

Induksi Perakaran Teh (*Camellia sinensis* L.) Secara *in Vitro* pada Klon yang Berbeda

Fitriana Ilma Farida dan Wirdhatul Muslihatin

Departemen Biologi, Fakultas Ilmu Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

e-mail: w_muslih@bio.its.ac.id

Abstrak—Pembentukan akar teh (*Camellia sinensis* L.) merupakan tahapan penting secara *in vitro*. Inisiasi perakaran tanaman dapat dipacu dengan menambahkan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi ZPT untuk inisiasi akar tanaman teh secara *in vitro* pada klon teh yang berbeda. Klon yang digunakan adalah Tea Research of Sri Lanka (TRI) 2024 dan TRI 2025. Eksplan berupa daun, diinokulasikan pada media induksi kalus dengan penambahan BAP 2 mg/l dan NAA 3 mg/l. Kalus yang terbentuk disubkultur pada media induksi tunas dengan penambahan BAP 3 mg/l, selanjutnya, disubkultur ke dalam media perakaran dengan penambahan IBA (*Indole Butyric Acid*) 0, 1, 2, 3 mg/l. Hasil penelitian menunjukkan, pada media perakaran tidak terbentuk akar, tetapi terbentuk embrio somatik dengan tahap yang berbeda, yaitu tahap globular, hati dan torpedo. Embrio somatik yang terbentuk memiliki perbedaan warna yaitu, hijau kekuningan, hijau dan hijau kecoklatan. Selain itu, mempunyai struktur: remah, intermediet dan kompak, serta mempunyai berat basah embrio somatik sebesar 10-290 mg.

Kata Kunci—*Camellia sinensis* L., IBA Perakaran, Teh, TRI 2024, TRI 2025.

I. PENDAHULUAN

TEH (*Camellia sinensis* L.) mengandung sejumlah besar polifenol, kafein, dan asam amino. Komponen polifenol utama adalah *catechins*, *epicatechin* (EC), *epicatechin-3-gallate* (ECG), *epigallocatechin* (EGC), dan *epigallocatechin-3-gallate* (EGCG) dan flavonoid, yang diketahui telah banyak berkontribusi pada fungsi biologis, seperti antimutagenik, antikanker, antioksidan dan sebagai pengikat radikal bebas [1][2][3], dan [4]. Kandungan asam amino, polifenol dan kafein merupakan faktor biokimia utama yang mempengaruhi kualitas teh [3]. Teh yang berkualitas tinggi akan meningkatkan harga teh [5].

Teh dibedakan menjadi dua varietas yakni, *C. sinensis* var. *assamica* yang berasal dari Assam dan *C. sinensis* var. *sinensis* yang berasal dari China [6][7]. Teh varietas *assamica* banyak dibudidayakan dan diproduksi dalam skala besar untuk kebutuhan industri di negara-negara berkembang seperti Indonesia [8].

Klon yang digunakan dalam penelitian ini adalah klon TRI 2024 dan TRI 2025 yang berasal dari varietas *assamica*. Klon TRI 2024 memiliki kandungan polifenol, asam amino dan kafein yang lebih tinggi dibandingkan dengan TRI 2025 dan memiliki produktivitas yang lebih rendah sebesar 2500 kg/ha/tahun, sedangkan klon TRI 2025 memiliki produktivitas sebesar 2.800 kg/ha/tahun [9][10], dan [11].

Teh dapat diperbanyak baik dengan biji atau dengan stek [12]. Perbanyakannya secara konvensional teh sangat lambat dan bahan tanam teh yang tidak cukup tersedia sepanjang tahun karena kemampuan perakaran tergantung musim sehingga menghasilkan tingkat kelangsungan hidup rendah pada pembibitan. Selain itu, perbanyakannya melalui biji sulit dilakukan karena benih yang dihasilkan tergantung pada tanaman yang heterogen karena tanaman teh bersifat allogami, sehingga sulit untuk mempertahankan karakter unggul, serta dibutuhkan waktu pematangan biji selama 12-18 bulan [13][14], dan [15].

Teknik kultur *in vitro* ini dapat menjadi pilihan ideal untuk pengelakan sistem multiplikasi konvensional dalam waktu yang relatif singkat [16]. Pembentukan akar merupakan tahapan penting dalam perbanyakannya bibit secara *in vitro*. Inisiasi perakaran tanaman dapat dipacu dengan menambahkan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) pada media tanam. Jenis dan konsentrasi ZPT mempengaruhi pertumbuhan tanaman. ZPT yang biasanya digunakan untuk induksi akar adalah golongan auksin [17]. IBA (*Indole Butyric Acid*) merupakan jenis auksin yang lebih efisien dalam menstimulasi perakaran dibandingkan dengan IAA [18]. Secara komersial IBA telah diketahui sebagai auksin utama yang digunakan dalam induksi akar adventif [19].

