

Perkecambahan dan Perbanyakkan Gaharu secara *In Vitro*

Mia Kosmiatin, Ali Husni, dan Ika Mariska

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

ABSTRACT

***In Vitro* Germination and Micropropagation of Agarwood. Mia Kosmiatin, A. Husni, and I. Mariska.** Agarwood (*Aquilaria malaccensis* Lank) is one of the forest wood that are continuously exploited. Currently, the Indonesian export of agarwood is decreasing because its population is endangered by excessive logging. Agarwood propagations need technology for reproduction of agarwood seedlings and their fungal inoculum. *In vitro* technique for germination of recalcitrant seeds and micropropagation are technologies that can be used for propagation of agarwood seedlings. An experiment was done to develop techniques for *in vitro* germination and micropropagation of agarwood. The *in vitro* germination was done using two different techniques. Firstly, sterile seeds were germinated on an MS medium + 50 mg/l PVP, 50 mg/l GA, and 1 mg/l BA or kinetin. Secondly, sterile seeds were germinated on basal medium of MS, ½ MS medium, MS medium without vitamins, as well as on MS medium without pyridoxine, nicotinic acid and WPM. Shoot initiations and multiplications were done on MS and ½ MS media containing 1, 3, or 5 mg/l BA. The explants used were cotyledone nodes, terminal shoots, single node with leaf, and single node without leaf. The results showed that the seed germination rate on the different media ranged from 7,14 to 50%. The seed germination rate on the MS medium without vitamins was the highest. The best explants for shoot induction and multiplication was single node with leaf which was cultured on MS + 1 mg/l BA.

Key words: *Aquilaria malaccensis* Lank, *in vitro* germination, micropropagation.

PENDAHULUAN

Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lank) adalah salah satu jenis tanaman hutan yang memiliki mutu sangat baik dengan nilai ekonomi tinggi karena kayunya mengandung resin yang harum baunya. Kayu yang mengandung resin ini dikenal dengan nama gaharu, *agarwood*, *aloeswood*, dan *oudh*. Selain untuk keperluan agama, gaharu juga dipakai sebagai bahan pembuat parfum, sabun sari aroma gaharu, pengobatan, dan sampo (Ng *et al.* 1997; Chakraborty *et al.* 1994). Kayu gaharu juga cocok digunakan untuk pembuatan pensil (Lopez 1998). Dengan nilai komersial yang demikian tinggi volume perdagangan gaharu semakin meningkat. Permintaan internasional terhadap gaharu dari tahun ke tahun terus bertambah (Shyun 1997; Ng *et al.* 1997). Menurut Susilo (2003), volume ekspor gaharu Indonesia pada periode 1990-1998 sebanyak 165 t dengan nilai US\$ 2.000.000 dan meningkat sebanyak 456 t dengan nilai US\$ 2.200.000 pada periode 1999-2000. Namun pada periode 2000-2002 volume ekspor menurun 30 t dengan nilai US\$ 600.000

karena gaharu sulit didapat. Selama ini gaharu diambil langsung dari hutan alam (Hartadi 1997; Peters 1996) sehingga populasi tanaman ini di Indonesia hampir punah (Oldfield *et al.* 1998). Sejak tahun 1994 CITES menetapkan tanaman penghasil gaharu jenis *A. malaccensis* termasuk APENDIX II, yaitu jenis tanaman yang terancam punah.

Kepunahan tanaman gaharu selain disebabkan oleh eksploitasi yang terus menerus juga belum tersedianya teknologi budi daya yang efisien. Teknologi ini sulit dikembangkan karena ketersediaan bibit yang terbatas. Selain itu, diperlukan juga teknologi inokulasi penyakit untuk mendapatkan kualitas gaharu yang baik (Isnaini dan Situmorang 2005).

Bibit gaharu diperbanyak secara konvensional baik secara generatif maupun vegetatif tetapi kedua teknik ini memerlukan waktu yang cukup lama dengan tingkat keberhasilan yang relatif masih rendah. Teknik *in vitro* telah banyak dimanfaatkan dan memberikan harapan di masa mendatang untuk mengatasi penyediaan bibit gaharu. Aplikasi teknologi ini dibidang pertanian selain dimanfaatkan untuk perbanyakan juga konservasi dan perbaikan tanaman. Pemanfaatan teknik *in vitro* terutama metode mikropropagasi dan embriogenesis somatik menjadi alternatif utama dalam pengembangan dan konservasi gaharu di Vietnam (Minh 2004).

