

**PENGUNAAN BEBERAPA MEDIUM KULTUR TERHADAP
INDUKSI EMBRIOGENESIS SOMATIK
PADA KULTUR MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii* Jung & Devr**

SKRIPSI

Diajukan sebagai bagian dari syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
Program Studi Biologi



Oleh

Shandy Wibowo

NIM 1504487

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPARTEMEN PENDIDIKAN BIOLOGI
FAKULTAS PENDIDIKAN MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PENDIDIKAN INDONESIA**

2019

PENGGUNAAN BEBERAPA MEDIUM KULTUR
TERHADAP INDUKSI EMBRIOGENESIS SOMATIK
PADA KULTUR MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii* Jung & Devr

Oleh
SHANDY WIBOWO

Skripsi yang diajukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana
Sains pada Program Studi Biologi Departemen Pendidikan Biologi Fakultas
Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

©SHANDY WIBOWO 2019

UNIVERSITAS PENDIDIKAN INDONESIA 2019

Hak cipta dilindungi undang-undang

skripsi ini tidak boleh diperbanyak seluruhnya atau sebagian dengan dicetak
ulang, difotokopi, atau cara lainnya tanpa izin dari penulis.

SHANDY WIBOWO

PENGGUNAAN BEBERAPA MEDIUM KULTUR
TERHADAP INDUKSI EMBRIOGENESIS SOMATIK
PADA KULTUR MEGAGAMETOFIT *Pinus merkusii* Jung & Devr

Disetujui dan disahkan oleh pembimbing:

Pembimbing I



Dr. rer. nat. Adi Rahmat, M.Si.

NIP: 196512301992021001

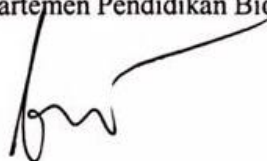
Pembimbing II



Dr. Hj. Widi Purwianingsih, M.Si.

NIP: 196209621991012001

Mengetahui,
Ketua Departemen Pendidikan Biologi



Dr. Bambang Supriatno, M.Si.

NIP: 196305211088031002

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi/tesis/disertasi dengan judul "Penggunaan Beberapa Medium Kultur Terhadap Induksi Embriogenesis Somatik Pada Kultur Megagametofit *Pinus merkusii* Jung & Devr" ini beserta seluruh isinya adalah benar-benar karya saya sendiri. Saya tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan dengan cara-cara yang tidak sesuai dengan etika ilmu yang berlaku dalam masyarakat keilmuan. Atas pernyataan ini, saya siap menanggung risiko/sanksi apabila di kemudian hari ditemukan adanya pelanggaran etika keilmuan atau ada klaim dari pihak lain terhadap keaslian karya saya ini.

Bandung, Agustus 2019

Penulis

Shandy Wibowo

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan karunia-Nya, serta memberikan kekuatan dan kesabaran kepada penulis sehingga skripsi ini dapat diselesaikan. Penulis mengucapkan terima kasih yang begitu besar kepada kedua orang tua penulis, Ibu Masindah dan Bapak Suryana dan adik saya Agnes Wahyudi yang senantiasa membantu penulis dalam bentuk kasih sayang, semangat, dukungan secara moral dan materil serta doa yang terus menerus demi kelancaran penulis dalam menyelesaikan skripsi yang berjudul "Penggunaan Ragam Medium Kultur Terhadap Induksi Embriogenesis Somatik Pada Kultur Megagametofit *Pinus merkusii* Jung & Devr" yang merupakan salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana Sains Program Studi Biologi. Keberhasilan skripsi ini tidak lepas atas bantuan berbagai pihak lain. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Kepada Bapak Dr. rer. nat. Adi Rahmat, M.Si. selaku pembimbing yang selalu memberikan ilmu, arahan, bimbingan semangat dan dorongan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini dengan lancar.
2. Kepada Ibu Dr. Hj. Widi Purwianingsih, M.Si. selaku pembimbing yang selalu memberikan arahan, bimbingan dan semangat kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini dengan lancar.
3. Kepada Bapak Dr. Bambang Supriatno, M.Si. selaku ketua Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI yang telah memberikan dukungan dan bimbingan pada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
4. Bapak Dr. Yayan Sanjaya, M.Si. selaku sekretaris Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.
5. Bapak Dr. Didik Priyandoko, M.Si. selaku ketua Program Studi Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.
6. Kepada Ibu Hj. Tina Safaria Nilawati, M.Si. selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan dukungan dan bimbingan pada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
7. Kepada segenap dosen Departemen Pendidikan Biologi dan staf akademik yang selalu membantu dalam memberikan fasilitas, ilmu, serta pendidikan pada penulis hingga dapat menunjang dalam menyelesaikan skripsi ini.

8. Kepada sahabat sekaligus rekan penelitian. Ima Nurfadilah dan Putri Muna K. yang selalu memberi masukan, bertukar pikiran dan membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
9. Kepada sahabat-sahabat saya di Kelas Biologi C 2015 yaitu Cipta, Enung, Fanny, Nafidz, Raka, Rifdah, Sabrina, Suci, Tomie, dan rekan-rekan lain yang tidak bisa tertulis disini.
10. Kepada Sahabat-sahabat seperjuangan sejak SMA yaitu Ady, Asep Toni, Basyar, Faridh, Ilham, Imam, Januar, Market, dan Pratama, yang telah memberikan dukungan pada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
11. Kepada sahabat-sahabat terdekat selama perkuliahan yaitu Fridayova Meidiana, Indri Berliani, Mega Rahmayani, dan Rizki Amelia. Yang telah memberikan dukungan moril kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
12. Kepada teman-teman seperjuangan di angkatan Biologi 2015 yang selalu memberi semangat kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
13. Serta masih banyak lagi pihak lain yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu.

