

REGENERASITANAMAN KERK LILY (*Lilium longiflorum* Thunb.) MELALUI EMBRIOGENESIS SOMATIK PADA EKSPLAN DAUN

[Regeneration of Kerk Lily (*Lilium longiflorum* Thunb.) via
Somatic Embryogenesis on Leaf Explant]

Priyono

Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia
Jalan PB Sudirman no. 90 Jember, 68118

ABSTRACT

The effects of plant growth regulators on somatic embryo genesis in *Lilium longiflorum* Thunb. leaf cultures were studied. The aim of the research is to study the regeneration of *L. longiflorum* via somatic embryogenesis of leaf explant. IAA at 5 level of concentrations (0-1 mg/l) combined with BAP at 4 level of concentrations (0-2 mg/l) were tested to induction of somatic embryogenesis in the first stage. Combination of two cytokinins, namely BAP and kinetin, combined with either of four auxins, namely IAA, IBA, NAA or 2,4D were tested to induce the somatic embryo genesis in the second stage. Combination of two concentrations of ABA, namely 0 and 1 mg/l combined with 5 level concentrations of GA₃, namely 0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1 mg/l were tested to improve the somatic embryos maturation. The results showed that somatic embryos were promoted by addition of IAA and BAP. The study of auxin and cytokinin combinations on somatic embryogenesis showed that somatic embryogenesis of kerk lily induced by addition of auxin and cytokinin in the culture medium. The maximum somatic embryo induction was obtained on medium contained of 0.25 mg/l IAA combined with 1 mg/l kinetin. Somatic embryos maturation were improved by transferring the somatic embryo from induction medium to maturation medium that contained 0.5 mg/l GA₃ + 1 mg/l ABA.

Kata kunci/key words: Regenerasi tanaman/p/a/ regeneration, *Lilium longiflorum*, embrio somatik/ somatic embryo, zat pengatur tumbuh tanaman/p/aw/ growth regulators.

PENDAHULUAN

Kerk lily termasuk tanaman Mas berumbi golongan monokotil. Bentuk tanaman berupa perdu perennial atau annual. Bunga terbentuk pada ujung batang, terdiri atas dua hingga lebih dari 10 kuntum. Bunga kerk lily tergolong bunga potong yang mempunyai nilai ekonomi tinggi. Namun untuk pengembangan bunga tersebut ditemui kendala antara lain keterbatasan bahan tanam yang berkualitas baik dalam jumlah besar (Sri Winarsih *et al.*, 1998).

Pengembangan tanaman kerk lily umumnya dilakukan secara vegetatif konvensional (Hoesen dan Gandawidjaja, 1985). Beragamnya bibit dan ketidakserempakan pembungaan yang diperoleh dari hasil teknik tersebut kurang menguntungkan bagi petani bunga kerk lily. Untuk mendapatkan tanaman yang seragam dalam jumlah besar dengan kualitas bunga yang baik sangat mungkin diperoleh dari perbanyakan kerk lily secara *in vitro*.

Perbanyakan kerk lily secara *in vitro* telah dilakukan oleh Takayama dan Misawa (1983) dengan menggunakan eksplan sisik umbi untuk membentuk bulblet. Liu dan Burger (1986) menggunakan eksplan tangkai bunga lily untuk membentuk tunas mikro. Sri Winarsih *et al.* (1998) menggunakan eksplan sisik umbi untuk membentuk bulblet maupun tunas mikro.

Kultur daun secara *in vitro* untuk menginduksi embriogenesis somatik telah berhasil dilakukan antara lain pada tanaman kapas (Trolinder dan Goodin, 1988), kopi robusta (Sumaryono dan Tahardi, 1993), kelapa sawit (Ginting dan Fatmawati, 1993), kakao (Tahardi dan Mardiana, 1995), teh (Tahardi *et al.*, 1997), karet (Tahardi, 1998), belimbing (Sukanto, 1998), *Myrtus communis* (Canhoto *et al.*, 1999), *chesnut* (Xing *et al.*, 1999), ginseng (Choi *et al.*, 1999), dan Iris (Shabli dan Ajlouni, 2000). Embriogenesis somatik pada kultur daun kerk lily selama ini belum pernah dilaporkan. Untuk itu penelitian

untuk memperbanyak tanaman kerk lily melalui embriogenesis somatik perlu dilakukan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh zat pengatur tumbuh terhadap pembentukan embrio somatik pada kultur daun kerk lily secara *in-vitro*.

BAHAN DAN METODE

Sterilisasi eksplan

Umbi kerk lily yang dipanen dari kebun dicuci dengan air untuk menghilangkan tanah yang menempel pada sisik umbi, kemudian dicuci dengan fungisida dan dibilas dengan air sampai bersih. Daun dipotong dengan panjang 3 cm, lalu dicuci dengan fungisida. Potongan daun dibawa ke dalam *laminar airflow cabinet*, direndam sambil dikocok dalam larutan clorox 10% selama 10 menit dan dibilas dengan air steril. Daun tsb dipotong dengan ukuran 1 cm dan dikultur pada media perlakuan.

