

Regenerasi Kultur Lengkeng Dataran Rendah cv. Diamond River melalui Embriogenesis Somatik

Roostika, I., V.N. Arief, dan N. Sunarlim

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

Naskah diterima tanggal 30 Januari 2008 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 4 Agustus 2008

ABSTRAK. Beberapa kultivar lengkeng toleran dataran rendah telah diintroduksi ke Indonesia termasuk lengkeng cv. Diamond River. Kultivar tersebut telah dibudidayakan secara komersial di daerah Kalimantan Barat. Namun, pengembangannya menghadapi kendala dalam hal penyediaan bibit. Dalam rangka memperoleh bibit lengkeng dalam jumlah yang berlimpah, perlu penerapan teknik kultur in vitro. Penelitian ini bertujuan untuk menginduksi dan meregenerasikan kalus embriogenik lengkeng cv. Diamond River. Induksi kalus dilakukan menggunakan daun muda sebagai eksplan. Regenerasi kalus embriogenik dilakukan dalam 4 tahap. Pada tahap pertama digunakan air kelapa pada konsentrasi 5 dan 10%. Pada tahap kedua, diuji pengaruh auksin (IBA dan NAA) serta sitokinin (BA dan kinetin) masing-masing pada taraf 0,5 ppm. Pada tahap ketiga, diuji pengaruh auksin IBA dan NAA pada taraf 0,1; 0,5; dan 1 ppm. Pada tahap keempat diuji perlakuan sukrosa pada taraf 2 dan 3% dengan atau tanpa auksin (IBA dan NAA) masing-masing pada taraf 0,5 dan 1 ppm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa regenerasi melalui embriogenesis somatik berpeluang diterapkan pada tanaman lengkeng cv. Diamond River. Respons kalus embriogenik lebih dominan ke arah pembentukan akar daripada tunas. Penggunaan media yang mengandung NAA 1 ppm mampu meningkatkan pembentukan tunas hingga mencapai lebih dari 30%, sedangkan penggunaan sukrosa 3% tanpa auksin mampu meningkatkan pembentukan planlet hingga mencapai 12%. Persentase keberhasilan aklimatisasi adalah sebesar 14%.

Katakunci: *Euphoria longan* Lam; Dataran rendah; Regenerasi; Embriogenesis somatik

ABSTRACT. Roostika, I., V.N. Arief, and N. Sunarlim. 2009. **Regeneration of Lowland Longan cv. Diamond River through Somatic Embryogenesis.** Several low-land longan cultivars have been introduced to Indonesia, including cultivar of Diamond River. This cultivar has been planted commercially and produced well in West Kalimantan. Unfortunately, the development of this cultivar was facing a problem on the availability of planting materials. In order to provide large number of Diamond River seedlings, tissue culture technique was used. The aim of the study was to induce and regenerate embryogenic calli of longan cv. Diamond River. A research on callus induction was conducted using young leaves as explants source. Regeneration of embryogenic calli was conducted in 4 steps. The first, coconut water at the rate of 5 and 10% were used. The second, the auxin (IBA and NAA) and cytokinin (BA and kinetin) at the level of 0.5 ppm, respectively were tested. The third, the IBA and NAA at the level of 0.1, 0.5, and 1 ppm were used. The fourth, the sucrose at the level of 2 and 3% with or without addition of IBA and NAA at the level of 0.5 and 1 ppm were used respectively. The results showed that somatic embryogenesis regeneration was potentially applied to longan cv. Diamond River. The root formation was more dominant than the shoot formation. The use of 1 ppm NAA could increase the shoot formation up to more than 30% whereas the use of 3% sucrose without auxin could increase the plantlet formation up to 12%. The 14% of plantlet produced by this technique grew well during acclimatization period.

Keywords: *Euphoria longan* Lam; Lowland; Regeneration; Somatic embryogenesis

Lengkeng termasuk famili *Sapindaceae* merupakan tanaman keras yang berasal dari dataran rendah Asia (China, Vietnam, dan Thailand). Di Indonesia, lengkeng tumbuh pada ketinggian di atas 600 m dpl., seperti di Malang, Jawa Timur, dan Ambarawa, Jawa Tengah. Sampai saat ini baru 2 varietas lengkeng yang dilepas, yaitu lengkeng varietas Batu dan varietas Selarong yang merupakan varietas lengkeng dataran tinggi (Direktorat Perbenihan dan Sarana Produksi 2007).

Produksi lengkeng di Indonesia masih rendah, akibat terbatasnya populasi tanaman

yang disebabkan oleh kurangnya peremajaan tanaman. Luas area dataran tinggi di Indonesia terbatas dan sebagian besar dari wilayah tersebut telah ditanami sayur-sayuran. Oleh karena itu, tidaklah mengherankan jika animo masyarakat untuk mengembangkan lengkeng dataran rendah sangat tinggi. Mereka bahkan bersedia membeli benih dari luar negeri dengan harga yang mahal (Direktorat Perbenihan dan Sarana Produksi 2007).

