

## PEMBENTUKAN EMBRIO SOMATIK DARI EKSPLAN DAUN RAMIN, SPESIES TANAMAN LANGKA

*Somatic embryo formation from leaf explant of ramin, a rare plant species*

Yelnititis

Kontributor Utama, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan  
Jl. Palagan Tentara Pelajar km 15, Purwobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta, Indonesia  
email penulis korespondensi : yelnititis@yahoo.com

Tanggal diterima: 08 Oktober 2020, Tanggal direvisi: 15 Oktober 2020, Disetujui terbit: 14 Desember 2020

### ABSTRACT

*Ramin (Gonystylus bancanus (Miq.) Kurz) is one of the most valuable timbers in Indonesia and the most over-exploited woody species, on the other hand, the success in propagation techniques are still limited. This species has been listed in Appendix II of CITES since 2004 as the number of trees and populations continuously decline. Tissue culture has been explored for mass propagation, however, this technique still faces the challenge, mainly in shoot elongation regenerated from single node explants. The purpose of these experiments is to select the best auxin (2,4-D, picloram, dan dicamba) and the best concentration of Benzyl Adenine (BA) treatment on somatic embryo formation. A series of experiments of somatic embryogenesis from leaf explant for ramin were conducted at Tissue Culture Laboratory, Center for Forest Biotechnology and Tree Improvement Yogyakarta. Modified Murashige and Skoog (MS) media supplemented with 0,1 mg/L thiamine; 0,5 mg/l nicotinic acid; 0,5 mg/L pyridoxine; 2.0 mg/L glycine and 100 mg/L myo-inositol were used as growth medium. In this study, three different auxins were used as treatments: 2,4-D (2,4 dichlorophenoxy acetic acid), picloram, and dicamba applied at 6.0 mg/L. The observation was made on the texture of callus formed and the performance of the somatic embryos obtained. The results showed that the texture of callus obtained is compact formed callus and green in color. The best treatment to induce globular somatic embryos is using 6.0 mg/L picloram within eight months. The best treatment to induce globular and torpedo somatic embryos is BA 3.0 mg/L treatment.*

**Keywords:** 2,4-D; picloram; dicamba; somatic embryogenesis; embryogenic

### ABSTRAK

Ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq.) Kurz) adalah salah satu jenis kayu bernilai tinggi dan spesies kayu yang banyak dieksploitasi di Indonesia, namun keberhasilan teknik perbanyakannya masih terbatas. Jenis ini telah dimasukkan ke dalam APPENDIX II CITES sejak tahun 2004, karena jumlah pohon dan populasi terus menerus mengalami penurunan. Kultur jaringan telah dilakukan untuk propagasi massal namun teknik ini masih menghadapi kendala terutama dalam pemanjangan tunas yang dihasilkan dari eksplan batang satu buku. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan jenis auksin terbaik (2,4-D, picloram dan dicamba) dan konsentrasi Benzyl Adenine (BA) terbaik pada pembentukan embrio somatik. Kegiatan penelitian embriogenesis somatik dari eksplan daun ramin sudah dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan, Yogyakarta. Modifikasi media MS yang ditambah dengan 0.1 mg/L thiamine; 0,5 mg/L nicotinic acid; 0,5 mg/L pyridoxine; 2.0 mg/L glikin and 100 mg/L myo-inositol digunakan sebagai medium tumbuh. Dalam penelitian ini, tiga jenis auksin berbeda digunakan sebagai perlakuan, 2,4-D (2,4 dichlorophenoxy acetic acid), picloram dan dicamba yang ditambahkan sebanyak 6.0 mg/L. Pengamatan dilakukan terhadap tekstur kalus yang terbentuk dan penampilan embrio somatik yang dihasilkan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tekstur kalus yang dihasilkan adalah kompak dan berwarna hijau. Perlakuan terbaik untuk induksi embrio somatik globular adalah picloram 6.0 mg/L dalam 8 minggu. Perlakuan BA 3.0 mg/L merupakan perlakuan terbaik untuk induksi embrio somatik globular dan torpedo.