Media dan Pemeliharaan Kultur

Media dasar yang digunakan adalah media Murashige dan Skoog (MS). Keasaman media diatur pada pH 5,7 dan dipadatkan dengan 2,5 % gelrite. 20 ml media dimasukkan ke dalam botol kultur lalu diautoklaf pada tekanan 21 psi selama 20 menit.

Kultur dipertahankan pada ruang gelap dengan suhu ruang 26-28°C selama dua minggu pertama, lalu disinari selama 16 jam terang dan 8 jam gelap selama masa kultur.

Perlakuan dan Analisis data

Induksi embriogenesis somatik

Percobaan dilakukan dua tahap, yaitu tahap pertama untuk mengetahui konsentrasi terbaik *Indole acetic acid* (IAA) dan *6-Benzyle-amino purine* (BAP), sedangkan tahap kedua untuk mengetahui pengaruh berbagai auksin dan sitokinin pada konsentrasi terbaik yang diperoleh dari percobaan tahap pertama.

Percobaan tahap pertama disusun berdasarkan rancangan acak lengkap factorial, dengan jumlah ulangan tiga kali. Faktor pertama adalah konsentrasi IAA, terdiri atas 5 aras/tingkat yaitu 0, 0,25, 0,5, 0,75 dan 1 mg/l. Faktor kedua adalah konsentrasi BAP, terdiri atas 4 aras yaitu 0, 0,5, 1 dan 2 mg/l.

Percobaan tahap kedua disusun berdasarkan rancangan acak lengkap faktorial dengan jumlah ulangan empat kali. Faktor pertama adalah jenis auksin (konsentrasi 0,25 mg/l) yang terdiri atas empat jenis, yaitu Indole Acetic Acid (IAA), *J-Naphthalene Acetic Acid* (NAA), *Indole -3-Butyric Acid* (DBA) dan *-2,4- dichlorophenoxyacetic acid* (2,4D). Faktor kedua adalah jenis sitokinin (konsentrasi 1 mg/l) yang terdiri atas dua jenis yaitu BAP dan kinetin.

Pendewasaan embrio somatik

Percobaan pada tahap ini disusun berdasarkan rancangan acak lengkap faktorial dengan ulangan tiga kali. Faktor pertama adalah konsentrasi *Absicic acid* (ABA) yang teridiri atas dua aras, yaitu: 0 dan 1 mg/l ABA. Faktor kedua adalah konsentrasi *Giberellic acid* (GA₃) yang terdiri atas lima tingkat/aras yaitu 0, 0,25,0,5,0,75 dan 1 mg/l GA₃.

Parameter yang diamati pada tahap induksi embriogenesis somatik adalah persentase eksplan yang membentuk embrio somatik dan jumlah embrio somatik per eksplan. Parameter yang diamati pada tahap pendewasaan embrio somatik adalah persentase embrio somatik yang telah mencapai fase 'kotiledonare'. Data dianalisis dengan meng-gunakan uji beda nyata terkecil pada taraf 5 %.

HASIL

Induksi embriogenesis somatik.

Embrio somatik dapat diperoleh dari kultur *in vitro* daun kerk lily. Proses pembentukan embrio somatik tersebut didahului dengan terjadinya pembengkakan pada bekas potongan

eksplan daun. Proses ini dilanjutkan dengan munculnya bintik-bintik kecil berwarna krem yang menyerupai globular pada rekahan tersebut. Globular tersebut tumbuh memanjang lalu membentuk embrio somatik. Dalam pengamatan mikroskopik, terlihat bahwa pada satu dompolan embrio somatik terdapat berbagai fase perkembangan embrio, yaitu globular, fase hati, torpedoid maupun kotiledonari (Gambar 1A).

Pada percobaan pertama diketahui bahwa auksin, sitokinin dan interaksi antara keduanya berpengaruh pada pembentukan embrio somatik, baik pada persentase eksplan yang dapat diinisiasi membentuk embrio somatik maupun pada jumlah embrio somatik per eksplan (Gambar 2). Embrio somatik masih dapat terbentuk pada media yang tidak mengandung BAP tetapi mengandung IAA, sebaliknya hal tersebut tidak dapat terjadi apabila media tidak mengandung IAA. Kenaikan IAA maupun BAP sampai konsentrasi tertentu dapat meningkatkan frekuensi terjadinya embrio somatik dan jumlah embrio somatik per eksplan. Hasil terbaik diperoleh pada kombinasi perlakuan 0,25 mg/l IAA dengan 1 mg/l BAP. Auksin (konsentrasi 0,25 mg/l) dan sitokinin (konsentrasi 1 mg/l) dipakai untuk uji berbagai jenis auksin dan sitokinin pada percobaan kedua.