Pengetahuan dan penguasaan sistem regenerasi dari setiap tanaman secara *in vitro* sangat diperlukan karena sangat menentukan dalam program peningkatan produktivitas tanaman teh melalui kultur jaringan untuk keperluan perbanyakannya [20].

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh konsentrasi zat pengatur tumbuh untuk inisiasi akar tanaman teh (*C. sinensis* L.) secara *in vitro* pada klon TRI 2024 dan TRI 2025.

II. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Besar Perbenihan dan Proteksi Tanaman Perkebunan (BBPPTP) Surabaya dan Laboratorium Biosains dan Teknologi Tumbuhan, Departemen Biologi, Fakultas Ilmu Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya pada bulan Desember 2016 – Juli 2017.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *dissecting kit*, *glassware* (botol kultur, erlenmeyer, cawan Petri, labu takar, gelas ukur, gelas beaker), pipet, *laminar air flow* (LAF),

autoklaf, pH meter, bunsen spirtus, timbangan analitik, *magnetic stirrer*, penyemprot alkohol (*hand sprayer*), lemari pendingin, *oven*, kompor, mikroskop stereo, kamera.

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah daun tanaman teh (*C. sinensis* L.) klon TRI 2024 dan TRI 2025, aquades, alkohol 70%, bahan dasar MS (*Murashige dan Skoog*), alkohol 96%, spirtus, BAP 2 mg/l, BAP 3 mg/l, and NAA 3 mg/l, IBA 0, 1, 2, 3 mg/l, kertas label, *tissue*, korek api, *aluminium foil* dan plastik *wrap*.

C. Cara Kerja

Penelitian ini terdiri atas beberapa tahapan yakni sterilisasi alat dan ruang kerja, induksi kalus, induksi tunas dan induksi perakaran.

1) Sterilisasi alat dan Ruang kerja

Sterilisasi alat menggunakan autoklaf (sterilisasi panas basah) atau oven (sterilisasi panas kering) dapat menyebabkan kematian bakteri, virus, jamur dan spora [21]. Pertama, disiapkan peralatan kaca (*glassware*) dan peralatan penanaman (*dissecting kit*) yang akan digunakan. Peralatan kaca (botol kultur) dan peralatan penanaman disterilisasi menggunakan oven selama 1 jam dengan suhu 100°C. Peralatan penanaman yang tidak tahan panas disterilisasi menggunakan alkohol 70% [22].

Sterilisasi ruang kerja menggunakan LAF. Sebelum LAF digunakan, dibersihkan seluruh bagian permukaan menggunakan alkohol 70%. Dihubungkan kabel daya ke stop kontak. Ditekan tombol power disebalah kiri alat. Dihidupkan lampu kemudian dihidupkan blower. Disiapkan *dissecting kit* dan *glass ware* yang akan digunakan untuk sterilisasi eksplan dan inokulasi ke dalam LAF. Sebelum peralatan dimasukkan dalam LAF harus disemprot dengan alkohol 70% terlebih dahulu [23]. Pekerjaan dalam kondisi aseptik dapat dilakukan dan LAF siap digunakan untuk sterilisasi eksplan dan inokulasi eksplan. Saat proses inokulasi eksplan, alat-alat *dissecting kit* disterilisasi dengan alkohol 96% dan dibakar dengan nyala api spiritus setiap kali akan digunakan di LAF [24].

2) Induksi Kalus

Eksplan yang digunakan berupa daun. Sterilisasi eksplan dilakukan dua tahap, yaitu sterilisasi permukaan diluar dan di dalam LAF. Setelah selesai, eksplan diambil dengan pinset steril dan diletakkan di atas cawan Petri yang telah dilapisi *tissue*. Eksplan daun dipotong dengan ukuran yang lebih kecil [14][25]. Selanjutnya, eksplan ditanam dalam media dengan bagian abaksial yang kontak dengan media [26]. Medium yang digunakan adalah media MS dengan penambahan sukrosa 30 gr/l, agar 8 gr/l, BAP 2 mg/l, dan NAA 3 mg/l. Dijaga tetap keasaman pH 5,7-5,8 [12]. Kultur diinkubasi selama 4 minggu dalam ruang gelap pada temperatur 27° C, hingga terbentuk kalus [12][14], dan [27].

3) Induksi Tunas

Kalus yang telah terbentuk kemudian disubkultur pada media induksi tunas. Medium yang digunakan adalah media MS dengan penambahan sukrosa 30 gr/l dan agar 8 gr/l dan BAP 3 mg/l. Dijaga tetap keasaman pH 5,7-5,8. Kultur diinkubasi selama 4 minggu dengan fotoperiodik 16 jam pada temperatur 27° C [14][28].