Semoga Allah SWT senantiasa membalas semua kebaikan yang telah diberikan. Semoga penelitian ini dapat memberikan manfaat khususnya bagi penulis dan umumnya kepada para pembaca.

Bandung, Agustus 2019

Penulis

Shandy Wibowo

ABSTRAK

Penggunaan Beberapa Medium Kultur terhadap Induksi Embriogenesis

Somatik pada Kultur Megagametofit *Pinus merkusii* Jung & Devr

Rendahnya tingkat regenerasi *Pinus merkusii* dan tingginya permintaan akan produksinya melatarbelakangi dilakukannya propagasi untuk mendapat bibit dalam waktu yang singkat. Jalur embriogenesis somatik dipilih karena memiliki keunggulan berupa produksi propagul yang lebih banyak dibandingkan dengan jalur organogenesis. Keberhasilan induksi embrio somatik pada *Pinus merkusii* masih berada dalam hasil yang belum optimal. Medium kultur yang cocok untuk menginduksi dan pemeliharaan jaringan embrionik bisa diperoleh dengan serangkaian *trial and error*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan jenis medium yang paling optimal dalam induksi embrio somatik dan pemeliharaan jaringan embrionik pada *Pinus merkusii*. Dalam penelitian ini ada 3 jenis medium yang digunakan, yaitu DCR, SH, dan Litvay, dengan tambahan ZPT pada masing-masing medium 9 μM 2,4-D dan 3 μM BAP. Setiap medium dilakukan pengulangan sebanyak 32 kali. Eksplan yang digunakan adalah megagametofit yang berwarna putih tidak terlalu pekat dan tidak terlalu bening. Respon yang diamati adalah persentase keberhasilan induksi dan proliferasi. Setelah 8 minggu kultivasi, terdapat perbedaan persentase keberhasilan dari setiap medium yang diujikan. Persentase induksi terbaik didapatkan dari megagametofit dari medium SH dengan persentase sebesar 8.12%, sedangkan respon keberhasilan induksi embriogenesis somatik dengan nilai terkecil didapatkan dari kultur megagametofit yang ditanam pada medium DCR, yaitu dengan nilai persentase sebesar 1.87%. Keberhasilan proliferasi dengan nilai paling baik didapat dari kultur megagametofit yang ditanam pada medium SH, dengan nilai persentase 2,5%. Pada kultur megagametofit yang ditanam pada medium Litvay didapatkan nilai keberhasilan proliferasi sebesar 1,66%. Pada medium DCR tidak ditemukan keberhasilan proses proliferasi

Kata kunci : embriogenesis somatik, *Pinus merkusii*, Medium kultur, DCR, SH, Litvay.

ABSTRACT

The Use of Several Culture Mediums on The Induction Of Somatic Embryogenesis In The Megagametophyte Culture Of Pinus merkusii Jung & Devr

The low rate of regeneration of Pinus merkusii and the high demand for its production are behind the propagation to get seedling rapidly. The embryogenesis pathway can produce more propagules than the organogenesis pathway. The rate of somatic embryo induction in Pinus merkusii is still in an under-optimal result. Suitable culture medium to induce and maintain embryonic tissue can be obtained by a series of trial and error. The purpose of this study was to obtain the most optimal type of medium in somatic embryo induction and maintenance of embryonic tissue in Pinus merkusii. In this study there were 3 types of medium used: DCR, SH, and Litvay, each medium was given an additional combination of PGR 9 μ M 2,4-D and 3 μ M BAP. Each medium is repeated 32 times. The explants used are megagametofit characterized by colour which are white not too thick and not too clear. The responses observed were the percentage of success of induction and proliferation. After 8 weeks of cultivation, there was a difference in the percentage of success of each medium tested. The best percentage of induction was obtained from megagametophyte from the SH medium with a percentage of 8.12%, while the success response of the somatic embryogenesis induction with the smallest value was obtained from megagametophyte culture grown in DCR medium, ie with a percentage value of 1.87%. Proliferation success with the best value is obtained from megagametophyte culture grown in SH medium, with a percentage value of 2.5%. In megagametofit culture planted in Litvay medium, the value of proliferation success was 1.66%. In the DCR medium no proliferation process was found to be successful

Keywords: somatic embryogenesis, Pinus merkusii, culture medium, DCR, SH, Litvay.

DAFTAR ISI

| | |
|---|------|
| UCAPAN TERIMAKASIH..... | i |
| ABSTRAK..... | iii |
| DAFTAR ISI..... | v |
| DAFTAR TABEL..... | vii |
| DAFTAR GAMBAR..... | viii |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | ix |
| BAB I PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1 Latar Belakang Penelitian..... | 1 |
| 1.2 Rumusan masalah Penelitian..... | 5 |
| 1.3 Tujuan Penelitian..... | 6 |
| 1.4 Manfaat Penelitian..... | 6 |
| 1.5 Struktur Organisasi Skripsi..... | 6 |
| BAB II EMBRIOGENESIS SOMATIK MEGAGAMETOFIT <i>Pinus merkusii</i> Jung & Devr. | 8 |
| 2.1 <i>Pinus merkusii</i> Jung & Devr..... | 8 |
| 2.2 Kegunaan <i>Pinus merkusii</i> | 10 |
| 2.3 Biji <i>Pinus merkusii</i> | 10 |
| 2.4 Embriogenesis..... | 11 |
| 2.4.1 Embriogenesis Zigotik <i>Pinus</i> | 12 |
| 2.4.1.1 Proembrio..... | 12 |
| 2.4.1.2 Embriogeni Awal..... | 13 |
| 2.4.1.3 Embriogeni Akhir..... | 15 |
| 2.4.2 Embriogenesis Somatik..... | 16 |
| 2.4.2.1 Tahapan Embriogenesis Somatik..... | 16 |
| 2.4.2.2 Embriogenesis Somatik pada Tumbuhan Konifer..... | 17 |
| 2.4.2.3 Embriogenesis Somatik Pada <i>Pinus</i> | 18 |
| 2.5 Medium Kultur..... | 19 |
| 2.5.1 Makronutrien..... | 20 |
| 2.5.2 Mikronutrien..... | 20 |
| 2.5.3 Sumber Karbon dan Energi..... | 21 |
| 2.5.4 Vitamin dan Myo-inositol..... | 21 |

