

Callus Induction from Cotyledon of *Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke

Fajri Marisa, Lisna Hidayati, Aries Bagus Sasongko, Tri Rini Nuringtyas*

Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

Article History

Received : May 03th, 2021

Revised : May 12th, 2021

Accepted : May 28th, 2021

Published : June 07th, 2021

*Corresponding Author:

Tri Rini Nuringtyas,

Fakultas Biologi

Universitas Gadjah Mada

Yogyakarta, Indonesia;

Email: tririni@ugm.ac.id

Abstract: *Gyrinops versteegii* is an endemic plant in eastern Indonesia that produced agarwood with high quality and economic value. This plant has been threatened by overexploitation which leads on decreasing in the natural population. This research aimed to induce in vitro callus formation to support the sustainable utilization of *G. versteegii*, which in the end, may support plant productivity. Callus induction was investigated using cotyledon and cultured on MS medium supplemented with several combination of plant growth regulators. The observations were done for the number of explants turned into callus and the duration for the first callus formation. The results showed that combination of 3 mg/L NAA + 0.5 mg/L BAP was recorded as the best combination for callus induction (63.63%). Callus with friable structure and bright color are obtained within nine days of incubation and showed the characteristic of embryonic callus. This result is expected to give a significant opportunity to conserve the natural population of *G. versteegii*.

Keywords: *Gyrinops versteegii*; callus; in vitro; plant growth regulator.

Pendahuluan

Gyrinops versteegii (Gilg.) Domke merupakan salah satu spesies penghasil gaharu endemik Indonesia dengan kualitas tinggi. Resin dari tanaman ini memiliki harga jual sangat tinggi (Susilo *et al.*, 2014). Spesies ini secara alami terdistribusi di bagian timur Indonesia seperti Nusa Tenggara Timur (NTT), Lombok, Sulawesi dan Papua (Trimulyaningsih, 2014).

Berdasarkan Peraturan Pemerintah No. 7/1999 dan Permenhut No. 447/Kpts-II/2003 menetapkan bahwa *G. versteegii* sebagai salah satu jenis tanaman penghasil gaharu yang dilindungi dan dilarang untuk ditebang (Susilo *et al.*, 2014). CITES (*The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora dan Fauna*) juga mengelompokan status konservasi *G. versteegii* ke dalam daftar appendix II. Padahal penelitian mengenai *G. versteegii* semakin banyak dilakukan dan didukung oleh kemampuan bioaktivitasnya sebagai antioksidan (Nuringtyas *et al.*, 2018), antikanker (Nuringtyas *et al.*, 2018; Wardana *et al.*, 2019) dan antivirus (Masita *et al.*, 2020).

Oleh karena itu, perlu dilakukan pengontrolan terhadap perdagangan spesies ini (Aini, 2015). Sebagai langkah antisipatif, diperlukan suatu usaha budidaya alternatif yang dapat menunjang kelestarian gaharu spesies ini.

Kultur *in vitro* merupakan salah satu teknik mikropropagasi yang dapat digunakan untuk budidaya secara masal dan cepat (Benjamin *et al.*, 2019). Salah satu teknik dalam kultur *in vitro* yang sering digunakan untuk mikropropagasi adalah induksi kalus yang mampu menghasilkan sel-sel yang bersifat meristematik (Efferth, 2019). Adapun protokol yang secara efisien mampu menginduksi kalus dengan zat pengatur tumbuh (ZPT) pada spesies *Gyrinops walla* dan *Aquilaria malaccensis* telah dilaporkan oleh Munasinghe *et al.*, (2017) dan Saikia *et al.*, (2013) dengan menggunakan eksplan daun. Hanya saja, pertumbuhan dan perkembangan kalus yang diperoleh dilaporkan masih sangat lambat. Oleh karena itu diperlukan penelitian untuk mencoba penggunaan sumber eksplan yang berbeda.

Berbagai penelitian melaporkan bahwa kotiledon adalah eksplan yang memiliki

produktifitas tinggi (Raza *et al.*, 2019), sehingga sangat berpotensi digunakan sebagai eksplan kultur mikropropagasi dengan tujuan produksi secara masal dan konservasi. Studi yang mengkaji induksi kalus berasal dari kotiledon *G. versteegii* belum pernah dilakukan.

