

INDUKSI EMBRIO SOMATIK DARI TANAMAN KAKAO ADAPTIVE ACEH MENGGUNAKAN EKSPLAN BUNGA SERTA ZAT PENGATUR TUMBUH PICLORAM¹

Induction of Embryo Somatic From Cacao Adaptive Aceh Using Flower Eksplant with Plant Growth Regulator Picloram

Zuyasna dan Siti Hafsa

Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh. Email penulis pertama: zuyasna@yahoo.com

ABSTRACT

In order to fulfill the cocoa revitalization program, relatively large quantities of seedling are needed. Tissue culture is one of the alternative techniques for vegetative propagation that produce the large numbers of seedlings and uniform in a relatively short time, and also does not depend on the season. A preliminary study to induce callus and embryo somatic cocoa clones adaptive in Aceh has been carried out using immature flower parts of cocoa. The result showed that picloram was able to produce somatic embryos of staminode of various explants. Callus growth began to appear after two weeks on staminode, and then were subcultured into the same medium to produce secondary somatic embryos.

Keywords: picloram, BAP, cacao, callus, somatic embryo

PENDAHULUAN

Benih kakao termasuk salah satu benih rekalsitran dengan daya simpan yang pendek. Benih rekalsitran dalam penyimpanan mempunyai kandungan air lebih dari 20%, tidak tahan dikeringkan dan tidak tahan disimpan pada suhu rendah (Pence, 1992; Benson, 2000; Fang *et al.*, 2004). Benih kakao yang dikeluarkan dari buahnya dapat berkecambah dalam waktu 3-4 hari dan segera akan kehilangan daya kecambahnya jika setelah hari ke 4 belum ditanam. Di samping daya simpan yang pendek, kekurangan lain dari benih kakao adalah sifat heterogenitas tanaman yang baru diketahui setelah tanaman berumur 4-5 tahun. Hal ini dapat merugikan petani jika

ternyata bibit yang ditanam dari benih memiliki sifat yang tidak sama seperti induknya atau tidak sesuai dengan yang diinginkan.

Perbanyakan tanaman kakao sampai saat ini paling banyak dilakukan secara generatif (75-90%) melalui benih hibrida F1 (*inter clonal hybrid*). Sebenarnya perbanyakan secara generatif melalui benih relatif lebih mudah tetapi tanaman yang dihasilkan mempunyai sifat yang tidak seragam (Maximova *et al.*, 2002).

¹ Penelitian ini didanai oleh Universitas Syiah Kuala, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, sesuai dengan Surat Perjanjian Penugasan Dalam Rangka Pelaksanaan Program Penelitian Fundamental Tahun Anggaran 2012 Nomor: 140/UN11/A.01/APBN-P2T/2012 Tanggal 2 April 2012

Perbanyakkan secara vegetatif lebih sulit dibandingkan dengan perbanyakkan secara generatif, namun tanaman yang dihasilkan lebih seragam. Tanaman kakao yang berasal dari perbanyakkan vegetatif (10-25%) pada umumnya diperoleh melalui metode stek, sambungan dan okulasi (entres) (Winarsih *et al.*, 2003). Bibit kakao asal perbanyakkan vegetatif saat ini belum dapat memenuhi permintaan akan bibit kakao dalam jumlah besar, karena sangat dibatasi oleh jumlah tunas dan cabang yang siap disetek, disambung, dan diokulasi. Bibit kakao yang dapat menghasilkan tanaman yang sama baiknya dengan induk unggulnya sangat diperlukan. Salah satu alternatif adalah dengan memanfaatkan bibit asal organ vegetatif yang dihasilkan melalui teknik kultur jaringan dengan proses embriogenesis somatik.