| | |
|--|-----------|
| 2.5.5 Asam Amino | 23 |
| 2.5.6 Suplemen Organik Tambahan..... | 24 |
| 2.5.7 Agen Pematat | 24 |
| 2.5.7 Zat Pengatur Tumbuh..... | 25 |
| BAB III METODE PENELITIAN | 27 |
| 3.1 Desain Penelitian | 27 |
| 3.2 Waktu dan Tempat Penelitian..... | 28 |
| 3.3 Alat dan Bahan | 28 |
| 3.4 Prosedur Penelitian | 28 |
| 3.4.1 Persiapan Pelaksanaan | 28 |
| 3.4.1.1 Persiapan Eksplan | 28 |
| 3.4.1.2 Pembuatan Stok Medium Kultur..... | 28 |
| 3.4.1.3 Pembuatan Medium | 32 |
| 3.4.1 Sterilisasi Alat..... | 33 |
| 3.4.2 Pelaksanaan Eksperimen | 33 |
| 3.4.3 Pengumpulan dan Analisis Data..... | 33 |
| 3.5 Alur Penelitian | 35 |
| BAB IV TEMUAN DAN PEMBAHASAN..... | 36 |
| 4.1 Keberhasilan Induksi Embrio Somatik..... | 37 |
| 4.1.1 Pengaruh Mikronutrien dan Sumber Nitrogen..... | 39 |
| 4.1.2 Pengaruh Mikronutrien FeEDTA dan Kalium..... | 43 |
| 4.1.3 Pengaruh Asam Amino dan Vitamin | 46 |
| 4.2 Proliferasi Embrio Somatik | 48 |
| BAB V SIMPULAN, IMPLIKASI, DAN REKOMENDASI..... | 54 |
| 5.1 Simpulan..... | 54 |
| 5.2 Implikasi | 54 |
| 5.3 Rekomendasi..... | 54 |
| DAFTAR PUSTAKA | 55 |
| LAMPIRAN..... | 66 |

DAFTAR TABEL

| Tabel | Halaman |
|---|---------|
| 3.1. Matriks perlakuan (Medium dan Kombinasi ZPT)..... | 28 |
| 3.2. Rincian alat yang digunakan dalam penelitian..... | 66 |
| 3.2 Rincian bahan yang digunakan dalam penelitian..... | 67 |
| 3.3 Rincian komposisi medium yang digunakan | 68 |
| 4.1 Persentase keberhasilan induksi embriogenesis somatik | 69 |
| 4.2 Persentase keberhasilan proliferasi embriogenesis somatik | 70 |
| 4.3 Rincian komposisi mikronutrien pada medium MS | 68 |
| 4.4 Persentase pembentukan kalus | 71 |

DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Halaman |
|---|---------|
| 2.1 <i>Pinus merkusii</i> Jungh.&De Vriese | 9 |
| 2.2 Struktur Biji Pada <i>Pinus</i> | 11 |
| 2.3 Fase-fase proembriogeni pada <i>Pinus</i> | 12 |
| 2.4 Fase-fase embriogeni awal pada <i>Pinus</i> | 14 |
| 2.5 Fase-fase embriogeni akhir pada <i>Pinus</i> | 15 |
| 3.1 Strobilus betina <i>Pinus merkusii</i> & Biji <i>Pinus merkusii</i> | 33 |
| 3.2 Alur Penelitian | 35 |
| 4.1 Induksi embrio somatik <i>Pinus merkusii</i> pada 3 jenis medium setelah 8 minggu kultivasi..... | 36 |
| 4.2 Megagametofit yang terinduksi & Juluran Suspensor (40x)..... | 37 |
| 4.3 Eksplan megagametofit terinduksi dari medium SH | 38 |
| 4.4 Tahap awal pembentukan embrio somatik..... | 38 |
| 4.5 Proliferasi embrio somatik <i>Pinus merkusii</i> pada 3 jenis medium setelah 8 minggu kultivasi..... | 48 |
| 4.6 Proliferasi embrionik megagametofit dalam medium Litvay | 49 |
| 4.7 Kultur egagametofit dari medium litvay yang mengalami browning | 50 |

DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Halaman |
|--|---------|
| 1. Alat dan Bahan Penelitian | 66 |
| 2. Komposisi Medium Kultur | 68 |
| 3. Data Primer Induksi Embriogenesis Somatik | 69 |
| 4. Data Primer Proliferasi Embriogenesis Somatik | 70 |
| 5. Data Respon Pembentukan Kalus | 71 |
| 6. Dokumentasi Penelitian | 72 |