Bahan dan Metode

Pembuatan Medium Induksi Kalus

Medium yang digunakan adalah *Murashige and Skoog* (MS) padat yang diperoleh dengan menambahkan agar sebanyak 0,7%. Kombinasi ZPT dilakukan dengan dua variasi yaitu kombinasi A: kinetin (KIN) + 2,4D dan kombinasi B: BAP + NAA seperti yang ditampilkan pada Tabel 1.

Sebanyak masing-masing 1 L medium dihomogenkan kemudian pH diatur pada kisaran antara 5,8 sampai 6,2. Selanjutnya, sebanyak masing-masing 20 mL medium dituang ke dalam botol kultur, dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 20 menit. Setelah sterilisasi selesai, medium dalam kondisi masih cair dan hangat dituang ke dalam cawan petri secara aseptis dalam LAF.

Tabel 1. Kombinasi konsentrasi ZPT untuk medium induksi kalus dari kotiledon *G. versteegii*

Perlakuan	Konsentrasi ZPT
A1	0,05 mg/L KIN + 1 mg/L 2,4 D
A2	0,1 mg/L KIN + 2 mg/L 2,4 D
A3	0,15 mg/L KIN + 3 mg/L 2,4 D
B1	0,25 mg/L BAP + 1 mg/L NAA
B2	0,5 mg/L BAP + 3 mg/L NAA
B3	1 mg/L BAP + 5 mg/L NAA

Preparasi Eksplan

Biji tanaman *G. versteegii* diperoleh dari perkebunan gaharu di wilayah Klaten, Jawa Tengah. Biji disterilisasi menggunakan 10 % larutan natrium hipoklorit (Bayclean) yang ditambah dengan 3 tetes Tween 20 selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan penggojokkan dalam alkohol 70 % selama 1 menit, dan terakhir biji dibilas menggunakan akuades steril sebanyak 3 kali. Biji yang telah steril kemudian

dikecambahkan dalam medium $\frac{1}{2}$ MS selama 2 bulan.

Kotiledon dikoleksi dari kecambah *G. versteegii* yang telah berukuran 2 cm. Tiap kotiledon dipotong pada bagian dasarnya kemudian dibagi menjadi 2 bagian dengan ukuran yang sama. Seluruh aktivitas kultur dilakukan secara aseptis dalam LAF

Induksi Pembentukan Kalus

Tiap eksplan kotiledon dikultur ke dalam medium induksi kalus yaitu A1, A2, A3, B1, B2, dan B3 (Tabel 1). Tiap petri berisi 3 potong kotiledon, kemudian diinkubasi dengan kondisi tanpa cahaya (gelap total) dengan suhu ruang berkisar 25 °C.

Pengamatan Kalus

Pengamatan pembentukan kalus dilakukan pada siang hari dan diulangi setiap 3 hari sekali selama 42 hari. Karakter yang diamati antara lain adalah kemunculan kalus pertama, warna, tekstur, dan ukuran kalus.

Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menghitung persentasi keberhasilan pembentukan kalus dan ukuran luas kalus yang dihasilkan.

Persentasi keberhasilan kalus dihitung dengan rumus:

$$\text{Persen keberhasilan} = \frac{\text{Banyak eksplan berkalus}}{\text{Total eksplan}} \times 100\%$$

Ukuran luas kalus dihitung dengan menggunakan aplikasi *KLONK image measurement*. Data luas kalus yang diperoleh dianalisis menggunakan *One-Way ANOVA* pada tingkat signifikansi $p < 0,05$. Hasil yang signifikan dilanjutkan dengan analisis *post hoc* Duncan.