Perbanyakkan melalui kultur *in vitro* dapat dilakukan melalui 3 cara, yaitu pembentukan tunas adventif, proliferasi tunas lateral, dan embriogenesis somatik. Proliferasi tunas lateral dapat dilakukan dengan cara mengkulturkan tunas aksilar atau tunas terminal ke dalam media yang mempunyai komposisi yang sesuai untuk proliferasi tunas sehingga diperoleh penggandaan tunas dengan cepat. Setiap tunas yang dihasilkan dapat dijadikan sebagai sumber untuk penggandaan tunas selanjutnya sehingga diperoleh tunas yang banyak dalam waktu yang relatif lebih singkat. Menurut Mariska dan Sukmadjaja (2003) faktor perbanyakan dengan teknik kultur *in vitro* jauh lebih tinggi dari cara konvensional. Selain itu, teknologi ini juga lebih menjamin keseragaman, bebas penyakit, dan biaya angkutan yang lebih murah.

Keberhasilan perbanyakan tanaman secara *in vitro* baik melalui penggandaan tunas, organogenesis maupun embriogenesis somatik sangat dipengaruhi oleh genotipa dan eksplan, jenis media dasar, serta

jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan (Monnier 1990; Liz dan Levicth 1997).

Pada umumnya, tanaman berkayu sangat sulit melakukan proliferasi tunas dan regenerasi, sehingga diperlukan manipulasi di dalam media tumbuhnya supaya eksplan mampu melakukan regenerasi membentuk tanaman utuh (Dixon dan Gonzales 1994). Penambahan sitokinin dalam media pada umumnya sangat diperlukan pada tahap induksi maupun penggandaan tunas. Oksidasi fenol pada tanaman berkayu juga cukup tinggi sehingga sering menghambat pertumbuhan eksplan. Penambahan senyawa yang dapat mengantisipasi aktivitas ini menjadi sangat diperlukan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan metode perkecambahan *in vitro* biji gaharu dan formulasi media serta eksplan yang sesuai untuk induksi dan multiplikasi tunas.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur *In Vitro* Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. Penelitian dilaksanakan sejak November 2004-Mei 2005. Bahan tanaman yang digunakan adalah gaharu (*A. Malaccensis* Lank) yang diperoleh dari Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor.

Perkecambahan *In vitro*

Eksplan yang digunakan adalah biji masak gaharu yang belum gugur dari pohonnya. Biji diisolasi kemudian disterilkan dengan kombinasi sterilan alkohol 70%, HgCl₂ 0,02 ppm, clorox 30 dan 20%, serta air destilata steril dan cairan antiseptik sebagai pembilas.

Biji yang steril dikulturkan dalam 2 seri. Seri pertama biji dikulturkan pada media MS dengan penambahan polivinil pyrolidon (PVP) yang dikombinasikan dengan GA₃ dan sitokinin (BA, kinetin) 1 mg/l. Seri kedua biji dikulturkan pada media MS, ½ MS, MS tanpa vitamin, MS tanpa piridoksin dan asam nikotinat serta WPM tanpa penambahan PVP.

Biji yang sudah berkecambah normal, tunas terminal dipotong dan disubkultur pada media tanpa zat pengatur tumbuh. Buku kotiledon dipotong akarnya kemudian dikulturkan pada media regenerasi tunas. Media yang dicoba adalah media MS dan ½ MS yang dikombinasikan dengan BA 1, 3, 5 mg/l. Pengamatan dilakukan terhadap persentase biji berkecambah, induksi tunas, jumlah tunas, jumlah daun, dan tinggi tunas.

Induksi dan Multiplikasi Tunas

Bahan tanaman yang digunakan sebagai eksplan dalam penelitian ini adalah tunas terminal, buku satu tunas dengan daun, dan buku satu tunas tanpa daun. Penanaman eksplan dilakukan dalam beberapa komposisi media perlakuan untuk mendapatkan media terbaik untuk pertunasan. Jenis media dasar yang digunakan adalah MS dan ½ MS. Dalam media tersebut ditambahkan ZPT BA konsentrasi 1, 3, dan 5 mg/l dengan penambahan sukrosa 30 g/l. Kemasaman media diatur dengan cara menambahkan NaOH atau HCl 0,1 N sehingga menjadi 5,7-5,8. Kultur disimpan dalam ruangan yang diberi sinar 1000 lux selama 16 jam setiap hari pada suhu 23-25°C.