Perbanyakkan secara *in vitro* melalui embriogenesis menyediakan sarana untuk menghasilkan sejumlah besar tanaman yang identik secara genetik dan sering merupakan tanaman yang bebas patogen. Teknik ini juga dapat digunakan untuk mengembangkan sistem transformasi genetik atau untuk melestarikan plasma nutfah melalui kriopreservasi embrio somatik. Namun, agar teknik ini dapat diaplikasikan dan ekonomis, penting dilakukan optimalisasi variabel sistem untuk mendapatkan embrio berkualitas dengan tingkat multiplikasi yang tinggi.

Beberapa penelitian kultur jaringan di Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia untuk menghasilkan bibit kakao hasil kultur jaringan melalui proses regenerasi embriogenesis somatik telah dilakukan (Winarsih & Priyono, 1995; Winarsih *et al.*,

2002; Winarsih *et al.*, 2003). Peneliti dari Negara lain juga mengembangkan regenerasi kakao melalui proses embriogenesis somatik (Mayolo *et al.*, 2003; Alemanno *et al.*, 2003; Traore *et al.*, 2003). Jenis eksplan kakao yang sudah diteliti daya regenerasinya adalah daun muda, nuselus, embriozigotik muda biji genotipe dan seluruh bagian-bagian bunga termasuk antera (Sondahl *et al.*, 1993; Alemanno *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998).

Meskipun telah banyak dilakukan penelitian di berbagai Negara tentang perbanyakkan kakao menggunakan teknik kultur jaringan dan induksi embrio somatik, akan tetapi belum diperoleh hasil yang memuaskan. Hal ini mungkin disebabkan adanya perbedaan respons masing-masing genotipe terhadap media kultur yang digunakan. Oleh karena itu produksi massal bibit kakao klon-klon baru dengan teknik kultur jaringan masih perlu penelitian lebih lanjut, terutama sekali terhadap klon-klon adaptif di Aceh.

Menurut Karp (1995), banyak bukti menunjukkan variasi somaklonal dipengaruhi oleh pemilihan jenis zat pengatur tumbuh terutama sekali besarnya konsentrasi dalam media. Zat pengatur tumbuh dapat berfungsi seperti mutagen. Menurut Shoemaker *et al.* (1991), frekuensi variasi somaklonal sangat tergantung pada konsentrasi auksin yang digunakan dalam medium induksi embrio somatik.

Sumber eksplan sangat penting dalam menginduksi variasi somaklonal. Semakin tua atau semakin khusus suatu jaringan, maka akan semakin besar variasi yang diperoleh dari tanaman yang diregenerasikan. Menurut Karp

(1995) pada tahun 1976 Bush *et al.* melaporkan bahwa tanaman *Chrysanthemum* yang diregenerasikan dari petal lebih mampu berbunga dan lebih tinggi ketidakhormatannya daripada tanaman yang dihasilkan dari pedikel. Sedangkan menurut Sutjahjo (1994) pada tahun 1980 Roest & Bokelman menyatakan bahwa eksplan yang berasal dari daun atau bagian daun memberikan keragaman genetik yang lebih besar daripada bagian tanaman lainnya.

Berdasarkan pengalaman peneliti pada induksi embrio somatik pada tanaman kacang tanah, bahwa penggunaan teknik kultur jaringan mampu mengubah karakter suatu tanaman. Perubahan yang terjadi akibat perlakuan pada teknik kultur jaringan bisa mengarah pada perbaikan ataupun penurunan suatu karakter, dan hal ini mengindikasikan terjadinya keragaman somaklonal (Zuyasna *et al.* 2005). Adanya keragaman somaklonal yang terjadi dalam teknik kultur jaringan dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan klon-klon baru yang memiliki sifat yang diinginkan pada suatu tanaman. Faktor-faktor yang mempengaruhi munculnya variasi somaklonal di antara sel atau jaringan tanaman yang dikulturkan secara *in vitro* yaitu: lamanya jaringan dalam kultur *in vitro*, sumber eksplan yang dipakai, tipe regenerasi yang digunakan, genotipe tanaman donor, konsentrasi dan tipe zat pengatur tumbuh yang digunakan atau digunakannya kondisi selektif dalam media *in vitro* (Amberger *et al.* 1992; Skirvin *et al.* 1993).