Hasil penelitian pada percobaan kedua menunjukkan bahwa jenis auksin, jenis sitokinin dan interaksi antara keduanya berpengaruh terhadap pembentukan embrio somatik (Gambar 3). IAA yang dipasangkan dengan BAP maupun kinetin merupakan auksin yang paling baik untuk proses pembentukan embrio somatik. Sedangkan peran BAP dan kinetin dalam pembentukan embrio somatik kerk lily tergantung pada auksin yang dipasangkan.

Pendewasaan embrio somatik

Pada penelitian ini, pendewasaan embrio somatik dilakukan dengan cara memindahkan eksplan daun yang embrio somatik yang diperoleh dari media induksi ke media pengecambahan.

Evaluasi pendewasaan embrio somatik didasarkan pada perkembangan embrio somatik yang telah berhasil membentuk calon plantlet yang ditandai dengan telah terbentuknya helaian daun kecil dan calon akar (Gambar 1B). Proses pendewasaan embrio somatik secara nyata dapat didorong oleh penambahan ABA dan GA₃. Dibandingkan dengan perlakuan tunggal, hasil yang lebih baik diperoleh dari kombinasi ABA dan GA₃. Persentase tertinggi embrio somatik yang dapat mencapai calon plantlet (70%) diperoleh media yang mengandung 1 mg/l ABA yang dikombinasikan dengan 0,5 mg/l GA₃ (Gambar 4). Embrio somatik kerk lily yang dihasilkan pada penelitian ini telah berhasil diakarkan dengan memindahkan embrio somatik pada media perakaran (Sri Winarsih *et al.*, 1998).

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, diketahui bahwa zat pengatur tumbuh merupakan faktor penting dalam embriogenesis somatik pada kultur daun kerk lily. IAA mutlak diperlukan untuk menginduksi embrio somatik kerk lily. Hal tersebut didasarkan pada kenyataan bahwa embrio somatik tidak dapat terbentuk pada media yang tidak mengandung IAA. Peran auksin, utamanya IAA pada induksi embriogenesis somatik juga telah diketahui dengan baik pada kultur *in vitro* kopi robusta (Lanaud, 1981), namun hasil sebaliknya telah dilaporkan Hatanaka *et al.* (1991).

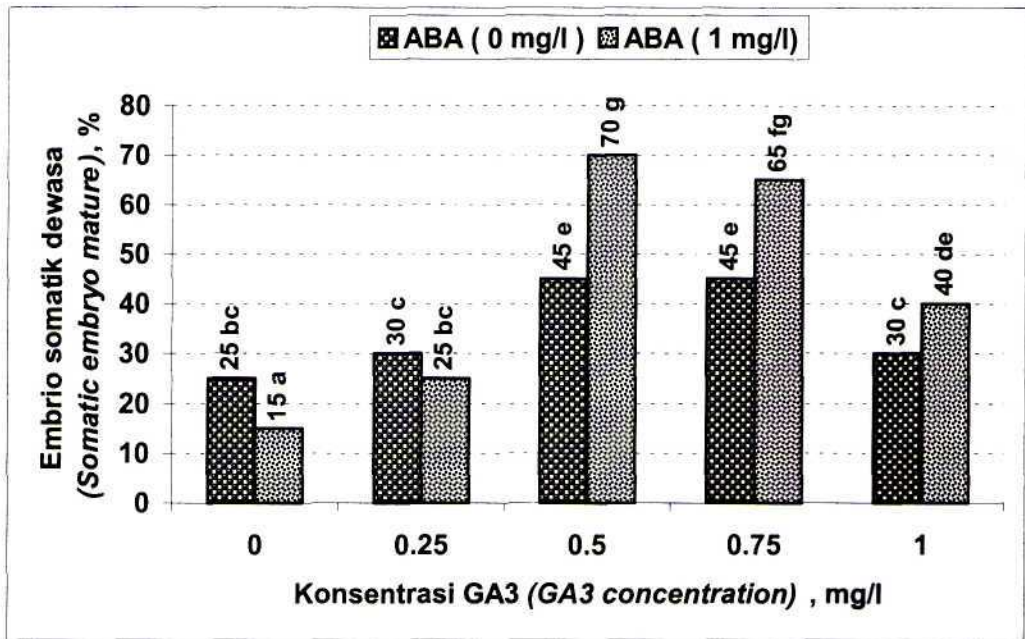
BAP juga berpengaruh pada induksi embriogenesis somatik kerk lily. Walaupun proses induksi embriogenesis somatik dapat terjadi pada media tanpa diperkaya dengan BAP, tetapi frekuensi daun yang dapat membentuk embrio somatik maupun jumlah embrio somatik per eksplan meningkat seiring dengan peningkatan BAP sampai dengan konsentrasi 1-2 mg/l. Hasil tersebut menunjukkan bahwa BAP sangat berperan dalam memperbaiki tingkat induksi embriogenesis somatik pada kultur *in vitro* daun kerk lily. Masih dapat terjadinya embriogenesis somatik pada media tanpa BAP kemungkinan karena adanya kandungan

