 ± 11 (a) A	15,3 ± 6 (a) A

Keterangan: Huruf kapital menyatakan perbandingan secara vertikal (membandingkan pengaruh kinetin), huruf kecil menyatakan perbandingan secara horizontal (membandingkan konsentrasi BAP), dan tidak tersedia (NA)

Berdasarkan Tabel 1, interaksi BAP dan kinetin berpengaruh nyata terhadap kedinian eksplan bertunas. Pada konsentrasi BAP 3 ppm (P2) pemberian kinetin 4 ppm (M2) memiliki nilai kedinian tunas terbaik (Gambar 1) dan berbeda nyata terhadap pemberian kinetin 3 ppm. Hasil tidak berbeda nyata diperoleh dengan kinetin 0 ppm (M0) dalam kondisi konsentrasi BAP yang sama, sedangkan pada kondisi kinetin dengan konsentrasi 4 ppm (M2) memiliki nilai yang tidak berbeda nyata terhadap semua faktor BAP. Namun, pada konsentrasi BAP 3 ppm (P2) memiliki nilai yang cenderung lebih baik terhadap konsentrasi kinetin 4 ppm (M2). Berdasarkan tabel hasil uji lanjut DMRT $\alpha = 5\%$ (Tabel 1) menunjukkan interaksi BAP dan kinetin pada perlakuan P2M2 menghasilkan kedinian eksplan bertunas tercepat selama 8,3 HST.



Gambar 1. Kenampakan kedinian eksplan bertunas, secara visual (a) dan kenampakan eksplan bertunas dengan mikroskop stereo (b). Keterangan: A = trikoma pada tunas, B = eksplan daun, dan C = kalus yang akan membentuk tunas



Gambar 2. Analisis SEM pada proses organogenesis langsung dan tidak langsung. Penampakan hasil SEM organogenesis langsung (a & b) serta organogenesis tidak langsung (c & d). Keterangan: primordia tunas (PT), trikoma (Tr), kalus kompak (KR), kalus remah (KR), dan tunas (T)

Hasil analisis menunjukkan (Gambar 2) hasil pengamatan menggunakan SEM terhadap proses organogenesis langsung dan tidak langsung dalam kultur jaringan tanaman. Gambar 2a dan 2b menunjukkan proses organogenesis langsung, yaitu tunas (T) terbentuk secara langsung dari jaringan eksplan tanpa melalui fase kalus. Pada gambar 2a, terlihat primordia tunas (PT) yang merupakan tahap awal pembentukan tunas baru. Sementara itu, gambar 2b menunjukkan adanya trikoma (Tr) yang berfungsi sebagai pelindung mekanis dan membantu dalam proses pertumbuhan tunas. Sebaliknya, gambar 2c dan 2d menggambarkan organogenesis tidak langsung, yaitu pembentukan tunas melalui fase kalus terlebih dahulu. Pada gambar 2c, terlihat kalus kompak (KK) yang merupakan jaringan dediferensiasi yang padat, berperan dalam regenerasi tunas melalui induksi hormon. Gambar 2d menunjukkan kalus remah (KR), yang memiliki struktur lebih longgar dibandingkan kalus kompak. Tunas (T) yang muncul berasal dari kalus ini dan trikoma (Tr) juga terlihat sebagai bagian dari pertumbuhan eksplan.

Jumlah Tunas

Hasil analisis sidik ragam (ANOVA) pengaruh interaksi konsentrasi BAP dan kinetin menunjukkan nilai yang berbeda sangat nyata terhadap variabel jumlah tunas. Hasil analisis tersebut kemudian dilakukan uji lanjut DMRT $\alpha = 5\%$ (Tabel 3). Berdasarkan Tabel 3 pada taraf kinetin 4 ppm (M2), pemberian BAP 3 ppm (P2) menghasilkan jumlah tunas tembakau yang lebih baik dan berbeda nyata dibandingkan dengan pemberian BAP 0 ppm (P0) dan 4 ppm (P3), tetapi tidak berbeda nyata dengan BAP 2 ppm (P1). Hasil yang diperoleh pada kondisi taraf BAP 3 ppm (P2) yang sama, nilai jumlah tunas tidak berbeda nyata terhadap pemberian kinetin. Namun, konsentrasi kinetin 4 ppm

(M2) cenderung memberikan hasil yang lebih baik pada taraf BAP 3 ppm (P2). Berdasarkan tabel hasil uji lanjut DMRT $\alpha = 5\%$ (Tabel 3), interaksi antara BAP dan kinetin pada perlakuan P2M2 menghasilkan jumlah tunas yang lebih baik, yaitu 81,3 tunas.