Hasil dan Pembahasan

Keberhasilan Induksi Kalus

Penelitian induksi kalus dengan sumber eksplan dari kotiledon *G. versteegii* dilakukan dengan menggunakan berbagai kombinasi dan konsentrasi ZPT dalam medium perlakuan yaitu A1, A2, A3, B1, B2, dan B3 dengan rincian kombinasi seperti pada Tabel 1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua perlakuan kombinasi ZPT berhasil menginduksi pembentukan kalus

(Tabel 2). Induksi kalus kotiledon *G. versteegii* memberikan rata-rata waktu pembentukan kalus paling cepat selama 6 hari yang diperoleh pada medium dengan kombinasi ZPT A2 (0,1 mg/L KIN + 2 mg/L 2,4D). A3 (0,15 mg/L KIN + 3 mg/L 2,4D) dan B1 (0,25 mg/L BAP + 1 mg/L NAA) dengan persentasi keberhasilan pembentukan kalus menengah yaitu 54,54%. Persentase keberhasilan pembentukan kalus tertinggi diperlihatkan pada medium perlakuan dengan kombinasi ZPT B2 (0,5 mg/L BAP + 3 mg/L NAA) yaitu 63,63% dengan rata-rata lama pembentukan kalus adalah 9 hari. Medium dengan kombinasi ZPT B2 (0,5 mg/L BAP + 3 mg/L NAA) dan B3 (1 mg/L BAP + 5 mg/L NAA) menunjukkan hasil seragam, yang mana waktu pembentukan kalusnya berkisar 9 hari (Tabel 2.).

Performa induksi kalus yang berbeda dari yang lain ditunjukkan oleh kombinasi ZPT A1 (0,05 mg/L KIN + 1 mg/L 2,4 D) yang memiliki persentasi keberhasilan induksi terendah yaitu sebesar 27,27%, dan waktu pembentukan kalus yang paling lama muncul, yaitu 18 hari (Tabel 2.). Eksplan yang dikultur pada medium A1 mengalami pertumbuhan yang sangat lambat, kemungkinan diakibatkan kurangnya ZPT yang diberikan untuk mendukung induksi kalus. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi dan kombinasi ZPT yang tepat sangat mempengaruhi kecepatan munculnya kalus.

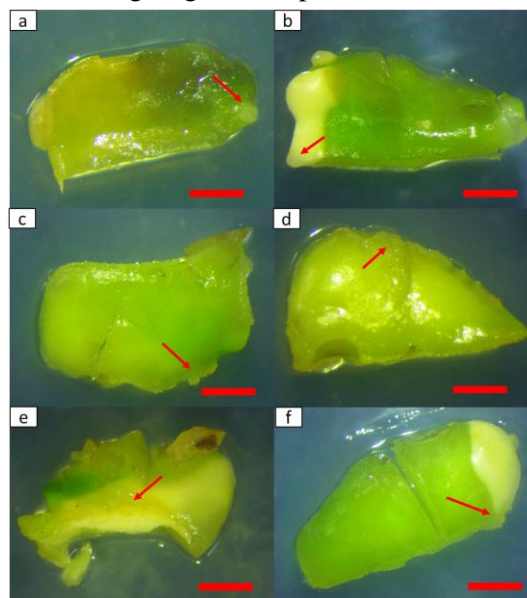
Tabel 2. Pengaruh penambahan berbagai konsentrasi dan kombinasi ZPT terhadap pembentukan kalus kotiledon *Girynops versteegii*

Pelakuan	Banyak eksplan berkalus (%)	Waktu pembentukan kalus pertama (hari)
K	0	-
A1	27,27	18
A2	54,54	6
A3	54,54	6
B1	54,54	6
B2	63,63	9
B3	54,54	9

Ket : A1 = 1 mg/L 2,4 D + 0.05mg/L KIN, A2 = 2 mg/L 2,4 D + 0.1mg/L KIN, A3 = 3 mg/L 2,4 D + 0.15mg/L KIN, B1 = 1 mg/L NAA + 0.25mg/L BAP, B2 = 3 mg/L NAA + 0,5mg/L BAP, B3 = 5 mg/L NAA + 1mg/L BAP. K = Kontrol.

Induksi pembentukan kalus pada eksplan kotiledon diawali oleh terjadinya

pembengkakan pada beberapa titik pada permukaan eksplan yang mengalami perlakuan (Gambar 1.). Penampakan eksplan menjadi membengkak dan ukuran eksplan membesar, hingga akhirnya kalus terbentuk. Menurut Sari *et al.* (2018), pembengkakan dan pemanjangan yang terjadi pada eksplan berhubungan erat dengan penyerapan nutrisi dari medium oleh eksplan. Sedangkan kemunculan kalus pada bagian yang terluka diakibatkan oleh respon tumbuhan untuk memperbaiki jaringan yang mengalami kerusakan. George dan Sherrington (1984) mengemukakan bahwa hormon endogen yang terkandung dalam eksplan mendukung terjadinya respons jaringan untuk membentuk kalus. Kotiledon merupakan jaringan aktif dan kaya akan hormon pertumbuhan seperti auksin dan sitokinin, sehingga memungkinkan induksi kalus berlangsung lebih cepat.