Peubah yang diamati pada percobaan ini adalah lama waktu induksi tunas, jumlah tunas, jumlah daun, dan tinggi tunas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perkecambahan *In vitro*

Perkecambahan biji gaharu sulit dilakukan di persemajaan, karena biji gaharu bersifat rekalsitran. Secara alami keberhasilan perkecambahan bijinya sangat rendah dan memerlukan waktu yang lama. Perkecambahan biji secara *in vitro* dapat dilakukan dengan memanfaatkan biji yang belum tua. Biji tersebut dikulturkan pada media dengan komposisi yang disesuaikan untuk dapat mengecembahkannya. Teknik ini sering digunakan untuk pengecambahan biji tanaman yang sulit dikecambahkan atau biji hasil persilangan dengan risiko keguguran embrio yang tinggi.

Dari seri pertama perkecambahan digunakan komposisi media MS yang dikombinasikan dengan zat pengatur tumbuh GA₃ 50 mg/l dan PVP 50 mg/l. Penambahan GA₃ yang mempunyai kemampuan untuk mendorong perkecambahan biji yang dorman ditujukan untuk memacu perkecambahan biji dan PVP untuk menghambat oksidasi fenol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan kedua senyawa tersebut tidak memberikan hasil yang menggembirakan dimana kisaran rata-rata perkecambahan hanya 7,14-25,00% (Tabel 1).

Penambahan GA₃ pada media hanya sedikit meningkatkan persentase perkecambahan. Penambahan sitokinin dengan aktivitas yang kuat (BA) dapat juga meningkatkan perkecambahan meski hanya 25% (Tabel 1).

Untuk meningkatkan perkecambahan dilakukan percobaan seri kedua. Pada seri ini dicoba menggunakan media yang lebih sederhana dengan menurunkan konsentrasi garam makro, mengurangi vitamin, media

dasar saja dan dicoba dengan media dasar yang banyak digunakan untuk tanaman berkayu. Media yang sederhana berhasil mengecambahkan biji panili hasil persilangan (Mariska *et al.* 1998), F1 hasil persilangan antara kacang hitam dengan kacang hijau (Kosmiatin 2004), kedelai (Kosmiatin *et al.* 2005). Media tanpa vitamin berhasil mengecambahkan biji terung hasil persilangan (Mariska *et al.* 2001). Hasil perkecambahan memperlihatkan peningkatan dibandingkan dengan perkecambahan seri pertama (Tabel 2).

Hasil perkecambahan seri kedua menunjukkan peningkatan yang cukup tinggi. Perkecambahan tertinggi (66,67) diperoleh dari biji yang dikulturkan pada media MS tanpa penambahan vitamin. Hasil ini sesuai dengan perkecambahan biji terung di mana media tanpa vitamin selain meningkatkan perkecambahan juga dapat mengurangi terbentuknya kecambah yang abnormal (mengkalus). Penggunaan media yang khusus untuk tanaman berkayu juga memberikan perkecambahan yang cukup tinggi (38,89). Perkecambahan ini lebih baik daripada penggunaan media MS dan MS $\frac{1}{2}$.

Kecambah yang normal, bagian tunasnya dipotong untuk pemanjangan tunas pada media tanpa zat

pengatur tumbuh. Tunas *in vitro* ini digunakan sebagai sumber eksplan pada multiplikasi tunas. Bagian buku kotiledon disubkultur pada media regenerasi tunas, MS dan $\frac{1}{2}$ MS yang dikombinasikan dengan BA 1, 3, 5 mg/l. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada buku kotiledon, tunas dapat diinduksi dengan baik, dengan jumlah yang beragam (Tabel 3)