Tabel 3. Pengaruh interaksi konsentrasi BAP dan kinetin terhadap jumlah tunas

Konsentrasi <i>benzyl amino purine</i> (BAP)	Konsentrasi kinetin		
	M0 (0 ppm)	M1 (3 ppm)	M2 (4 ppm)
P0 (0 ppm)	0 (b) B	41,67 ± 13,6 (a) AB	41 ± 17,3 (a) BC
P1 (2 ppm)	51,67 ± 8 (a) A	67,67 ± 11,9 (a) A	63,67 ± 10 (a) AB
P2 (3 ppm)	51,3 ± 2,5 (a) A	47,67 ± 9,5 (a) AB	81,3 ± 28,7 (a) A
P3 (4 ppm)	57,3 ± 18 (a) A	25,67 ± 21 (ab) B	19,3 ± 7,2 (b) C

Keterangan: Huruf kapital menyatakan perbandingan secara vertikal (membandingkan pengaruh kinetin) dan huruf kecil menyatakan perbandingan secara horizontal (membandingkan konsentrasi BAP)

Jumlah Daun

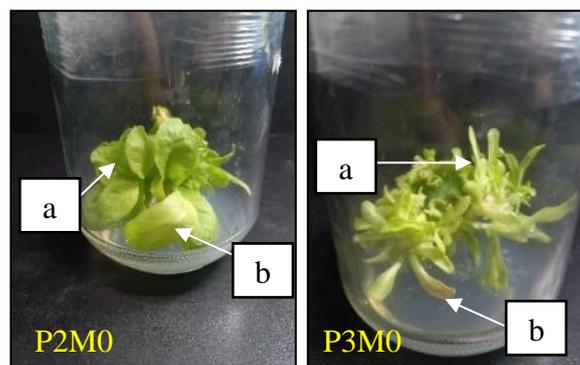
Hasil analisis sidik ragam (ANOVA) pengaruh interaksi konsentrasi BAP dan kinetin menunjukkan nilai yang berbeda sangat nyata terhadap faktor perlakuan interaksi. Hasil analisis tersebut kemudian dilakukan uji lanjut DMRT $\alpha = 5\%$ dan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Pengaruh interaksi konsentrasi BAP dan kinetin terhadap jumlah daun

Konsentrasi <i>benzyl amino purine</i> (BAP)	Konsentrasi kinetin		
	M0 (0 ppm)	M1 (3 ppm)	M2 (4 ppm)
P0 (0 ppm)	0 (b) C	79 ± 29,5 (a) AB	61 ± 33,4 (a) B
P1 (2 ppm)	88,33 ± 27,6 (a) B	119,67 ± 41 (a) A	120,67 ± 29 (a) A
P2 (3 ppm)	111 ± 6 (a) BC	101 ± 27,6 (a) AB	142,3 ± 44,1 (a) A
P3 (4 ppm)	136 ± 30 (a) A	42 ± 42,7 (b) B	30 ± 9,8 (b) B

Keterangan: Huruf kapital menyatakan perbandingan secara vertikal (membandingkan pengaruh kinetin), huruf kecil menyatakan perbandingan secara horizontal (membandingkan konsentrasi BAP)

Salah satu indikator dari terbentuknya tunas adalah dengan kemunculan daun. Kemunculan daun tersebut dapat mengindikasikan baik tidaknya tunas yang terbentuk. Berdasarkan Tabel 4, interaksi BAP dan kinetin berpengaruh nyata terhadap jumlah daun. Pada taraf kinetin 4 ppm (M2) pemberian BAP 3 ppm (P2) memiliki nilai yang lebih baik dan berbeda nyata terhadap pemberian BAP 0 ppm (P0) dan 4 ppm (P3) tetapi tidak berbeda nyata pada taraf 2 ppm (P1). Sedangkan pada taraf BAP 3 ppm (P2) memiliki nilai tidak berbeda nyata terhadap penambahan kinetin 0 ppm (M0), 3 ppm (M1), dan 4 ppm (M2). Namun pada taraf BAP 3 ppm, konsentrasi kinetin 4 ppm (M2) memiliki nilai yang cenderung lebih baik. Berdasarkan tabel hasil uji lanjut DMRT $\alpha = 5\%$ menunjukkan interaksi BAP dan kinetin pada perlakuan P2M2 menghasilkan jumlah daun yang lebih baik, yaitu 142,3 helai (Gambar 3).