4) Induksi Perakaran

Tunas yang telah terbentuk kemudian disubkultur pada media MS dengan penambahan sukrosa 30 gr/l, agar 8 gr/l dan berbagai konsentrasi IBA (0, 1, 2 dan 3 mg/l). Dijaga tetap keasaman pH 5,7-5,8. Kultur diinkubasi selama 4 minggu dengan fotoperiodik 16 jam pada temperatur 27° C [14][28].

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Induksi Kalus

Penelitian ini diawali dengan penanaman eksplan daun untuk menghasilkan kalus. Komposisi media yang digunakan dalam menginduksi kalus yaitu BAP 2 mg/l dan NAA 3 mg/l. Inisiasi kalus terjadi setelah 3 minggu inkubasi dan pada inkubasi minggu ke-6 kalus semakin besar dan berbentuk bulatan-bulatan kecil. Kalus yang terbentuk mempunyai struktur remah (*friable*). Struktur kalus yang remah merupakan kalus yang memiliki kualitas baik [29].

Menurut George *et al.* (2008) kalus embriogenik dan kalus non-embriogenik dapat dibedakan dari morfologi dan warna kalus [30]. Berdasarkan ciri-ciri kalus yang diamati, menurut Nagesh *et al.* (2010), George *et al.* (2008), dan Seran *et al.* (2007) kalus yang terbentuk merupakan kalus embriogenik [27][30], dan [31]. Kalus embriogenik mempunyai struktur remah, berwarna kuning kehijauan hingga hijau, permukaan yang tidak rata yang sebagian besar berbentuk agregat-agregat kecil yang berbentuk nodul dan sel mengandung pati [27][31], dan [32].

Tabel 1.
Morfologi kalus embriogenik setelah inkubasi selama 6 minggu.

	Klon	
	TRI 2024	TRI 2025
Morfologi Kalus		
Struktur	Remah	Remah
Bentuk	Bulatan kecil	Bulatan kecil
Warna	Hijau kekuningan	Hijau

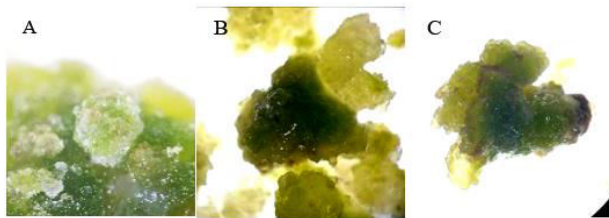
Kalus embriogenik adalah massa pro-embrio yang tumbuh pada media yang mengandung auksin, yang dapat berkembang menjadi embrio somatik setelah disubkultur ke dalam media yang sesuai dan tidak mengandung auksin [33][34]. Warna hijau pada kalus adalah akibat efek sitokinin dalam pembentukan klorofil. Warna kalus mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan, sehingga semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofilnya [29]. Menurut Dehghani *et al.* (2011) warna dan tekstur kalus yang dihasilkan tergantung pada eksplan yang digunakan, umur kalus dan kondisi pertumbuhannya [35].

B. Induksi Tunas dan Perakaran

Kalus yang terbentuk disubkultur pada media MS dengan penambahan BAP 3 mg/l. Setelah diinkubasi selama 8 minggu tidak terbentuk tunas pada klon TRI 2024 dan TRI 2025, tetapi terbentuk embrio somatik. Pada penelitian Gonbad *et al.*

(2014) BAP 3 mg/l memiliki rata-rata jumlah pembentukan tunas yang tinggi pada klon Iran 100 [28]. Selain itu, berdasarkan penelitian Aye *et al.* (2008) metode regenerasi tunas yang berasal dari eksplan daun paling optimum menggunakan media dengan komposisi BAP 3 mg/l [36]. Regenerasi tanaman melalui kultur jaringan bersifat spesifik. Formulasi media yang digunakan untuk meregenerasikan klon tertentu belum tentu dapat digunakan untuk klon lainnya [37].

Secara umum tahap perkembangan embriogenesis memiliki tiga tahap perkembangan yang berbeda, yakni: tahap globular, hati, dan torpedo (Gambar 1.) [38].



Gambar. 1. Tahap embrio somatik yang terbentuk pada media BAP 3 mg/l. A. Globular (Perbesaran 32x), B. Hati (Perbesaran 24x), C. Torpedo (Perbesaran 28x).