sitokinin endogen pada daun kerk lily. Hal tersebut terjadi juga pada pembentukan tunas mikro pada kultur tangkai bunga kerk lily (Liu dan Burger, 1986), bulblet dan tunas mikro pada kultur sisik kerk lily (Priyono dan Winarsih, 2000). Dengan diketahuinya bahwa peran BAP pada induksi embriogenesis somatik pada kultur daun kerk lily meningkat apabila dikombinasikan dengan IAA, menunjukkan bahwa kedua zat pengatur tumbuh tersebut berinteraksi dalam proses embriogenesis somatik. Hasil serupa telah dilaporkan pada embriogenesis somatik kopi arabika (Priyono, 1992). Takayama dan Misawa (1982) melaporkan bahwa kombinasi sitokinin dan auksin menentukan arah pembentukan organ pada kultur *in vitro* sisik kerk lily, selanjutnya Shibli dan Ajlaoui (2000) melaporkan bahwa dalam pembentukan embrio somatik pada bunga Iris juga ditentukan oleh komposisi kombinasi sitokinin dan auksin. Hal tersebut menunjukkan bahwa kombinasi sitokinin dan auksin tidak hanya mempengaruhi embriogenesis somatik tetapi juga pada organogenesis.

Pada pengujian kombinasi BAP dan kinetin dengan beberapa auksin diketahui bahwa BAP maupun kinetin merupakan sitokinin yang baik untuk induksi embriogenesis pada kultur *in vitro* daun kerk lily. Hasil optimal kedua sitokinin tersebut tergantung pada auksin yang dipasang. BAP lebih baik dikombinasikan dengan NAA atau IBA, sedangkan kinetin lebih baik dikombinasikan dengan IAA atau 2,4D. Kombinasi antara kinetin dengan IAA merupakan yang terbaik untuk induksi embriogenesis pada penelitian ini. Nampaknya kombinasi terbaik sitokinin dan auksin pada induksi embriogenesis somatik sangat tergantung pada spesies tanaman. BAP + 2,4D baik untuk induksi embriogenesis somatik pada kultur daun kopi 'arabusta' (Dublin, 1981) dan *chessnut* (Xing *et al.*, 1999), kinetin + NAA pada kopi catimor (Garcia dan Menendez, 1987), BAP + IBA pada kopi robusta (Sumaryono dan Tahardi, 1993), kinetin + 2,4D pada kakao (Tahardi, 1995) dan teh (Tahardi *et al.*, 1997). Lanaud (1981) telah

melakukan pengujian beberapa kombinasi sitokinin dan auksin pada embriogenesis kopi robusta dengan hasil bahwa BAP + IAA merupakan kombinasi terbaik, lalu disusul berturut-turut kinetin + IAA, BAP + IBA dan BAP + NAA. Pengaruh kombinasi sitokinin dan auksin juga dilaporkan Shibli dan Ajlouni (2000) pada embriogenesis somatik bunga Iris. Pada penelitian tersebut, hanya BAP yang dikombinasikan dengan IBA atau 2,4D yang dapat membentuk embrio somatik, sebaliknya tidak dapat terbentuk embrio somatik apabila 2-isopentenyl adenine (2-iP), zeatin atau thidiazuron dikombinasikan dengan IBA maupun 2,4D. Hatanakae/a/. (1991) melaporkan bahwa 2-iP, BAP dan kinetin, dapat menginduksi embriogenesis somatik pada kultur daun kopi robusta, proses tersebut terhambat apabila ketiga sitokinin tersebut dikombinasikan dengan NAA, IBA, IAA atau 2,4D. Pence *et al.* (1979) melaporkan bahwa kombinasi antara kinetin, 2-iP atau BAP dengan IAA, NAA atau 2,4D tidak dapat mendorong embriogenesis somatik pada kakao, tetapi proses tersebut dapat terjadi pada media yang mengandung air kelapa + NAA. Chen *et al.* (1987) melaporkan bahwa kinetin + NAA tidak dapat mendorong embriogenesis pada pepaya, proses tersebut baru dapat terjadi apabila kombinasi tersebut ditambah dengan GA₃. Hal serupa dilaporkan Tahardi (1998), bahwa embrio somatik karet dapat diperoleh dari kalus embrionik yang disubkultur pada media yang diperkaya kinetin + NAA + GA₃.