Berdasarkan penjelasan di atas, kami melakukan pengkajian terhadap klon kakao yang adaptif di Aceh guna mendapatkan metode

perbanyak tanaman secara kultur jaringan melalui pendekatan embrio somatik.

METODOLOGI PENELITIAN

Kuncup bunga kakao yang berukuran antara 3 - 6 mm diambil dari tanaman kakao milik petani yang telah beradaptasi di Aceh (Trienggadeng-Pidie, Seureke-Aceh Utara, dan Babahrot-Aceh Barat Daya). Pengambilan bunga dilakukan pada pagi hari sebelum matahari bersinar (sebelum jam 8 pagi). Proses persiapan eksplan dilakukan menurut prosedur Young *et al.* (2003). Mula-mula bunga yang masih kuncup dikumpulkan dalam wadah yang berisi air dingin (4°C). Air dingin dibuang dan semua kuncup bunga kakao dimasukkan ke dalam wadah yang berisi larutan Bayclean 5% dan ditambah 5 tetes Tween 20 dengan temperatur 4°C, dikocok rata selama 5 menit. Kuncup bunga kakao selanjutnya dicuci dengan air steril dingin (4°C) sebanyak 3-4 kali. Kuncup bunga yang sudah steril dimasukkan ke dalam larutan DKW tanpa gula, temperatur dijaga tetap 4°C sampai waktunya ditanam dalam media kultur atau media perlakuan.

Di laboratorium, dilakukan proses sterilisasi lebih lanjut dengan mencelupkan kuncup bunga ke dalam larutan alkohol 70% selama 20 detik, dan dilanjutkan dengan larutan Bayclean 10 % dan 5 tetes Tween 20 selama 15 menit, selanjutnya dicuci dengan air steril minimal 3 - 4 kali. Eksplan selanjutnya diletakkan di atas kertas saring yang steril dan dipisahkan bagian-bagian petal, anter, dan staminodia dengan menggunakan scalpel steril. Masing-masing eksplan kemudian diletakkan dalam

media inisiasi yang mengandung garam makro dan mikro DKW menurut Li *et al.* (1998) yang diperkaya dengan 100 mgL^{-1} myo-inositol, 250 mg L^{-1} glutamine, 1 mgL^{-1} BAP, 20 g glucose, dan 7 g bacto agar. Sebagai wadah kultur digunakan petridish berukuran $100 \times 15 \text{ mm}$, pH media diukur 5,7 dengan menggunakan KOH, dan media diautoklaf pada temperatur $121 \text{ }^\circ\text{C}$ selama 20 menit. Kultur disimpan dalam kondisi gelap pada temperatur $20 \text{ }^\circ\text{C}$ selama 14 hari.

Setelah 14 hari di dalam inisiasi media, eksplan dipindahkan ke media SCG (Secondary Callus Growth) dengan berbagai konsentrasi pikloram (1;2;3;4;5 mgL^{-1}) yang diperkaya dengan 1 mgL^{-1} BAP. Pengamatan terhadap respons eksplan pada media perlakuan dilakukan setelah 14 hari di dalam media perlakuan. Setiap perlakuan diulang sebanyak 5 kali. Parameter yang digunakan adalah persentase eksplan yang hidup, persentase eksplan yang respons dan jumlah embrio yang terbentuk per eksplan setelah 2 minggu dalam media SCG. Data diolah menggunakan Excel software.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisa statistik terhadap induksi awal menunjukkan bahwa daerah asal eksplan kakao tidak menunjukkan perbedaan respons terhadap media induksi embrio yang digunakan. Hal ini menunjukkan bahwa protokol induksi embrio kakao yang digunakan dalam penelitian ini bisa dipakai untuk induksi embrio somatik dari eksplan bunga kakao dari Pidie, Aceh Utara dan Aceh Barat Daya. Namun demikian, dari hasil penelitian menunjukkan genotipe kakao menentukan

keberhasilan induksi embrio somatik, sepanjang genotipe yang sama digunakan sebagai eksplan protokol induksi embrio somatik dapat dipakai.