Embrio somatik tahap globular yang teramati merupakan tahap perkembangan dari pro-embrio yang dicirikan dengan bentuk yang bulat atau membulat (Gambar 1A). Selanjutnya, embrio somatik tahap globular berkembang menjadi tahap hati yang dicirikan adanya cekungan. Ketika awal perkembangan bentuk hati terjadi pembentukan SAM (*Shoot Apical Meristem*) [39][40]. RAM (*Root Apical Meristem*) juga terbentuk pada tahap ini ketika terbentuk perpanjangan hipokotil dan pembentukan kotiledon [41]. Leysner dan Day (2002) menyatakan bahwa embrio somatik tahap hati terjadi pembentukan satu atau dua kotiledon [42]. Terbentuknya kotiledon dimulai dengan adanya lekukan yang membentuk dua area bagian atas tetapi masih pendek (Gambar 1B). Perkembangan lanjut dan struktur bipolar semakin jelas pada tahap torpedo. Tahap torpedo ini dicirikan adanya cekungan pada tahap hati semakin dalam sehingga membentuk perpotongan (Gambar 1C). Hal ini ditandai dengan pemanjangan embrio dan pemanjangan kotiledon [39].

Embrio somatik yang telah terbentuk disubkultur pada media perakaran dengan komposisi IBA 0,1,2,3 mg/l. Setelah diinkubasi selama 6 minggu tidak terjadi inisiasi akar pada klon TRI 2024 maupun klon TRI 2025. Meskipun tidak membentuk akar, namun terdapat respon yang berbeda-beda pada embrio somatik yang dapat diamati pada media IBA 0,1,2,3 mg/l, yaitu morfologi embrio (struktur makroskopis dan warna embrio somatik), dan berat basah embrio somatik. Berdasarkan penelitian Goo *et al.* (1997) BAP 3 mg/l efektif dalam menginduksi dan menginisiasi morfogenesis dalam proses embriogenesis somatik langsung pada tanaman teh [43].

Embriogenesis somatik terdiri atas dua tahap. Pertama, terjadi diferensiasi sel somatik menjadi sel embriogenik secara langsung (tanpa tahap dediferensiasi) atau secara tidak langsung (dengan dediferensiasi dan biasanya melibatkan tahap kalus) dan berproliferasi. Tahap embriogenik langsung terjadi pada teh klon TRI 2024 maupun teh klon TRI 2025

pada penelitian ini. Kedua, setelah terjadi stimulus oleh *inducer*, terjadi inisiasi embrio somatik dimana sel atau pro-embrio mulai berkembang dan masuk ke dalam tahap maturasi sel embriogenik menjadi embrio somatik [44][45]. *Inducer* yang digunakan dalam tahap maturasi kalus embrio somatik merupakan media tanpa auksin, yakni media induksi perakaran pada media ini [33][34].

C. Morfologi Embrio Somatik

Struktur makroskopis dan warna embrio somatik merupakan kondisi morfologi embrio somatik. Warna embrio somatik merupakan gambaran visual embrio somatik sehingga dapat diketahui bahwa embrio somatik yang terbentuk sel-selnya masih aktif membelah atau mati. Berdasarkan pengamatan yang telah dilakukan, menunjukkan bahwa terdapat perbedaan warna dan tekstur embrio somatik teh pada media perakaran dengan komposisi IBA yang berbeda pada klon TRI 2024 dan TRI 2025 (Tabel 2-3).

Tabel 2.

Warna dan struktur embrio somatik klon TRI 2024 pada media perakaran.				
Komposisi Media	Warna Embrio Somatik		Struktur Embrio Somatik	
	Awal	Akhir	Awal	Akhir
IBA 0 mg/l	Hijau kekuningan	Hijau kecoklatan	Kompak	Kompak
IBA 1 mg/l	Hijau kekuningan	Hijau kecoklatan	Kompak	Kompak
IBA 2 mg/l	Hijau kekuningan	Hijau	Kompak	Kompak
IBA 3 mg/l	Hijau kekuningan	Hijau kekuningan	Kompak	Intermediet

Tabel 3.

Warna dan struktur embrio somatik klon TRI 2025 pada berbagai media perakaran.				
Komposisi Media	Warna Embrio Somatik		Struktur Embrio Somatik	
	Awal	Akhir	Awal	Akhir
IBA 0 mg/l	Hijau kekuningan	Hijau	Kompak	Kompak
IBA 1 mg/l	Hijau kekuningan	Hijau	Kompak	Kompak
IBA 2 mg/l	Hijau kekuningan	Hijau	Kompak	Kompak
IBA 3 mg/l	Hijau kekuningan	Hijau kekuningan	Kompak	Remah

Terjadi perubahan warna embrio somatik klon TRI 2024 pada media IBA 0 mg/l dan IBA 1 mg/l dari warna hijau kekuningan menjadi hijau kecoklatan. Perubahan warna menjadi coklat (*browning*) terjadi akibat adanya metabolisme senyawa fenol. *Browning* yang terjadi disebabkan ketidakseimbangan hormon, tetapi pada media yang sama tidak menunjukkan perubahan warna coklat pada klon TRI 2025. Hal ini membuktikan bahwa keseimbangan nutrisi dalam formulasi media bersifat spesifik [37][46].