Pada penelitian ini penambahan ABA dan GA₃ dapat mendorong pendewasaan embrio somatik kerk lily. Peranan ABA pada pendewasaan embrio somatik kerk lily lebih baik jika dikombinasikan dengan GA₃. Peran GA₃ ini telah dirunjukkan juga pada perkembangan embrio somatik *Myrtus communis* (Canhoto *et al.*, 1999). Pada penelitian pembungaan kerk lily (De Hertogh dan Blakely, 1972) GA₃ dapat memperpendek waktu yang dibutuhkan untuk terjadinya pembungaan. ABA tampaknya memang efektif untuk



Gambar 4. Pengaruh ABA dan GA₃ pada persentase pendewasaan embrio somatik pada kultur *in vitro* kerk lily. Angka-angka dalam histogram yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji BNT pada taraf 5%

KESIMPULAN

1. Regenerasi tanaman kerk lily melalui embriogenesis somatik telah dapat diinduksi dari kultur *in vitro* pada eksplan daun.
2. Pembentukan embrio somatik kerk lily dipengaruhi oleh auksin dan sitokinin, yang mana IAA mutlak diperlukan dalam induksi embrio somatik kerk lily. IAA yang dikombinasikan/ dipasangkan dengan BAP maupun kinetin merupakan auksin yang paling baik unruk proses pembentukan embrio somatik. Sedangkan peran BAP dan kinetin dalam pembentukan embrio somatik kerk lily tergantung pada jenis auksin yang digunakan. Kombinasi 1 mg/l kinetin + 0,25 mg/l IAA merupakan kombinasi terbaik untuk induksi embrio somatik kerk lily.
3. Pendewasaan embrio somatik hasil kultur daun perlu dilakukan. Pendewasaan embrio somatik kerk lily tersebut dapat didorong dengan memindahkan embrio somatik yang diperoleh dari media induksi ke media yang mengandung 1 mg/l ABA dan 0,5 mg/l GA₃

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Bapak Direktur Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia atas ijin dipublikasikannya tulisan ini. Ucapan serupa disampaikan kepada sdr Didi Suhendi, teknisi Kultur Jaringan Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

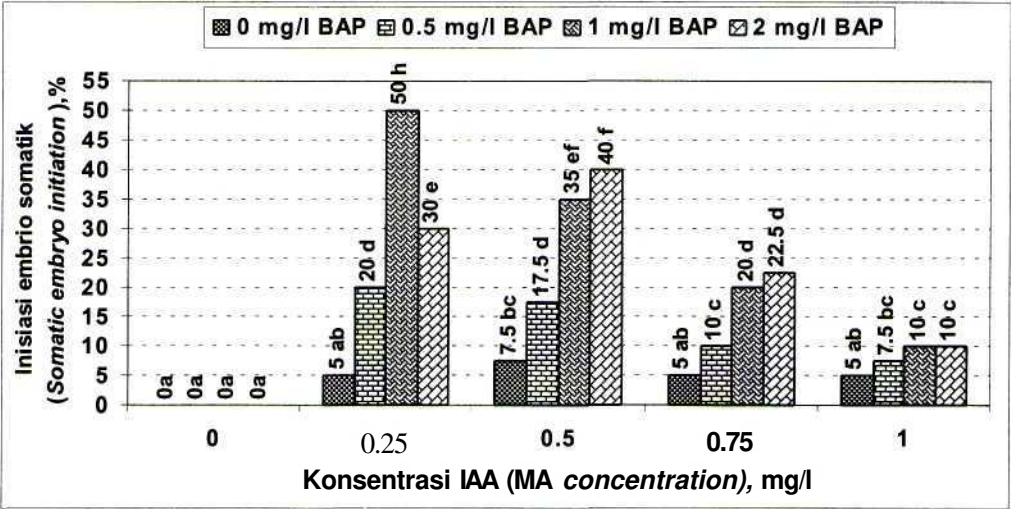
DAFTAR PUSTAKA

Ammirato PV. 1983. The Regulation of Somatic Embryo Development in Plant Cell Culture: Suspension Culture Technique and Hormonal Requirements. *Biotechnology* 1, 68-73.

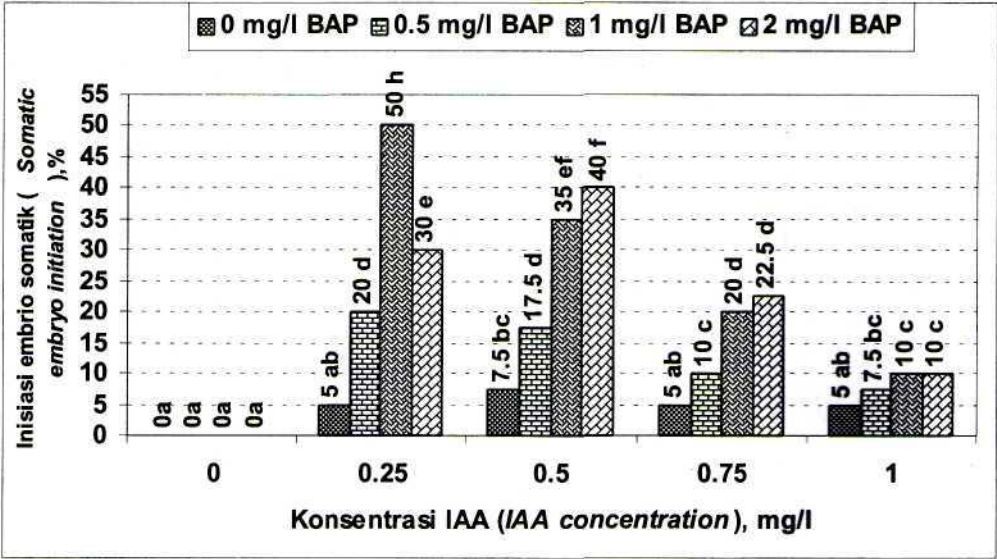
Canhoto JM, Maria L and Cruz GS. 1999. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Myrtle. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57, 13-21

Chen MH, Wong PJ and Maeda E. 1987. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in *Carica papaya* L. Tissue Culture Derived from Root Explants. *Plant Cell Report* 6,348-351.