Gambar 1. Penampakan eksplan kotiledon *Girynops versteegii* pada awal kemunculan kalus. a) Perlakuan A1; b) Perlakuan A2; c) Perlakuan A3; d) Perlakuan B1; e) Perlakuan B2; dan f) Perlakuan B3. Tanda panah menunjukkan kalus pertama yang muncul. Bar = 1 mm

Karakter Morofologi Kalus

Hasil pengamatan morofologi kalus menunjukkan bahwa ukuran kalus terbesar diperlihatkan pada medium perlakuan B2 yaitu sebesar 7,47 cm² dan B3 yaitu sebesar 7,40 cm² (Table 3.). Kedua perlakuan menghasilkan luas kalus yang tidak berbeda setelah diuji statistik menggunakan ANOVA. Sedangkan perlakuan yang lain yaitu A1, A2, A3, dan B1 menunjukkan

perbedaan yang signifikan dari perlakuan B2 dan B3. Hal ini menandakan bahwa perlakuan NAA dengan kisaran 3 – 5 mg/L yang dikombinasi dengan BAP dengan konsentrasi 0,5– 1 mg/L memberikan pengaruh yang sama dalam menginduksi kalus dari kotiledon *G. versteegii* dan merupakan kombinasi ZPT yang terbaik dalam menginduksi pembentukan kalus pada eksplan kotiledon *G. versteegii*.

Kombinasi ZPT pada perlakuan B2 (3 mg/L NAA + 0,5mg/L BAP) merupakan kombinasi ZPT yang disarankan oleh Buddhapriya dan Senarath (2016) dan Munasinghe *et al.*, (2017) untuk induksi kalus pada daun tanaman *Gyrinops walla*. Pada penelitian ini, waktu yang diperlukan untuk pembentukan kalus pertama lebih cepat dibandingkan kedua penelitian diatas. Keberhasilan induksi kalus dari koteiledon *G. versteegii* pada penelitian ini membuktikan bahwa kombinasi tersebut juga dapat diaplikasikan pada spesies dan organ lain.

Tabel 3. Karakter morfologi kalus dari kotiledon *Gyrinops versteegii* pada berbagai kombinasi ZPT

Perlakuan	Morfologi kalus		Luas Kalus (cm ²)
	Struktur	Warna	
K	-	-	-
A1	Kompak	Kecoklatan	1.75±0.07 ^d
A2	Remah	Putih	6.52±0.11 ^b
A3	Remah	Krim	6.62±0.11 ^b
B1	Remah	Putih	5.44±0.10 ^c
B2	Remah	Putih	7.47±0.15 ^a
B3	Remah	Putih	7.40±0.18 ^a

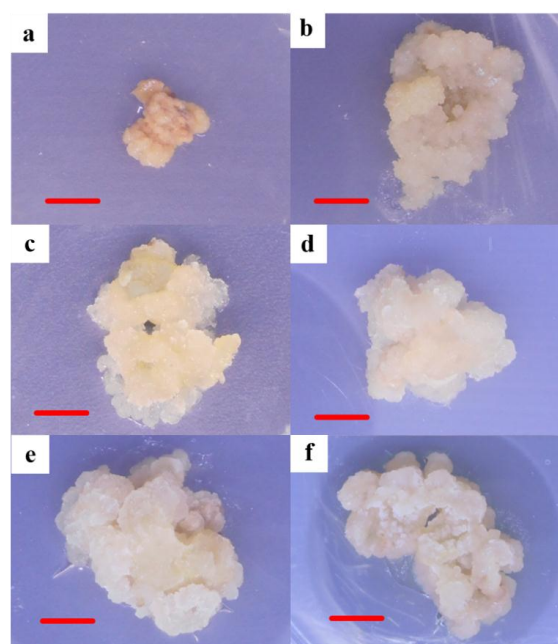
Ket : A1 = 1 mg/L 2,4 D + 0.05mg/L KIN, A2 = 2 mg/L 2,4 D + 0.1mg/L KIN, A3 = 3 mg/L 2,4 D + 0.15mg/L KIN, B1 = 1 mg/L NAA + 0.25mg/L BAP, B2 = 3 mg/L NAA + 0.5mg/L BAP, B3 = 5 mg/L NAA + 1mg/L BAP. Data menunjukkan rata-rata + sd dari 3 replikasi. Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada satu kolom menunjukkan berbeda nyata pada $p < 0.001$ dianalisis dengan ANOVA dan post hoc DMRT.