Browning disebabkan pelepasan senyawa negatif dan disintegrasi sel. Reaksi ini dikatalis oleh enzim polifenol oksidase dan tirosinase. Fenol yang teroksidasi akan membentuk kuinon. Quinon adalah senyawa yang menyebabkan adanya warna coklat pada kultur kalus. Intensitas warna coklat berkorelasi positif dengan hiperaktifitas enzim oksidatif, sedangkan peningkatan enzim tersebut terkait dengan reaksi pertahanan jaringan dari stres

oksidatif. Peristiwa pencoklatan juga disebabkan oleh semakin bertambahnya umur sel atau jaringan dan menghambatnya proses pertumbuhan embrio somatik [1][29][46], dan [47].

Pada klon TRI 2025 pada media IBA 2 mg/l dan klon TRI 2025 pada media IBA 0, 1, dan 2 mg/l terjadi perubahan warna embrio somatik dari hijau kekuningan menjadi hijau. Perubahan warna menjadi hijau ini menandakan bahwa meningkatnya klorofil pada embrio somatik dan menunjukkan adanya perkembangan embriogenesis somatik, sedangkan pada konsentrasi IBA 3 mg/l pada kedua klon ini tidak mengalami perubahan warna [29].

Struktur makroskopis embrio somatik merupakan salah satu penanda kualitas suatu kalus (Tabel 2-3). Tekstur embrio somatik dapat bervariasi dari kompak hingga remah [48]. Hasil menunjukkan bahwa struktur kalus klon TRI 2024 dan TRI 2025 pada komposisi media IBA 0,1 dan 2 mg/l mempunyai tekstur kompak. Embrio somatik dengan struktur kompak (*non-friable*) apabila antara sel atau kumpulan sel yang lain tidak mudah dipisahkan dan bertekstur keras [49].

Struktur kalus klon TRI 2024 dan TRI 2025 pada komposisi media IBA 3 mg/l terjadi perubahan struktur embrio somatik dari kompak menjadi intermediet dan remah (*friable*). IBA termasuk ke dalam golongan auksin Terbentuknya embrio somatik berstruktur remah dipacu oleh adanya auksin dalam konsentrasi tinggi. Auksin menstimulasi pemanjangan sel dengan cara penambahan plastisitas dinding sel menjadi longgar, sehingga air dapat masuk ke dalam dinding sel. Oleh karena itu, embrio somatik yang remah mengandung banyak air karena tidak mengalami lignifikasi dinding sel, serta antara kumpulan sel yang satu dengan yang lain relatif mudah untuk dipisahkan [50]. Kondisi abnormal yang mungkin terjadi pada awal periode kultur media ini adalah sel epidermis dari hipokotil embrio terjadi pembesaran secara abnormal karena adanya auksin dengan konsentrasi yang tinggi dan hubungan dengan sel korteks terputus, sehingga menghasilkan kumpulan sel yang longgar [34]. Jadi, terbentuknya kalus yang remah merupakan hasil aktivitas pembelahan sel yang meningkat [48].

D. Berat Basah Embrio Somatik

Berat basah merupakan berat tanaman yang dipengaruhi oleh kandungan air dalam jaringan, unsur hara, dan hasil aktivitas metabolismenya [51]. Berdasarkan uji statistik antara komposisi media dengan klon teh tidak memiliki pengaruh terhadap berat basah embrio somatik, ditunjukkan dengan nilai p value sebesar 0,543 (p value > 0,05).

Tabel 4.

Komposisi Media	Klon	
	TRI 2024	TRI 2025
IBA 0 mg/l	10	110
IBA 1 mg/l	10	150
IBA 2 mg/l	40	160
IBA 3 mg/l	60	290

Peningkatan konsentrasi IBA pada setiap klon menunjukkan peningkatan berat basah embrio somatik. Berat basah terendah klon TRI 2024 ditunjukkan pada konsentrasi IBA 0 mg/l sebesar 10 mg, dan berat basah tertinggi ditunjukkan pada konsentrasi IBA 3 mg/l sebesar 60 mg. Pada klon TRI 2025

berat basah terendah ditunjukkan pada konsentrasi IBA 0 mg/l sebesar 110 gr, dan berat basah tertinggi ditunjukkan pada konsentrasi IBA 3 mg/l sebesar 290 gr.

Rendahnya berat basah klon TRI 2024 pada media IBA 0 mg/l dan IBA 1 mg/l sebesar 10 gr, disebabkan perkembangan embrio somatik menjadi *browning*. *Browning* terjadi akibat teroksidasinya fenol yang bersifat toksik dan dapat menghambat pertumbuhan atau bahkan menyebabkan kematian jaringan, sehingga berpengaruh terhadap berat basah yang rendah pada komposisi media ini [29][52].