A

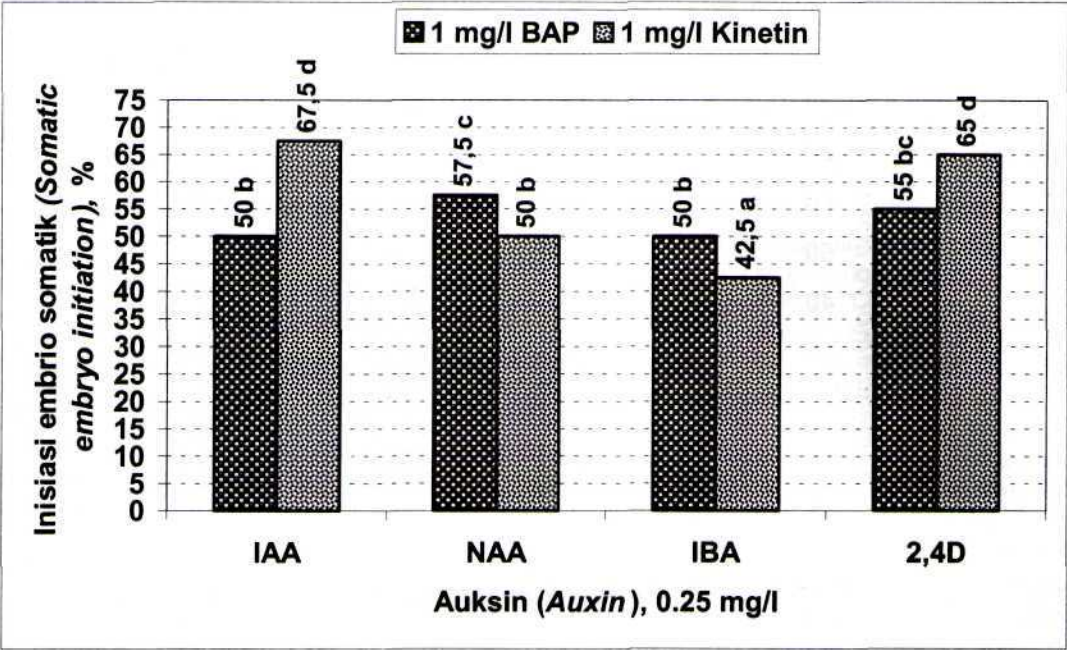


B

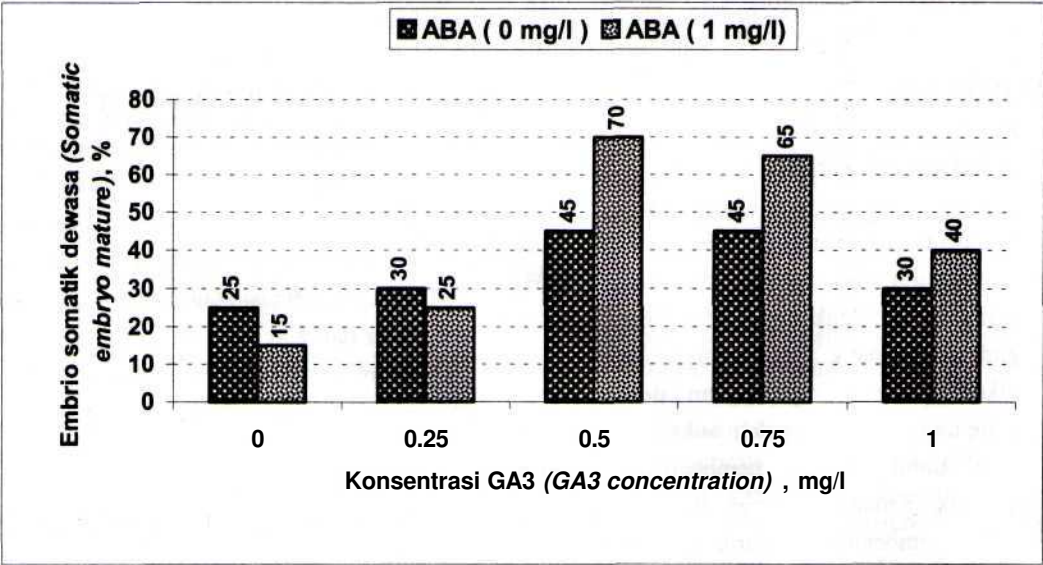


Gambar 2. Pengaruh IAA dan BAP pada pembentukan embrio somatic pada kultur *in vitro* kerk lily. A: inisiasi embrio somatic (%), B: jumlah embrio. Angka-angka dalam histogram yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji BNT pada taraf 5%.