**Kata kunci:** 2,4-D; picloram; dicamba; embriogenesis somatik; embriogenik

### I. INTRODUCTION

Ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq.) Kurz) merupakan tanaman berkayu yang tumbuh di hutan rawa gambut di Sumatera dan Kalimantan. Genus *Gonystylus* terdiri dari 30

spesies dan *G.bancanus* merupakan spesies yang paling banyak dieksploitasi. Kayu ramin banyak digunakan untuk furnitur, bingkai foto dan beberapa kerajinan kecil lainnya. Semua spesies *Gonystylus* sudah dimasukkan ke dalam

APPENDIX III pada tahun 2001 (Suhartono & Mardiasuti, 2003) dan APPENDIX II CITES pada tahun 2004 dan efektif pada tahun 2005.

Perbanyakan tanaman ini masih mempunyai banyak masalah terutama dalam penyediaan material tanaman dari biji atau anakan. Ketidak-teraturan musim berbunga mempunyai kontribusi pada kelangkaan material tanaman. Ramin menghasilkan bunga dan buah setiap 4 – 5 tahun. Disisi lain, tidak semua tanaman induk menghasilkan buah. Di hutan rawa gambut alam, jenis/ spesies ini telah dilaporkan berbunga setiap tahun. Degradasi/ pengurangan tegakan ramin telah diprediksi menjadi penyebab perubahan pola pembungaan dan pembuahan.

Perbanyakan vegetatif pada ramin sudah berhasil dilakukan menggunakan setek batang atau akar. Perbanyakan tanaman menggunakan teknik kultur jaringan dilakukan sebagai alternatif untuk perbanyakan massal. Sampai sekarang, laporan keberhasilan perbanyakan ramin melalui kultur jaringan masih sangat terbatas. Yelnitis & Komar, (2011) melaporkan bahwa tunas ramin yang diinduksi dari eksplan batang satu buku dengan menggunakan zat pengatur tumbuh (ZPT) Benzyl adenine (BA) masih mengalami pertumbuhan yang lambat. Sebagai alternatif lain dilakukan penelitian menggunakan embriogenesis somatik. Embriogenesis somatik merupakan sel somatik yang berdiferensiasi menjadi embrionik yang dapat membentuk embrio secara *in vitro* (Fehér, 2008, Ikeuchi et al., 2013), menggunakan beberapa sumber eksplan tanaman, dengan dan perlakuan medium dan ZPT yang berbeda (Garcia et al., 2019). Embriogenesis somatik berpotensi menghasilkan tanaman dalam jumlah massal dan hingga saat ini sudah menjadi protokol rutin pada tanaman berkayu (Pais, 2019). Menurut Etienne et al., (2018) embriogenesis somatik merupakan salah satu teknik yang bermanfaat luas digunakan untuk perbanyakan dan transformasi genetik pada tanaman kopi. Khadke & Kuvalekar, (2013) menyatakan

bahwa perbanyakan tanaman melalui embriogenesis somatik merupakan syarat utama pemanfaatan perbanyakan klonal, transformasi genetik dan konservasi plasma nutfah tanaman berkayu. Lema-Rumińska et al., (2013) melaporkan bahwa embriogenesis somatik adalah suatu metode yang efektif untuk produksi dalam skala massal dalam waktu singkat. Pada tanaman berkayu, embriogenesis somatik memainkan peranan penting dalam perbanyakan klonal, menjadi *tool* untuk produksi biji sintetik, konservasi plasma nutfah dan *cryopreservation* (Guan et al., 2016).

Embriogenesis somatik dapat dilakukan dengan dua cara yaitu secara langsung dan tidak langsung. Embriogenesis somatik langsung adalah pembentukan embrio somatik tanpa pembentukan kalus (Normah et al., 2013) Sedangkan embriogenesis somatik tidak langsung dilakukan perbanyakan kalus sebelum pembentukan embrio somatik. ZPT 2,4-D adalah salah satu jenis auksin yang sangat banyak digunakan untuk embriogenesis somatik pada beberapa jenis tanaman dibandingkan auksin jenis lain seperti picloram dan dicamba. Selain auksin, sitokinin seperti BA juga sering digunakan pada tanaman tertentu untuk induksi kalus embriogenik dan embrio somatik seperti pada kopi (Hapsoro et al., 2020). Pada umumnya tanaman memiliki respon yang lebih baik terhadap BA dibandingkan dengan sitokinin jenis lain (Purnamaningsih, 2016). Teknik ini dapat menghasilkan embrio somatik dengan jumlah tidak terbatas, seragam dan dalam waktu yang singkat. Embrio somatik yang dihasilkan mempunyai struktur bipolar tanpa jaringan vaskular dengan jaringan induk. Dari penelitian Yelnitis, (2012) dilaporkan bahwa peningkatan konsentrasi 2,4-D menjadi 6,0 mg/L menghasilkan kalus remah yang dapat berkembang menjadi kalus embriogenik dan selanjutnya membentuk embrio somatik, namun embrio somatik yang diperoleh masih terbatas. Berdasarkan hal diatas dilakukan penelitian dengan menggunakan 3 jenis auksin (2,4-D,