Gambar 3. Eksplan daun tembakau, yaitu yang telah terbentuk tunas dan daun (a) serta daun yang mengalami nekrosis (b)

PEMBAHASAN

Pemotongan eksplan menggunakan TCL efektif memunculkan tunas dan daun pada semua perlakuan. Hal ini karena penggunaan TCL memaksimalkan kontak eksplan dengan media kultur, mendukung penyerapan hormon, serta mengoptimalkan regenerasi. Jaringan yang tipis meningkatkan penyerapan hara dan hormon dalam media, sehingga merangsang pembelahan sel dan diferensiasi (Teixeira da Silva & Dobránszki, 2013).

Pengaruh Konsentrasi *Benzyl Amino Purine* (BAP) dan Kinetin Terhadap Kedinian Eksplan Bertunas, Jumlah Tunas, dan Jumlah Daun Tembakau Secara *In Vitro* Kedinian Eksplan Bertunas

Tunas yang terbentuk hasil interaksi dari P2M2 pada Tabel 2 menghasilkan kedinian eksplan bertunas tercepat, hal ini dikarenakan sifat BAP menurut Dewi et al. (2023) mendukung pembelahan sel yang intensif. *Benzyl amino purine* (BAP) mempercepat transisi sel dari fase G1-S dan G2-M dalam siklus sel, yang pada gilirannya meningkatkan laju sintesis protein untuk proses mitosis. Hal ini menyebabkan pembelahan sel yang terus-menerus membantu dalam pembentukan massa sel yang tidak terdiferensiasi. Bentuk kedinian eksplan bertunas pada Gambar 1 menunjukkan awal kemunculan tunas pada eksplan yang ditandai dengan munculnya primordia tunas. Dalam metode multiplikasi, fase organogenesis langsung ditandai dengan kemunculan primordia tunas atau daun (Unsong et al., 2022). Sedangkan organogenesis tidak langsung pada tunas diawali dengan terbentuknya kalus (Khozin et al., 2022). Organogenesis langsung dapat dilihat pada Gambar 2a dan 2b yang menunjukkan trikoma (Tr) dan primordia tunas muncul dari adaksial daun. Menurut Schuchovski et al. (2020), organogenesis langsung mengalami pembentukan tunas langsung dari eksplan tanpa melalui kalus. Munculnya tunas ditandai dengan adanya primordia daun dan banyak di antaranya terdapat trikoma, sedangkan organogenesis tidak langsung dapat dilihat pada Gambar 2c yang menunjukkan kalus mengalami fase globular (kalus kompak). Pembentukan kalus menjadi kompak disebabkan oleh proses lignifikasi (Wahyudiningsih et al., 2022). Pada Gambar 2d menunjukkan kalus kompak memiliki tekstur yang keras, padat dan ruang antar selnya tersusun dengan rapat. Menurut Faramayuda dan Ramelan (2016) kalus yang mengalami pembentukan tekstur kompak berkorelasi dengan pembentukan tunas.

Sitokinin BAP dan kinetin berperan dalam mengatur transkripsi protein dalam pertumbuhan dan perkembangan sel tumbuhan (Royani et al., 2021). BAP melakukan proses pembentukan tunas dengan mensintesis RNA, mempercepat sintesis protein, dan menginduksi aktivitas enzim yang terlibat dalam pembelahan sel. Enzim yang terlibat dalam pembelahan sel mempercepat peralihan siklus sel. Ketika hormon dan nutrisi terdapat dalam sel akan merangsang aktivasi gen-gen transkripsi, dan terjadi peningkatan pembelahan sel. Stimulasi ini dapat menyebabkan pembelahan sel pada nodus menjadi lebih cepat, sehingga mempercepat pembentukan tunas (Khozin & Restanto, 2022).

