

## RESPON KULTUR ANTERA TEMBAKAU TERHADAP MEDIA BERNUTRISI DAN AgNPs SECARA IN VITRO

### RESPONSE OF TOBACCO ANTHHER CULTURE TO NUTRIENT MEDIA AND AgNPs IN IN VITRO

Mohammad Nur Khozin<sup>1\*</sup>, Yusuf Dary Ahnaf<sup>1</sup>, Parawita Dewanti<sup>2</sup>, Didik Pudji Restanto<sup>1</sup>, Iryono<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Program Studi Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember, Jalan Kalimantan Tegalboto No.37, Kab. Jember 68121, Jawa Timur, Indonesia

<sup>2</sup> Center for Development of Advanced Science and Technology (CDAST), Universitas Jember, Jalan Kalimantan Tegalboto No.37, Kab. Jember 68121, Jawa Timur, Indonesia

<sup>3</sup> Koperasi Agrobisnis Tarutama Nusantara (TTN), Tarutama Nusantara, Jalan Brawijaya No.3, Kab. Jember 68136, Jawa Timur, Indonesia

\*Korespondensi: nurkhozin@unej.ac.id

Diterima: 27 Juli 2025 / Direvisi: 24 Oktober 2025 / Disetujui: 16 Desember 2025

#### ABSTRAK

Tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) merupakan tanaman musiman bernilai ekonomi tinggi, namun produksinya di Indonesia terus mengalami penurunan dalam beberapa tahun terakhir. Penggunaan varietas hibrida dapat menjadi solusi karena memiliki produktivitas dan ketahanan penyakit yang lebih baik, tetapi pembentukannya secara konvensional memerlukan waktu lama. Teknik kultur antera dapat digunakan untuk mempercepat pembentukan galur murni karena menghasilkan tanaman homozigot hanya dalam satu generasi. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis interaksi antara jenis media kultur (MS dan Chu's N6) dengan penambahan beberapa konsentrasi Nanopartikel silver (AgNPs) yaitu 0,0; 2,5; 5,0; 7,5; dan 10,0 mg L<sup>-1</sup> terhadap pertumbuhan antera tembakau secara in vitro. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 10 perlakuan dan 3 ulangan, kemudian data dianalisis menggunakan ANOVA dan diuji lanjut DMRT dengan taraf kepercayaan 95%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa media MS merupakan media terbaik dalam mempercepat dan memperbanyak induksi swelling, kalus, tunas, dan akar, sedangkan konsentrasi AgNPs terbaik diperoleh pada 2,5 mg L<sup>-1</sup> yang mampu meningkatkan respons pertumbuhan serta sedikit mengurangi tingkat kontaminasi media. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi media MS dan AgNPs dosis rendah mampu meningkatkan efisiensi regenerasi antera tembakau dan berpotensi digunakan sebagai protokol standar dalam produksi galur murni secara cepat, efisien, dan steril di laboratorium kultur jaringan.

Kata kunci: Chu's N6, Kultur Antera, MS, Nanopartikel Silver, Tembakau

#### ABSTRACT

Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) is a seasonal crop with high economic value, but its production in Indonesia has continued to decline in recent years. The use of hybrid varieties can be a solution because they have better productivity and disease resistance, but their

conventional formation requires a long time. Anther culture techniques can be used to accelerate the formation of pure lines because they produce homozygous plants in just one generation. This study aimed to determine the interaction between the types of culture media (MS and Chu's N6) with the addition of several concentrations of silver nanoparticles (AgNPs), namely 0, 2.5, 5, 7.5, and 10 mg L<sup>-1</sup> on the growth of tobacco anthers in vitro. The study used a Completely Randomized Design (CRD) with 10 treatments and 3 replications, then the data were analyzed using ANOVA and further tested with DMRT at the 95% level. The results showed that MS medium was the best medium in accelerating and increasing the induction of swelling, callus, shoots, and roots, while the best concentration of AgNPs was obtained at 2.5 mg L<sup>-1</sup> which was able to increase the growth response and slightly reduce the level of media contamination. The findings of this study indicate that the combination of MS medium and low-dose AgNPs can increase the efficiency of tobacco anther regeneration and has the potential to be used as a standard protocol in the production of pure lines quickly, efficiently, and sterilely in tissue culture laboratories.

Key words: Anther Culture, Chu's N6, MS, Silver Nanoparticles, Tobacco

## PENDAHULUAN

Tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) merupakan tanaman musiman yang banyak dibudidayakan di Indonesia karena memiliki nilai ekonomi tinggi. Pendapatan Cukai Hasil Tembakau (CHT) Indonesia pada tahun 2024 mencapai 216,9 triliun rupiah (Kementerian Keuangan Direktorat Jenderal Bea dan Cukai, 2025). Akan tetapi, nilai tersebut mengalami penurunan yang disebabkan karena penurunan produksi tembakau (Badan Pemeriksa Keuangan Republik Indonesia, 2024). Menurut data (Badan Pusat Statistik, 2024) produksi tembakau pada tahun 2020 hingga tahun 2023 mengalami penurunan dari 22,6 ribu ton menjadi 238,80 ribu ton. Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mengatasi penurunan produksi tembakau adalah menggunakan tembakau varietas unggul seperti varietas hibrida.

Tembakau varietas hibrida dipilih karena memiliki keunggulan mampu menghasilkan 4-5 helai daun lebih banyak sehingga dapat membantu meningkatkan produksi tembakau. Selain itu, tembakau varietas hibrida juga memiliki keunggulan lain seperti

kemampuan adaptasi yang lebih baik, pertumbuhan yang seragam, serta ketahanan terhadap penyakit seperti *Phytophthora nicotianae*, *Ralstonia solanacearum*, dan *Tobacco Mozaik Virus* (TMV) (Herawati & Yulaikah, 2011). Akan tetapi dalam pembentukan tanaman tembakau hibrida memerlukan persilangan dua tanaman tembakau galur murni. Secara konvensional, pembentukan tanaman galur murni memerlukan waktu yang cukup lama karena melalui proses persilangan dan seleksi berulang hingga minimal keturunan ke-5 (F5) (Nurhidayah *et al.*, 2023). Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mengatasi masalah tersebut yaitu dengan menggunakan teknik kultur anthera tembakau. Tanaman tembakau yang terbentuk dari kultur anthera dapat dikatakan galur murni karena memiliki homozigositas 100% dan terbentuk hanya dalam 1 generasi saja (Sari & Solmaz, 2021).