picloram dan dicamba) dan BA dari kelompok sitokinin

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan jenis auksin (2,4-D, picloram dan dicamba) dan konsentrasi BA yang paling cocok untuk induksi embrio somatik dari eksplan daun ramin.

## II. BAHAN DAN METODE

### A. Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan, Yogyakarta.

### B. Bahan, alat dan metode

#### 1. Bahan dan peralatan

Material tanaman yang digunakan sebagai eksplan adalah daun muda dari tanaman yang berumur 8 tahun. Peralatan yang digunakan adalah timbangan analitik, *hot plate* dan *stirer* magnet, pH meter, *microwave*, botol kultur, *aluminium foil*, *autoclave*, *laminar air flow cabinet* (LAFC), pinset, *scalpel* dan lain-lain. Bahan pembantu lain yang digunakan adalah alkohol 96 %, spiritus dan lain-lain.

#### 2. Metode penelitian dan pengamatan

Daun muda dibersihkan dengan sabun cair selama 10 menit dibersihkan dengan air bersih sebanyak tiga kali. Selanjutnya eksplan disterilisasi dengan menggunakan alkohol 70%, HgCl<sub>2</sub> dan bayclin dan terakhir dibilas dengan air steril sebanyak tiga kali. Medium dasar Murashige dan Skoog (MS) yang diperkaya dengan 0.1 mg/L thiamine; 0,5 mg/L nicotinic acid; 0,5 mg/L pyridoxine; 2.0 mg/L glysin and 100 mg/L myo-inositol dijadikan sebagai media tumbuh. Sebagai perlakuan ditambahkan 6.0 mg/l dari tiga jenis auksin berbeda yaitu 2,4-D, picloram dan dicamba dan BA dengan konsentrasi (1.0; 2.0 dan 3.0 mg/L) yang dilakukan dalam dua kegiatan yang berbeda. pH media dijadikan 5.7 dengan menambahkan NaOH atau HCl. Media sebanyak 20 ml dimasukkan ke dalam botol kultur, disterilisasi

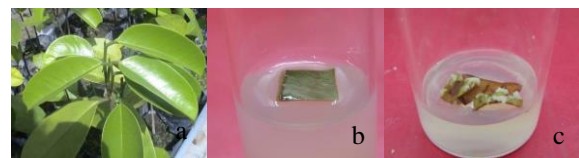
dengan menggunakan autoclave selama 20 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15 kg cm<sup>-3</sup> (15 lbs). Selanjutnya eksplan ditumbuhkan di dalam media perlakuan yang sudah disiapkan. Pengamatan dilakukan terhadap tekstur kalus (kompak atau remah), jumlah embrio somatik globular dan torpedo dan penampilan embrio somatik yang dihasilkan.

## III. HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Pengaruh jenis auksin

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sterilan yang digunakan dalam proses sterilisasi cocok untuk mendapatkan eksplan yang bersih/steril. Hal ini ditunjukkan dengan persentase eksplan steril yang dihasilkan sampai umur dua bulan mencapai 100%. Semua eksplan yang ditumbuhkan pada perlakuan memberikan respon yang berbeda.

Dari tiga perlakuan yang diuji, induksi kalus terjadi pada periode yang berbeda dan tipe kalus yang dihasilkan juga berbeda. Perlakuan 6.0 mg/l 2,4-D merupakan perlakuan terbaik untuk induksi kalus. Induksi kalus dari perlakuan ini rata-rata terjadi 20 hari setelah inokulasi dan lebih cepat dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Induksi kalus dipengaruhi oleh jenis dan zat pengatur tumbuh yang digunakan. Pada eksplan daun tanaman kopi robusta asal Lampung, (Hapsoro et al., 2020) melaporkan bahwa pembentukan kalus pada perlakuan kombinasi 2,4-D dengan thidiazuron terjadi rata-rata 16 hari setelah dikulturkan.