Kalus yang terbentuk dari eksplan kotiledon *G. versteegii* secara umum memiliki struktur yang *friable* atau remah, berair dan sangat mudah untuk dipisahkan. Tidak hanya itu, kalus juga memperlihatkan pertumbuhan yang sangat cepat dan menunjukkan karakter kalus embrionik.

Jin dan Keng (2013), menyatakan bahwa

sifat *friable* pada struktur kalus disebabkan oleh sel-sel kalus yang tersusun longgar, dan berinding tipis sehingga memiliki frekuensi pembelahan yang tinggi. Kalus bertekstur *friable* umumnya terbentuk akibat baiknya kemampuan jaringan dalam menyerap air (Akaneme dan Eneobong, 2008). Kotiledon sendiri merupakan bagian biji yang sangat mudah mengikat air untuk mempercepat perkecambahan. Karakter kotiledon ini sangat mendukung terbentuknya kalus *friable*.

Tekstur *friable* pada suatu kalus juga dipicu oleh keberadaan hormon auksin endogen yang diproduksi secara internal oleh eksplan. Kotiledon merupakan organ utama yang mendukung perkembangan embrio dan fase pertumbuhan awal tumbuhan. Kotiledon diketahui memiliki berbagai hormon endogen yang sangat kompleks untuk mendukung pemanjangan, proliferasi dan diferensiasi sel, seperti auksin (IAA), asam absisat dan sitokinin (Zeatin) (Centeno *et al.*, 1997)



Gambar 2. Morfologi kalus dari kotiledon *Gyrinops versteegii* pada berbagai medium perlakuan. a) Perlakuan A1; b) Perlakuan A2; c) Perlakuan A3; d) Perlakuan B1; e) Perlakuan B2; dan f) Perlakuan B3. Bar = 0,5 cm

Pengamatan terhadap morfologi kalus juga menunjukkan bahwa kebanyakan kalus yang terbentuk pada eksplan memiliki warna yang cerah (Gambar 2.). Menurut Na *et al.* (2007),

warna pada kalus erat kaitannya dengan ukuran ruang antar sel, sehingga semakin cerah warna kalus maka ukuran ruang antar selnya besar dan sel-selnya tervakuolasi. Shinta *et al.* (2020) juga menyatakan bahwa, warna kalus merupakan indikator morfologi yang digunakan untuk mengetahui pertumbuhan kalus dan mengetahui apakah kalus memiliki karakter embriogenik atau tidak. Kalus yang memiliki warna cerah seperti putih dan kekuningan diduga sedang mengalami masa pertumbuhan yang baik, sehingga warna yang dihasilkan pun berbeda namun dapat pula disebabkan oleh jaringan kalus yang tidak mengandung kloroplas. Tsuru *et al.* (1999) melaporkan bahwa umumnya kalus berwarna putih merupakan jaringan embriogenik yang belum mengandung kloroplas tetapi memiliki kandungan pati yang tinggi.



Gambar 3. Pertumbuhan kalus kotiledon *Gyrinops versteegii* pada berbagai medium perlakuan. A1 = 1 mg/L 2,4 D + 0.05mg/L KIN, A2 = 2 mg/L 2,4 D + 0.1mg/L KIN, A3 = 3 mg/L 2,4 D + 0.15mg/L KIN, B1 = 1 mg/L NAA + 0.25mg/L BAP, B2 = 3 mg/L NAA + 0.5mg/L BAP, B3 = 5 mg/L NAA + 1mg/L BAP. Dari kiri ke kanan menunjukkan waktu 0, 6, 9, 18, 24, 36, dan 42 hari setelah kultur. Bar kuning = 1mm, dan bar merah = 0,5 cm