Dewasa ini, terdapat beberapa varietas lengkeng yang beradaptasi di lingkungan dataran rendah, salah satu di antaranya adalah

varietas Diamond River. Varietas tersebut telah dibudidayakan di beberapa daerah, termasuk Singkawang dan Pontianak, Kalimantan Barat. Namun, pengembangannya menghadapi kendala, yaitu keterbatasan bibit. Oleh sebab itu, dalam upaya mengembangkan area pertanaman lengkeng, maka kegiatan penyediaan bibit perlu ditingkatkan.

Lambatnya proses penyediaan bibit lengkeng masih merupakan masalah dalam meningkatkan efisiensi penangkarnya. Perbanyak bibit cangkokan yang umum dilakukan, ternyata tidak mampu menyediakan bibit dalam jumlah banyak. Di sisi lain, perbanyak dengan cara okulasi maupun penyambungan belum memberikan hasil yang memuaskan. Persentase bibit jadi hasil penyambungan dan penempelan yang dilakukan pada semaian batang bawah berumur 12 bulan masing-masing sebesar 38,3 dan 6,7% untuk teknik sambung celah dan melalui teknik okulasi irisan (Supriyanto *et al.* 1997). Oleh karena itu, dibutuhkan penerapan teknologi alternatif yang mampu menyediakan bibit lengkeng dalam jumlah yang banyak. Teknologi yang berpeluang untuk diterapkan adalah teknik kultur in vitro.

Penerapan teknik kultur in vitro untuk perbanyak bibit telah banyak diterapkan pada berbagai tanaman, seperti tanaman nanas (Firoozabady dan Moy 2004), ginseng (Choi *et al.* 1999), bambu (Mukunthakumar dan Mathur 1992), ketimun (Pellinen *et al.* 1997), jati dan abaka (Mariska 2002), teh (Janeiro *et al.* 1997), serta anggrek dan pisang (Ganapathi *et al.* 2001). Untuk keperluan perbanyak bibit secara masal, regenerasi melalui organogenesis dan embriogenesis somatik sering direkomendasikan para peneliti. Pada sistem regenerasi organogenesis, perbanyak tanaman dapat dilakukan melalui proliferasi tunas aksilar. Penelitian pendahuluan (tidak dipublikasikan) menunjukkan bahwa cara tersebut tidak efektif dan tidak efisien karena eksplan mengalami pencoklatan, sehingga tidak dapat lama bertahan hidup dan tidak mampu memperbanyak diri. Oleh karena itu, regenerasi melalui embriogenesis somatik perlu diuji penggunaannya pada tanaman lengkeng.

Embriogenesis somatik adalah suatu proses, di mana sel somatik berkembang membentuk tanaman baru melalui tahap perkembangan embrio yang spesifik tanpa melalui fusi gamet

(Purnamaningsih 2002). Teknik tersebut sangat prospektif untuk diterapkan (Senaretna 1992) karena peluang bibit yang dihasilkan akan jauh lebih banyak dan waktu yang diperlukan relatif lebih singkat dibandingkan dengan organogenesis. Pada embriogenesis, setiap sel pada jaringan yang ditanam berpotensi berkembang menjadi 1 individu baru, sehingga kapasitas produksi bibitnya dapat mencapai ratusan ribu hingga jutaan bibit per tahun. Dilaporkan pada tanaman obat langka purwoceng, penerapan embriogenesis somatik mampu menghasilkan bibit hingga 200 kali lipat dari bibit yang dihasilkan dari jalur organogenesis melalui proliferasi tunas adventif (Roostika *et al.* 2007).

Regenerasi melalui embriogenesis somatik tidak hanya berguna bagi perbanyak tanaman secara masal, tetapi dapat juga diterapkan untuk tujuan studi fisiologi perkembangan embrio, genetika dan biokimia untuk produksi tanaman transgenik, serta untuk produksi benih sintetik (de Almeida dan de Almeida 2006).

Pada embriogenesis somatik, tahapan yang harus dilalui adalah induksi kalus embriogenik, pematangan, dan perkecambahan kalus embriogenik menjadi embrio somatik. Tujuan penelitian adalah untuk menginduksi dan meregenerasikan kalus embriogenik lengkeng cv. Diamond River. Diduga bahwa pemberian auksin atau sitokinin secara eksogen serta peningkatan taraf sukrosa dalam media regenerasi dapat meningkatkan daya regenerasi kalus embriogenik lengkeng cv. Diamond River.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor, pada tahun 2004-2006. Bahan tanaman yang digunakan adalah lengkeng dataran rendah varietas Diamond River. Beberapa tahapan kegiatan yang tercakup dalam penelitian ini adalah sterilisasi bahan tanaman, induksi kalus embriogenik, regenerasi kalus embriogenik, dan aklimatisasi planlet.