Dari Tabel 3 terlihat bahwa buku kotiledon gaharu dapat diinduksi pembentukan tunasnya. Eksplan yang sama juga digunakan pada tanaman *Pteurocarpus marsupium* (Chand dan Singh 2004) dan spesies acacia (Nanda *et al.* 1999) untuk multiplikasi tunasnya. Tunas ini dapat diinduksi pada semua konsentrasi BA yang dicoba baik pada media dasar MS maupun MS yang diencerkan garam makronya (MS $\frac{1}{2}$). Penambahan BA 1 mg memberikan jumlah rata-rata tunas tertinggi 3,6 dengan waktu induksi tunas tercepat 16,60 hari setelah kultur. Kombinasi BA pada medium untuk meregenerasikan buku kotiledon tanaman berkayu berhasil pada *Pteurocarpus marsupium* dengan 1 mg/l BA (Chand dan Singh 2004), acacia dengan 2 mg/l BA (Nanda *et al.* 1999), *Dalbergia retusa* 2 mg/l BA (Cerdas dan Guzman 2004).

Tabel 1. Rata-rata perkecambahan biji gaharu pada media MS dengan penambahan PVP.

Media (mg/l)	Rata-rata waktu kecambah	Rata-rata persentase perkecambahan
MSP50	19,00±2,83	7,14±12,20
MS GA ₃ 50P50	18,17±1,61	14,29±19,67
MSBA1 GA ₃ 50P50	18,29±2,21	25,00±0,00
MSK1 GA ₃ 50P50	18,29±2,21	14,29±13,36

P = polivinil pyrrolidon, K = kinetin.

Tabel 2. Rata-rata perkecambahan biji gaharu pada media yang lebih sederhana.

Media	Rata-rata waktu kecambah	Rata-rata perkecambahan (%)
$\frac{1}{2}$ MS	15,75±0,35	33,33±28,87
MSV0	19,31±2,35	66,67±38,19
MS Mod	18,04±2,44	42,50±28,99
MS	16,50±2,50	25,00±25,00
WPM	18,67±2,84	38,89±30,90

$\frac{1}{2}$ MS = MS dengan kandungan garam makro $\frac{1}{2}$ kali dari komposisi dasar + vitamin, MSV0 = MS tanpa vitamin, MS Mod = MS tanpa asam nikotinat dan piridoksin.

Tabel 3. Induksi dan pertumbuhan tunas dari eksplan buku kotiledon pada media regenerasi.

Media (mg/l)	Waktu induksi tunas	Rata-rata jumlah tunas	Rata-rata jumlah daun	Rata-rata tinggi tunas
MS + BA1	16,60±3,05	3,60±0,89	4,24±1,60	1,01±0,33
MS + BA3	20,20±8,07	2,80±0,84	3,19±0,24	0,92±0,18
MS + BA5	17,40±4,28	3,00±1,41	3,17±0,54	0,93±0,19
$\frac{1}{2}$ MS + BA1	24,25±3,30	3,25±0,96	4,75±0,39	1,33±0,28
$\frac{1}{2}$ MS + BA3	21,4±3,97	2,20±0,84	5,17±0,90	1,59±0,29
$\frac{1}{2}$ MS + BA5	23,80±2,49	2,40±1,67	4,05±0,39	0,98±0,60

Penggunaan media dasar $\frac{1}{2}$ MS memberikan hasil yang tidak berbeda dengan media MS, bahkan pada media ini tunas yang tumbuh relatif lebih tinggi dan lebih banyak jumlah daunnya. Hal ini akan lebih baik dalam perbanyakkan karena di samping penggunaan MS $\frac{1}{2}$ yang lebih efisien dari setiap buku daun dapat kembali digunakan untuk eksplan dalam perbanyakkan tunas selanjutnya.

Induksi dan Multiplikasi Tunas

Perbanyakkan gaharu secara alami dapat dilakukan dengan generatif maupun vegetatif. Perbanyakkan vegetatif dapat dilakukan dengan cara cangkok, okulasi, stek batang, dan stek pucuk. Perbanyakkan vegetatif secara konvensional memberikan hasil yang terbatas dengan keberhasilan tertinggi hanya 40% sejak dari persemaian sampai ke lapang dengan waktu yang cukup lama (Departemen Kehutanan 2003). Dengan teknik *in vitro* perbanyakkan secara vegetatif diharapkan dapat meningkatkan keberhasilan, mempersingkat waktu, dan keseragaman yang tinggi.