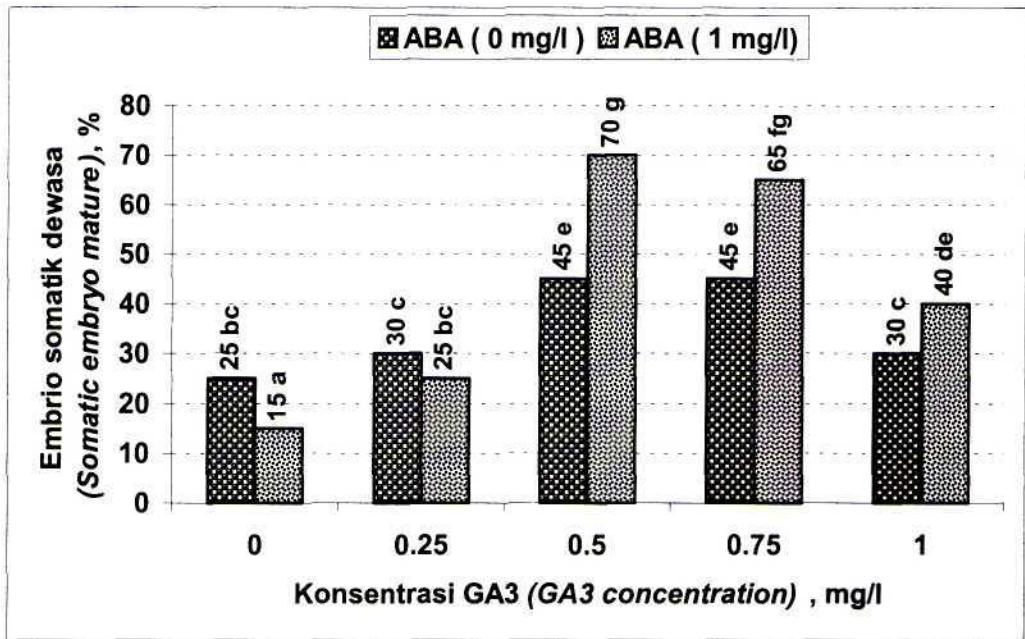
A



B



Gambar 3. Pengaruh berbagai auksin dan sitokinin pada pembentukan embrio somatik pada kultur *in vitro* kerk lily. A: inisiasi embrio somatik (%), B: jumlah embrio. Angka-angka dalam histogram yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji BNT pada taraf 5%



Gambar 4. Pengaruh ABA dan GA₃ pada persentase pendewasaan embrio somatik pada kultur *in vitro* kerk lily. Angka-angka dalam histogram yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji BNT pada taraf 5%

KESIMPULAN

1. Regenerasi tanaman kerk lily melalui embriogenesis somatik telah dapat diinduksi dari kultur *in vitro* pada eksplan daun.
2. Pembentukan embrio somatik kerk lily dipengaruhi oleh auksin dan sitokinin, yang mana IAA mutlak diperlukan dalam induksi embrio somatik kerk lily. IAA yang dikombinasikan/ dipasangkan dengan BAP maupun kinetin merupakan auksin yang paling baik unruk proses pembentukan embrio somatik. Sedangkan peran BAP dan kinetin dalam pembentukan embrio somatik kerk lily tergantung pada jenis auksin yang digunakan. Kombinasi 1 mg/l kinetin + 0,25 mg/l IAA merupakan kombinasi terbaik untuk induksi embrio somatik kerk lily.
3. Pendewasaan embrio somatik hasil kultur daun perlu dilakukan. Pendewasaan embrio somatik kerk lily tersebut dapat didorong dengan memindahkan embrio somatik yang diperoleh dari media induksi ke media yang mengandung 1 mg/l ABA dan 0,5 mg/l GA₃

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Bapak Direktur Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia atas ijin dipublikasikannya tulisan ini. Ucapan serupa disampaikan kepada sdr Didi Suhendi, teknisi Kultur Jaringan Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Ammirato PV. 1983. The Regulation of Somatic Embryo Development in Plant Cell Culture: Suspension Culture Technique and Hormonal Requirements. *Biotechnology* 1, 68-73.

Canhoto JM, Maria L and Cruz GS. 1999. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Myrtle. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57, 13-21

Chen MH, Wong PJ and Maeda E. 1987. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in *Carica papaya* L. Tissue Culture Derived from Root Explants. *Plant Cell Report* 6,348-351.