Pemberian kinetin dalam media pertumbuhan dapat meningkatkan pembelahan dan perbesaran sel lebih cepat, khususnya dalam proses morfogenesis, yaitu pembentukan struktur dan organ tanaman, serta perkembangan organel sel (Rahma, 2020). Menurut Mawaddah et al. (2021)

pemberian konsentrasi BAP 1 mg/L dan kinetin 1 mg/L cenderung memiliki pertumbuhan tunas tebu tercepat. Hal ini mungkin karena konsentrasi tersebut mencukupi kandungan hormon endogen eksplan. Menurut Martins et al. (2022) kinetin yang diinteraksikan dengan BAP memiliki jaringan dengan sel yang berdiferensiasi dan arah pertumbuhan morfologi yang jelas. Hal ini karena efek buruk yang dimiliki BAP dapat dikurangi dengan penambahan kinetin. Dalam penelitiannya menjelaskan efek buruk yang ditimbulkan BAP, yaitu jaringan xilem dan floem yang mengecil sehingga mempersempit penyerapan hara pada media, adanya kinetin dapat memperbesar jaringan xilem dan floem pada eksplan sehingga penyerapan eksplan terhadap nutrisi dalam media dapat mempercepat waktu muncul tunas.

Jumlah Tunas

Hasil pengamatan jumlah tunas yang dihasilkan dari interaksi BAP dan kinetin dapat diindikasikan sebagai keberhasilan dalam multiplikasi tunas tembakau. Semakin banyak tunas yang terbentuk pada eksplan menunjukkan tingginya tingkat multiplikasi suatu tanaman (Paserang & Riska, 2022). Berdasarkan Tabel 3 perlakuan P2M2 (BAP 3 ppm; kinetin 4 ppm) menjadi perlakuan terbaik dalam menginduksi jumlah tunas, sedangkan perlakuan P3M2 (BAP 4 ppm; kinetin 4 ppm) mengalami penurunan jumlah tunas pada eksplan tembakau. Hal ini diduga konsentrasi sitokinin yang terlalu tinggi mengakibatkan penurunan jumlah tunas pada eksplan tembakau. Penelitian ini selaras dengan Erawati et al. (2021) dimana interaksi BAP dan kinetin terhadap tanaman vanili memiliki jumlah tunas yang fluktuatif dengan nilai yang cenderung mengalami penurunan seiring peningkatan jumlah sitokinin yang diberikan. Pada penelitian Praseptiana et al. (2017) faktor BAP 0,5 mg/L; 1 mg/L; 2 mg/L yang diinteraksikan dengan kinetin taraf 0,5 mg/L; 1 mg/L memiliki jumlah tunas dengan nilai tertinggi pada perlakuan 0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L kinetin sebesar 4,46 tunas, sedangkan nilai terendah dihasilkan pada perlakuan 2,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L kinetin sebesar 1 tunas. Penurunan jumlah tunas diduga karena konsentrasi sitokinin yang terdapat pada eksplan terlalu tinggi sehingga berpotensi dalam menghambat pertumbuhan.

Pengaruh kinetin dengan penambahan BAP yang berbeda pada perlakuan P2M2 (BAP 3 ppm; kinetin 4 ppm) memiliki nilai tidak berbeda nyata dan cenderung lebih tinggi dari P0M2 (BAP 0 ppm + kinetin 4 ppm), dan P3M2 (BAP 4 ppm + kinetin 4 ppm). Jumlah tunas pada taraf kinetin yang sama mengalami peningkatan seiring dengan penambahan BAP, seperti yang dijelaskan bahwa kinetin mampu meningkatkan pembentukan tunas dan memacu morfogenesis pada jaringan eksplan (Wulannanda et al., 2023). Dalam penelitian ini konsentrasi BAP yang lebih rendah dari kinetin cenderung memiliki jumlah tunas yang lebih banyak. Berdasarkan data Tabel 3 penambahan BAP pada konsentrasi yang lebih rendah daripada konsentrasi kinetin dapat meningkatkan jumlah tunas seperti perlakuan P1M1, P1M2, P2M2. Penelitian serupa yang telah dilakukan Hapsari et al. (2023) pada tanaman pisang barangan menghasilkan tunas terbaik pada perlakuan 2 ppm BAP + 3 ppm kinetin sebanyak 5–8 tunas dengan morfologi daun yang lebih besar. Penambahan BAP yang melebihi batas optimal dapat menimbulkan efek buruk pada induksi tunas (Nazir et al., 2022). Hal ini dapat dilihat pada perlakuan P3M1 dan P3M2, kedua perlakuan tersebut mengalami penurunan jumlah tunas pada konsentrasi BAP dan kinetin yang sama besar.