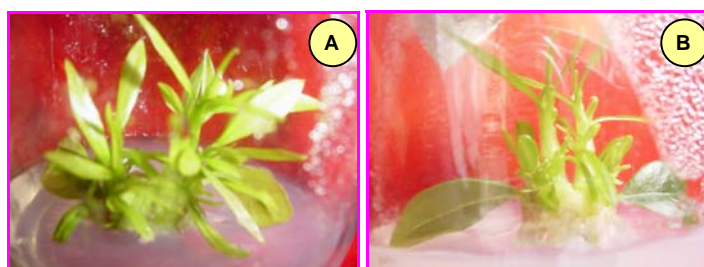
Perbanyakkan secara *in vitro* dapat menggunakan berbagai macam eksplan. Eksplan yang relatif mudah

diinduksi tunasnya adalah eksplan yang memiliki jaringan meristem atau bakal tunas seperti tunas terminal dan bakal tunas pada buku. Untuk mengetahui eksplan yang paling mudah, paling cepat, dan paling tinggi faktor multiplikasinya, induksi tunas dilakukan dengan menggunakan eksplan tunas terminal, buku satu tunas dengan daun dan buku satu tunas tanpa daun. Hasil pengamatan disajikan pada Tabel 4.

Penggunaan eksplan yang berbeda ternyata hanya memberikan hasil yang sedikit berbeda. Perbedaan yang jelas hanya terlihat pada rata-rata waktu induksi tunas. Waktu induksi tunas tercepat diperoleh dari eksplan buku tanpa daun, yaitu 13,83 hari setelah kultur. Eksplan ini dikulturkan pada media $\frac{1}{2}$ MS + BA 5 mg/l. Tetapi kecepatan induksi pembentukan tunas tidak menjamin banyaknya tunas yang terbentuk. Induksi tunas terbanyak (4,6) diperoleh dari eksplan buku dengan daun yang dikulturkan pada media MS + BA 1 mg/l (Gambar 1). Penggunaan eksplan buku satu tunas dengan maupun tanpa daun memberikan hasil yang hampir sama, meskipun demikian buku dengan daun memberikan jumlah tunas yang terbentuk dan tinggi tunas yang lebih baik daripada buku tanpa daun.

Tabel 4. Rata-rata pertumbuhan tunas gaharu dari berbagai sumber eksplan.

Sumber eksplan	Media (Mg/l)	Rata-rata waktu induksi tunas	Rata-rata jumlah tunas	Rata-rata jumlah daun	Rata-rata tinggi tunas
Buku (+daun)	MSBA1	16,20±3,27	4,60±1,52	4,76±1,32	0,63±0,17
	MSBA3	16,40±3,13	3,80±1,79	3,26±0,71	0,53±0,13
	MSBA5	14,80±0,45	2,20±1,10	3,33±0,62	0,67±0,40
	$\frac{1}{2}$ MSBA1	22,40±10,43	3,00±0,71	3,63±0,65	0,86±0,92
	$\frac{1}{2}$ MSBA3	17,75±3,40	2,50±1,29	3,32±1,16	0,53±0,15
	$\frac{1}{2}$ MSBA5	18,00±4,12	2,00±0,71	3,57±0,250	0,46±0,11
Buku (-daun)	MSBA1	15,83±3,13	3,67±0,52	3,79±0,86	0,56±0,29
	MSBA3	15,00±0,00	2,33±1,21	5,13±1,09	0,60±0,20
	MSBA5	17,33±4,04	1,33±0,58	3,67±0,58	0,32±0,03
	$\frac{1}{2}$ MSBA1	16,00±2,97	2,67±1,37	4,83±0,49	0,46±0,05
	$\frac{1}{2}$ MSBA3	20,00±3,42	2,57±0,79	3,39±0,85	0,34±0,11
	$\frac{1}{2}$ MSBA5	13,83±2,40	3,50±0,84	3,46±0,60	1,16±1,29
Tunas terminal	MSBA1	33,17±4,26	2,67±0,82	4,53±2,44	0,56±0,24
	MSBA3	33,00±4,69	3,25±1,89	4,75±0,84	0,49±0,22
	MSBA5	33,50±3,83	2,50±0,55	4,47±0,91	0,55±0,15
	$\frac{1}{2}$ MSBA1	32,80±3,83	3,00±0,00	3,67±0,53	0,63±0,15
	$\frac{1}{2}$ MSBA3	37,00±3,55	3,86±0,69	3,36±1,93	0,53±0,31
	$\frac{1}{2}$ MSBA5	38,80±1,79	2,60±0,55	3,83±1,11	0,47±0,14



Gambar 1. Pertumbuhan tunas pada media MS + BA 1 mg/(A) dan MS + BA 3 mg/l (B).