Upaya untuk mendukung pertumbuhan kultur anthera tanaman tembakau dapat dilakukan melalui pemilihan jenis media dan penambahan nanopartikel silver (AgNPs) pada media. Media yang sering

digunakan dalam kultur *in vitro* yaitu media MS karena memiliki unsur makro, mikro, dan vitamin yang lebih lengkap. Media kultur lain yang dapat digunakan untuk membantu pertumbuhan antera tembakau yaitu Chu's N6 karena sering digunakan untuk kultur antera pada padi. Hasil penelitian Pattnaik *et al.* (2020) menunjukkan bahwa antera padi yang dikulturkan pada media Chu's N6 memiliki persentase pembentukan kalus dan planlet hijau yang lebih tinggi yaitu sebesar 21,66 dan 76%, sementara pada media MS hanya 13,66 dan 38,86%. Selain media, penambahan AgNPs dalam media memberikan hasil positif. Penelitian Ewais *et al.* (2015) pada tanaman *Solanum nigrum* menunjukkan persentase kalus tertinggi yaitu sebesar 89% yang merupakan perlakuan 8 mg L<sup>-1</sup>. Penelitian sebelumnya oleh El-Fiki *et al.* (2015) menunjukkan bahwa perbedaan jenis media kultur berpengaruh nyata terhadap keberhasilan induksi haploid pada *Nicotiana glauca*. Antera yang dikultur pada media MS menghasilkan persentase tanaman haploid tertinggi, yaitu berkisar antara 52–80%, dibandingkan dengan media MT (32–52%) dan N (28–44%). Media MS yang diperkaya dengan kombinasi ZPT NAA dan Kinetin terbukti paling efektif untuk pembentukan kalus dan regenerasi tanaman, dengan respons morfologi yang mendekati 67% dari tanaman diploid. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui interaksi antara perlakuan media kultur (MS dan Chu's N6) dan pemberian AgNPs terhadap regenerasi antera tembakau (*Nicotiana glauca* L.).

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Oktober 2024 hingga Maret 2025 yang

bertempat di Laboratorium Ekofisiologi dan Kultur Jaringan Program Studi Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Jember. Eksplan yang digunakan yaitu antera di dalam kuncup bunga tembakau pada tahap 2 yang memiliki ukuran 16-22 mm (Chuprov–Netochin *et al.*, 2016). Kuncup bunga tersebut diambil dari tanaman tembakau Na-Oogst dengan varietas H382 yang berumur 56-63 hari yang diambil dari perkebunan tembakau milik Koperasi Agrobisnis Tarutama Nusantara.

### Persiapan dan sterilisasi eksplan

Kuncup bunga yang telah dipilih sesuai ukuran (*stage 2*), selanjutnya dilakukan *pre-cooling* dengan memasukkan eksplan ke dalam refrigerator yang memiliki suhu 4 °C selama 3 hari. Perlakuan cekaman suhu rendah tersebut bertujuan untuk menggeser arah perkembangan antera yang semula gametofit ke arah sporofit (Sood *et al.*, 2021). Sterilisasi eksplan dilakukan di dalam LAF dengan merendam dan menggojok perlahan kuncup bunga tersebut menggunakan alkohol 70% selama 30 – 60 detik, Natrium Hipoklorit (NaOCl) 1% selama 15 menit, dan dibilas dengan akuades steril selama 3 menit sebanyak 2 kali.

### Pembuatan media kultur dan perlakuan

Bahan-bahan seperti MS basal (4,43 g L<sup>-1</sup>), Chu's N6 basal (3,99 g L<sup>-1</sup>), sukrosa (30 g L<sup>-1</sup>), ZPT NAA (0,5 mg L<sup>-1</sup>) dan BAP (1 mg L<sup>-1</sup>) yang diberikan dalam semua perlakuan media (El-Fiki *et al.*, 2015), dan AgNPs komersial (kemurnian ≥ 99%, ukuran partikel ±10–20 nm) sesuai perlakuan (0, 2,5, 5, 7,5, dan 10 mg L<sup>-1</sup>), kemudian ditambah akuades hingga volume akhir 1.000 mL. Larutan tersebut kemudian

dihomogenkan dan dilakukan pengecekan pH dengan kisaran 5,8 – 6,2. media ditambahkan agar sebanyak 8 g L<sup>-1</sup> kemudian diautoklaf selama 30 menit dalam suhu 121°C dan tekanan 15 psi. Setelah selesai dari autoklaf, media kultur segera dimasukkan dalam cawan *petri dish disposabel* di dalam LAF (Laminar Air Flow) kemudian diwrap dengan *plastic wrap* supaya kontaminan tidak dapat masuk ke dalam media.

### Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 10 perlakuan yang merupakan kombinasi antara dua jenis media kultur (MS dan Chu's N6) serta lima konsentrasi Nanopartikel silver (AgNPs) yaitu 0,0; 2,5; 5,0; 7,5; dan 10,0 mg L<sup>-1</sup>. Setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali, sehingga terdapat total 30 satuan percobaan. Setiap satuan percobaan terdiri atas lima antera tembakau yang dikultur dalam satu petri. Penempatan petri dilakukan secara acak untuk meminimalkan pengaruh faktor lingkungan laboratorium yang tidak diinginkan

### Inokulasi eksplan

Kuncup bunga tembakau yang telah disterilisasi kemudian dibuka dan diambil bagian antera atau kepala sari. Antera yang sudah dipisahkan dari Filamen kemudian ditanam pada media sesuai dengan perlakuan dengan jumlah 5 antera dalam 1 petri dan diulang sebanyak 3 kali sehingga total terdapat 30 petri. Selanjutnya antera yang telah ditanam diinkubasi pada suhu 26°C dengan fotoperiode 16 Jam pencahayaan di bawah lampu putih 2.000 lux (Sood *et al.*, 2021).

### Parameter pengamatan dan analisis data

Parameter pengamatan pada penelitian ini dibagi menjadi parameter kuantitatif dan kualitatif. Parameter kuantitatif meliputi kedinian eksplan *swelling*, berkalus, bertunas dan berakar, persentase eksplan *swelling*, berkalus, bertunas dan berakar, jumlah tunas dan akar, dan persentase media terkontaminasi jamur atau bakteri. Parameter kualitatif yaitu warna kalus, tekstur kalus, dan analisis SEM (*Scanning Electron Microscopy*). Data parameter pengamatan kuantitatif diolah secara statistik menggunakan uji *Analysis of Variance* (ANOVA) dan apabila terdapat hasil analisis yang signifikan, maka dilakukan uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) dengan taraf kepercayaan 95%.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Rekapitulasi hasil ANOVA pada setiap parameter

Rekapitulasi hasil *Analysis of Variance* (ANOVA) dari pengaruh media kultur dan berbagai konsentrasi AgNPs pada media kultur terhadap regenerasi eksplan (*swelling*, berkalus, dan bertunas) dapat dilihat pada Tabel 1. Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa tidak terdapat interaksi antara perlakuan media kultur dan konsentrasi AgNPs terhadap seluruh parameter. Faktor tunggal media kultur memberikan pengaruh berbeda sangat nyata pada parameter kedinian *swelling*, kedinian kalus, persentase kalus, kedinian tunas, dan jumlah tunas. Faktor tunggal konsentrasi AgNPs memberikan pengaruh berbeda sangat nyata pada parameter kedinian *swelling*, kedinian kalus, persentase kalus, dan kedinian tunas.

Table 1. Rekapitulasi hasil *Analysis of Variance* (ANOVA)

| Parameter                        | Nilai F-Hitung     |                    |                    |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                                  | M                  | N                  | M x N              |
| Kedinian <i>swelling</i>         | 102,51**           | 41,93**            | 2,48 <sup>tn</sup> |
| Kedinian kalus                   | 55,97**            | 28,18**            | 0,73 <sup>tn</sup> |
| Persentase kalus                 | 15,12**            | 6,99**             | 1,37 <sup>tn</sup> |
| Kedinian tunas                   | 33,38**            | 5,93**             | 0,91 <sup>tn</sup> |
| Persentase tunas                 | 1,10 <sup>tn</sup> | 0,29 <sup>tn</sup> | 0,10 <sup>tn</sup> |
| Jumlah tunas                     | 12,87**            | 3,38*              | 1,18 <sup>tn</sup> |
| Persentase media terkontami nasi | 0 <sup>tn</sup>    | 0,5 <sup>tn</sup>  | 0 <sup>tn</sup>    |

Keterangan: (M) Media kultur, (N) Konsentrasi AgNPs, (M x N) Interaksi, (\*\*) berbeda sangat nyata, (\*) berbeda nyata, (<sup>tn</sup>) tidak berbeda nyata.