Gambar 1. a. Tanaman sumber eksplan, b. Eksplan daun ramin dan c. Kalus dari perlakuan 2,4-D (Dok. Yelnititis)

Eksplan yang ditumbuhkan pada medium yang ditambah dengan 6 mg/L (dicamba dan picloram) menunjukkan respon yang 2 kali lebih lambat dibandingkan dengan perlakuan 2,4-D. Respon eksplan dari perlakuan ini diamati

dalam 42 hari setelah inokulasi. Respon pertama yang diamati adalah penebalan dari eksplan daun dan penebalan hanya terjadi pada bagian eksplan yang mengalami pelukaan. Respon yang sama juga dilaporkan Rahayu et al., (2016) bahwa kalus dapat diinduksi pada medium yang ditambah dengan 2,4-D, dicamba dan picloram pada 42 hari setelah dikulturkan pada eksplan daun *Centella asiatica*. Setelah 8 minggu dikulturkan, bagian eksplan yang mengalami pelukaan dan menebal mulai membentuk kalus kompak berwarna hijau dan kuning (Gambar 2a – c). Pada tanaman *Acrocomia aculeata* kalus berkembang lebih lama lagi, setelah 4 – 6 bulan pada media induksi yang mengandung picloram (Meira et al., 2020)

Dari penelitian ini tidak semua eksplan membentuk kalus tetapi kalus hanya diperoleh dari bagian eksplan yang mengalami pelukaan (Gambar 1 b) yang diawali dengan penebalan. Hapsoro et al., (2020) juga melaporkan bahwa penebalan dan induksi kalus pada kopi robusta terjadi akibat pelukaan pada bagian tanaman.

Kalus yang dihasilkan pada penelitian ini merupakan kalus kompak berwarna hijau, embriogenik dan pertumbuhannya lambat dan hijau keputihan (Gambar 1 b - c). Hussein et al., (2006) menyatakan bahwa kalus embriogenik dicirikan dengan bentuknya yang cenderung kompak, berwarna putih kekuningan dengan struktur nodular dan pertumbuhannya lambat. Kalus kompak secara perlahan berkembang membentuk embrio globular (Gambar 2 a – c) sedangkan kalus berwarna keputihan tidak berkembang dan menjadi coklat dan mati. Menurut de Moura et al., (2017) pembentukan embrio somatik dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain zat pengatur tumbuh, umur jaringan tanaman induk yang digunakan sebagai eksplan dan jenis media tumbuh yang digunakan. Zuyasna et al., (2012) menyatakan bahwa penggunaan picloram dapat menginduksi pembentukan embrio somatik dari eksplan tanaman coklat. Pada tanaman yang sama Kouassi et al., (2017) mendapatkan embrio somatik dari perlakuan kombinasi picloram dan

kinetin. Sedangkan Rahayu et al., (2016) melaporkan bahwa pada medium yang ditambah dengan dicamba dihasilkan struktur globular dari eksplan petiol/ tangkai daun tanaman *Centella asiatica*.



Gambar 2. Embrio somatik globular dari perlakuan a. dicamba dan b - c picloram (Dok. Yelnititis)

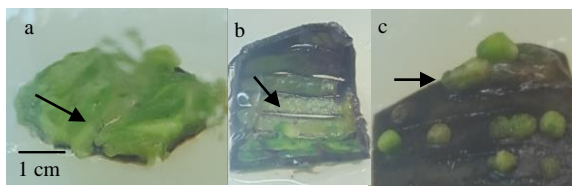
Pada penelitian ini, embrio somatik dihasilkan dari perlakuan dicamba dan picloram tetapi tidak dihasilkan dari perlakuan 2,4-D. Hal ini diduga disebabkan karena konsentrasi 2,4-D yang digunakan sudah tinggi dan bersifat menghambat. Berbeda dengan penelitian Wójcik et al., (2020) menyatakan bahwa 2,4-D sangat efektif untuk induksi embrio somatik dengan persentase mencapai 78%. Dari penelitian Adri, (2017) pada tanaman gambir diperoleh proembrio dan embrio somatik globular dari perlakuan 2,4-D 1,0 mg/L. Selanjutnya Yelnititis, (2012) mendapatkan embrio somatik dan plantlet *Shorea pinanga* dari perlakuan 2,4-D 3.0 mg/L. Penggunaan picloram dengan konsentrasi 6.0 mg/L pada media dasar MS merupakan perlakuan terbaik untuk induksi embrio somatik globular. de Moura et al., (2017) juga menyatakan bahwa perlakuan picloram lebih baik dibandingkan dengan dicamba untuk pembentukan embrio somatik. Pada tanaman monokotil macam palm (*Acrocomia aculeata* (Jack.) penggunaan picloram dengan konsentrasi 450  $\mu$ M (10,8 mg/L) dihasilkan kalus embriogenik yang berpotensi membentuk embrio somatik (Meira et al., 2020). Rata-rata embrio somatik globular yang dihasilkan dari perlakuan ini adalah sebanyak 10.4 embrio. Sedangkan dari perlakuan dicamba 6.0 mg/l rata-rata embrio somatik globular yang dihasilkan adalah sebanyak 7.5 embrio. Secara visual embrio somatik yang dihasilkan berwarna hijau dan