Embrio somatik pada media IBA 3 mg/l memiliki berat basah yang paling tinggi dikarenakan sel embrio somatik mengalami pemanjangan dan diikuti dengan pembesaran sel dan peningkatan berat basahnya. Peningkatan berat basah embrio somatik menunjukkan berlangsungnya proses pertumbuhan sel dalam embrio somatik. Auksin berperan dalam meningkatkan plastisitas dinding sel. Sel dapat membesar sebagai respon terhadap perubahan tekanan turgor saat dinding sel meningkatkan plastisitas, sehingga air dapat berdifusi masuk ke dalam sel [50][53].

KESIMPULAN

Komposisi media perakaran dengan konsentrasi zat pengatur tumbuh IBA 0, 1, 2 dan 3 mg.l⁻¹ tidak dapat menginduksi akar pada tanaman teh klon TRI 2024 dan TRI 2025, tetapi terbentuk embrio somatik dengan tahap yang berbeda, yaitu tahap globular, hati dan torpedo. Embrio somatik yang terbentuk memiliki perbedaan warna yaitu, hijau kekuningan, hijau dan hijau kecoklatan. Selain itu, mempunyai struktur: remah, intermediet dan kompak, serta mempunyai berat basah embrio somatik sebesar 10-290 mg.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] E. Jang *et al.*, "1H NMR-Based Metabolomic Characterization During Green Tea (*Camellia sinensis*) Fermentation," *Food Res. Int.*, vol. 44, pp. 597–604, 2011.
- [2] A. Gramza, K. Józef, and A. Ryszard, "Tea Polyphenols – Their Antioxidant Properties And Biological Activity," *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, vol. 14, no. 3, pp. 219–235, 2005.
- [3] J. Tang, M. Y. S. Li, and Q. Tang, "A Review on the Identification Indicators of Tea Germplasm," *J. Agric. Sci. Technol.*, vol. 1, pp. 1–7, 2011.
- [4] J. D. K. Arachchi, M. T. K. Gunasekare, M. A. B. Ranatunga, P.A.N. Punyasiri, J. L., and R. P. Karunagodad, "Biochemical Characteristics of Tea (*Camellia L. spp.*) Germplasm Accessions in Sri Lanka: Correlation between Black Tea Quality Parameters and Organoleptic Evaluation," *Int. J. Tea Sci.*, vol. 10, no. 1, 2014.
- [5] C. Gilbert, "Impact Of Macroeconomic Factors On The Global Tea Economy," *J. Agric. Econ.*, vol. 61, no. 2, 2010.
- [6] V. R. Preedy, *Tea in Health and Disease Prevention*. London: Elsevier, 2013.
- [7] T. Balasaravanan, P. P.K, R. R. Kumar, N. Muraleedharan, and A.K. Shasany, "Genetic Diversity Among South Indian Tea Germplasm (*Camellia sinensis*, *C. assamica* and *C. assamica* spp. *lasiocalyx*) Using AFLP Markers," *Plant Sci.*, vol. 165, pp. 365–372, 2003.
- [8] M. S. Haq and Karyudi, "Upaya Peningkatan Produksi Teh (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) Melalui Penerapan Kultur Teknis," *War. PPTK*, vol. 27, no. 1, pp. 71–84, 2013.
- [9] L. Chen, A. Zeno, and M. C. Zong, *Global Tea Breeding: Achievements, Challenges and Perspective*. London: Springer, 2012.
- [10] P. Ponnuragan and U. I. Baby, "Morphological, Physiological and Biochemical Changes in Resistant and Susceptible Cultivars of Tea in Relation to Phomopsis Disease," *Plant Pathol. J.*, vol. 6, no. 1, pp. 91–94, 2007.
- [11] G. W. Sanderson, "The Chemical Composition of Fresh Tea Flush as