Induksi Embrio Somatik Primer

Sebanyak 10 genotipe bunga kakao dari Pidie, Aceh Utara, dan Aceh Barat Daya dievaluasi kemampuannya membentuk ES primer dalam media induksi. Pada Tabel 1 dapat dilihat persentase eksplan yang hidup dan respons dalam media DKW yang diperkaya dengan pikloram dengan berbagai konsentrasi. Staminodia yang dikulturkan dalam media induksi ES dengan pikloram 4 mmgL^{-1} umumnya berkembang membentuk ES berwarna kuning kemerahan atau putih (tergantung dari genotipenya) langsung dari eksplan, tanpa pembentukan kalus embriogenik, yang tumbuh dari pinggir staminodia. Ukuran ES yang tumbuh sekitar 1-2 mm, sebagian besar pada fase globular. Sedangkan dalam media pikloram 5 mmgL^{-1} , staminodia yang dikulturkan membentuk kalus embriogenik yang selanjutnya berkembang membentuk struktur globular sebagai tahapan awal pembentukan ES. Kalus embriogenik dan ES berwarna putih berkembang dari seluruh permukaan staminodia. Dari 10 genotipe kakao dari tiga lokasi perkebunan rakyat di Aceh yang diuji, 8 genotipe mampu membentuk ES primer dengan persentase dan rata-rata jumlah ES per eksplan yang tinggi dalam media induksi (Tabel 1). Untuk genotipe asal Pidie dan Abdy, induksi ES dari staminodia hanya memberikan hasil baik dalam media yang mengandung pikloram 3 mgL^{-1} masing-masing dihasilkan

jumlah ES per eksplan 1 dan 2 (Tabel 1). Genotipe Ab2 merupakan yang paling responsif di

antara 10 genotipe yang diuji dalam media DKW dengan berbagai konsentrasi pikloram.

Tabel 1. Persentase eksplan yang hidup dan respons dalam media DKW yang diperkaya dengan pikloram dengan berbagai konsentrasi serta jumlah embrio pada umur 14 hari kultur

A. Persentase Eksplan yang Hidup

MP	Genotipe									
	PdL	Pd2	PdB	Pd4	AbL	Ab2	Ab3	AUT1	AUT2	AUT3
B1 (pikloram 1 mgL ⁻¹)	0	60	20	100	100	100	100	100	100	80
B2 (pikloram 2 mgL ⁻¹)	100	0	100	100	100	100	100	100	100	40
B3 (pikloram 3 mgL ⁻¹)	100	20	100	100	100	100	80	100	100	80
B4 (pikloram 4 mgL ⁻¹)	100	80	100	100	100	100	100	100	100	80
B5 (pikloram 5 mgL ⁻¹)	100	60	60	0	100	100	100	100	100	60