Eksplan yang digunakan dalam penelitian adalah daun yang masih muda. Sebelum proses sterilisasi, eksplan dicuci dengan air detergen

kemudian direndam dalam campuran Benlate. Selanjutnya eksplan disterilisasi berturut-turut dengan alkohol 70% selama 5 menit, NaOCl 1,575% selama 5 menit, dan NaOCl 1,05% selama 10 menit. Setelah proses sterilisasi, eksplan dicuci dengan akuades steril sebanyak 3 kali.

Induksi kalus embriogenik dilakukan dengan menerapkan teknik yang telah ditemukan oleh Litz (1988), yaitu menggunakan media dasar Gamborg yang mengandung 2.4-D 0,5 ppm dan kinetin 1 ppm. Inkubasi dilakukan pada kondisi gelap di ruang kultur dengan suhu 20°C hingga terbentuk kalus embriogenik. Kalus embriogenik ditandai dengan terbentuknya struktur kalus yang *friable* (remah dan mudah terpisahkan) serta berwarna putih atau kekuningan. Kalus embriogenik yang dihasilkan dari tahap pertama digunakan sebagai eksplan pada proses regenerasi yang menggunakan 4 metode.

Pada percobaan pertama, diujikan metode yang telah dilaporkan oleh Litz (1988) dengan maksud untuk mengetahui pengaruh beberapa formulasi media terhadap daya regenerasi kalus embriogenik varietas Diamond River. Kalus embriogenik ditanam pada media dasar Gamborg yang mengandung sukrosa 1 dan 2% dengan penambahan air kelapa pada konsentrasi 5 dan 10%.

Pada percobaan kedua, untuk mengetahui respons kalus terhadap perlakuan auksin dan sitokinin. Kalus embriogenik ditanam dalam media dasar MS dengan sukrosa 1% yang ditambah dengan auksin atau sitokinin. Auksin yang dicobakan adalah IBA dan NAA, masing-masing pada taraf 0,5 ppm, sedangkan sitokinin yang digunakan adalah BA dan kinetin, masing-masing pada taraf 0,5 ppm.

Pada percobaan ketiga, diteliti pengaruh jenis dan konsentrasi auksin terhadap regenerasi kalus embriogenik. Kalus embriogenik ditanam pada media dasar MS dengan sukrosa 1% yang ditambah dengan auksin NAA dan IBA masing-masing pada taraf 0,1, 0,5, dan 1 ppm.

Pada percobaan keempat, diteliti pengaruh peningkatan taraf sukrosa terhadap regenerasi kalus embriogenik. Kalus ditanam pada media dasar MS dengan kandungan sukrosa 2 dan 3% baik dengan atau tanpa penambahan auksin IBA

dan NAA, masing-masing pada taraf 0,5 dan 1 ppm.

Untuk keempat percobaan regenerasi tersebut, kalus embriogenik diinkubasikan dalam ruang kultur dengan suhu 20°C, intensitas cahaya 800-1.000 lux, dan fotoperiodisitas 16 jam terang. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 5-10 kali di mana setiap botol terdiri atas 8-10 embrio. Peubah yang diamati adalah persentase regenerasi yang mencakup pembentukan tunas, akar, dan planlet (tunas yang berakar), dilakukan setiap bulan.

Pada tahap aklimatisasi planlet, bahan tanaman yang digunakan dipilih dari planlet yang vigor. Total planlet yang diaklimatisasi sebanyak 21 tanaman. Media yang digunakan adalah campuran antara tanah dan kompos dengan perbandingan 1:1. Planlet ditanam dalam polibag yang berisi media aklimatisasi, kemudian setiap polibag disungkup dengan gelas plastik untuk mempertahankan kelembaban. Selama 2 minggu, planlet disimpan pada ruang kultur. Setelah itu, planlet dipindahkan ke rumah kaca. Setelah 1 bulan, sungkup plastik dibuka secara bertahap, pada sore hari kemudian dilanjutkan sepanjang hari. Peubah yang diamati adalah persentase bibit yang hidup dan tumbuh.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi kalus embriogenik tanaman lengkung berhasil dilakukan menggunakan media yang ditemukan oleh Litz (1988). Inisiasi kalus terjadi setelah 1 bulan dikulturkan. Kalus embriogenik muncul sekitar 2,5 bulan dan ditandai dengan adanya struktur kalus yang berwarna kekuningan dan remah (mudah terpisahkan) dan selanjutnya terbentuk struktur yang mirip dengan pasangan-pasangan keping berwarna putih yang menandakan terbentuknya embrio. Total jumlah embrio yang terbentuk dari 1 helai daun adalah sekitar 1.000 embrio. Data ini menunjukkan bahwa teknik embriogenesis somatik berpeluang diterapkan untuk memperbanyak bibit lengkung secara masal.