mengkilat. Pada penelitian ini semua embrio somatik globular yang diperoleh dari perlakuan dicamba maupun dari perlakuan picloram belum dapat berkembang membentuk tahap selanjutnya.

Dari 3 jenis auksin yang digunakan dalam penelitian ini, 2 perlakuan diantaranya (dicamba dan picloram) dapat menghasilkan embrio somatik globular. Perlakuan picloram 6.0 mg/L merupakan perlakuan paling baik untuk induksi embrio somatik globular. Rata-rata jumlah embrio somatik globular terbentuk dari perlakuan ini adalah sebanyak 10.4 embrio. Embrio somatik globular yang dihasilkan berwarna hijau dan mengkilat. Pada tanaman *Eucalyptus grandis* x *E. Urophylla*, de Moura et al., (2017) mendapatkan embrio somatik berwarna kekuningan dan mengkilat dari perlakuan picloram. Sedangkan dari perlakuan dicamba diperoleh embrio somatik globular dengan jumlah yang lebih sedikit dibandingkan dengan perlakuan picloram yaitu sebanyak 7.5 embrio. Sampai penelitian berakhir semua embrio somatik yang dihasilkan dari perlakuan 6.0 mg/L picloram dan dicamba tidak berkembang menjadi tahap selanjutnya.

### B. Pengaruh konsentrasi BA

Dari penelitian ini, semua perlakuan BA (1.0; 2.0 dan 3.0 mg/L) dapat menghasilkan embrio somatik.



Keterangan → : embrio somatik torpedo

Gambar 3. Embrio somatik dari perlakuan (a) BA 1,0 mg/L dan (b) 2,0 mg/L dan BA 3,0 mg/L umur 35 hari setelah induksi

Embrio somatik umumnya terbentuk pada bagian permukaan atas daun dan bagian yang mengalami luka (Gambar 3 a – c). Semakin tinggi konsentrasi BA yang digunakan semakin banyak embrio somatik yang dihasilkan. Embrio

somatik yang terbentuk umumnya terjadi pada bagian permukaan dan pinggir eksplan, mengkilat dan berwarna putih kekuningan sampai hijau.

Dari perlakuan BA 1.0 mg/L diperoleh embrio somatik dengan jumlah paling sedikit dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Embrio somatik paling banyak diperoleh dari perlakuan BA 3.0 mg/L dengan jumlah rata-rata sebanyak 9.8 embrio somatik. Perlakuan 3,0 mg/L BA juga merupakan perlakuan yang paling baik pada tanaman kentang (Viola et al., 2017).

Tabel 1. Embrio somatik dari perlakuan BA

Perlakuan mg/L	Jumlah es		Penampilan biakan
	glob	torp	
BA 1.0	2.0	1.0	Kalus putih kehijauan, remah
BA 2.0	5.0	1.8	Embrio somatik putih kehijauan, globular dan torpedo
BA 3.0	9.8	4.0	Embrio somatik hijau, globular dan torpedo

Keterangan. Jumlah es : jumlah embrio somatik,  
glob : globular,  
torp : torpedo

Embrio yang diperoleh dari masing-masing perlakuan BA tersebut memperlihatkan perbedaan dalam jumlah dan tahapannya. Embrio somatik diperoleh dari semua perlakuan BA (1.0, 2.0 dan 3.0 mg/L) dan umumnya terbentuk pada bagian permukaan atas eksplan daun yang dikulturkan.