#### Kedinian dan persentase eksplan *swelling*

Perlakuan media kultur MS dan Chu's N6 serta konsentrasi AgNPs menunjukkan terdapat pengaruh nyata tetapi tidak terdapat interaksi antara kedua perlakuan tersebut, sehingga disajikan seperti pada Tabel 2. Kedinian eksplan *swelling* tercepat berada pada media kultur MS dan AgNPs 2,5 mg L<sup>-1</sup>. Hal tersebut dapat terjadi karena media MS memiliki unsur hara mikro yang lebih tinggi konsentrasinya daripada media Chu's N6 seperti pada unsur N, Ca, dan Mg. Unsur N berperan sebagai komponen utama dari asam nukleat, fosfolipid, dan protein untuk mendukung pembelahan dan diferensiasi sel menjadi jaringan dan organ tumbuhan (Wang *et al.*, 2024). Unsur Ca memiliki fungsi menjaga kestabilan struktur dinding sel dan ikatan silang pektin sehingga pembelahan dan regenerasi sel tidak terhambat (Wdowiak *et al.*, 2024). Sementara unsur Mg memiliki peran sebagai

aktivator beberapa enzim tanaman dan regulator dalam penyerapan unsur P dan K (Harris *et al.*, 2018). Unsur P dan K yang lebih banyak konsentrasinya pada media Chu's N6 menjadi kurang optimal dalam penyerapannya karena unsur Mg yang tidak sebanyak pada media MS.

Persentase Eksplan *swelling* pada Tabel 2 menunjukkan bahwa semua perlakuan menyebabkan eksplan menjadi *swelling*. *Swelling* pada eksplan terjadi akibat pelonggaran dinding sel yang dikendalikan oleh aktivitas gen ekspansi dan XTH. Mekanisme ini terutama dipicu oleh auksin endogen pada antera, dan diperkuat oleh keberadaan auksin eksogen (NAA) dalam media kultur, sehingga seluruh perlakuan menunjukkan pembentukan *swelling* (Cosgrove, 2022).

Tabel 2. Pengaruh perlakuan media kultur dan AgNPs terhadap kedinian dan persentase *swelling*

| Perlakuan              | Kedinian <i>Swelling</i> (hari) | Persentase <i>Swelling</i> (%) |
|------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| <b>Media Kultur</b>    |                                 |                                |
| MS                     | 10±3,047 a                      | 100±0,00                       |
| Chu's N6               | 15,4±4,56 b                     | 100±0,00                       |
| <b>AgNPs</b>           |                                 |                                |
| 0 mg L <sup>-1</sup>   | 9,17±2,136 a                    | 100±0,00                       |
| 2,5 mg L <sup>-1</sup> | 8,67±1,86 a                     | 100±0,00                       |
| 5 mg L <sup>-1</sup>   | 12,67±3,93 b                    | 100±0,00                       |
| 7,5 mg L <sup>-1</sup> | 15,50±3,78 c                    | 100±0,00                       |
| 10 mg L <sup>-1</sup>  | 17,50±4,32 d                    | 100±0,00                       |

#### Kedinian dan persentase eksplan berkalus

Perlakuan media kultur MS dan Chu's N6 serta konsentrasi AgNPs menunjukkan terdapat pengaruh nyata tetapi juga tidak terdapat interaksi antara kedua perlakuan terhadap parameter ini sehingga data disajikan seperti pada Tabel 3.

Tabel 3. Pengaruh perlakuan media kultur dan AgNPs terhadap kedinian pembentukan dan persentase kalus

| Perlakuan              | Kedinian Kalus (hari) | Persentase Kalus (%) |
|------------------------|-----------------------|----------------------|
| <b>Media Kultur</b>    |                       |                      |
| MS                     | 38,87±5,78<br>a       | 88,89±16,26<br>a     |
| Chu's N6               | 46,80±6,95<br>b       | 64,44±29,45<br>b     |
| <b>AgNPs</b>           |                       |                      |
| 0 mg L <sup>-1</sup>   | 38,50±3,78<br>b       | 100±0,00<br>a        |
| 2,5 mg L <sup>-1</sup> | 34,83±4,21<br>a       | 88,88±27,21<br>ab    |
| 5 mg L <sup>-1</sup>   | 43,17±6,46<br>c       | 77,78±17,21<br>ab    |
| 7,5 mg L <sup>-1</sup> | 47,50±4,59<br>d       | 61,11±25,09<br>cd    |
| 10 mg L <sup>-1</sup>  | 50,17±6,17<br>d       | 55,55±27,21<br>d     |

Data pada Tabel 3 menunjukkan kesamaan yaitu media MS memiliki kecenderungan kedinian pembentukan kalus tercepat dan membentuk kalus dengan persentase terbanyak. Hal tersebut dapat terjadi karena media MS, selain memiliki konsentrasi unsur hara makro yang relatif lebih tinggi, juga memiliki komposisi unsur hara mikro yang lebih lengkap dibandingkan dengan media Chu's N6. Unsur mikro tersebut antara lain Mn, Zn, B, Na, Co, Cu, dan Mo, yang memiliki berbagai fungsi fisiologis penting. Salah satu di antaranya, Mn, berperan sebagai kofaktor dalam proses fotosintesis, khususnya dalam reaksi pemisahan air pada Fotosistem II (PSII). (Alejandro *et al.*, 2020). Unsur Zn berfungsi sebagai kofaktor enzimatis (karbonat anhidrase dan superoksida dismutase) yang berperan dalam meregulasi hormon auksin (Kimura *et al.*, 2023). Unsur B berperan dalam metabolisme nitrogen dan auksin sehingga dapat membantu dalam pembelahan sel (Brdar-Jokanović, 2020).

Unsur Na memiliki fungsi menggantikan ion kalium apabila unsur K tersedia terbatas yaitu sebagai kofaktor untuk enzim tertentu dan sebagai osmoregulator untuk pergerakan stomata serta pertumbuhan sel (Sarraf *et al.*, 2023).