Jumlah Daun

Berdasarkan Tabel 4 perlakuan P2M2 (BAP 3 ppm; kinetin 4 ppm) menjadi perlakuan terbaik pada variabel jumlah daun. Hal tersebut dapat dilihat dengan penambahan kinetin menunjukkan penambahan jumlah daun pada eksplan. Menurut Ningrum et al. (2024) penambahan medium kultur dengan kinetin dapat meningkatkan jumlah daun. Hal tersebut diperkuat pada dasar teori kinetin yang menyatakan zat pengatur tumbuh golongan sitokinin yang dapat mendorong pertumbuhan daun.

Pembentukan dan pembelahan sel dalam organ tumbuhan dipengaruhi oleh sitokinin, seperti kinetin. Eksplan yang digunakan juga berperan dalam mempartisi jaringan meristem karena mengandung banyak pengendali pertumbuhan alami, yang mendorong perkembangan susunan daun. Namun, penambahan sitokinin dalam jumlah yang melebihi optimal dapat menyebabkan ukuran batang dan daun menjadi kecil dan berwarna pucat (Riono, 2019). Dalam penelitian ini penambahan BAP yang berlebihan menyebabkan daun mengalami nekrosis. Pada Gambar 2 perlakuan P2M0 dan

P3M0 menunjukkan eksplan yang mengalami nekrosis pada pucuk daun. Menurut Zulkarnain (2018) vitrifikasi dan nekrosis berkaitan erat dengan tingkat konsentrasi BAP dalam medium kultur. Hal tersebut menjadi masalah yang serius dalam kultur *in vitro* karena pucuk yang dihasilkan memiliki ruas pendek dan menurunkan jumlah eksplan layak di subkultur, seiring meningkatnya konsentrasi BAP dapat memengaruhi frekuensi vitrifikasi dan nekrosis. Penambahan kinetin dapat membantu mengurangi efek buruk yang dihasilkan oleh BAP.

Penambahan BAP dalam medium mengakibatkan penurunan rasio palisade/spons yang lebih signifikan, terutama jika tidak ada kinetin menunjukkan penurunan dalam perkembangan anatomi daun (Manokari et al., 2022). Hal ini karena BAP memiliki dampak yang negatif terhadap ketebalan sklerenkim karena sering dikaitkan dengan adanya senyawa fenolik. Senyawa fenolik berhubungan secara signifikan terhadap produksi lignin, yang menjadi salah satu penyusun dinding sel tanaman (Tikhomirova et al., 2018). Jadi, daun yang memiliki ketebalan dinding sel rendah menyebabkan konduktivitas hidrolik yang menurun.

Konduktivitas hidrolik yang terdapat dalam eksplan mencerminkan terbentuknya jaringan xilem daun (Falchi et al., 2020). Sehingga tunas yang ditumbuhkan dalam medium BAP menunjukkan rendahnya konduktivitas hidrolik yang berkorelasi dengan nekrosis pada pucuk. Menurut Martins et al. (2022) tunas yang diberi BAP menunjukkan tanda-tanda stres fisiologi yang jelas karena kandungan pigmen fotosintesis rendah dan aktivitas dari antioksidan yang tinggi. Penelitian yang telah dilakukannya menjelaskan kombinasi 1,25 μM BAP + 1,25 μM kinetin lebih direkomendasikan karena dapat mengurangi dampak negatif dari BAP pada tanaman *in vitro*.

SIMPULAN

Pemotongan dengan TCL efektif dalam mendukung multiplikasi tunas pada semua eksplan. Pemberian *benzyl amino purine* (BAP) berpengaruh nyata terhadap parameter kedirian eksplan berkalus dan tidak berbeda nyata terhadap parameter lainnya. Konsentrasi BAP yang memberikan kedirian eksplan berkalus terbaik adalah konsentrasi 3 ppm BAP yang dapat menginduksi kalus dalam waktu 10,78 HST, sedangkan pemberian kinetin berpengaruh sangat nyata terhadap kedirian eksplan bertunas. Konsentrasi kinetin terbaik pada kedirian eksplan bertunas ditunjukkan oleh perlakuan P2M2 yaitu 4 ppm, yang dapat menginduksi tunas dalam waktu 8,3 HST. Interaksi konsentrasi BAP dan kinetin berpengaruh sangat nyata terhadap variabel kedirian eksplan bertunas, jumlah tunas, dan jumlah daun. Konsentrasi BAP 3 ppm + kinetin 4 ppm menjadi perlakuan terbaik yang dapat menginduksi kedirian eksplan bertunas dalam waktu 8,3 HST, jumlah tunas, 81,3, dan jumlah daun 142,3 helai.