DAFTAR PUSTAKA

- Abrahamsson, M. (2016). Patterning During Embryo Development in *Pinus*, With Special Emphasis on Somatic Embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences , Department of Plant Biology*, Swedish University of Agricultural Sciences. *Uppsala*. Doctoral Thesis.
- Abo El-Nil, M. (1989). The effects of amino acid nitrogen on growth of date palm callus. Second Symposium on date palm, K.F.U., AI-Hassa, Saudi Arabia, 59-65.
- Ahloowalia, B.S. & Maretzki, A. (1983). Plant regeneration via somatic embryogenesis in sugarcane. *Plant Cell Rep.* 2, 21-25.
- Allan, E. (1991). Plant cell culture. In: Plant cell and tissue cultuer. (A. Stafford, and Warren, G. – Ed.). Chichester, Johan Wiley & Sons. PP. 1-25.
- Aliyu & O., Mashood. (2005). Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale* L.) breeding: An appraisal. *African J. Biotechnol.* 4(13):1485-1489.
- Alrasjid, H., D., Natawiria & A., Ng. Gintings. (1983). Pembinaan Hutan Pinus Khususnya *Pinus merkusii* Untuk Penghara Industri. Pusat Litbang Hasil Hutan dan Perum Perhutani 27-28 Juli 1983. *Simpo Pinus '83 Proceeding*. Jakarta.
- Ammirato, P.V. (1983). Embryogenesis. In: Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V. and Yamada, Y. (Eds.). *Hand Book of Plant Cell Culture*. Vol. 1- techniques for propagation and breeding. Macmillan Publishing Company, New York.
- Ammirato P. V. (1989). Recent progress in somatic embryogenesis. *IAPTC News Letter* 57:12-16.
- von Arnold, S. & Clapham, D. (2008) . Spruce embryogenesis. In: Suárez MF, Bozhkov PV (eds) *Plant embryogenesis: methods in molecular biology*, *Human Press, Totowa, NJ*, 427:31–47
- Aronen, T., Pehkonen, T. & Ryyänen, L. (2009). Enhancement of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Pinus sylvestris* . *Scand J Forest Res* 24:372–383
- Arya, S., Kalia, R. K. & Arya, I. D. (2000). Induction of somatic embryogenesis in *Pinus roxburghii* Sarg. *Plant Cell Report.* 19: 775-780
- Asano, Y., Katsumoto, H., Inokuma, C., Kaneko, S., Ito, Y. & Fujiie, A. (1996). Cytokinin and thiamine requirements and stimulative effects of riboflavin and α -ketoglutaric acid on embryogenic callus induction from the seeds of *Zoysia japonica* Steud. *J. Plant Physiol.* 149, 413-417.

- Barwale, U. B., Kerns, H. R. & Widholm, J. M. (1986). Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* 167, 473-481.
- Biondi, S., & Thorpe, T. A. (1981). Requirement for a tissue culture facility. *Plant tissue culture: methods and application in agriculture/edited by Trevor A. Thorpe*.
- Becwar, M. R., Nagmani, R. & Wann, S. R. (1990). Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Canadian Journal of Forest Research* 20, 810-817
- Becwar, M. R. & Pullman, E. S. (1995). *Somatic Embryogenesis in Loblolly Pine (Pinus taeda L)*. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht Netherlands.
- Behrendt, U. & Zoglauer, K. (1996). Boron controls suspensor development in embryogenic cultures of *Larix decidua*. *Physiol. Plant.* 97, 321-326.
- Bhojwani, S. S. & Razdan, M. K. (1983). *Plant Tissue Culture Theory and Practice*. New York : Elsevier.
- Bhojwani, S. S. & Razdan, M. K. (1989). *Plant tissue culture. Theory and Practise*. Elsevier, New York.
- Boer, E. & Ella, A. B. (Editor). (2001). *Plant Resources of South -East Asia no.18*. Plants Producing Exudates. Prosea Bogor.
- Bozhkov, P. V., Ahn, I. S. & Park, Y. G. (1997). Two alternative pathways of somatic embryo origin from polyembryonic mature stored seeds of *Pinus koraiensis*. Sieb et Zucc. *Canadian Journal of Botany* 75:509–512
- Brown, D. C. W., Finstad, K. I. & Watson, E. M. (1995). Somatic embryogenesis in herbaceous dicots. In: *In vitro Embryogenesis in plants*. (T. A. Thorpe-Ed.). Amsterdam, Kluwer Academic Publishers. PP. 345-415.
- Buchholz, J. T. (1920). Embryo development and polyembryony in relation to the phylogeny of conifers. *American Journal of Botany* 7(4):125-145
- Buchholz, J. T. (1926). Origin of Cleavage Polyembryony in Conifers. *Botanical Gazette* 81(1):55- 71
- Carneros, E., Celestino, C., Klimaszewska, K., Park, Y. S., Toribio, M. & Bonga, J. M. (2009). Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 98:165–178
- Cooling, E. N. G. (1967). Report of a visit to South-east Asia to obtain seeds of tropical pines. For. Dept. Zambia, For. Res. Bull. No. 13: vi + 57
- Corryanti & Rahmawati, R. (2015). Terobosan Memperbanyak Pinus (*Pinus merkusii*). PUSLITBANG PERUM PERHUTANI – CEPU