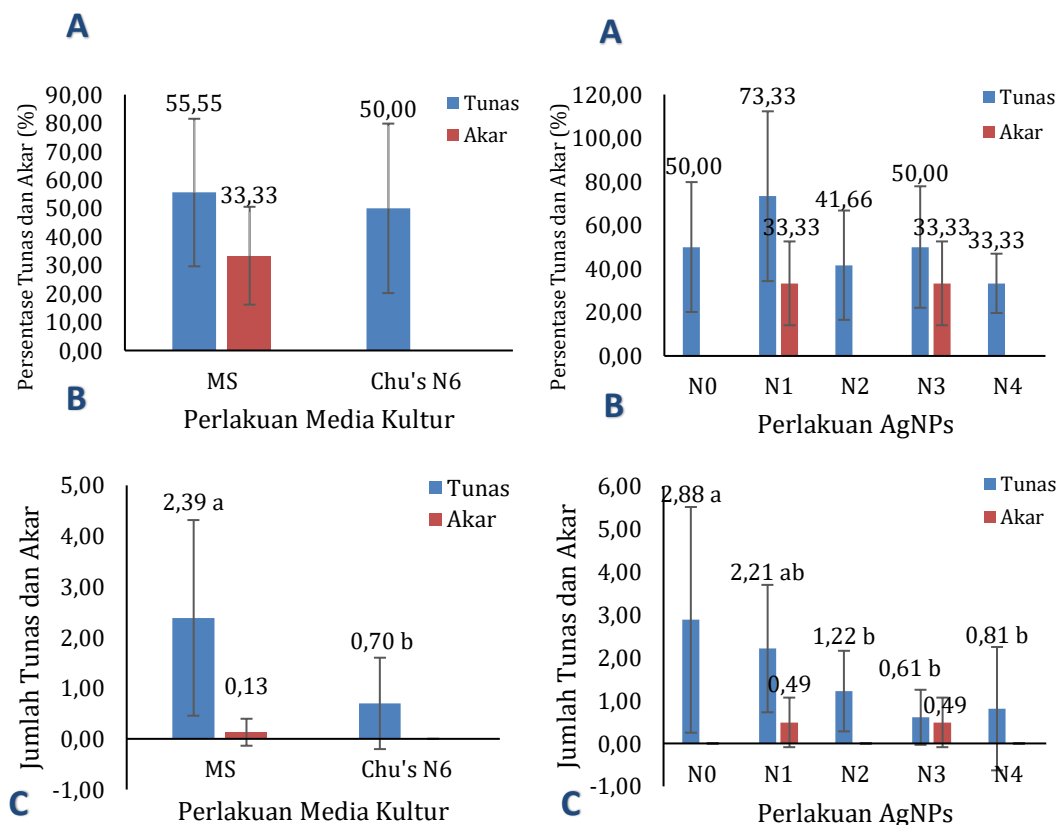
Sementara unsur Co, Cu, dan Mo merupakan unsur logam sehingga dibutuhkan dalam jumlah yang sangat sedikit. Unsur Co merupakan komponen dari kobalamin atau vitamin B12 yang dibutuhkan oleh beberapa enzim untuk memfiksasi N<sub>2</sub> (Hu *et al.*, 2021). Unsur Cu berfungsi sebagai kofaktor enzim yang berpartisipasi dalam banyak jalur biokimia dan memainkan peran dalam fotosintesis, respirasi, penginderaan etilen, dan sistem antioksidan (Xu *et al.*, 2024). Sementara unsur Mo berperan sebagai katalis dalam degradasi purin, sintesis fitohormon, asimilasi nitrogen, dan detoksifikasi sulfat (Rana *et al.*, 2020). Unsur hara mikro tersebut dalam penyerapannya akan lebih optimal apabila unsur Ca pada media tersedia dalam jumlah banyak, karena unsur Ca berperan dalam aktivator enzim serta transpor banyak ion unsur baik makro dan mikro yang dibutuhkan oleh tanaman (Saito & Uozumi, 2020).

Kesamaan lain, antara kedua parameter pada Tabel 3 yaitu AgNPs dengan konsentrasi 10 mg L<sup>-1</sup> menjadi perlakuan AgNPs dengan kedinian terlama dan persentase kalus yang terbentuk terendah. Hal tersebut dikarenakan pada konsentrasi 10 mg L<sup>-1</sup> bagi eksplan anther tembakau sudah termasuk ke dalam konsentrasi yang tinggi sehingga menyebabkan keracunan unsur logam silver sehingga menyebabkan pertumbuhan dan perkembangan eksplan terganggu.

### Kedinian, persentase, dan jumlah eksplan bertunas dan berakar

Data pada parameter kedinian dan jumlah tunas serta akar menunjukkan bahwa tidak terdapat interaksi antara kedua perlakuan yang diberikan. Namun demikian, masing-masing perlakuan memberikan pengaruh terhadap kedinian pembentukan tunas, terutama perlakuan dengan

penambahan BAP  $1 \text{ mg L}^{-1}$  yang menunjukkan respons lebih cepat dibandingkan NAA  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ . Sementara itu, pada parameter persentase bertunas dan berakar, tidak ditemukan pengaruh yang signifikan, baik dari interaksi maupun dari perlakuan individu, sebagaimana ditampilkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Pengaruh perlakuan media dan AgNPs terhadap kedinian tunas dan akar (A), persentase tunas dan akar (B), serta jumlah tunas dan akar (C).

Gambar 1 menunjukkan bahwa media terbaik untuk kedinian, persentase, dan jumlah tunas dan akar terbaik ditunjukkan pada media MS. Selain memiliki kandungan unsur hara makro dan mikro, media MS juga memiliki vitamin yang lebih lengkap dan tinggi konsentrasinya daripada media Chu's N6 yaitu biotin, asam folat, dan myo-inositol. Biotin memiliki fungsi yaitu sebagai

kofaktor untuk beberapa enzim karboksilasi dalam metabolisme primer. Selain itu, biotin juga diperlukan untuk pembentukan membran lemak dan metabolit energi yang menopang pertumbuhan sel akar dan tunas (Che *et al.*, 2003). Asam folat (vitamin B9) berfungsi sebagai perkusor tetrahydrofolate yaitu kofaktor utama dalam reaksi transfer satu-karbon (*one-*

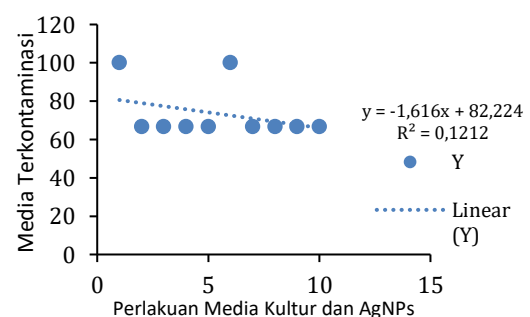
*carbon metabolism*) yang diperlukan untuk sintesis purin, pirimidin, asam amino, dan klorofil (Ayala-Rodríguez *et al.*, 2017). Melalui mekanisme tersebut, asam folat sangat penting dalam sintesis DNA dan RNA sehingga mempercepat siklus pembelahan sel, merangsang produksi hormon, dan meningkatkan penyerapan nutrisi tanaman yang dapat membantu untuk diferensiasi membentuk tunas dan akar (Sahito *et al.*, 2024). Myo-inositol berperan sebagai percursor penting dalam sintesis fosfolipid membran (fosfatidil-inositol) serta polisakarida dinding sel seperti pektin yang mendukung dalam pembelahan dan pembentukan dinding sel baru selama pertumbuhan kultur dan pembentukan tunas (Hu *et al.*, 2020). Selain itu, myo-inositol juga membantu penyerapan dan mobilitas unsur Zn pada tanaman gandum (Amaral & Brown, 2022).

