

Pengaruh matriks kapsul terhadap perkecambahan benih sintetik teh (*Camellia sinensis* L.)

Effect of capsule matrix on germination of synthetic seeds of tea (Camellia sinensis L.)

SUMARYONO^{*)} & Rizka T SAPTARI

Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia,
Jl. Taman Kencana No.1, Bogor 16128, Indonesia

Diterima tanggal 19 Agustus 2015/disetujui tanggal 5 Oktober 2015

Abstract

Synthetic seed technology has been developed to combine the practical use of ordinary seeds and clonal plant materials. Single somatic embryos of tea (Camellia sinensis L.) clone GMB 9 were encapsulated using sodium alginate and CaCl₂ at different concentrations to produce synthetic seeds. Encapsulating matrices with and without somatic embryos were made of WP medium and 20 g/L sucrose with 1, 2 or 3% sodium alginate and 50 or 100 mM CaCl₂. Encapsulating matrices without somatic embryos were then tested its physical characteristics, whereas the capsules with somatic embryos were observed its germination rate and secondary embryo formation every week up to six weeks. The results showed that the concentrations of sodium alginate and CaCl₂ were affected significantly the physical characteristics of encapsulating matrix produced. The sufficient level of hardness and highest germination rate was obtained from 2% sodium alginate and 50 mM CaCl₂. Sodium alginate at 1% or less produced soft, leaky and oval encapsulating matrices which were not suitable for synthetic seeds. Sodium alginate 3% and 100 mM CaCl₂ produced rounded and very hard encapsulating matrices and inhibited the germination of somatic embryos. Germination rates of tea synthetic seeds and somatic embryos without encapsulation were 5 to 20% after six weeks.

[Key words: Artificial seed, *Camellia sinensis* L., encapsulation, germination, somatic embryo, synthetic seed]

Abstrak

Teknologi benih sintetik dikembangkan untuk memadukan kepraktisan penggunaan benih biasa dengan bahan tanam klonal. Embrio somatik tunggal dari tanaman teh (*Camellia sinensis* L.) klon GMB 9 dienkapsulasi menggunakan natrium alginat dan CaCl₂ untuk membuat benih sintetik. Matriks kapsul dengan dan tanpa embrio somatik dibuat dari medium WP dengan sukrosa 20 g/L dicampur dengan natrium alginat 1, 2, atau 3% dan CaCl₂ 50 atau 100 mM. Matriks kapsul tanpa

embrio somatik kemudian diuji sifat fisiknya, sedangkan matriks kapsul dengan embrio somatik diamati daya kecambah dan pembentukan embrio somatik sekunder setiap minggu sampai dengan enam minggu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi natrium alginat dan CaCl₂ sangat berpengaruh terhadap sifat fisik matriks kapsul yang dihasilkan. Tingkat kekerasan yang memadai dan menghasilkan persentase perkecambahan yang tinggi diperoleh dengan alginat 2% dan CaCl₂ 50 mM. Natrium alginat pada konsentrasi 1% atau kurang menghasilkan matriks kapsul yang lunak, mudah bocor dan berbentuk lonjong sehingga tidak sesuai untuk benih sintetik. Natrium alginat konsentrasi 3% pada larutan CaCl₂ 100 mM menghasilkan benih sintetik yang bulat, sangat keras dan menghambat perkecambahan embrio somatik teh. Daya kecambah benih sintetik dan embrio somatik teh tanpa enkapsulasi berkisar 5 - 20% setelah enam minggu.

[Kata kunci: Benih buatan, *Camellia sinensis* L., enkapsulasi, perkecambahan, embrio somatik, benih sintetik]

Pendahuluan

Tanaman teh (*Camellia sinensis* L. Kuntze) telah berhasil diperbanyak secara *in vitro* melalui embriogenesis somatik (Tahardi *et al.*, 2000; Akula & Akula, 2005). Teknik enkapsulasi embrio somatik teh menjadi benih sintetik dikembangkan untuk memudahkan pengiriman embrio somatik, mempertahankan viabilitas embrio dalam jangka waktu yang lebih lama, serta meningkatkan partumbuhan dan daya hidup benih dengan cara menambahkan hara, mikoriza, zat pengatur tumbuh dan pestisida ke dalam matriks gel. Di samping itu benih sintetik dapat menghilangkan tahap perkecambahan dan pendewasaan embrio *in vitro* yang biasa dilakukan untuk planlet.

Teknologi benih sintetik telah diterapkan pada berbagai macam bahan tanaman seperti embrio somatik, akar berambut (*hairy roots*), pucuk tunas, tunas aksiler, setek, dan benih biasa dari banyak jenis tanaman (Arun Kumar *et al.*, 2005; Latif *et al.*, 2007; Nor Asmah *et al.*, 2011; Siong *et al.*,

^{*)}Penulis korespondensi: sumaryono@iribb.co.id

2012; Cheruvatur *et al.*, 2013b; Haque & Ghosh, 2014). Teknik enkapsulasi embrio zigotik tanaman *Camellia sinensis* telah dilakukan (Seran *et al.*, 2005), namun belum pernah dilakukan pada embrio somatik teh.