Air kelapa merupakan endosperma cair buah kelapa dan sering digunakan dalam regenerasi beberapa tanaman, seperti tanaman gandum (Mathias dan Simpson 1986), bayam

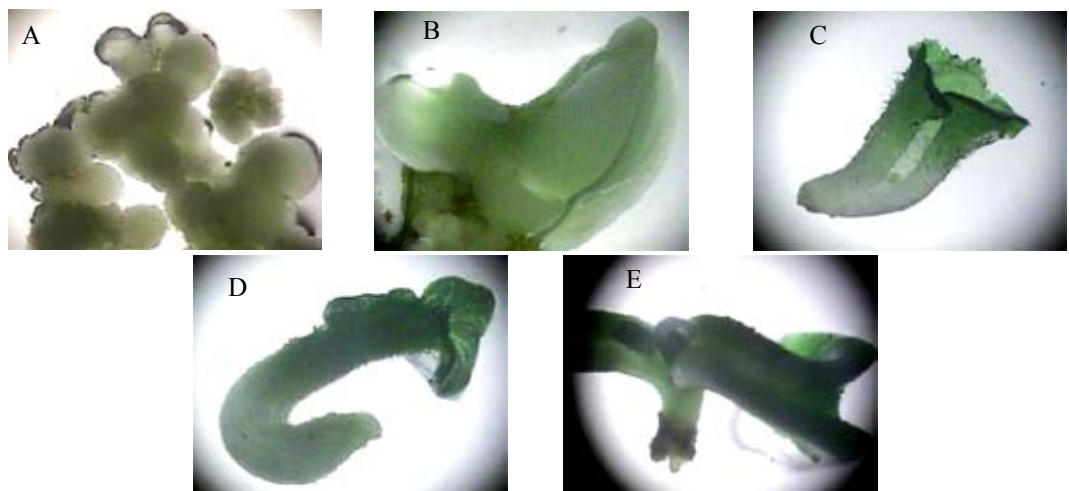
(Al Khayri 1993), dan kiwi (Boase *et al.* 1993). Telah dilaporkan bahwa air kelapa mengandung senyawa-senyawa kompleks yang berperan sebagai faktor pertumbuhan tanaman mencakup vitamin, asam amino, dan sitokinin. Senyawa N-difenil urea yang terdapat dalam air kelapa dilaporkan mempunyai fungsi fisiologis yang sama dengan sitokinin, yaitu berperan dalam pembelahan sel selama proses regenerasi jaringan tanaman.

Hasil percobaan pertama menunjukkan bahwa kalus embriogenik lengkung dapat beregenerasi membentuk embrio yang lengkap (planlet, yang mengandung tunas dan akar) dan embrio yang tidak lengkap (hanya membentuk tunas atau akar). Dalam hal ini, pembentukan planlet diawali dengan pembentukan struktur yang bipolar (2 kutub), yaitu calon tajuk dan calon akar. Diduga bahwa perkembangan kalus embriogenik dipengaruhi oleh kondisi hormon endogen dan eksogen (ZPT). Ketika taraf auksin lebih tinggi daripada sitokinin maka pertumbuhan akar lebih dominan, sebaliknya ketika taraf sitokinin, lebih tinggi daripada auksin maka yang dominan terbentuk adalah tunas. Sebagaimana dilaporkan oleh Sahrawat dan Chand (2001) bahwa perubahan keseimbangan hormon di dalam sel atau sensitivitas sel terhadap zat pengatur tumbuh, khususnya auksin dan sitokinin turut

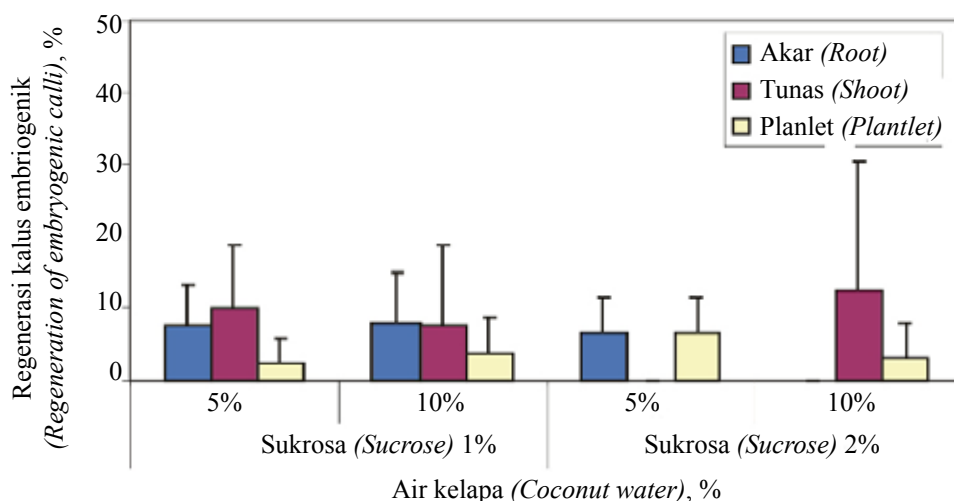
menentukan proses regenerasi.