Gambar 2. Pembentukan kalus pada pangkal tunas pada media MS + BA 5 mg/l.

Hal ini sesuai dengan mikropropagasi pada cendana yang menggunakan buku dengan daun untuk perbanyakannya (Minh dan Thu 2001).

Penggunaan eksplan tunas terminal gaharu ternyata tidak lebih baik daripada kedua jenis eksplan yang lain. Induksi tunas aksilarnya sangat lama (lebih dari 30 hari) setelah kultur. Rata-rata jumlah tunas tidak lebih baik daripada eksplan buku. Sebaliknya pada tanaman *Lagerstromia parviflora* di mana jumlah tunas terbanyak diperoleh dari eksplan tunas terminal yang dikulturkan pada media MS dan MS + BA 2,5 mg/l (Quraishi *et al.* 1997).

Penambahan zat pengatur tumbuh BA konsentrasi rendah (0,1-3,0 mg/l) banyak dilaporkan berhasil menginduksi tunas pada tanaman berkayu seperti pada *L. parviflora* (Quraishi *et al.* 1997), *D. retusa* (Cerdas dan Guzman 2004), *Salvia nemerosa* L. (Skaia *et al.* 2004), cendana (Minh dan Thu 2001), *Pterocarpus marsupium roxb* (Chand dan Singh 2004), *Wrightia tinctoria* (Purohit dan Kukda 2004). Pada perbanyakan gaharu, penambahan BA 1 mg/l pada media dasar MS untuk eksplan buku dengan daun berhasil menginduksi jumlah tunas tertinggi meskipun waktu induksinya tidak paling cepat.

Pada penelitian ini pengenceran media dasar $\frac{1}{2}$ kali komposisi dasarnya ditujukan untuk mengurangi kandungan nitrogen pada media. Minh dan Thu (2001) melaporkan bahwa kandungan nitrogen yang tinggi pada media akan menimbulkan tingginya pembentukan tunas yang tidak normal dan menghambat proliferasi tunas pada mikropropagasi tanaman cendana. Pada tanaman gaharu ternyata penurunan kandungan N pada media MS tidak memberikan perbedaan yang mencolok. Perbedaan justru terlihat pada peningkatan konsentrasi BA. Dari pengamatan visual biakan terlihat kecenderungan peningkatan konsentrasi BA terutama pada media MS menginduksi pembentukan kalus pada pangkal tunas (Gambar 2).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Biji gaharu lebih baik dikecambahkan pada media yang sederhana, yaitu media MS tanpa penambahan vitamin, zat pengatur tumbuh maupun senyawa lain seperti PVP.
2. Buku kotiledon gaharu dapat diinduksi tunasnya.
3. Eksplan terbaik untuk induksi dan multiplikasi tunas adalah buku satu tunas dengan daun dan dikulturkan pada media MS + BA 1 mg/l.
4. Peningkatan konsentrasi BA sampai 5 mg/l meningkatkan pembentukan tunas yang tidak normal.

DAFTAR PUSTAKA

- Cerdas, L.V. and L.A. Guzman. 2004.** Organogenesis *in vitro* en *Dalbergia retusa* (Papilionaceae). *Rev. Biol. Trop.* 52(1):41-46.
- Chand, S. and A.K. Singh. 2004.** *In vitro* shoot regeneration from cotyledonary node explants of a multipurpose leguminous tree, *Pterocarpus marsupium roxb.* *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40(2):167-170.
- Chakraburty, K.; A. Kumar, and V. Menon. 1994.** Trade in agarwood. TRAFFIC India and WWF India Publications New Delhi.
- Departemen Kehutanan. 2003.** Teknik budidaya gaharu. Pusat Litbang Hutan dan Konservasi alam. Bogor.
- Dixon, R.A. and R.A. Gonzales. 1994.** Plant cell culture. A Practical Approach 2nd Edition. Oxford University Press New York. p. 101.
- Hartadi, I. 1997.** The hunt for gaharu. Gaharu, a rare commodity already on Appendix II of CITES, is still collected in large quantity. *Conservation Indonesia* 13(2). Industrial Hidupan Liar (The Wildlife Industry). WWF. Jakarta.
- Isnaini, Y., dan J. Situmorang. 2005.** Aplikasi bioteknologi untuk pengembangan tanaman gaharu (*Aquillaria* spp.) di Indonesia (Studi kasus: Perkembangan penelitian