B. Persentase Eksplan yang Respon

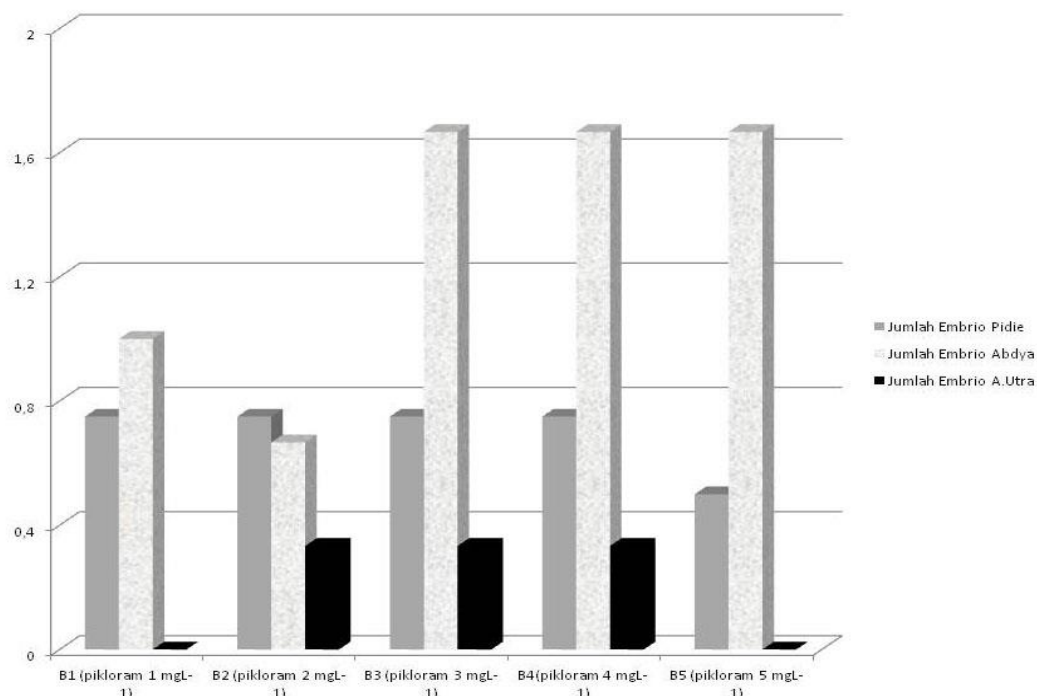
	PdL	Pd2	PdB	Pd4	AbL	Ab2	Ab3	AUT1	AUT2	AUT3
B1 (pikloram 1 mgL ⁻¹)	0	0	0	20	100	100	80	40	60	20
B2 (pikloram 2 mgL ⁻¹)	40	0	80	20	60	100	80	60	80	20
B3 (pikloram 3 mgL ⁻¹)	60	0	20	0	100	100	60	100	40	20
B4 (pikloram 4 mgL ⁻¹)	60	40	0	60	100	100	60	100	40	40
B5 (pikloram 5 mgL ⁻¹)	60	0	0	0	100	100	100	100	40	20

c. Jumlah Embrio umur 14 hari

	PdL	Pd2	PdB	Pd4	AbL	Ab2	Ab3	AUT1	AUT2	AUT3
B1 (pikloram 1 mgL ⁻¹)	1	0	1	1	0	2	1	0	0	0
B2 (pikloram 2 mgL ⁻¹)	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0
B3 (pikloram 3 mgL ⁻¹)	1	1	1	0	1	2	2	1	0	0
B4 (pikloram 4 mgL ⁻¹)	0	1	1	1	1	2	2	1	0	0
B5 (pikloram 5 mgL ⁻¹)	0	0	1	1	1	2	2	0	0	0

Secara umum peningkatan konsentrasi cenderung akan meningkatkan persentase pembentukan embrio somatik. Pada konsentrasi pikloram sebesar 2 mgL^{-1} , embrio somatik yang terbentuk sedikit tetapi ukurannya relatif besar. Sebaliknya pada konsentrasi pikloram sebesar 4 mgL^{-1} , embrio somatik yang terbentuk relatif lebih banyak tetapi berukuran lebih kecil. Bertambahnya umur kultur akan meningkatkan persentase eksplan

yang membentuk embrio somatik (data tidak disajikan, masih dalam pengamatan). Kecenderungan meningkatnya pembentukan embrio somatik karena meningkatnya konsentrasi ZPT disajikan pada Gambar 1. Selain itu embrio somatik yang telah terbentuk akan berkembang ke tahap perkembangan embrio selanjutnya, misalnya dari bentuk globular menjadi hati sedangkan yang telah berada pada fase hati selanjutnya membentuk torpedo.