Urutan proses regenerasi kalus embriogenik menjadi planlet didahului dengan terbentuknya struktur globular, hati, torpedo, dan kotiledon sebagaimana ditampilkan pada Gambar 1. Berdasarkan grafik pada Gambar 2, dapat diketahui bahwa varietas Diamond River kurang memberikan respons yang positif terhadap formulasi media yang mengandung air kelapa. Pada media tersebut, kemampuan regenerasi kalus embriogenik sangat rendah, terutama ke arah pembentukan planlet, yaitu kurang dari 10%.

Respons jaringan tanaman terhadap zat pengatur tumbuh adalah berbeda-beda. Baik auksin (Firoozabady dan Moy 2004) maupun sitokinin (Sripaoraya *et al.* 2003) dapat digunakan dalam proses regenerasi melalui jalur embriogenesis somatik. Hasil percobaan kedua menunjukkan bahwa penggunaan auksin lebih sesuai untuk regenerasi kalus embriogenik lengkung daripada penggunaan sitokinin. Namun, regenerasi hanya mengarah pada pembentukan tunas atau akar dan planlet tidak terbentuk sama sekali. Pada konsentrasi 0,5 ppm, penggunaan IBA lebih baik daripada NAA (Gambar 3). Pada masa inkubasi 3 bulan, sebagian besar embrio tidak mampu berkembang lebih lanjut dan bahkan mati. Hal ini menunjukkan bahwa formulasi media yang



Gambar 1. Urutan proses regenerasi lengkung cv. Diamond River melalui jalur embriogenesis somatik: globular (A), hati (B), torpedo (C), kotiledon awal (D), dan kotiledon akhir (E) (*The process of regeneration of longan cv. Diamond River through somatic embryogenesis: globular (A), heart (B), torpedo (C), early cotyledonary stage (D), and late cotyledonary stage (E)*)

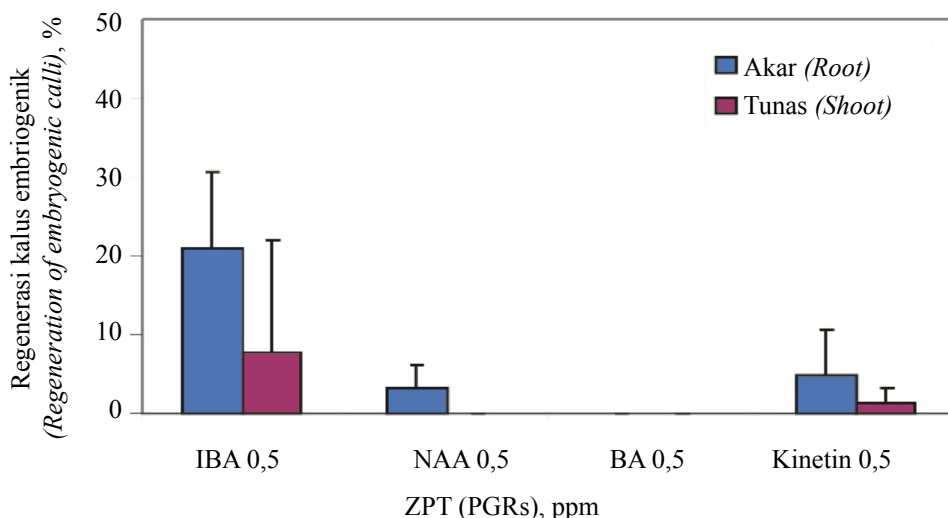


Gambar 2. Pengaruh air kelapa dan sukrosa terhadap regenerasi kalus embriogenik lengkung Diamond River, 3 bulan setelah tanam (The effect of coconut water and sucrose to the regeneration of embryogenic calli of longan cv. Diamond River, 3 months after

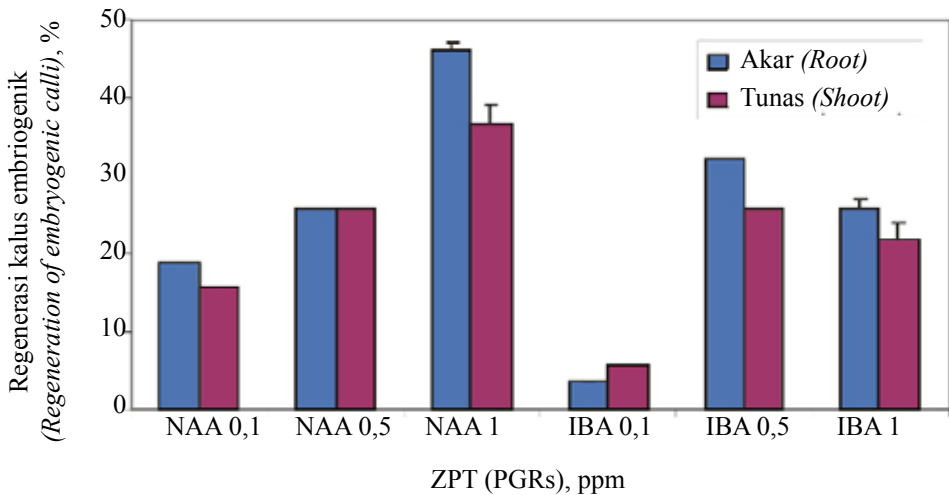
diujikan belum optimal bagi perkembangan kalus embriogenik untuk membentuk bibit somatik.