Tunas yang terbentuk pada Gambar 1 dapat terbentuk karena pengaruh dari pemberian AgNPs mampu menghambat sintesis auksin (Zhang *et al.*, 2023). Akumulasi dan ekspresi auksin yang rendah menyebabkan rasio auksin:sitokinin dalam jaringan menjadi lebih kecil. Kondisi ini juga sejalan dengan komposisi ZPT eksogen pada media, di mana konsentrasi sitokinin (BAP) yang ditambahkan memang lebih tinggi dibandingkan auksin (NAA), sehingga turut memperkuat dominasi sitokinin dalam proses morfogenesis. (Sun *et al.*, 2017). Apabila hormon auksin lebih banyak, maka ekspresi gen WUS (*wuschel*) dalam membantu pembentukan primordia tunas menjadi terhambat, karena ekspresi gen WUS hanya memiliki efek sinergis dengan hormon sitokinin (Ikeuchi *et al.*, 2019). Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa kombinasi sitokinin Benzyl Aminopurine (BAP) dan Furfuryl

Aminopurine (Kinetin) secara efektif meningkatkan multiplikasi tunas tembakau secara *in vitro* melalui teknik Thin Cell Layer (TCL), yang memperkuat efektivitas penggunaan sitokinin dalam regenerasi tunas (Khozin *et al.*, 2025). Akar yang terbentuk diduga dapat terjadi karena konsentrasi auksin di dalam eksplan tersebut lebih tinggi daripada eksplan yang lain sehingga hanya pada eksplan tersebut yang mampu memunculkan akar.

### Persentase Media Terkontaminasi Jamur atau Bakteri

Parameter ini diteliti untuk melihat pengaruh sifat antikontaminan dari AgNPs terhadap media kultur sesuai dengan konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini. Sementara jenis media kultur tidak terlalu memiliki pengaruh terhadap terjadinya kontaminasi jamur maupun bakteri seperti pada Gambar 2.



Gambar 2. Pengaruh media kultur dan AgNPs terhadap persentase media terkontaminasi jamur atau bakteri

Gambar 2 menunjukkan media terkontaminasi jamur atau bakteri tertinggi berada pada perlakuan tanpa AgNPs (0 mg L<sup>-1</sup>). Sementara media yang diberi AgNPs 2,5 – 10 mg L<sup>-1</sup> menunjukkan kecenderungan persentase media terkontaminasi jamur atau bakteri yang sedikit lebih rendah yaitu 66,67%. Hal tersebut sejalan dengan hasil penelitian Alfarraj *et al.* (2023) yaitu



mengenai efektivitas AgNPs dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus* spp. dan jamur *Alternaria* spp. menunjukkan bahwa penggunaan AgNPs dengan konsentrasi 5 dan 10 ppm masih belum menunjukkan efek antikonaminan dari AgNPs. Penghambatan atau efek antikonaminan baru terlihat pada media kultur yang diberi AgNPs dengan konsentrasi 20 ppm ke atas.

AgNPs lebih reaktif dengan bakteri gram-negatif karena memiliki lapisan Lipoposakarida (LPS) yang tebal pada dinding selnya dan dengan lapisan peptidoglikan yang tipis sehingga penetrasi AgNPs lebih mudah hingga ke dalam sel bakteri (More *et al.*, 2023). Mekanisme AgNPs dalam membunuh kontaminan yaitu dengan melekat pada membran sel mikroba melalui gaya elektrostatis (permukaan AgNPs beruatan positif berinteraksi dengan membran sel bermuatan negatif) sehingga menyebabkan perubahan morfologi membran yaitu penyusutan sitoplasma, terlepasnya membran hingga kerusakan struktural. Kerusakan tersebut meningkatkan permeabilitas membran sehingga ion, protein, dan ATP sel bocor keluar yang mengakibatkan terganggunya osmoregulasi dan respirasi sel (More *et al.*, 2023). Selain itu, AgNPs memicu pembentukan ROS di dalam sel mikroba. ROS ini (superoksida dan hidrogen peroksida) menyebabkan stres oksidatif yang dapat merusak membran lipid, protein, dan DNA mikroba (Mikhailova, 2024). Mekanisme lain yaitu  $Ag^+$  yang dilepaskan dapat berikatan dengan gugus-SH (sulfhidril) pada enzim-enzim mikroba, menghambat aktivitas katalik protein penting termasuk enzim respirasi. Pengikatan ini mengganggu sintesis protein dan replikasi sel mikroba (Mikhailova,

2024). AgNPs juga dapat berinteraksi langsung dengan DNA bakteri/jamur.  $Ag^+$  dapat mengikat gugus fosfat dan belerang pada DNA yang dapat menyebabkan kesulitan dalam replikasi dan transkripsi genetik (More *et al.*, 2023).

#### Warna dan tekstur kalus

Warna kalus dianalisis dengan membandingkan warna kalus dengan *munsell color chart*, sementara tekstur kalus dianalisis dengan menyentuh permukaan kalus menggunakan pinset steril di dalam LAF dan juga melalui pengamatan secara visual. Data dari warna dan tekstur kalus dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Pengaruh perlakuan media dan AgNPs terhadap warna dan tekstur kalus

| Perlakuan                               | Warna  | Tekstur     |
|-----------------------------------------|--------|-------------|
| MS + 0 mg L <sup>-1</sup> AgNPs         | Hijau  | Kompak      |
| MS + 2,5 mg L <sup>-1</sup> AgNPs       | Hijau  | Kompak      |
| MS + 5 mg L <sup>-1</sup> AgNPs         | Hijau  | Kompak      |
| MS + 7,5 mg L <sup>-1</sup> AgNPs       | Hijau  | Intermediet |
| MS + 10 mg L <sup>-1</sup> AgNPs        | Kuning | Intermediet |
| Chu's N6 + 0 mg L <sup>-1</sup> AgNPs   | Hijau  | Kompak      |
| Chu's N6 + 2,5 mg L <sup>-1</sup> AgNPs | Hijau  | Kompak      |
| Chu's N6 + 5 mg L <sup>-1</sup> AgNPs   | Hijau  | Kompak      |
| Chu's N6 + 7,5 mg L <sup>-1</sup> AgNPs | Hijau  | Kompak      |
| Chu's N6 + 10 mg L <sup>-1</sup> AgNPs  | Kuning | Kompak      |

Data warna kalus pada Tabel 4 menunjukkan bahwa semua kalus berwarna hijau kecuali pada perlakuan yang diberi AgNPs 10 mg L<sup>-1</sup> kalus berwarna kuning. Hal tersebut dapat terjadi karena AgNPs yang diserap tanaman dapat meningkatkan

jumlah klorofil a dan b sehingga kalus terlihat lebih hijau (Satya *et al.*, 2024). Selain itu, AgNPs juga dapat menghambat pembentukan dan aktivitas etilen yang dapat menyebabkan degradasi klorofil (Azadi *et al.*, 2021). AgNPs juga membantu penyerapan unsur hara yang berperan dalam pembentukan klorofil seperti N, Mg, dan Fe sehingga memperlihatkan kalus yang berwarna hijau (Azadi *et al.*, 2021). Sementara kalus pada pemberian 10 mg L<sup>-1</sup> AgNPs memiliki warna kalus kuning. Hal tersebut diduga karena konsentrasi AgNPs tersebut sudah menyebabkan toksisitas karena AgNPs dapat membentuk ROS secara berlebihan sehingga apabila konsentrasi lebih ditingkatkan, maka warna kalus dapat berubah menjadi coklat akibat *senescent*. Hasil serupa juga ditunjukkan oleh penelitian Khozin & Mona (2025), bahwa penggunaan kombinasi BAP dan Kinetin pada teknik Thin Cell Layer (TCL) mampu menginduksi pembentukan kalus hijau kompak dan meningkatkan laju regenerasi kalus tanaman tembakau secara signifikan.