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait penggunaan komponen eksternal lain sebagai pendukung percepatan regenerasi eksplan tembakau. Komponen eksternal baik dalam penggunaan media, penggunaan nanoteknologi, penggunaan agar, penggunaan arang, penggunaan glukosa, dan sebagainya. Sehingga diperoleh metode regenerasi eksplan tembakau yang lebih banyak dan cepat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Laboratorium Ekofisiologi dan Kultur Jaringan Program Studi Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Jember dan Perusahaan Tarutama Nusantara (TTN) dan LP2M Universitas Jember yang telah memfasilitasi dan mendukung penelitian ini.

REFERENSI

- Badan Pusat Statistik (BPS) Provinsi Jawa Timur. (2023). Ekspor dan impor. (7 September 2023, 21:10 WIB). Diakses dari <https://www.bps.go.id>.
- Badan Pusat Statistik (BPS). (2024). *Buletin statistik perdagangan luar negeri*, 19(2), 23-24.
- Anindiyati, I., & Erawati, D. N. (2020). Induksi tunas tembakau (*Nicotiana tabacum L*) varietas Kasturi 2 dengan variasi konsentrasi bap secara *in vitro*. *Agriprima, Journal of Applied Agricultural Sciences*, 4(1), 18-25.

- Arafah, D. L., Hernawati, D., & Nuryadin, E. (2021). The effect of bap (6-benzyl amino purine) on the growth of potato axillary shoots (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro*. *Jurnal Biologi Tropis*, 21(3), 641-647. doi: 10.29303/jbt.v21i3.2823.
- Djajadi, D. (2015). Tobacco diversity in Indonesia. *Berkala Penelitian Hayati*, 20(2), 27-32. doi: 10.23869/106
- Dewi, E. S. (2016). *Bahan ajar pemuliaan tanaman*. Aceh: Unimal Press.
- Dewi, K. P., Nugroho, L. H., Sasongko, A. B., & Hidayati, L. (2023). Pengaruh konsentrasi sukrosa terhadap kadar piperin pada kalus cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.). *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*, 49-58. doi: 10.24002/biota.v8i2.6347.
- Erawati, D. N., Fisdiana, U., & Humaida, S. (2017). Peran benzyl amino purine pada induksi tunas kultur tembakau white burley. *Jurnal Ilmiah INOVASI*, 17(3), 127. doi: 10.25047/jii.v17i3.553.
- Erawati, D. N., Mawaddah, Y., Humaida, S., & Wardati, I. (2021). Optimasi konsentrasi kinetin dan benzyl amino purine pada kultur tunas vanili (*Vanilla planifolia*). *Jurnal Ilmiah Inovasi*, 21(1), 54-57. doi: 10.25047/jii.v21i1.2636.
- Falchi, R., Petrusa, E., Braidot, E., Sivilotti, P., Boscutti, F., Vuerich, M., ... Casolo, V. (2020). Analysis of non-structural carbohydrates and xylem anatomy of leaf petioles offers new insights in the drought response of two grapevine cultivars. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1457. doi: 10.3390/ijms21041457.
- Faramayuda, F. E., & Ramelan, R. S. (2016). Optimasi induksi kalus tanaman cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl) dengan berbagai variasi zat pengatur tumbuh. *Kartika: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 4(2), 21-25. doi: 10.26874/kjif.v4i2.62.
- Hapsari, B. W., Wulandari, D. R., Rantau, D. E., Al-Hafiih, E., & Martin, A. F. (2023). Multiplikasi tunas *in vitro* sukun bone (*Artocarpus altilis* (Park.) Fosberg) pada media wp dengan penambahan sitokinin dan adenin sulfat. *National Multidisciplinary Sciences*, 2(3), 278-284. doi: 10.32528/nms.v2i3.297.
- Hidayah, V. N., & Dewanti, P. (2023). Thin cell layer method. *Jurnal Agrotek Tropika*, 11(1), 89-95.
- Isnandza, H. W. (2015). Pengaruh konsentrasi bap (6-benzyl amino purin) terhadap multiplikasi tunas tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) melalui teknik *in vitro* (Skripsi sarjana). Universitas Jember, Jawa Timur, Indonesia.
- Karamina, H., Indawan, E., & Agustina, F. I. K. (2022). Efektivitas perbedaan konsentrasi bap terhadap pertumbuhan planlet pisang cavendish dengan teknik thin cell layer. *Kultivasi*, 21(2). doi: 10.24198/kultivasi.v21i2.35373.
- Khozin, M. N., & Restanto, D. P. (2022). Regenerasi tanaman porang (*Amarphophallus onchophyllus*) secara *in vitro* dengan eksplan daun. *Agritrop: Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian (Journal of Agricultural Science)*, 20(1), 59-65.
- Khozin, M. N., Restanto, D. P., & Kusbianto, D. E. (2022). Somatic embryogenesis direct and indirect on porang plants (*Amarphophallus onchophyllus*). *Jurnal Agrotek Indonesia (Indonesian Journal of Agrotech)*, 7(2), 42-45.
- Lee, Y., & Park, J. (2022). Advances in thin cell layer (tcl) technology for plant tissue culture: A review of recent applications and innovations. *Journal of Plant Physiology*, 265, 153-162. doi: 10.1016/j.jplph.2022.153162.
- Manokari, M., Badhepuri, M. K., Cokulraj, M., Dey, A., Rajput, V. D., Minkina, T., & Shekhawat, M. S. (2022). Correction to: Differential morphometric and micro-morpho-anatomical responses toward types of culture vessels used in micropropagation of *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 150(1), 251. doi: 10.1007/s11240-022-02307-3.
- Martins, J. P. R., Wawrzyniak, M. K., Ley-López, J. M., Kalemba, E. M., Mendes, M. M., & Chmielarz, P. (2022). 6-Benzylaminopurine and kinetin modulations during *in vitro* propagation of *Quercus robur* (L.): An assessment of anatomical, biochemical, and physiological profiling of shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 151(1), 149-164. doi: 10.1007/s11240-022-02339-9.