Konsentrasi auksin mempengaruhi proses regenerasi kalus embriogenik lengkung. Hasil percobaan ketiga menunjukkan bahwa pada umur 2 bulan, NAA 1 ppm menghasilkan persentase pembentukan tunas dan akar yang lebih tinggi

(hampir 50%) dibandingkan dengan IBA 0,5 ppm (Gambar 4). IBA dan NAA merupakan auksin dengan aktivitas yang kuat, tetapi translokasi NAA lebih cepat daripada IBA dan persistensi NAA lebih lama daripada IBA. Walaupun demikian, formulasi media ini masih harus dioptimasi kembali karena biakan tidak mampu



Gambar 3. Pengaruh auksin dan sitokinin terhadap regenerasi kalus embriogenik lengkung Diamond River yang ditanam pada media yang mengandung sukrosa 1%, 2 bulan setelah tanam (The effect of auxins and cytokinines to the regeneration of embryogenic calli of longan cv. Diamond River that planted on media containing 1% sucrose, 2 months after planting)

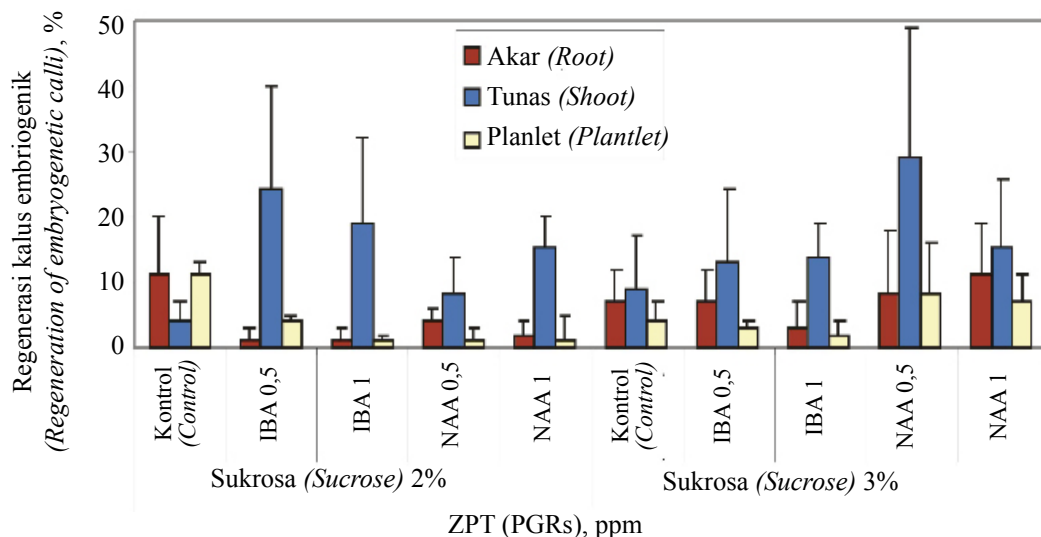


Gambar 4. Pengaruh jenis dan taraf auksin terhadap regenerasi kalus embriogenik lengkeng Diamond River yang ditanam pada media yang mengandung sukrosa 1%, 2 bulan setelah tanam (*The effect of the kind and rate of auxins to the regeneration of embryogenic calli of longan cv. Diamond River that planted on media containing 1% sucrose, 2 months after planting*)

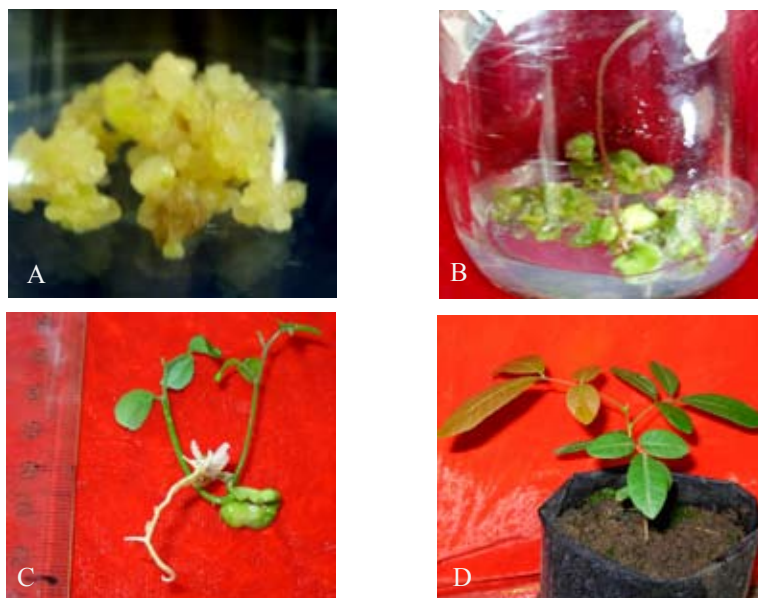
berkembang lebih lanjut dan bahkan banyak yang mati pada umur 3 bulan setelah tanam.