Pengamatan terhadap perubahan morfologi eksplan kotiledon hingga membentuk kalus (Gambar 3.), menunjukkan bahwa pertumbuhan kalus dari kotiledon *G. versteegii* mengalami 3 fase utama yaitu fase lag yang berlangsung hingga hari ke 6 untuk eksplan dalam medium A2, A3 dan B1, hari ke 9 untuk eksplan dalam medium B2 dan B3, serta hari ke 18 untuk eksplan dalam medium A1. Fase ini ditandai dengan terjadinya pembengkakan pada beberapa sisi eksplan. Selanjutnya, fase eksponensial diperkirakan terjadi hingga hari ke 36 pada semua perlakuan. Pada fase ini seluruh

bagian eksplan perlahan-lahan berubah menjadi kalus sepenuhnya. Terakhir adalah awal fase penurunan atau kematian yang diamati pada hari ke 42. Fase ini ditandai dengan terjadinya perubahan warna pada eksplan menjadi kecoklatan (*browning*). Pada fase ini terjadi penurunan pertumbuhan akibat kematian sel. Saat berada dalam fase kematian, eksplan kemudian di subkultur ke medium baru untuk menghentikan fase kematian tersebut dan diperoleh kalus generasi berikutnya.

Kesimpulan

Hasil penelitian induksi kalus pada eksplan kotiledon *G. versteegii* menunjukkan bahwa perlakuan B2 dengan kombinasi 3 mg/L NAA + 0.5mg/L BAP dan B3 dengan kombinasi 5 mg/L NAA + 1mg/L BAP merupakan perlakuan terbaik dalam menginduksi kalus pada kotiledon *G. versteegii* dengan menghasilkan ukuran luas kalus terbesar berturut-turut sebesar 7,47 cm² dan 7,40 cm². Perlakuan ini juga memberikan kalus yang *friable* dan embrionik.

Ucapan terima kasih

Terima kasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Kemensitek-Dikti atas dukungan pendanaan melalui skema PDUPT No. 2726/UN1.DITLIT/DIT-LIT/PT/2020

Referensi

- Aini, A. Q. (2015). Pengaruh Variasi Konsentrasi Hormon NAA Terhadap Induksi Kalus Gaharu (*Gyrinops versteegii* (Gilg) Domke) Melalui Teknik In Vitro dan Pemanfaatannya sebagai Karya Ilmiah Populer. Skripsi. Universitas Jember: Jawa Timur.
<https://repository.unej.ac.id/handle/123456789/67004>
- Akaneme, F.I., & Eneobong, E.E. (2008). Tissue culture in *Pinus caribaea* Mor. var. Hondurensis barr. and golf. II: Effects of two auxins and two cytokinins on callus growth habits and subsequent organogenesis. *African Journal of Biotechnology*, 7, (6): 757–765. ISSN: 1684–5315. <https://www.ajol.info/>