Dilihat dari strukturnya, perbedaan konsentrasi BA yang digunakan menghasilkan embrio somatik dengan tahapan yang berbeda. Dari semua perlakuan BA yang digunakan diperoleh embrio somatik dengan struktur bipolar (punya bakal akar dan bakal tunas) dan globular. Pada tanaman manggis diperoleh embrio somatik dengan struktur globular, hati dan torpedo dari perlakuan BA 3.0 mg/l yang dikombinasikan dengan madu (Juliana et al., 2019).

Hasil penelitian ini merupakan inisiasi perbanyak ramin menggunakan teknik kultur jaringan. Pemilihan jenis zat pengatur tumbuh

dan konsentrasi yang tepat berpengaruh terhadap jumlah dan tahapan embrio somatik yang dihasilkan. Penggunaan BA dapat menghasilkan embrio somatik tahap globular dan torpedo dan penggunaan picloram dan dicamba hanya dapat menginduksi embrio somatik globular. Dalam kurun waktu 8 bulan pada perlakuan 6 mg/ L picloram mampu menghasilkan 10 embrio per eksplan. Demikian pula dengan perlakuan BA, semakin tinggi konsentrasi BA yang digunakan semakin banyak embrio yang dihasilkan (10 globular dan 4 torpedo). Hasil penelitian ini dapat dijadikan referensi untuk penelitian perbanyak ramin selanjutnya. Penelitian ini masih perlu dilanjutkan untuk menghasilkan embrio yang siap dipindahkan ke medium perkecambahan dengan menggunakan ZPT BA dan picloram.

#### IV. KESIMPULAN

Perlakuan 6,0 mg/L 2,4-D paling baik untuk induksi kalus, sedangkan perlakuan 6,0 mg/L dicamba dan picloram dapat menginduksi pembentukan embrio somatik globular. Perlakuan 6,0 mg/L picloram merupakan perlakuan terbaik untuk induksi embrio somatik globular dengan jumlah rata-rata 10.4 embrio. Perlakuan 3,0 mg/L BA juga merupakan perlakuan terbaik untuk menghasilkan embrio somatik globular dan torpedo. Penggunaan picloram lebih baik dibandingkan dengan dicamba dan 2,4-D dalam menginduksi embrio somatik.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada ITTO atas dukungan dana untuk pelaksanaan kegiatan ini melalui proyek : "Ensuring Genetic Diversity of Ramin Seed Source and Ramin Population from Rooted Cuttings including in the title "Collection of wild genetic resources of ramin from Sumatra and Kalimantan (includes the production of rooted cuttings for Sumatra and Kalimantan)".

#### DAFTAR PUSTAKA

- Adri, R. F. (2017). Pengaruh 2,4-D terhadap induksi embrio somatik tanaman gambir (*Uncaria gambir* Roxb.). *Menara Ilmu*, *XI*(75), 177–181.
- de Moura, L. C., Xavier, A., da Cruz, A. C. F., Gallo, R., Gatti, K. C., Miranda, N. A., & Otoni, W. C. (2017). Effect of explant type, culture media and picloram and dicamba growth regulators on induction and proliferation of somatic embryos in *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. *Revista Arvore*, *41*(5), 1–10. <https://doi.org/10.1590/1806-90882017000500002>
- Etienne, H., Breton, D., Breitler, J. C., Bertrand, B., Déchamp, E., Awada, R., Marraccini, P., Lérans, S., Alpizar, E., Campa, C., Courtel, P., Georget, F., & Ducos, J. P. (2018). Coffee somatic embryogenesis: How did research, experience gained and innovations promote the commercial propagation of elite clones from the two cultivated species? *Frontiers in Plant Science*, *9*(November), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01630>
- Fehér, A. (2008). The initiation phase of somatic embryogenesis: What we know and what we don't. *Acta Biologica Szegediensis*, *52*(1), 53–56.
- Garcia, C., Furtado de Almeida, A. A., Costa, M., Britto, D., Valle, R., Royaert, S., & Marelli, J. P. (2019). Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *137*, 193–212. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01569-8>
- Guan, Y., Li, S.-G., Fan, X.-F., & Su, Z.-H. (2016). Application of somatic embryogenesis in woody plants. *Frontiers in Plant Science*, *07*(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00938>
- Hapsoro, D., Hamiranti, R., & Yusnita, Y. (2020). In vitro somatic embryogenesis of superior clones of robusta coffee from Lampung, Indonesia: Effect of genotypes and callus induction media. *Biodiversitas*, *21*(8), 3811–3817. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210849>
- Hussein, S., Ibrahim, R., & Kiong, A. (2006). Somatic embryogenesis: an alternative method for in vitro micropropagation. *Ianian Journal of Biotechnology*, *4*(3), 156–161.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant callus: Mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell*, *25*(September), 3159–3173. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>