- gaharu di SEAMEO Biotrop). Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Bioteknologi Pertanian Indonesia. Malang.
- Liz, R.E. and Y. Levith. 1997.** Effect of 1-amino cyclopropane-1-carbolic acid, aminoethoxivinylglycine, methylglucosylbis-(gluanylhyaone) and dicyohexamonium sulfat on induction of embryogenic compotence of mango nuclear explants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 6: 171-176.
- Lopez, D.T. 1998.** Malayan timbers for pencil manufacture. *The Malaysian Forester* 41(1):17-24.
- Mariska, I. dan D. Sukmadjaja. 2003.** Kultur jaringan abaka. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian.
- Mariska, I., Hobir, K. Mulya, A. Husani, D. Sukmadjaja, E.G. Lestari, and S. Rahayu. 2001.** Improvement of bacterial wilt resistance of eggplant through protoplast fusion. *Jurnal Litbang pertanian* 20(1):6-11.
- Mariska, I., Hobir, A. Husni, M. Kosmiatin, dan Y. Rusyadi. 1998.** Penyelamatan embrio hasil persilangan antara panili budi daya dan panili liar. Laporan Hasil Penelitian. Balitbio.
- Kosmiatin, M. 2004.** Kultur embrio dan penggandaan kromosom F1 hasil persilangan antara kacang hijau (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) dengan kacang hitam (*V. mungo* (L.) Hepper). Tesis Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Kosmiatin, M., S. Hutami, A. Husni, I. Mariska, dan S. Utami. 2005.** Optimasi metode penapisan pada tanaman kedelai untuk toleransi terhadap kekeringan. Laporan Hasil Penelitian BB-Biogen.
- Minh, T.V. and B.T.T. Thu. 2001.** Manipulation of tissue culture techniques in woody species conservation and improvement: (2) Sandal wood (*Aquilaria crassna* Pierre ex. Lecombe) meristem culture. *Proc. Plant & Animal*
- Monnier, M. 1990.** Induction embryogenesis in suspension culture. *Method in Molecular Biology. Plan Cell Tiss. Org. Cult.* 6:149-157.
- Nanda, K., S. Philips, and A. Dewan. 1999.** Rapid *in vitro* propagation of Acacia species. *Proc. The International Wood Biotechnology Symposium, Oxford UK, July 11-16.*
- Ng, L.T., Y.S. Chang, and A.A. Kadir. 1997.** A review on agarwood (gaharu) producing Aquilaria species. CITES.
- Oldfield, S., C. Lusty, and A. MacKinven. 1998.** The word list of threatened trees. *World Conservation Monitoring Centre. World Conservation Press Cambridge.*
- Peters, M.C. 1996.** Observation on sustainable exploitation of non-timber tropical forest product: An ecologists perspective. *In Perez, M.R. and J.E.M. Arnold (Eds.). Current Issues in Non Timber Forest Products Research. CIFOR-ODA. Jakarta. p. 19-39.*
- Purohit, S.D. and G. Kukda. 2004.** Micropropagation of an adult tree-*Wrightia tinctoria*. *Indian J. Biotechnol.* 3:216-220.
- Quraishi, A., V. Kochke, and S.K. Mishra. 1997.** Micropropagation of *Lagerstroemia parviflora* through axillary bud culture. *Silvae Genetica* 46(4):242-245.
- Shyun, C.Y. 1997.** Gaharu. FRIM in focus. The forest Research Institute Malaysia, January. 1997. Kuala Lumpur.
- Skaia, Ewa, Wysoki, Nska, and Halina. 2004.** *In vitro* regeneration of *Salvia nemerosa* L. from shoot tips and leaf explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40(6):596-602.
- Susilo, K.A. 2003.** Budidaya gaharu dan masalahnya. Pustaka Sinar Harapan. Jakarta. 48 hlm.
-