Data tekstur kalus menunjukkan bahwa seluruh perlakuan pada media Chu's N6 menghasilkan tekstur kalus yang kompak, sedangkan pada media MS tekstur kalus umumnya kompak tetapi berubah menjadi intermediet pada konsentrasi AgNPs 7,5 dan 10 mg L<sup>-1</sup>. Perbedaan ini diduga kuat berkaitan dengan komposisi nutrisi media MS yang lebih lengkap, terutama pada unsur mikro seperti Mn, Zn, B, Cu, dan Mo, yang diketahui dapat meningkatkan aktivitas metabolik dan laju proliferasi sel kalus (Kaewubon *et al.*, 2021; Pathak & Srivastava, 2023).

Meskipun kedua media memperoleh ZPT yang sama, yaitu BAP dan NAA, respons eksplan terhadap hormon sangat

ditentukan oleh ketersediaan nutrisi basal, termasuk bentuk nitrogen, mikroelemen, dan keseimbangan ion dalam media (Zhang *et al.*, 2022; Hassan *et al.*, 2023). Media MS, dengan kelengkapan mineralnya, memungkinkan interaksi yang lebih optimal antara hormon endogen dan NAA–BAP eksogen sehingga pada kondisi tertentu, terutama ketika dipadukan dengan AgNPs, jaringan mampu menghasilkan tekstur kalus yang lebih intermediet. Sebaliknya, media Chu's N6 memiliki komposisi nutrisi yang lebih sederhana, khususnya kadar nitrogen organik, sehingga proliferasi kalus lebih terarah dan menghasilkan struktur yang lebih kompak secara konsisten di seluruh perlakuan (Jia *et al.*, 2021).

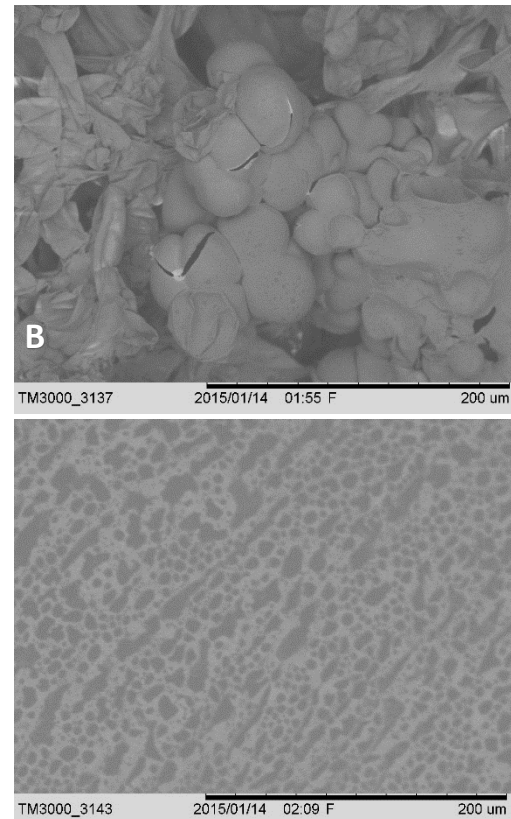
Selain itu, AgNPs pada konsentrasi rendah hingga moderat diketahui dapat memicu sinyal stres oksidatif ringan yang mampu meningkatkan pembelahan sel tanpa menimbulkan kerusakan jaringan, namun efek stimulatif ini lebih muncul pada media dengan nutrisi lengkap, seperti MS (Rashmi *et al.*, 2023). Hal ini menjelaskan mengapa perubahan tekstur kalus hanya terjadi pada media MS tetapi tidak pada Chu's N6 meskipun diberikan ZPT dan AgNPs yang sama.

Meskipun kedua media diberikan ZPT yang sama, yaitu BAP dan NAA, respons hormonal eksplan sangat dipengaruhi oleh kondisi nutrisi dasar media, termasuk bentuk nitrogen, ketersediaan unsur mikro, dan keseimbangan ion (Ikeuchi *et al.*, 2019). Kecukupan nutrisi pada Media MS tersebut memungkinkan interaksi yang lebih kuat antara hormon endogen dan eksogen sehingga, pada konsentrasi tertentu AgNPs, dapat menghasilkan tekstur kalus intermediet. Sebaliknya, media Chu's N6 dengan komposisi nutrisi yang lebih sederhana dan kandungan nitrogen organik

lebih tinggi cenderung menghasilkan kalus yang lebih padat atau kompak (Nitsch & Nitsch, 1969; Singh *et al.*, 2023). Hal ini menjelaskan mengapa perubahan tekstur hanya terjadi pada media MS dan tidak pada Chu's N6. Hasil penelitian Ali *et al.* (2019) yang menggunakan perlakuan AgNPs dengan konsentrasi rendah pada kultur kalus *Caralluma tuberculata* menunjukkan hasil yang tidak signifikan terhadap proliferasi kalus apabila perlakuan AgNPs diuji sendiri. Hal tersebut membuktikan bahwa AgNPs dengan konsentrasi rendah tidak berpengaruh terhadap pembentukan tekstur kalus karena proliferasi sel kalus dapat lebih berpengaruh apabila diberi perlakuan hormon. AgNPs memiliki pengaruh dengan menekan hormon etilen, yang mana hormon etilen memiliki efek antagonis yaitu dengan menghambat fungsi sitokinin untuk mendorong pembelahan dan perluasan sel (Stoyanova-Bakalova *et al.*, 2022) sehingga dengan penambahan hormon sitokinin BAP, kalus cenderung menjadi lebih hijau dan padat. Seperti pada penelitian yang telah dilakukan oleh Tamimi & Othman (2023) pada pisang (*Musa acuminata*) menunjukkan bahwa interaksi antara AgNPs dengan hormon BAP dapat memberikan efek sinergis dalam merangsang pertumbuhan eksplan terutama dalam penyerapan nutrisi, translokasi, organogenesis, serta proliferasi sel bergantung pada konsentrasi dan jenis tanaman yang digunakan.

#### Analisis SEM

Analisis SEM (*Scanning Electron Microscopy*) digunakan untuk mengamati struktur morfologi permukaan sampel yang diuji. Hasil analisis SEM pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur permukaan kalus (A) dan daun (B) yang diamati menggunakan mikroskop SEM dengan perbesaran 200x pada perlakuan media MS + 7,5 mg L<sup>-1</sup> AgNPs

Hasil analisis SEM pada Gambar 3 menunjukkan terdapatnya lubang-lubang yang cukup besar dan banyak baik pada kalus maupun daun. Lubang tersebut dapat terbentuk akibat pemberian perlakuan AgNPs dengan konsentrasi 7,5 mg L<sup>-1</sup>. Ukuran AgNPs hingga skala nano dapat menginduksi pori-pori baru dengan ukuran yang lebih besar, akibat dari partikel AgNPs yang lebih besar yang kemudian dipaksa masuk melalui mekanisme penyerapan (Yan & Chen, 2019).

#### SIMPULAN

1. Tidak terdapat interaksi antara jenis media kultur dan konsentrasi Nanopartikel silver (AgNPs) terhadap

pertumbuhan dan perkembangan kultur antera tembakau (*Nicotiana tabacum* L.).