Gambar 1. Jumlah embrio somatik rata-rata pada media DKW dengan berbagai konsentrasi pikloram

Induksi ES Sekunder

ES primer yang terbentuk dalam media dengan pikloram berkembang membentuk kalus embriogenik dengan berbagai tahapan awal dari perkembangan ES sekunder. Perkembangan ES sekunder lebih lanjut masih akan dilihat 1 bulan ke depan karena masih dalam tahap multiplikasi.

Pembentukan ES sekunder dari eksplan ES primer sangat dipengaruhi oleh fase perkembangan ES primer yang digunakan sebagai eksplan. Eksplan ES primer dari beberapa genotipe asal Pidie dan Abdya yang terbentuk dalam media pikloram mampu membentuk ES sekunder atau kalus embriogenik.

Pengaruh ZPT terhadap Induksi ES Sekunder.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa penambahan pikloram dengan konsentrasi 3 mgL⁻¹ cukup baik untuk menginduksi pembentukan ES sekunder dari eksplan ES primer pada genotipe Abdya 1 dan Abdya 3. Pada genotipe asal Pidie penambahan pikloram 2, 4, dan 5 mgL⁻¹ dalam media induksi meskipun mempunyai persentase pembentukan ES sekunder yang hampir sama,

menghasilkan rata-rata jumlah ES sekunder per eksplan yang lebih rendah dibandingkan dengan pikloram 3 mgL⁻¹.

Dari hasil percobaan ini eksplan petal dan anter setelah dipindahkan ke media SCG tidak dapat berkembang lebih lanjut membentuk embrio somatik. Persentase anter yang menunjukkan gejala hidup dan respons 14 hari setelah tanam pada media induksi dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Persentase anter yang menunjukkan gejala hidup dan responsif terhadap media induksi kalus dari 10 genotipe anter 14 hari setelah tanam.

A. Persentase Eksplan yang Hidup

MP	ST Pidie			ST Abdya			ST Autra			
	Pd1	Pd2	Pd3	Pd4	Ab1	Ab2	Ab3	AUT1	AUT2	AUT3
B1 (pikloram 1 mgL ⁻¹)	40	0	0	0	40	40	100	80	100	100
B2 (pikloram 2 mgL ⁻¹)	100	40	0	100	40	100	60	80	100	100
B3 (pikloram 3 mgL ⁻¹)	100	100	60	100	40	60	60	60	100	0
B4 (pikloram 4 mgL ⁻¹)	60	80	60	100	0	0	0	100	100	80
B5 (pikloram 5 mgL ⁻¹)	60	80	0	100	100	0	0	100	100	100

B. Persentase Eksplan yang Respon

MP	ST Pidie			ST Abdya			ST Autra			
	Pd1	Pd2	Pd3	Pd4	Ab1	Ab2	Ab3	AUT1	AUT2	AUT3
B1 (pikloram 1 mgL ⁻¹)	0	0	0	0	20	40	20	40	20	60
B2 (pikloram 2 mgL ⁻¹)	0	0	0	20	0	20	0	80	20	80
B3 (pikloram 3 mgL ⁻¹)	20	60	0	20	0	20	20	20	0	100
B4 (pikloram 4 mgL ⁻¹)	0	20	20	20	0	0	0	40	0	0
B5 (pikloram 5 mgL ⁻¹)	0	20	0	60	20	0	0	40	20	60

SIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa zat pengatur tumbuh pikloram mampu menumbuhkan embrio somatik dari bagian staminodia berbagai genotipe eksplan kakao yang adaptif di Aceh. Penelitian akan dilanjutkan guna mencari media yang tepat untuk regenerasi embrio somatik menjadi tanaman mini (plantlet).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Universitas Syiah Kuala, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, sesuai dengan Surat Perjanjian Penugasan Dalam Rangka Pelaksanaan Program Penelitian Fundamental Tahun Anggaran 2012 Nomor: 140/UN11/A.01/APBN-P2T/2012 Tanggal 2 April 2012. Untuk itu kami mengucapkan terima kasih. Ucapan terima kasih juga kami sampaikan 3 orang mahasiswa Fakultas Pertanian (Rahmi Fajri, Gilang Ramadhan dan Ovan Syahputra) yang telah menjadi bagian dari pekerjaan penelitian ini sebagai kegiatan praktek lapang.