- Juliana, T., Isda, M. N., & Iriani, D. (2019). Embriogenesis somatik dari kalus manggis (*Garcinia mangostana* L.) asal Bengkalis dengan pemberian BAP dan madu secara in vitro. *Al-Kauniah: Journal of Biologi*, 12(1), 8–17.  
<https://doi.org/10.15408/kauniah.v12i1.5667>
- Khadke, S., & Kuvalekar, A. (2013). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and stem explants of *Nothapodytes foetida*: a critically endangered plant species. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 3(1), 257–264.
- Kouassi, M. K., Kahia, J., Kouame, C. N., Tahi, M. G., & Koffi, E. K. (2017). Comparing the effect of plant growth regulators on callus and somatic embryogenesis induction in four elite *Theobroma cacao* L. genotypes. *HortScience*, 52(1), 142–145.  
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI11092-16>
- Lema-Rumińska, J., Goncerzewicz, K., & Gabriel, M. (2013). Influence of abscisic acid and sucrose on somatic embryogenesis in cactus *Copiapoa tenuissima* Ritt. forma *mostruosa*. *The Scientific World Journal*, 2013(June 2013). <https://doi.org/10.1155/2013/513985>
- Meira, F. S., Luis, Z. G., Cardoso, I. M. de A. S., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2020). Somatic embryogenesis from leaf tissues of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jack.) Lodd. Ex Mart.). *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 92(3), 1–16.  
<https://doi.org/10.1590/0001-3765202020180709>
- Normah, M. N., Rohani, E. R., & Mohamed-Hussein, Z. A. (2013). Somatic embryogenesis in higher plants. *Malaysian Applied Biology*, 42(2), 1–12.
- Pais, M. S. (2019). Somatic embryogenesis induction in woody species: The future after OMICs data assessment. *Frontiers in Plant Science*, 10(March), 1–18.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00240>
- Purnamaningsih, R. (2006). Induksi kalus dan optimasi regenerasi empat varietas padi melalui kultur in vitro. *Jurnal AgroBiogen*, 2(2), 74.  
<https://doi.org/10.21082/jbio.v2n2.2006.p74-80>
- Rahayu, S., Roostika, I., & Bermawie, N. (2016). The effect of types and concentrations of auxins on callus induction of *Centella asiatica*. *Nusantara Bioscience*, 8(2), 283–287.  
<https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n080224>
- Suhartono, T., & Mardiasuti, A. (2003). *Pelaksanaan Konvensi Cites (Convention International on Trade of Endangered Species of Flora and Fauna) di Indonesia*. (pp. 285–304). JICA.
- Viola, Y. R. N., Roviq, M., & Wardiyati, T. (2017). Pengaruh konsentrasi BA terhadap pembentukan embrio somatik pada tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.) secara in vitro. *Journal of Agricultural Science*, 2(1), 10–17.  
<https://jpt.ub.ac.id/index.php/jpt/article/view/123>
- Wójcik, A. M., Wójcikowska, B., & Gaj, M. D. (2020). Current perspectives on the auxin-mediated genetic network that controls the induction of somatic embryogenesis in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1–19.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21041333>
- Yelnititis. (2012). Pembentukan kalus remah dari eksplan daun ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq.) Kurz). *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 6(3), 181–193.  
<https://doi.org/10.20886/jpth.2012.6.3.181-194>
- Yelnititis, & Komar, T. E. (2011). Mikropropagasi ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq.) Kurz) dari eksplan batang satu buku secara in vitro. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 5(3149–162), 148–162.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.20886/jpth.2011.5.3.149-157>
- Zuyasna, Hafsah, S., Fajri, R., Syahputra, M. O., & Ramadhan, G. (2012). The effect of picloram concentrations and explants types on the induction of somatic embryo on North Aceh Cocoa genotype. *Proceeding of The 2th Annual International Conference Syih Kuala Univercity & The 8th IMT-GT Uninet Bioscience Conference*, 2(1), 395–398.