- Affected By Clone And Climate,” *Tea Quart.*, vol. 35, pp. 101–110, 1964.
- [12] Abeywardana, Ranaweera, Ranatunga, and A. Warnasooriya, “Somatic Embryogenesis Protocol for Tea (*Camellia Sinensis* (L.) O Kuntze),” in *Third International Research Symposium Rajarata University of Sri Lanka*, 2015.
- [13] A. Begum *et al.*, “Study On In Vitro Propagation Of Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) Through Different Explants,” *J. Glob. Biosci.*, vol. 4, no. 7, pp. 2878–2887, 2015.
- [14] Bidarigh, Sirous, and A. Ebrahim, “Study Effect Of IBA Hormone Levels On Rooting In Micro Cuttings Of Tea (*Camellia Sinensis* L.),” *J. Agric. Biol. Sci.*, vol. 1, no. 8, 2013.
- [15] T. K. Mondall, L. Amita, B. Malathi, and S. Paramvir, “Review of Plant Biotechnology and Applied Genetics: Recent Advances of Tea (*Camellia sinensis*) Biotechnology,” *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 76, pp. 195–25, 2004.
- [16] S. Boonerjee, M. I. Hoque, and R.H. Sarker, “Development Of In Vitro Micro Propagation System In Tea Plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] Using Shoot Tip and Nodal Segment Explants,” *Tea J. Bangladesh*, vol. 42, pp. 21–30, 2013.
- [17] T. Arlianti, F. S. Sitti, N. N. Kristina, and R. Oti, “Pengaruh Auksin IAA, IBA, Dan NAA Terhadap Induksi Perakaran Tanaman Stevia (*Stevia Rebaudiana*) Secara In Vitro,” *Bul. Litro*, vol. 24, no. 2, 2013.
- [18] B. Bartel, S. LeClere, M. Magidin, and B. K. Zolman, “Inputs To The Active Indole-3-Acetic Acid Pool: De Novo Synthesis, Conjugate Hydrolysis And Indole-3-Butyric Acid –Oxidation,” *J. Plant Growth Regul.*, vol. 20, pp. 198–216, 2001.
- [19] J. P. Slovin, S. B. Robert, and D. . Jerry, *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones: Auxin*. Elsevier, 1999.
- [20] Sukmadjaja, Deden, and M. Ade, “Regenerasi dan Pertumbuhan Beberapa Varietas Tebu (*Saccharum officinarum* L.) secara In Vitro,” *J. AgroBiogen*, vol. 7, no. 2, pp. 106–118, 2011.
- [21] R. A. B. D. Silva, R. L. Mário, H. F. Lúcia, I. M. Alexandra, and P. N. F., “Effect of Different Methods of Sterilization On the Inactivation of Bacterial Endotoxin (LPS) In Endodontic Files,” *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 38, pp. 270–272, 2007.
- [22] M. S. Fitri, T. Zairin, and H. Essy, “In-Vitro Effect of Combined Indole Butyric Acid (IBA) and Benzil Amino Purine (BAP) on the Planlet Growth of *Jatropha curcas* L.,” *J. Nat.*, vol. 1, no. 1, 2012.
- [23] Zulkarnain, *Kultur Jaringan Tanaman*. Jakarta: Bumi Aksara, 2009.
- [24] A. Fitrianti, “Efektivitas Asam 2,4 Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan Kinetin pada Medium MS dalam Induksi Kalus Sambilotto dengan Eksplan Potongan Daun,” Universitas Negeri Semarang, 2006.
- [25] P. Daisy, H. Sriyanti, and W. Ari, *Teknik Kultur Jaringan : Pengenalan dan Petunjuk Perbanyak Tanaman Secara Vegetatif-Modern*. Yogyakarta: Kanisius, 1994.
- [26] H. S. Dhaliwal, E. C. Yeung, and T. A. Thorpe, “IBA Inhibition of in Vitro Organogenesis in excised Tobacco Leaf Explants,” *Vitr. Cell. Dev. Biol.- Plant*, vol. 40, pp. 235–238, 2003.
- [27] T. H. Seran, K. Hirimburegama, and M. T. K. Gunasekare, “Production of Embryonic Callus from Leaf Explants of *Camelia sinensis* (L.),” *J. Nat.Sci.Foundation Sri Lanka*, vol. 35, no. 3, pp. 191–196, 2007.
- [28] R. A. Gonbad, R. S. Uma, A. A. Maheran, and M. Rosfarizan, “Research Article: Influence of Cytokinins in Combination with GA3 on Shoot Multiplication and Elongation of Tea Clone Iran 100 (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze),” *Sci. World J.*, 2014.
- [29] Lizawati, “Induksi Kalus Embriogenik dari Eksplan Tunas Apikal Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha Curcas* L.) dengan Penggunaan 2,4 D dan TDZ,” vol. 1, no. 2, 2012.
- [30] E. F. George, A. H. Michael, and D. K. Greet-Jan, *Plant Propagation by Tissue Culture*. Netherlands: Springer, 2008.
- [31] K. S. Nagesh, S. Shantamma, and T. Pullaiah, “Somatic Embryogenesis and Plant Reegeration from Callus Cultures of *Curculigo orchioides* Gertn.,” *Indian J. Biotechnol.*, vol. 9, pp. 408–413, 2010.