- Culafic, L., Budimir, S., Vujicic, R. & Neskovic, M. (1987) Induction of somatic embryogenesis and embryo development in *Rumex acetosella* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 11, 133-139.
- Dahlian, E., & Hartoyo. (1997). Komponen Kimia Terpetin dari Getah Tusam (*Pinus merkusii*) Asal Kalimantan Barat. *Info Hasil Hutan*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan. Bogor. 4(1):38-39
- Debeaujon, I. & Branchard, M. (1993). Somatic embryogenesis in Cucurbitaceae. *Plant Cell Tiss Org Cult* 34: 91-100.
- Digby, J. & Skoog, F. (1966). Cytokinin activation of thiamine biosynthesis in tobacco callus cultures. *Plant Physiol.* 41, 647-652.
- Dinar, L. (2007). *OPTIMASI INDUKSI EMBRIOGENESIS SOMATIK Pinus Merkusii Jung & Devr. MELALUI APLIKASI TEKNIK PEMOTONGAN UJUNG KALAZA EKSPLAN*. Bandung: Universitas Pendidikan Indonesia
- Dogra, P. D. (1967). Seed sterility and Disturbances in Embryogeny in Conifers with Particular Reference to Seed Testing and Tree Breeding in Pinaceae. *Studia Forestalia Suecica* Nr 45, Royal College of Forestry, Stockholm
- Evans, D. A., Sharp, W. R. & Flick, C. E. (1981). Growth and behaviour of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. In: *Thorpe TA (ed) Plant tissue culture: methods and applications in agriculture*. Academic, New York, pp 45–113
- Fehér, A. (2005). Why somatic plant cells start to form embryos? In: Mujid, Abdul and Samaj, Josef. eds. *Somatic Embryogenesis. Plant Cell Monographs*, Springer; Berlin/Heidelberg. vol. 2, p. 85-101.
- Filonova, L. H., von Arnold, S., Daniel, G. & Bozhkov, P. V. (2002). Programmed cell death eliminates all but one embryo in a polyembryonic plant seed. *Cell Death & Differentiation* 9:1057–1062
- de Fossard, R. (1976). Tissue culture for plant propagation. Armidale: University of New England
- Fujimura, T. & Komamine, A. (1980). Mode of action of 2,4-D and zeatin in somatic embryogenesis in carrot cell suspension culture. *Z Pflanzenphysiol* 99: 1-8.
- Gauch, H. G. (1973). Inorganic plant nutrition. Dowden, Hutchinson and Ross, Stroudsburg.
- George, E. F. & Sherrington, P. D. (1984). Plant Propagation by Tissue Culture. Hand Book and Directory of Comercial Laboratories. Eastern Press, Reading, Berks. England. p. 9-449.
- George, E. F., Puttock, D. J. M. & George, H. J. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, Exegetics Ltd., Westbury, England. 65–113.

- Gibbs, R. D. (1974). Chemotaxonomy of flowering plants, vol 1–3. McGill-Queen's University Press, Montreal.
- Gifford, E. M., & Foster, A. S. (1989). Morphology and Evolution of Vascular Plants. W.H. Freeman Company: New York. pp. 401-453
- Ghosh, B. & Sen, S. (1991). Plant regeneration through somatic embryogenesis from spear callus culture of *Asparagus cooperi*. *Plant Cell Rep* 9:667–670
- Gupta, P. K., Dandekar, A. M. & Durzan, D. J. (1988). Somatic proembryo formation and transient expression of a luciferase gene in Douglas fir and loblolly pine protoplasts. *Plant Sci.* 58, 85-92.
- Gupta, P. K. & Durzan, D. J. (1985). Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Reports* 4, 177-179
- Gupta, P. K. (1988). "Advances in Biotechnology of Conifers". *Current Science* : 57 (12). 629-637. India : National Chemical Laboratory.
- Gupta, P. K. (1995). *Somatic Embryogenesis in Sugar Pine (Pinus lambertiana)*. dalam S. Jain, P.K. Gupta, R. Newton (eds). *Somatic Embryogenesis in Woody Plant Vol.3*. Dordrecht Netherlands : Kluwer Academic Publisher.
- Halperin, W. & Wetherell, D. F. (1965). Ammonium requirement for embryogenesis *in vitro*. *Nature* 205, 519-520.
- Harborne, J. B. (1998). Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis, 3rd edn. *Chapman and Hall, London*, pp 40–106
- He, D. G., Yang, Y. M. & Scott, K. J. (1991). Zinc deficiency and the formation of white structures in immature embryo cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Tiss Org* 24:9–12.
- Hidayat, J. & Hansen, C.P. (2001). *Informasi Singkat Benih Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese. IFSP. Bandung.
- Ho, W.-J. & Vasil, I. K. (1983). Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): Growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. *Ann. Bot.* 51, 719-726.
- Homès, J. & Vansveren-Van, Espen N. (1973). Effets du saccharose et de la lumière sur le développement et la morphologie de protocormes d'Orchides cultivés *in vitro*. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.* 106, 89-106.
- Hutami, S. (2006). Penggunaan arang aktif dalam kultur *in vitro*. *Berita Biologi* 8(1):83-89.
- Hutami, Sri. (2008). Masalah Pencoklatan Pada Kultur Jaringan. *Jurnal AgroBiogen* 4(2):83-88