DAFTAR PUSTAKA

- Alemanno L., M. Berthouly, N. Michaux-Ferriere. 1997. A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. In *Vitro Cell Dev. Bio. Plant* 33:163-172.
- Alemanno, L., T. Ramos, A. Gargadenc, C. Andary, N. Ferriere. 2003. Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. *Ann. Bot.* 92:613-623.
- Amberger LA, Palmer RG & Shoemaker RC. 1992. Analysis of culture -induced variation in soybean. *Crop Sci.* 32:103-1108.
- Benson, E.E. 2000. In vitro plant recalcitrance: an introduction. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 36:141-148.
- Fang, J.Y., A. Wetten, P. Hadley. 2004. Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos for long-term germplasm storage. *Plant Sci.* 166:669-675.
- Karp A. 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 85:295-302.
- Li Z., A. Traore, S. Maximova, M.J. Guiltinan. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using Thidiazuron. In *Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 34:2293-299
- Maximova, S.N., L. Alemanno, A. Young, N. Ferriere, A. Traore, M.J. Guiltinan. 2002. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38:252-259.
- Mayolo, G.A., S.N. Maximova, S. Pishak, M.J. Guiltinan. 2003. Moxalactam as a counter-selection antibiotic for agrobacterium-mediated transformation and its positive effects on *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. *Plant Sci.* 164:607-615.
- Pence, V.C. 1992. Abscisic acid and the maturation of cacao embryos in vitro. *Plant Physiol.* 98:1391-1395.
- Shoemaker RC, Amberger L A, Palmer RG, Oglesby L & JP Ranch. 1991. Effect of picloramichlorophenoxyacetic

- acid concentration on somatic embryogenesis and heritable variation in soybean (*Glycine max* (L) Merr). In *Vitro Cell Dev. Biol.* 27,84-88.
- Skirvin RM, Norton M & McPheeters KD. 1993. Somaclonal variations : Has it proved useful for plant improvement?. In *Vitro Culture. Acta Horticulturae.* 336p.
- Sondahl, M.R., S. Liu, C. Bellato, A. Bragin. 1993. Cocoa somatic embryogenesis. *Acta Horticulturae* 336:245-248.
- Sutjahjo SH. 1994. Induksi keragaman somaklon ke arah ketenggangan terhadap keracunan aluminium pada tanaman jagung. Disertasi. Institut Pertanian Bogor. 139 hal.
- Traore, A., S.N. Maximova, M.J. Gultinan. 2003. Micropropagation of *Theobroma cacao* L. using somatic embryo-derived plants. In *Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 1:1-7.
- Winarsih, S., D. Santoso, T. Wardiyati. 2002. Embriogenesis somatik dan regenerasi dari eksplan embrio zigotik genotipe (*Theobroma cacao* L.). *Pelita Perkebunan* 18: 99-108.
- Winarsih, S., D. Santoso, T. Wardiyati. 2003. Embriogenesis somatik dan regenerasi tanaman pada kultur *in vitro* organ bunga genotipe. *Pelita Perkebunan* 19:1-16.
- Winarsih, S dan Priyono. 1995. Induksi tunas aksiler pada genotipe secara *in vitro*. *Pelita Perkebunan* 11:159-167.
- Zuyasna, Sudarsono, H. Aswidinnoor, R. Suseno. 2005. Pendugaan Komponen Genetik Pembentukan Embrio Somatik pada Persilangan Kacang tanah US-605 dengan cv. Kelinci. *J. Agrotropika* X(2):95-100.