- Choi YE, Yang DC and Yoon ES. 1999.** Rapid Propagation of *Eleutherococcus senticosus* via Direct Somatic Embryogenesis from Explant or Seedlings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58, 93-97.
- Dublin P. 1981.** Embryogenese Somatique Directe sur Fragments de Feuilles de Cafeier arabusta. *Café Cacao Thé* 25 (4), 237-242.
- De Hertogh AA and Blakely N. 1972.** Influence of Gibberellins A₃ and A_{AKI} on Development of Forced *Lilium longiflorum* Thunb. cv. Ace. *J.Amer. Soc.Hort.Sci.* 97(3), 320-324.
- Garcia E and Menendez A. 1987.** Embryogenesis Somatica a Partir de Explantes Foliares del Cafeto Catimor. *Café Cacao Thé* 31(1), 15-22.
- Ginting G and Fatmawati. 1993.** Propagation Methodology of Oilpalm at Marihat. *Proc. of the ISOPB Int. Symp. on Recent Development in Oilpalm Tissue Culture and Biochemistry*, hlm.33-37.
- Hatanaka T, Arakawa O, Yasuda T, Uchida Nand Yamaguchi T. 1991.** Effect of Plant Growth Regulators on Somatic Embryogenesis in Leaf Cultures of *Coffea canephora*. *Plant Cell report* 10, 179-182.
- Hoesen DSH dan Gandawidjaja D. 1985.** Lili Bunga Pegunungan. *Buletin Kebun Raya* 6(6), 141-147.
- Konan NK, Sangwan RS and Sangwan BS. 1994.** Somatic Embryogenesis from Cultured Mature Cotyledons of Cassava. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 37, 91-102.
- Lanaud C. 1981.** Production de Plantules de *Coffea canephora* par Embryogeneses Somatique Realise a Partir de Culture *in vitro* d'ovules. *Café Cacao Thé* 25(4), 231-235.
- Liu L and Burger DW. 1986.** In-vitro Propagation of Easter Lily from Pedicels. *Hort. Sci.* 21(6), 1437-1438.
- Pence VC, Hasegawa PM and Janick J. 1979.** Asexual Embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *J. Amer. Soc. Hort. Sci* 104(2), 145-148.
- Priyono. 1992.** Direct Somatic Embryogenesis in Arabika Coffee Derived from Hypocotyle Skin Explant. *Indon.J.Trop.Agric.* 3(2), 64-66.
- Priyono dan Sri Winarsih. 2000.** Pengaruh Arah dan Ukuran Potongan Sisik Umbi Kerk Lily (*Lilium longiflorum* Thunb.) terhadap Pembentukan Tunas Mikro dan Bulblet Secara *In-vitro*. *Berita Biologi* 5(1), 85-92.
- Shibli RA and Ajlouni MM. 2000.** Somatic Embryogenesis in the Endemic Black Iris. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61, 15-21.
- Sri Winarsih, Priyono dan Zaenudin. 1998.** Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh terhadap Perbanyakan Kerk Lily secara *In-vitro*. *Jurnal Hortikultura* 8 (3), 1145-1152.
- Sukanto LA. 1998.** Regenerasi Tanaman Belimbing melalui Kultur Akar Secara *In-vitro*. *Berita Biologi* 4 (2dan3), 66-70
- Sumaryono dan Tahardi JS. 1993.** Perbanyakan Klon Kopi Robusta Toleran Nematoda melalui Embri-ogenesis Somatic Langsung. *Menara Perkebunan* 61 (3), 50-55.
- Tahardi JS and Mardiana N. 1995.** Cocoa Regeneration via Somatic Embryogenesis. *Menara Perkebunan* 63 (1), 3-7.
- Tahardi JS, Sumaryono and Mardiana N. 1997.** Initiation and Maintenance of Embryogenic Suspension Culture of Tea. *Menara Perkebunan* 65 (1), 1-8.
- Tahardi JS. 1998.** Plant Regeneration in *Hevea brasiliensis* via Somatic Embryogenesis. *Menara Perkebunan* 66 (1), 1-8.
- Takayama S and Misawa M. 1982.** Regulation of Organ Formation by Cytokinin and Auxin in *Lilium* Bulbscale Grown *In-vitro*. *Plant Cell Physiol.* 23, 67-74.
- Takayama S and Misawa M. 1983.** The Mass Propagation of *Lilium* *In-vitro* by Stimulation of Multiple Adventitious Bulbscale Formation and by Shake Culture. *Can.J. Bot.* 61, 224-228.
- Trolinder NL and Goodin JR. 1988.** Somatic Embryogenesis in Cotton I. Effects of Sources of Explant and Hormon Regime. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 12, 31-42.
- Vieitez FJ. 1995.** Somatic Embryogenesis in Chesnut. Dalam: Somatic Embryogenesis in Woody Plants Vol. 2. Jam SM, Gupta PK and Newton RJ (eds). Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands. Him 375-407.
- Xing Z, Powell WA and Maynard CA. 1999.** Development and Germination of American Chestnut Somatic Embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57, 44-55.