- Jain, S. M., Dong, N., & Newton, R. J. (1989). Somatic embryogenesis in slash pine (*Pinus elliottii*) from immature embryos cultured in vitro. *Plant Sci.* 65, 233-241.
- Jones, S. & Luchsinger, A. (1987). *Plant Systematic 2nd* . Mc Graw-hill Book Company. Singapore.
- Jones, N. B. & van Staden, J. (2001). Improved somatic embryo production from embryogenic tissue of *Pinus patula* . *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37:543–549
- De Klerk & Geert-Jan. (2007). The Component of Plant Tissue Culture Media II : Organic Additions, Osmotic, and pH Effects, and Support Systems. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*, 115–173
- Klimaszewska, K., Bernier-Cardou, M., Cyr, D. R. & Sutton, B. C. S. (2000). Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36:279± 286.
- Klimaszewska, K., Park, Y. S., Overton, C., Maceacheron, I. & Bonga, J. M. (2001). Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. *In Vitro Cell Dev Plant* 37:392–399
- Klimaszewska, K., Trontin, J. F., Becwar, M. R., Devillard, C., Park, Y. S. & Lelu-Walter, M. A. (2007). Recent progress in somatic embryogenesis of four *Pinus* spp. *Tree and Forestry Science and Biotechnology* 1:11-25
- Koch, K. E. (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 509-540.
- Kolotelo, D. (1997). Anatomy and Morphology of Conifer Tree Seed. Forest Nursery Technical Series 1.1. Ministry of Forests. *British Columbia. Canada.*
- Komarayati, S., Gusmailina, dan G. Pari. 2002. Pembuatan Kompos dan Arang Kompos dari Serasah dan Kulit Kayu Tusam. *Buletin Penelitian Hasil Hutan. Bogor.* 20(3):231-232
- Lapp, M. S., J. Malinek, & M. Coffey. 1995. Micropropagation of western white pine (*Pinus monticola*) by induction of shoots on bud explants from 1- to 7-year-old trees. *Plant Cell Rep.* 15:264--267.
- Lelu-Walter, M.A., Bastien C., Drugeault A., Gouez M. L. & Klimaszewska K. (1999) Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators. *Physiologia Plantarum.* 105:719-728.

- Lelu-Walter, M. A., Bernier-Cardou, M. & Klimaszewska, K. (2006). Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* (Ait.). *Plant Cell Rep* 25:767–776
- Lippmann, B. & Lippmann, G. (1984). Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean, *Glycine max* L. Merr. *Plant Cell Rep.* 3, 215-218.
- Litz, R. E. (1988). Somatic embryogenesis from cultured leaf explants of the tropical tree *Euphoria longan* Stend. *J. Plant Physiol.* 132, 190-193.
- Loh, C. S. & Lim, G. K. (1992). The influence of medium components on secondary embryogenesis of winter oil seed rape, *Brassica napus Oleifera* (Metzg) Sink. *New Phytologist* 121(3):425–430
- Mangundikoro, A. (1983). Pola dan Strategi Pengembangan Hutan Tanaman *Pinus merkusii*. Pusat Litbang Hasil Hutan dan Perum Perhutani 27-28 Juli 1983. *Simpo Pinus '83 Proceeding*. Jakarta.
- Marjati, K., (1994). Industri Non Kayu Menjelang Abad XXI. *Duta Rimba IX* (169-170):41-47.
- Mathew, M .M., & Philip, V. J. (2003). Somatic embryogenesis versus zygotic embryogenesis in *Ensete superbum*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 72: 267-275.
- Mashayekhi, K. & Neumannn, K. H. (2006) Investigations on the influence of boron on somatic embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 84, 279-283.
- Mensuali-Sodi, A., M. Panizza, G. Serra, & F. Tognoni. (1993). Involvement of activated charcoal in the modulation of abiotic and biotic ethylene levels in tissue-cultures. *Sci. Hort.* 54:49-57.
- Mihaljevic, S., Bjedov, I., Kovac, M., Levanic, D. L. & Jelaska, S. (2002). Effect of explant source and growth regulators on in vitro callus growth of *Taxus baccata* L. *Washingtonni. Food Technol Biotech* 40(4):299–303.
- Miller, J. H. (1968). Fern gametophytes as experimental material. *Bot. Rev.* 34, 361-426.
- Murashige, T. & Skoog, F. A. (1962). Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant;* 15: 473-479.
- Nagmani, R., Diner, A. M. & Sharma, G. C. (1993). Somatic embryogenesis in logleaf pine (*Pinus palustris*). *Can J Forest Res* 23(5):873–876
- Naik, P. M., & Al-Khayri, J. M. (2016). Somatic Embryogenesis of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Through Cell Suspension Culture. *Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants, Second Edition*, 357-366.

- Narayanaswami, S. & Larue, C. D. (1955). The morphogenic effects of various physical factors on the gemmae of *Lunaria*. *Phytomorph.* 5, 99-109.
- Newton, R. J., Marek-Swize, K. A., Magallanes-Cedeno, M. E., Dong, N., Sen, S., & Jain, S. M. (1995). Somatic embryogenesis in slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.). In *Somatic embryogenesis in woody plants* (pp. 183-195). Springer Netherlands.
- Niedz, R. P. & Evens, T. J. (2008). The effects of nitrogen and potassium nutrition on the growth of nonembryogenic and embryogenic tissue of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *BMC Plant Biology* 8:126–136
- Oridate, T. & Oosawa, K. (1986). Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension callus culture in melon (*Cucumis melo* L.). *Jap J Breed* 36: 424-428.
- Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., & Simons, A. (2009). Agroforestry database: a tree species reference and selection guide version 4.0. *World Agroforestry Centre ICRAF, Nairobi, KE.*
- Oswald, T. H., Smith, A. E. & Phillips, D. V. (2006). Callus and plantlet regeneration from cell cultures of ladino clover and soybean. *Physiol Plantarum* 39(2):129–134
- Ötvös, K., Pasternak, T. P., Miskolczi, P., Domoki, M., Dorjgotov, D., Szücs, A., Bottka, S., Dudits, D., & Fehér, A. (2005). Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *The Plant Journal*, vol. 43, no. 6, p. 849-860.
- Pancaningtyas, S. (2015). Study on the Presence And Influence Of Phenolic Compound In Callogenesis and Somatic Embryo Development of Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Pelita Perkebunan* 31(1).
- Park, Y. S., Lelu-Walter, M. A., Harvengt, L., Trontin, J. F., MacEacheron, I., Klimaszewska, K. & Bonga, J. M. (2006). Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 86:87–101
- Pasternak, T. P., Prinsen, E., Ayaydin, F., Miskolczi, P. P., Potters, G., Asard, H., Vanaonckelen, H. A., Dudits, D., & Feher, A. (2002). The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiology*, vol. 129, no. 4, p. 1807-1819.
- Percy, R. E., Klimaszewska, K. & Cyr, D. R. (2000). Evaluation of somatic embryogenesis for clone propagation of western white pine. *Can J Forest Res* 30:1867–1876