Pada percobaan keempat, IBA dan NAA pada taraf 0,5 dan 1 ppm diterapkan kembali, tetapi taraf sukrosa ditingkatkan menjadi 2 dan 3%. Hasil percobaan menunjukkan bahwa penggunaan sukrosa 2 dan 3% tanpa auksin mampu menghasilkan planlet. Penambahan auksin ke dalam media tersebut justru tidak mampu meningkatkan persentase pembentukan planlet. Diduga bahwa kandungan auksin endogen dalam kalus embriogenik lengkeng cukup tinggi, sehingga tidak memerlukan auksin eksogen. Persentase pembentukan planlet tertinggi diperoleh dari perlakuan sukrosa 2% tanpa auksin dengan persentase mencapai 12% (Gambar 5). Proses regenerasi tanaman lengkeng melalui embriogenesis somatik secara lengkap ditampilkan pada Gambar 6. Secara umum regenerasi kalus embriogenik lengkeng cv. Diamond River lebih dominan ke arah pembentukan akar daripada tunas pada semua formulasi media yang dicobakan. Dalam hal ini, pembentukan tunas lebih diharapkan daripada pembentukan akar karena induksi perakaran dari eksplan tunas lebih mudah dibandingkan dengan induksi tunas dari eksplan akar.

Pada tahap aklimatisasi, beberapa planlet mampu bertahan hidup dan tumbuh dengan persentase keberhasilan 14%. Tumbuhnya bibit tersebut ditandai dengan munculnya daun yang berwarna merah. Hal ini diperkuat dengan hasil penelitian mikropropagasi tanaman manggis di mana keberhasilan aklimatisasi ditandai dengan munculnya sepasang daun yang berwarna merah (Roostika *et al.* 2005). Rendahnya tingkat keberhasilan aklimatisasi kemungkinan disebabkan oleh penguapan planlet yang tinggi, karena lapisan kutikulanya masih tipis. Van Huylenbroeck dan Debergh (1996) melaporkan bahwa selama proses aklimatisasi, planlet harus beradaptasi terhadap lingkungan baru, seperti tingkat kelembaban yang lebih rendah, tingkat intensitas cahaya yang lebih tinggi, fluktuasi suhu, dan juga stres karena penyakit. Selain itu, penguapan air dan lemahnya piranti fotosintesis menjadi penyebab utama kegagalan aklimatisasi. Diduga bahwa kegiatan pra-aklimatisasi minimal selama 1 bulan atau penambahan sukrosa pada taraf yang lebih tinggi dari 3% pada media tumbuhnya akan meningkatkan keberhasilan aklimatisasi planlet lengkeng.



Gambar 5. Pengaruh peningkatan taraf sukrosa dan uaksin terhadap regenerasi kalus embriogenik lengkung Diamond River, 3 bulan setelah tanam (*The effect of the rate of sucrose and auxins to the regeneration of embryogenic calli of longan cv. Diamond River, 3 months after planting*)



Gambar 6. Proses regenerasi kultur lengkung cv. Diamond River melalui jalur embriogenesis somatik: kalus embriogenik (A), embrio somatik (B), planlet (C), dan bibit hasil aklimatisasi (D) (*The regeneration process of longan culture cv. Diamond River through somatic embryogenesis: embryogenic callus (A), somatic embryos (B), plantlet (C), and seedling (D)*)

KESIMPULAN

1. Regenerasi lengkung cv. Diamond River secara embriogenesis somatik berpeluang untuk diterapkan.
2. Regenerasi kalus embriogenik lengkung cv. Diamond River lebih dominan ke arah pembentukan akar daripada tunas pada semua formulasi media yang diujikan.
3. Penggunaan media yang mengandung NAA 1 ppm mampu meningkatkan persentase pembentukan tunas mencapai lebih dari 30%, sedangkan penggunaan sukrosa 3% tanpa auksin mampu meningkatkan persentase pembentukan planlet hingga mencapai 12% dibandingkan dengan hasil penelitian terdahulu (6%).
4. Persentase keberhasilan aklimatisasi adalah sebesar 14%.

SARAN

1. Perlu dicoba penggunaan ABA untuk menyerempakkan kematangan embrio, sehingga pembentukan planlet dapat ditingkatkan.
2. Untuk meningkatkan keberhasilan aklimatisasi maka diperlukan kegiatan pra-aklimatisasi selama minimal 1 bulan atau menambahkan sukrosa pada taraf yang lebih tinggi dari 3% pada media tumbuhnya sebelum aklimatisasi.