2. Jenis media kultur berpengaruh nyata secara mandiri, di mana media MS menunjukkan hasil terbaik dalam mempercepat dan memperbanyak induksi swelling, pembentukan kalus, tunas, dan akar dibandingkan media Chu's N6.
3. Konsentrasi AgNPs 2,5 mg L<sup>-1</sup> memberikan respons terbaik terhadap pertumbuhan antera tembakau serta membantu mengurangi tingkat kontaminasi media kultur.
4. Kombinasi penggunaan media MS dan AgNPs dosis rendah direkomendasikan sebagai pendekatan yang efektif dan efisien untuk meningkatkan regenerasi antera tembakau secara in vitro.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas Jember yang telah mendanai penelitian ini serta kepada Koperasi Agrobisnis Tarutama Nusantara yang telah menyediakan eksplan untuk penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Alejandro, S., Höller, S., Meier, B., & Peiter, E. (2020). Manganese in Plants: From Acquisition to Subcellular Allocation. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00300>
- Alfarraj, N. S., Tarroum, M., Al-Qurainy, F., Nadeem, M., Khan, S., Salih, A. M., Shaikhaldein, H. O., Al-Hashimi, A., Alansi, S., & Perveen, K. (2023). Biosynthesis of Silver Nanoparticles and Exploring Their Potential of Reducing the Contamination of the In Vitro Culture Media and Inducing the Callus Growth of *Rumex nervosus* Explants. *Molecules*, 28(9), 3666. <https://doi.org/10.3390/molecules28093666>
- Ali, A., Mohammad, S., Khan, M. A., Raja, N. I., Arif, M., Kamil, A., & Mashwani, Z.-R. (2019). Silver Nanoparticles Elicited In Vitro Callus Cultures for Accumulation of Biomass and Secondary Metabolites in *Caralluma tuberculata*. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 715–724. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1577884>
- Amaral, D. C., & Brown, P. H. (2022). Foliar Application of an Inositol-Based Plant Biostimulant Boosts Zinc Accumulation in Wheat Grains: A  $\mu$ -X-Ray Fluorescence Case Study. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.837695>
- Ayala-Rodríguez, J. Á., Barrera-Ortiz, S., Ruiz-Herrera, L. F., & López-Bucio, J. (2017). Folic Acid Orchestrates Root Development Linking Cell Elongation with Auxin Response and Acts Independently of the Target of Rapamycin Signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 264, 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.09.011>
- Azadi, M., Siavash Moghaddam, S., Rahimi, A., Pourakbar, L., & Popović-Djordjević, J. (2021). Biosynthesized Silver Nanoparticles Ameliorate Yield, Leaf Photosynthetic Pigments, and Essential Oil Composition of Garden Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Exposed to UV-B Stress. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 105919. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105919>
- Badan Pemeriksa Keuangan Republik Indonesia. (2024). *Laporan Keuangan Pemerintah Pusat Tahun 2023*.

- [https://www.bpk.go.id/assets/files/lkpp/2023/lkpp\\_2023\\_1717473846.pdf](https://www.bpk.go.id/assets/files/lkpp/2023/lkpp_2023_1717473846.pdf)
- Badan Pusat Statistik. (2024). *Produksi Tanaman Perkebunan (Ribu Ton) Tahun 2020 – 2023*. <https://www.bps.go.id/id/statistics-table/2/MTMylzl=/produksi-tanaman-perkebunan.html>.
- Brdar-Jokanović, M. (2020). Boron Toxicity and Deficiency in Agricultural Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1424. <https://doi.org/10.3390/ijms21041424>
- Che, P., Weaver, L. M., Wurtele, E. S., & Nikolau, B. J. (2003). The Role of Biotin in Regulating 3-Methylcrotonyl-Coenzyme A Carboxylase Expression in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 131(3), 1479–1486. <https://doi.org/10.1104/pp.013243>
- Chuprov–Netochin, R., Neskorođov, Y., Marusich, E., Mishutkina, Y., Volynchuk, P., Leonov, S., Skryabin, K., Ivashenko, A., Palme, K., & Touraev, A. (2016). Novel Small Molecule Modulators of Plant Growth and Development Identified by High-Content Screening with Plant Pollen. *BMC Plant Biology*, 16(1), 192. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0875-4>
- Cosgrove, D. J. (2022). Building an Extensible Cell Wall. *Plant Physiology*, 189(3), 1246–1277. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac184>
- El-Fiki, A., El-Metabteb, G., Sayed, A.-H., & Adly, M. (2015). Androgenesis Induced in *Nicotiana glauca* and the Effect of Gamma Irradiation. *Notulae Scientiae Biologicae*, 7(1), 66–71. <https://doi.org/10.15835/nsb719477>
- Ewais, E. A., Elshazly, E. H., Ewais, E. A., Desouky, S. A., & Elshazly, E. H. (2015). Evaluation of Callus Responses of *Solanum nigrum* L. Exposed to Biologically Synthesized Silver Nanoparticles. *Nanoscience and Nanotechnology*, 5(3), 45–56. <https://doi.org/10.5923/j.nn.20150503.01>
- Hassan, M. M., Alam, M. M., Yang, K., & Lee, S. H. (2023). Hormonal cross-talk and nutrient interactions regulate plant organogenesis in vitro. *Plant Cell Reports*, 42, 1151–1166. <https://doi.org/10.1007/s00299-023-03038-0>
- Harris, K. D., Vanajah, T., & Puvanitha, S. (2018). Effect of Foliar Application of Boron and Magnesium on Growth and Yield of Green Chilli (*Capsicum annum* L.). *AGRIEAST: Journal of Agricultural Sciences*, 12(1), 26. <https://doi.org/10.4038/agri east.v12i1.49>
- Herawati, A., & Yulaikah, S. (2011). Varietas Unggul dan Pemuliaan Tembakau Virginia di Indonesia. Balai Penelitian Tanaman Tembakau dan Serat. . *Repository Kementrian Pertanian*. <https://repository.pertanian.go.id/handle/123456789/15784>
- Hu, L., Zhou, K., Ren, G., Yang, S., Liu, Y., Zhang, Z., Li, Y., Gong, X., & Ma, F. (2020). Myo-Inositol Mediates Reactive Oxygen Species-Induced Programmed Cell Death via Salicylic Acid-dependent and Ethylene-dependent Pathways in Apple. *Horticulture Research*, 7(1), 138. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00357-2>
- Hu, X., Wei, X., Ling, J., & Chen, J. (2021). Cobalt: An Essential Micronutrient for Plant Growth? *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.768523>
- Ikeuchi, M., Favero, D. S., Sakamoto, Y., Iwase, A., Coleman, D., Rymen, B., & Sugimoto, K. (2019). Molecular Mechanisms of Plant Regeneration. *Annual Review of Plant Biology*, 70(1), 377–406. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100434>
- Jia, X., Wang, P., Li, Y., & Sun, W. (2021). Comparative effects of basal media