- Perl, A., Saad, S. & Sahar, N. (1995). Establishment of long-term embryogenic culture of seedless *Vitis vinifera* a systemic effect of auxins and the role of abscisic acid. *Plant Sci* 104 (2): 193-200.
- Pierik, R. L. M. (1997). *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ.
- Pousujja, R., Granhof, J., & Willan, R. L. (1986). *Pinus merkusii* Jungh. & De Vriese. *Seedleaflets*, (7).
- Ptak, A., Tahchy, A. E., Skrzypek, E., Wójtowicz, T. & Laurain-Mattar, D. (2013). Influence of auxins on somatic embryogenesis and alkaloid accumulation in *Leucosium aestivum* callus. *Cent. Eur. J. Biol.* • 8(6) • 2013 • 591-599
- Purnamaningsih, R. (2002). Regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik dan beberapa gen yang mengendalikannya. *Buletin AgroBio*, 5(2), 51-58.
- Raemakers, K., Jacobson, E. & Visser, R. (1995). *Proliferative Somatic Embryogenesis in Woody Species*. dalam S. Jain, P.K. Gupta & R. Newton (eds). *Somatic Embryogenesis in Woody Plan Vol.4* . Dordrecht Netherlands : Kluwer Academic Publisher.
- Rahmadani, E. (2007). *OPTIMASI INDUKSI EMBRIOGENESIS SOMATIK Pinus merkusii Jung. & Devr. MELALUI TEKNIK PENDINGINAN EKSPLAN*. Bandung: Universitas Pendidikan Indonesia.
- Raven, J. A. (1986). Biochemical disposal of excess H⁺ in growing plants? *New Phytol.* 104, 175-206.
- Rayns, F. W. & Fowler, M. R. (1993). Media design and use. *In: Hunter CF (Ed.) In vitro cultivation of plant cell*. Butterworth- Heinemann, pp.43-46.
- Rikiishi, K., Matsuura, T., Maekawa, M. & Takeda, K. (2008). Light control of shoot regeneration in callus cultures derived from Barley (*Hordeum vulgare* L.) immature embryos. *Breed. Sci.* 58: 129-135.
- Rout, G. R., Mohapatra, A. & Jain, S. M. (2006). Tissue culture of ornamental pot plants: a critical review on present scenario and future prospects. *Biotech. Adv.* 24: 531-560.
- Roy, C. C. (1962). The embryology of conifers: a review. *Phytomorphology* 12:313-338
- Rusfiandi, H. (2007). *OPTIMASI INDUKSI EMBRIOGENESIS SOMATIK Pinus merkusii Jung. & Devr. MELALUI KOMBINASI TEKNIK PENDINGINAN DAN PEMOTONGAN UJUNG KALAZA EKSPLAN*. Bandung: Universitas Pendidikan Indonesia.
- Saad, A. I. M. & Elshahed, A. M. (2012). Plant Tissue Culture Media. *Recent Advances in Plant in vitro Culture. Intech*.

- Salajova, T., Salaj, J., Jasik, J. & Kormutak, A. (1995). Somatic embryogenesis in *Pinus nigra* Arn. - In: Jain, S.M., Gupta, P.K., Newton, R.J. (ed.): Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol. 3, Gymnosperms. Pp. 270-220. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht..
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C. & Harper J. F. (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* 14:S401–S417
- Santoso, U. & Nursandi, F. (2002). Kultur Jaringan Tanaman. UMM Pres. Malang.
- Sastrohamidjojo, H. (2004). Kimia Minyak Atsiri. Gadjah Mada University Press. Cetakan Pertama.
- Schenk, R. U. & Hildebrandt, A. C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50, 199-204
- Scheres, B. (2007). Stem-cell niches: nurse rhymes across kingdoms. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*. 8:345-354
- Sharp, W. R., Sondahl, M. R., Caldas, L. S. & Maraffa, S. B. (1980). The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Hort. Rev.* 2, 268-310
- Shetty, K. & McKersie, B. D. (1993). Proline, thioproline and potassium mediated stimulation of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Sci* 88:185–193
- Shin, H. & Kim, Y. W. (2012). Somatic embryogenesis of *Pinus rigida* X *Pinus taeda* and the relationship between the initiation of embryogenic tissue and zygotic embryo development. *Plant Biotechnol Rep* 6:175–181
- Shohaël, A. M. (2008). *ADVANTAGES OF PLANT TISSUE CULTURE*. [Online], Tersedia: https://www.jsps.go.jp/english/e-plaza/e-sdialogue/2008c/data/1004_utsunomiyajoshi2.pdf. [20 September 2018]
- Singh, H. (1978). Embryology of Gymnosperms. In: Zimmermann W, Carlquist Z, Ozenda P, Wulff HD (eds) *Handbuch der Pflanzenanatomie*. Gebrüder Borntrager, Berlin, pp 187–241
- Skinner, D. (1992). Ovule and embryo development, seed production and germination in orchard grown control pollinated loblolly pine (*Pinus taeda* L.) from coastal South Carolina. Victoria, BC, Canada: Department of Biology, University of Victoria.
- Skoog, F. (1944). Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. *Am. J. Bot.* 31, 19-24.
- Skoog, F. & Miller, R. A.. (1957). Chemical regulations of growth and organ formation in plant tissue culture *in vitro*. *Sym. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-131.