- [32] L. Admojo, I. Ari, and H. Hananto, “Perkembangan Penelitian Induksi Kalus Embriogenik Pada Jaringan Vegetatif Tanaman Karet Klonal (*Hevea brassiliensis* Muell. Arg),” *War. Perkaretan*, vol. 33, no. 1, pp. 19–28, 2014.
- [33] Kikuchi *et al.*, “Abscisic Acid and Stress Treatment are Essential For The Acquisition of Embryogenic Competence by Carrot Somatic Cells”, *Planta*, vol. 223, pp. 637–645, 2006.
- [34] V. Raghavan, “Role 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) in Somatic Embryogenesis on Cultured Zygotic Embryos of Arabidopsis: Cell Expansion, Cell Cycling, and Morphogenesis During Continuous Exposure of Embryos to 2,4-D,” *Am. J. Bot.*, vol. 91, no. 11, pp. 1743–1756, 2004.
- [35] I. Dehghani, A. Mostajeran, and G. Asghari, “In Vitro and In Vivo Production Of Gingerols And Zingiberene in Ginger Plant (*Zingiber officinale* Roscoe),” *Iran. J. Pharm. Sci.*, vol. 7, no. 2, pp. 117–121, 2011.
- [36] T. H. Aye, K. M. Twin, and A.A. Khain, “Propagation of Commercial Tea (*Camellia sinensis* L.) by Efficient in Vitro Tissue Culture Methods,” in *International Conference on Sustainable Development: Issues dan Prospect*, 2008, pp. 1–10.
- [37] S. Suhesti *et al.*, “Induksi Kalus dan Regenerasi Dua Varietas Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Secara In Vitro,” *J. Littri*, vol. 21, no. 2, 2015.
- [38] K. D. Pandey, K. S. Arvind, Bhupendra, and Chaudhary, “Boron-Mediated Plant Somatic Embryogenesis: A Provocative Model,” *J. Bot.*, 2012.
- [39] Yelnitis, “Induksi Embrio Somatik Shorea pinanga Scheff. Pada Kondisi Fisik Media Berbeda,” *J. Pemuliaan Tanam. Hutan*, vol. 7, no. 2, pp. 73–84, 2013.
- [40] Y. H. Su, L. Yu-Bo, and S. Z. Xian, “Auxin-Cytokinin Interaction Regulates Meristem Development,” *Mol. Plant*, vol. 4, no. 4, pp. 616–625, 2011.
- [41] S. H. Howell, *Molecular Genetics of Plant Development*. United Kingdom: Cambridge University Press, 2000.
- [42] O. Leyser and S. Day, *Mechanism in Plant Developmen*. Blackwell Publishing Ltd, 2003.
- [43] P. Y. Goo, A. H. N. In-Suk, and Peter, “Effect of Exogeneous Plant Growth Regulators on Morphogenetic Response in Vitro by Embryo and Leaf Cultures of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze,” *Korean J. Plant Tissue Cult.*, vol. 24, no. 3, pp. 129–135, 1997.
- [44] V. M. Jiménez, “Regulation of In Vitro Somatic Embryogenesis With Emphasis on The Role of Endogenous Hormones,” *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, vol. 13, no. 2, pp. 196–223, 2001.
- [45] S. A. Merkle, W. Parrot, and B. S. Flin, *Morphogenic Aspect of Somatic Embryogenesis, In: Torpeded In Vitro Embryogenesis in Plants*. Dordrecht, 1995.
- [46] A. Sedighi, S. D. Farideh, Mansour, Gholami, and R. K. Mahmoud, “Study of The Effect of Plant Growth Regulators, Size, and Cultivar of The Grape Inflorescence Explant on Production of Phenolic Compounds In An in Vitro Condition,” *J HerbMed Pharmacol*, vol. 3, no. 1, pp. 35–40, 2014.
- [47] A. S. N. Ali, F. A. Siddiqui, and J. Iqbal, “Rapid Clonal Multiplication of Sugarcane (*Saccharum officinarum*) Trough Callogenesis and Organogenesis,” *Pak. J. Bot.*, vol. 4, no. 11, pp. 123–138, 2008.
- [48] R. L. M. Pierik, *In Vitro Culture of Hinger*. Netherland: Martinus Nijhoff Publisher, 1987.
- [49] D. E. Evans, J. O. D. Coleman, and A. Kearns, *Plant Cell Culture*. New York: Bios Scientific Publishers Limited, 2003.
- [50] P. H. Raven and B. J. George, *Biology Sixth Edition*. Mc Graw Hill, 2001.
- [51] W. Handayani, N. Yulita, and S. Nintya, “Respon Pertumbuhan dan Produksi Alkaloid pada Kalus Berakar *Datura metel* L. Terhadap Peningkatan Mikronutrie dari Medium MS,” *Bul. Anat. dan Fisiol.*, vol. 20, no. 1, pp. 29–36, 2012.
- [52] D. Waryastuti, E. Lilik, T. Setyobudi, and Wardiyati, “Pengaruh Tingkat Konsentrasi 2,4-D Dan BAP pada Media MS Terhadap Induksi Kalus Embriogenik Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.),” *J. Produksi Tanam.*, vol. 5, no. 1, pp. 140 – 149.
- [53] D. L. Rayle and E. C. Robert, “The Acid Growth Theory of Auxin-induced Cell Elongation Is Alive and Well,” *Plant Physiol.* vol. 99, pp. 1271–1274, 1992.