- and nitrogen forms on callus proliferation and morphogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 147, 125–137.
- Kaewubon, P., Thammasiri, K., & Wannakang, K. (2021). Influence of micronutrients on callus characteristics and regeneration efficiency in tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 57, 679–690.
- Kementerian Keuangan Direktorat Jenderal Bea dan Cukai. (2025, January 13). *Penerimaan Bea Cukai Tahun 2024 Tumbuh Positif*. <https://www.beacukai.go.id/berita/penerimaan-bea-cukai-tahun-2024-tumbuh-positif.html>
- Khozin, M. N., & Mona, M. D. S. (2025, May). Induction and Regeneration of Tobacco Callus using Benzyl Aminopurine (BAP) and Furfuryl Aminopurine (Kinetin) With Thin Cell Layer (TCL) Technique. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1497(1), 012017. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1497/1/012017>
- Khozin, M. N., Mona, M. D. S., Dewanti, P., Putri, W. K., Soeparjono, S., & Restanto, D. P. (2025). Multiplikasi Tunas Tembakau Secara In Vitro Menggunakan Benzyl Amino Purine Dan Furfuryl Amino Purine Melalui Metode Thin Cell Layer. *Al-Kauniyah: Jurnal Biologi*, 18(2), 349-361.
- Kimura, S., Vaattovaara, A., Ohshita, T., Yokoyama, K., Yoshida, K., Hui, A., Kaya, H., Ozawa, A., Kobayashi, M., Mori, I. C., Ogata, Y., Ishino, Y., Sugano, S. S., Nagano, M., & Fukao, Y. (2023). Zinc Deficiency-induced Defensin-like Proteins are Involved in the Inhibition of Root Growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 115(4), 1071–1083. <https://doi.org/10.1111/tpj.16281>
- Mikhailova, E. O. (2024). Green Silver Nanoparticles: An Antibacterial Mechanism. *Antibiotics*, 14(1), 5. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14010005>
- More, P. R., Pandit, S., Filippis, A. De, Franci, G., Mijakovic, I., & Galdiero, M. (2023). Silver Nanoparticles: Bactericidal and Mechanistic Approach against Drug Resistant Pathogens. *Microorganisms*, 11(2), 369. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020369>
- Nurhidayah, S., Purwoko, B. S., Dewi, I. S., Suwarno, W. B., & Lubis, I. (2023). Agronomic Performance and Selection of Green Super Rice Doubled Haploid Lines from Anther Culture. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 24(2). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240218>
- Pattnaik, S., Dash, B., Bhuyan, S., Katara, J., Parameswaran, C., Verma, R., Ramesh, N., & Samantaray, S. (2020). Anther Culture Efficiency in Quality Hybrid Rice: A Comparison between Hybrid Rice and Its Ratooned Plants. *Plants*, 9(10), 1306. <https://doi.org/10.3390/plants9101306>
- Pathak, P., & Srivastava, R. (2023). Role of micronutrients in modulating callus structure and morphogenesis: recent advances. *Plant Physiology Reports*, 28, 567–579.
- Rana, M. S., Bhandana, P., Sun, X., Imran, M., Shaaban, M., Moussa, M. G., Saleem, M. H., Elyamine, A. M., Binyamin, R., Alam, M., Afzal, J., Khan, I., Din, I. U., Ahmad, I., Younas, M., Kamran, M., & Hu, C. (2020). Molybdenum as an Essential Element for Crops: An Overview. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 24(5), 18535–18547. <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2020.24.004104>
- Rashmi, S., Verma, A., & Chauhan, P. (2023). Silver nanoparticles modulate oxidative signaling and improve morphogenic response in plant tissue culture systems. *Environmental*

- Nanotechnology, Monitoring & Management*, 20, 100753.
- Sahito, Z. A., Zehra, A., Yu, S., Chen, S., Arif, M. A. R., Raza, S. T., Lahori, A. H., Mwaheb, M. A., He, Z., & Yang, X. (2024). Folic Acid Supplementation Improves Seed Germination, Seedling Growth and Cadmium Uptake in a Mining Ecotype of *Solanum nigrum* L. *Environmental Technology & Innovation*, 34, 103600. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2024.103600>
- Saito, S., & Uozumi, N. (2020). Calcium-Regulated Phosphorylation Systems Controlling Uptake and Balance of Plant Nutrients. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00044>
- Samih M. Tamimi, & Halima Othman. (2023). Silver Nanoparticles for Enhancing the Efficiency of Micropropagation of Banana (*Musa acuminata* L.). *Tropical Life Sciences Research*, 34(2). <https://doi.org/10.21315/tlsr2023.34.2.8>
- Sari, N., & Solmaz, I. (2021). *Doubled Haploid Production in Watermelon* (pp. 97–110). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1331-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1331-3_6)
- Sarraf, M., Janeeshma, E., Arif, N., Qudrat Ullah Farooqi, M., Kumar, V., Ansari, N. A., Ghani, M. I., Ahanger, M. A., & Hasanuzzaman, M. (2023). Understanding the role of beneficial elements in developing plant stress resilience: Signalling and crosstalk with phytohormones and microbes. *Plant Stress*, 10, 100224. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100224>
- Satya, Hashmi, K., Gupta, S., Mishra, P., Khan, T., & Joshi, S. (2024). The Vital Role of Nanoparticles in Enhancing Plant Growth and Development. *The 3rd International Electronic Conference on Processes*, 48. <https://doi.org/10.3390/engproc2024067048>
- Sood, S., Prasanna, P. S., Reddy, T. V., & Gandra, S. V. S. (2021). Optimized Protocol for Development of Androgenic Haploids and Doubled Haploids in FCV Tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Doubled Haploid Technology: Volume 2: Hot Topics, Apiaceae, Brassicaceae, Solanaceae*, 293–305.
- Stoynova-Bakalova, E., Bakalov, D. V., & Baskin, T. I. (2022). Ethylene Represses the Promoting Influence of Cytokinin on Cell Division and Expansion of Cotyledons in Etiolated *Arabidopsis thaliana* Seedlings. *PeerJ*, 10, e14315. <https://doi.org/10.7717/peerj.14315>
- Sun, J., Wang, L., Li, S., Yin, L., Huang, J., & Chen, C. (2017). Toxicity of Silver Nanoparticles to *Arabidopsis*: Inhibition of Root Gravitropism by Interfering with Auxin Pathway. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(10), 2773–2780. <https://doi.org/10.1002/etc.3833>
- Wang, Q., Li, S., Li, J., & Huang, D. (2024). The Utilization and Roles of Nitrogen in Plants. *Forests*, 15(7), 1191. <https://doi.org/10.3390/f15071191>
- Wdowiak, A., Podgórska, A., & Szal, B. (2024). Calcium in Plants: an Important Element of Cell Physiology and Structure, Signaling, and Stress Responses. *Acta Physiologiae Plantarum*, 46(12), 108. <https://doi.org/10.1007/s11738-024-03733-w>
- Xu, E., Liu, Y., Gu, D., Zhan, X., Li, J., Zhou, K., Zhang, P., & Zou, Y. (2024). Molecular Mechanisms of Plant Responses to Copper: From Deficiency to Excess. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(13), 6993. <https://doi.org/10.3390/ijms25136993>
- Yan, A., & Chen, Z. (2019). Impacts of Silver Nanoparticles on Plants: A Focus on the Phytotoxicity and Underlying Mechanism. *International Journal of*

- Molecular Sciences*, 20(5), 1003.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20051003>
- Zhang, H., Liu, X., Wang, J., & Ge, Y. (2022). Basal salt composition influences hormonal response pathways during callus induction and shoot organogenesis. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41, 2285–2298.
- Zhang, N., Sun, J., Yin, L., Liu, J., & Chen, C. (2023). Silver Nanoparticles: From In Vitro Green Synthesis to In Vivo Biological Effects in Plants. *Advanced Agrochem*, 2(4), 313–323.  
<https://doi.org/10.1016/j.aac.2023.08.004>