- Smertenko, A. P., Bozhkov, P. V., Filonova, L. H., von Arnold, S., Hussey & P. J. (2003). Reorganization of the cytoskeleton during developmental programmed cell death in *Picea abies* embryos. *Plant Journal* 33:813-824
- Smith, D. L. (1968). The growth of shoot apices and inflorescences of *Carex flacca* Schreb. in aseptical culture. *Annals of Botany* 32:361-370.
- Stojičić, D., Uzelac, R., Janošević, D., Čulafić, L., & Budimir, S. (2007). Induction of Somatic Embryogenesis In *Pinus heldreichii* Culture. *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, 59 (3), 199-202.
- Street, H. E. (1979). Embryogenesis and chemically induced organogenesis. pp. 123-153 dalam Sharp W.R., Larsen P.O., Paddock E.F. and Raghavan V. (eds.) *Plant Cell and Tissue Culture*. Ohio State Univ. Press, Columbus
- Sukarno, Agus., Hardiyanto, Eko, B., Marsoem, Sri Nugroho., & Na'iem, Mohammad. (2012). *Pengaruh Perbedaan Kelas Umur terhadap Produktivitas Getah Pinus merkusii Jungh et de Vriese Ras Lahan Jawa melalui Penjadapan Getah Metode Bor*. Fakultas Kehutanan Universitas Gadjah Mada, Jogjakarta.
- Sukmadjaja, D. (2005). Embriogenesis Somatik Langsung pada Tanaman Cendana. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* Vol.10 no.1.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (1998). *Plant Physiology*. Sinauer Associates, inc. USA.
- Tisserat, B. (1979). Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 30:1275-1283.
- Tomar U.K. & Gupta S.C. (1988). Somatic embryogenesis and organogenesis in callus cultures of a tree legume – *Albizia richardiana* King. *Plant Cell Rep.* 7, 70-73.
- Torres K.C. (1989). Tissue culture techniques for horticultural crops. New York, London: Chapman and Hall; 1989.
- Tsui, C. (1948). The role of zinc in auxin synthesis in the tomato plant. *Am. J. Bot.* 35, 172-178.
- Vashishta, P. C. (1983). *Gymnoisperm*. S. Chand dan Company Ltd. New Delhi.
- Vashista, P. C. (1976). *Botani For Degree Students Part III, Bryophyta*, S. Chand & Company LTD, New Delhi.
- Verma, D. C., Litvay, J. D., Johnson, M. A. & Einsphar, D. W.(1982). Media development for cell suspensions of conifers. pp. 59-60 in Fujiwara A. (ed.) 1982 (q.v.).
- Vinterhalter, D. & Vinterhalter, B.S. (1997). Micropropagation of *Dracaena* sp. In: Bajaj YPS (ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry* 40, High-tech. and Micropropagation VI. Berlin, Heidelberg: Springer. p131- 146.

- Wang, Z., Zeng, X., Chen, C., Wu, H., Li, Q., Fan, G. & Lu, W. (1980). Induction of rubber plantlets from anther of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. *in vitro*. Chinese J. Trop. Crops 1, 16-26.
- Warrag, E. I., Lesney, M. S., & Rockwood, D. L. (1990). Micropropagation of field tested superior *Eucalyptus grandis* hybrids. *New Forests* 4: 67–79
- Webb, D. T. & Santiago, O. D. (1983). Cytokinin induced bud formation on caribbean pine (*Pinus caribaea* Morlet) embryos *in vitro*. *Plant Sci. Lett.* 32:17-21
- Wetherell, D. F. (1980). *Introduction to In Vitro Propagation* . Terjemahan Koenoemardiah. New York: Every Publishing Group Inc. Wayne New York : Elsevier.
- Wetherell, D. F. (1984). Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 3, 221-227.
- White, P. R. (1943). Nutrient deficiency studies and improved inorganic nutrients for cultivation of excised tomato roots. *Growth*; 7: 53- 65.
- White, P. R. (1954). *The Cultivation of Animal and Plant Cells*. 1st. edition. Ronald Press, New York.
- Williams, C. G. (2009). *Conifer Reproductive Biology*. Springer Science + Business Media B.V.
- Wu, H. C. & E. S Du Toit. (2004). Reducing oxidative browning during *in vitro* establishment of *Protea cynaroides*. *Sci. Hort.* 100(1-4):355-358.
- Yang, J., S. Wu, & C. Li. (2013). High Efficiency Secondary Somatic Embryogenesis in *Hovenia dulcis* T. Through Solid and Liquid Culture. *The Scientific World Journal.* 2: 718-754.
- Yildirim, T., Kaya, Z. & Isik, K. (2006). Induction of embryogenic tissue and maturation of somatic embryos in *Pinus brutia* TEN. *Plant Cell Tiss Org Cult* 87:67–76.
- Youssief, E. Y. (2009). *In Vitro Propagation of Strawberry (Fragaria annanasa Duch.) Through Organogenesis via Runner Tips*. Thesis. The Islamic University– Gaza, Faculty of Science, *Master of Biological Sciences*.
- Zhang, B., Stoltz, L. P. & Snyder, J. C. (1986). *In vitro* proliferation and *in vivo* establishment of *Euphorbia fulgens*. *HortScience* 21, 859.
- Zhu, T., Moschou, P. N., Alvarez, J. M., Sohlberg, J. J. & von Arnold, S. (2016). *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 2* is important for protoderm and suspensor development in the gymnosperm Norway spruce. *BMC Plant Biology* 16(1):19