- index.php/ajb/article/view/58521
- Benjamin, E. D., Ishaku, G. A., Peingurta, F. A., & Afolabi, A.S. (2019). Callus Culture for the Production of Therapeutic. *American Journal of Plant Biology*. 4 (4): 76-84. doi: 10.11648/j.ajpb.20190404.14
- Buddhapriya, A. N., & Senarath, W.T.P.S.K. (2016). In vitro micropropagation of *Gyrinops walla* (gaerth) Using leaf disc explants. Proceedings of 1st International Conference on Bioscience and Biotechnology. 1: 11-14. doi: 10.17501/biotech.2016.1103
- Centeno, M.L., Rodríguez, R., Berros, B., & Rodríguez, A. (1997). Endogenous hormonal content and somatic embryogenic capacity of *Corylus avellana* L. cotyledons. *Plant Cell*. 17 (2): 139-144. doi: 10.1007/s002990050367
- Efferth, T. (2019). Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering*. 5: 50-59. doi: 10.1016/j.eng.2018.11.006
- George, E. F., & Sherrington, T. D. (1984). Plan Propagation by tissue culture handbook and directory of commercial laboratories. Eastern Press, England. ISBN: 0-9509325-0-7, pp: 477. <https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/414482>
- Jin, C. S., & Keng, C. L. (2013). Factor Affecting the Selection of Callus Cell Line and The Preparation of The Cell Suspension Culture of *Artemisia annua* L. *Plant Tissue Cult & Biotech*. 23, (2): 157-16. doi: 10.3329/ptcb.v23i2.17507
- Masita, R., Nuringtyas, T.R., Wijayanti, N., & Hidayati, L. (2020). Antiviral activity of agarwood *Aquilaria malaccensis* lamk and *Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke leaves ethanolic extract against dengue serotype 3 virus in vitro. AIP Conference Proceedings 2231 (1): 040077. doi: 10.1063/5.0002645
- Munasinghe. S.P., Weerakoon, S. R., Somaratne, S., & Ranasinghe, C. (2017). An Efficient Callus Induction Protocol for *Gyrinops walla* Gaetner ‘Walla patta’, a commercially Important Agarwood Species in Sri Lanka. *Scholars Journal of Research in Agriculture and Biology*. 2 (2): 96-102. ISSN: 2456-6527. <https://www.researchgate.net/publication/326160208>
- Na, H., Kim, K.W., Kwack, Y., Kim, S.K., & Chun, C. (2007). Comparative anatomy of embryogenic and non-embryogenic calli from *Pimpinella brachycarpa*. *Journal of Plant Biology*. 50 (3): 344–350. doi: 10.1007/BF03030665
- Nuringtyas, T.R., Isromarina, R., Septia, Y., Hidayati, L., Wijayanti, N., & Moeljopawiro, S. (2018). The antioxidant and cytotoxic activities of the chloroform extract of agarwood (*Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke) leaves on HeLa cell lines. AIP Conference Proceedings. 2002 (1): 020067. doi: 10.1063/1.5050163
- Raza, G., Singh, M. B., & Bhalla, P. L. (2019). Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Commercial Soybean Cultivars. *Plants (Basel, Switzerland)*. 9 (1): 38. doi: 10.3390/plants9010038
- Saikia, M., Shrivastava, K., Singh, S. S. (2013). Effect of Culture Media and Growth Hormones on Callus Induction in *Aquilaria malaccensis* Lam., a Medically and Commercially Important Tree Species of North East India. *Asian Journal of Biological Sciences*. 6 (2): 96-105. doi: 10.3923/ajbs.2013.96.105
- Sari, Y.P., Kusumawati, E., Saleh, C., Kustiawan, W., & Sukartingsih. (2018). Effect of sucrose and plant growth regulators on callogenesis and preliminary secondary metabolic of different explant *Myrmecodia tuberosa*. *Nusantara Bioscience*. 10 (3): 183-192. doi: 10.13057/nusbiosci/n100309
- Shinta. S., Minarno, E.B., & Rofiqoh, I. (2020). In vitro embryogenic callus induction of

Carica pubescens Lenne and K.Koch using 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid) and BAP (6-Benzylaminopurin). *Journal of biology researcher*. 25, (2) : 38-44. Retrieved: <http://www.berkalahayati.org/index.php/jurnal/article/view/49>

Susilo A, Kalima T, & Santoso E. (2014). *Panduan Lapangan Pengenalan Jenis Pohon Penghasil Agarwood *Gyrinops* spp. di Indonesia*. Puslitbang - Konservasi dan Rehabilitasi. Kementerian Kehutanan Indonesia. <http://lib.ugm.ac.id/ind/>

Trimulyaningsih. (2014). *Ekologi agarwood *Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke di hutan Lombok Barat*. Disertasi. Universitas Gadjah Mada: Yogyakarta. <http://lib.ugm.ac.id/ind/>

Tsuro, M., Koda, M., & Inoue, M. (1999). Comparison effect of different types of cytokine for shoot formation and plant regeneration in leaf-derived callus of lavender (*Lavandura vera* DC). *Scientia Horticulturae*, 81 (3): 331-336. doi: 10.1016/S0304-4238(99)00003-5

Wardana, T.A.P., Nuringtyas, T.R., Wijayanti, N., & Hidayati, L. (2019). Phytochemical analysis of agarwood (*Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke) leaves extracts as anticancer using GC-MS. *AIP Conference Proceedings*. 2194 (1): 020136. doi: 10.1063/1.5139868