- Mawaddah, S. K., Saputro, N. W., & Lestari, A. (2021). Pemberian naphthalene acetic acid (naa) dan kinetin terhadap multiplikasi tunas tanaman jahe (*Globba leucantha* var. *bicolor* Holttum) pada kultur *in vitro*. *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*, 23(1), 43-50. doi: 10.14710/bioma.23.1.43-50.
- Mok, D. W. S., & Mok, M. C. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(1), 89-118. doi: 10.1146/annurev.arplant.52.1.89.
- Nazir, U., Gul, Z., Shah, G. M., & Khan, N. I. (2022). Interaction effect of auxin and cytokinin on *in vitro* shoot regeneration and rooting of endangered medicinal plant *Valeriana jatamansi* Jones through tissue culture. *American Journal of Plant Sciences*, 13(2), 223-240. doi: 10.4236/ajps.2022.132014.
- Ningrum, W. C., Jumadi, R., & Lailiyah, W. N. (2024). Pengaruh pemberian naa dan kinetin terhadap pertumbuhan eksplan pisang cavendish (*Musa paradisiaca* L.) melalui teknik kultur jaringan secara *in vitro*. *Tropicrops (Indonesian Journal of Tropical Crops)*, 7(1), 11-23. doi: 10.30587/tropicrops.v7i1.7454.
- Nolla, R. Z., Nurjanah, R., & Mustika, C. (2020). Analisis pengaruh inflasi, kurs, dan produksi terhadap ekspor tembakau di Indonesia. *E-Journal Perdagangan Industri dan Moneter*, 8(2), 77. doi: 10.22437/pim.v8i2.8767.
- Paserang, A. P., & Riska, R. (2022). Aplikasi hormon bap, naa, dan air kelapa terhadap multiplikasi pisang cavendish (*Musa acuminata* L.) secara *in vitro*. *Biocelebes*, 16(1), 38-46. doi: 10.22487/bioceb.v16i1.15949.
- Pendong, S., Tilaar, W., Tombuku, J. L., & Tumbel, S. L. (2020). Perbanyakkan krisan *Chrysanthemum indicum* L. varietas Riri menggunakan zat pengatur tumbuh kinetin dengan teknik kultur *in vitro*. *Majalah INFO Sains*, 1(2), 7-21. doi: 10.55724/jis.v1i2.12.
- Phong, T. H., Hieu, T., Tung, H. T., Mai, N. T. N., Khai, H. D., Cuong, D. M., ... & Nhut, D. T. (2023). Silver nanoparticles enhance the *in vitro* plant regeneration via thin cell layer culture system in purple passion fruit. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1(1), 1-13. doi: 10.1007/s11240-023-02566-8.
- Praseptiana, C., Darmanti, S., & Prihastanti, E. (2017). Multiplikasi tunas tebu (*Saccharum officinarum* L. var. Bululawang) dengan perlakuan konsentrasi bap dan kinetin secara *in vitro*. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*, 2(2), 153-160. doi: 10.14710/baf.2.2.2017.153-160.
- Purba, R. V. (2017). Induksi kalus eksplan daun tanaman anggur (*Vitis vinifera* L.) dengan aplikasi 2,4-D secara *in vitro*. *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika*, 6, 2301-6515.
- Rananda, A. I., & Khozin, M. N. (2023). The effect of different sterilization methods on obtaining sterile leaf explants of porang (*Amorphophallus muelleri* B.). *Journal of Soilscape and Agriculture*, 2(1), 1-11.
- Rahma, S. (2020). Pengaruh kinetin dan 2,4-D terhadap pertumbuhan eksplan jeruk kasturi (*Citrofortunella microcarpa*) secara *in vitro* (Skripsi sarjana). Universitas Islam Riau, Riau, Indonesia.
- Riono, Y. (2019). Zat pengatur tumbuh kinetin untuk pertumbuhan subkultur pisang barangan (*Musa paradisiaca* L.) dengan metode kultur jaringan. *Jurnal Agro Indragiri*, 4(1), 22-33. doi: 10.32520/jai.v4i1.1049.
- Royani, J. I., Chotimah, S., Utami, R. N., Fatma, W. S., & Fatmawaty, A. P. (2021). Effect of benzylaminopurine and kinetin for shoot multiplication of *Indigofera* (*Indigofera zollingeriana* Miq.) by *in vitro* culture. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 637(1), 012053. doi: 10.1088/1755-1315/637/1/012053.
- Schuchovski, C., Sant'Anna-Santos, B. F., Marra, R. C., & Biasi, L. A. (2020). Morphological and anatomical insights into *de novo* shoot organogenesis of *in vitro* 'Delite' rabbiteye blueberries. *Heliyon*, 6(11).
- Teixeira da Silva, J. A., & Dobránszki, J. (2013). Thin cell layer technology: A brief history, new perspectives, and its application in plant micropropagation. *The Open Horticulture Journal*, 6(1), 17-27. doi: 10.2174/1874840601306010017.