PUSTAKA

1. Al-Khayri, J.M, F.H. Huang, T.E., Morelock, and T.A. Busharar. 1993. Spinach Tissue Culture Improved With Coconut Water. *HortSci*. 27(4):357-358.
2. Boase, M.R., S. Wright, P.L. Mc-Leay. 1993. Coconut Milk Enhancement of Axillary Shoot Growth of Kiwifruit. *New Zealand J. Crop and Hort. Sci.* 21:171-176.
3. Choi, Y-E., D-C. Yang, and E-S. Yoon. 1999. Rapid Propagation of *Eleutherococcus senticosus* via Somatic Embryogenesis from Explant of Seedlings. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 58:93-97.

4. de Almeida, M. and C.V. de Almeida. 2006. Somatic Embryogenesis and In Vitro Plant Regeneration from Pejibaye Adult Plant Leaf Primordial. *Pesq. Agropec. Bras.* 41(9):1449-1452.
5. Direktorat Perbenihan dan Sarana Produksi. 2007. Pengembangan Lengkeng Dataran Rendah. Direktorat Perbenihan dan Sarana Produksi. http://siphorti.info/ditbenih/index.php?option=com_content&task=view&id=25. [7 April 2008].
6. Firoozabady, E. and Y. Moy. 2004. Regeneration of Pineapple Plants via Somatic Embryogenesis and Organogenesis. *In Vitro Cell Dev. Biol.Plant.* 40:67-74.
7. Ganapathi, T.R., L. Srinivas, P. Suprasanna, and V.A. Bapat. 2001. Regeneration of Plants from Alginate-Encapsulated Somatic Embryos of Banana cv. Rasthali (*Musa* spp. AAB group). *In Vitro Cell Dev. Biol.Plant.* 37:178-181.
8. Janeiro, L.V., A. Ballester, and A.M. Vieitez. 1997. In Vitro Response of Encapsulated Somatic Embryos of Camellia. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 51:119-125.
9. Litz, R.E. 1988. Somatic Embryogenesis from Cultured Leaf Explants of the Tropical Tree *Euphoria longan* Stend. *J. Plant Physiol.* 132:190-193.
10. Mariska, I. 2002. Perkembangan Penelitian Kultur In Vitro pada Tanaman Industri, Pangan dan Hortikultura. *Bul. Agrobio*. 5(2):45-50.
11. Mathias, R.J. and E.S. Simpson. 1986. The Interaction of Genotype and Culture Medium on the Tissue Culture Responses of Wheat (*Triticum aestivum* L. em. thell.) Callus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 7:31-37.
12. Mukunthakumar, S. and J. Mathur. 1992. Artificial Seed Production in the Male Bamboo *Dendrocalamus strictus*. *Plant Science*. 87:109-113.
13. Pellinen, T.P., S. Soryari, R. Tahyonen, and P. Sewon. 1997. Somatic Embryogenesis in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Callus and Suspension Cultures. *J. Applied Botany-Angewandte Botanik*. 71(3-4):116-118.
14. Purnamaningsih, R. 2002. Regenerasi Tanaman melalui Embryogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya. *Bul. Agrobio*. 5(2):51-58
15. Roostika, I., N. Sunarlim, dan I. Mariska. 2005. Mikropropagasi Tanaman Manggis (*Garcinia mangostana*). *J. Agrobiogen*. 1(1):20-25.
16. _____, R. Purnamaningsih, I. Darwati, and I. Mariska. 2007. Regeneration of Indonesian Endangered Medicinal Plant of Pruatjan through Somatic Embryogenesis. *Indonesian J. Agric. Sci.* 8(2):60-66.
17. Sahrawat, A.K. and S. Chand. 2001. Continuous Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of Hypocotyl Segments of *Psoralea corylifolia* Linn. An Endangered and Medicinally Important Fabaceae Plant. *Current Science*. 81(10):1328-1331.
18. Senaretna. 1992. Artificial Seeds. *Biotech. Adv.* 10:379-392.

19. Sripaoraya, S., R. Marchant, J.B. Power, and M.R. Davey. 2003. Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis and Organogenesis of Commercial Pineapple (*Ananas comosus* L.). *In Vitro Cell Dev. Biol._Plant.* 39:450-454.
20. Supriyanto, A., Hardiyanto, H. Samekto, dan D. Kristianto. 1997. Perakitan Teknologi Pembibitan Lengkeng secara Sambung Dini. *Dalam: M. Mahfud, M.C. Widjajanto, D.D. Rosmahani, L. (Eds). Seminar Hasil Penelitian dan Pengkajian Komoditas Unggulan, 12-13 Des 1996, BPTP Karangploso. Pp. 314-327.*
21. Van Huylenbroeck and P.C. Debergh. 1996. Physiological Aspects in Acclimatization of Micropropagation Plantlets. *Plant Tissue Culture and Biotechnology.* 2(3):136-141.