- Tikhomirova, L. I., Bazarnova, N. G., & Sinitsyna, A. A. (2018). Histochemical study of xylem cells in *in vitro* culture of *Iris sibirica* L. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 44, 860-869. doi: 10.1134/S1068162018070129.
- Tobacconomics. (2023). The economics of tobacco farming in Indonesia. Diakses dari www.tobacconomics.org.
- Unsong, N., Tilaar, W., & Sumayku, B. R. (2022). Sterilisasi dan penggunaan zat pengatur tumbuh (benzil amino purin) terhadap pertumbuhan eksplan tunas pisang abaka (*Musa textilis* Nee) melalui teknik *in vitro*. *Agri-Sosioekonomi*, 18(3), 717-724.
- Wahyudiningsih, T. S., Farid, N., Novianto, E. D., & Noviantika, T. (2022). Induksi kalus dari eksplan biji immature kepel (*Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook. f. & Th.) secara *in vitro*. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 16(1), 1-9.
- Wardhono, A., Arifandi, J. A., & Indrawati, Y. (2019). *Standar dan mutu tembakau besuki na-oogst*. Jember: CV. Pustaka Abadi.
- Wulannanda, A., Anwar, S., & Kusmiyati, F. (2023). Kajian penambahan kinetin dan 2,4-D terhadap pertumbuhan kultur jaringan tanaman pisang barangan (*Musa paradisiaca* L.) pada fase subkultur. *Agroteknika*, 6(1), 1-12. doi: 10.55043/agroteknika.v6i1.161.
- Zhang, H., Li, F., Liu, X., & Yang, Y. (2023). Application of thin cell layer culture in plant biotechnology: Advances and challenges. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 154(3), 443-457. doi: 10.1007/s11240-023-02055-2.
- Zulkarnain, Z. (2018). Pengaruh iaa dan bap terhadap proliferasi kalus serta vitrifikasi dan nekrosis pucuk pada kultur jaringan *Guichenotia macrantha* Turcz. *Buletin Agronomi Universitas Jambi*, 1, 11-15.