Enkapsulasi pada umumnya menggunakan bahan gel untuk membentuk pembungkus (matriks kapsul) benih yang dapat melindungi embrio somatik tanpa merusak embrio namun masih memungkinkan embrio untuk berkecambah (Cheruvatur *et al.*, 2013a). Kapsul harus cukup padat (*rigid*) dan kuat (*durable*) seperti benih biasa sehingga mudah ditangani untuk disimpan, dikirim atau ditanam. Matriks kapsul juga tidak boleh mudah bocor (*leaky*) sehingga ke dalam matriks kapsul dapat ditambahkan hara, zat pengatur tumbuh dan pestisida. Penambahan hara atau zat pengatur tumbuh seperti giberellin (GA₃) ke dalam matriks kapsul diperlukan untuk membantu perkecambahan benih (Arun Kumar *et al.*, 2005; Cheruvatur *et al.*, 2013b). Oleh karena itu, pengembangan struktur (matriks) kapsul yang sesuai sangat penting dalam pembuatan benih sintetik. Penelitian ini dilakukan untuk mengenkapsulasi embrio somatik teh klon unggul GMB 9 menggunakan alginat dan CaCl₂ serta mengevaluasi sifat kapsul dan pengaruhnya terhadap perkecambahan embrio somatik tanaman teh.

Bahan dan Metode

Bahan tanam dan kondisi kultur

Bahan tanam yang digunakan adalah embrio somatik teh klon GMB 9 pada tahap perkembangan kotiledon (Gambar 1A). Prosedur untuk menghasilkan embrio somatik teh mengikuti protokol oleh Tahardi *et al.* (2000). Embrio somatik tunggal dengan panjang 4-5 mm diperoleh dari kultur proliferasi embrio pada umur 2-3 minggu setelah subkultur dan digunakan langsung tanpa perlakuan sterilisasi. Media dengan alginat, larutan CaCl₂, pipet, cawan Petri dan air disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,0 kg/cm² selama 20 menit sebelum digunakan. Seluruh kultur diletakkan pada ruang kultur dengan intensitas cahaya 20 µmol foton/m²/s dengan fotoperiode 12 jam dan suhu sekitar 25°C.

Pengaruh alginat dan CaCl₂ terhadap sifat fisik kapsul

Medium WP (Lloyd & McCown, 1981) dibuat dengan sukrosa 20 g/L dan ditambahkan natrium alginat dengan beberapa konsentrasi yakni 1, 2, dan 3% (w/v). Kapsul tanpa embrio somatik dibuat dengan memipet larutan campuran alginat dan medium tersebut kemudian dijatuhkan ke dalam

larutan CaCl₂ 50 mM atau 100 mM selama 20 menit. Kapsul yang terbentuk dibilas dengan air steril selama 20 menit.

Sifat fisik yang meliputi tingkat kekerasan, ukuran, kebundaran, bobot segar dan kandungan air dari matriks kapsul tanpa embrio yang dihasilkan dari masing-masing perlakuan diamati dengan ulangan sebanyak sepuluh. Tingkat kekerasan (*hardness*) kapsul diukur dengan alat *texture analyzer* menggunakan probe TA4/100 diameter 1 cm, tekanan 30%, dan kecepatan 0,5 mm/s. Angka kekerasan kapsul adalah tekanan maksimal (*peak force*) terukur yang dikonversikan ke satuan tekanan F Newton. Ukuran kapsul adalah rata-rata dari diameter tertinggi dan terendah dari kapsul. Perbandingan antara diameter tertinggi dan terendah mencerminkan tingkat kebundaran (*roundness*) dari kapsul yang terbentuk, dengan angka satu menunjukkan tingkat kebundaran yang sempurna, semakin tinggi angkanya bentuk benih sintetik semakin lonjong. Untuk menetapkan bobot segar, kapsul segar diletakkan pada kertas filter sebelum ditimbang guna menghilangkan air yang menempel pada permukaan kapsul. Bobot kering diperoleh setelah kapsul dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C selama 24 jam. Kandungan air adalah bobot segar dikurangi bobot kering dibagi bobot segar dan dikalikan dengan 100%. Untuk mengukur tingkat kebocoran (*leaking*), diukur bobot segar dikurangi bobot segar benih setelah disimpan selama dua minggu dalam keadaan tertutup rapat dibagi bobot segar dan dikalikan dengan 100%.

Enkapsulasi dengan alginat dan CaCl₂

Medium WP dibuat seperti di atas dengan natrium alginat 1, 2, 3% (w/v). Embrio somatik fase kotiledon (Gambar 1A) dicampur ke dalam medium dan diambil dengan pipet (diameter dalam 5,5 mm) kemudian dijatuhkan ke dalam larutan CaCl₂ (50 atau 100 mM) selama 20 menit. Kapsul yang mengandung embrio (benih sintetik) dibilas dengan air steril selama 20 menit. Benih tersebut selanjutnya dikultur pada medium padat WP di cawan Petri untuk uji perkecambahan. Dalam medium perkecambahan ditambahkan sukrosa 20 g/L dan Gelrite 2 g/L. Tiap perlakuan terdiri dari 10 embrio dalam satu cawan Petri dengan delapan ulangan. Embrio somatik tanpa enkapsulasi digunakan sebagai kontrol. Perkecambahan embrio diamati setiap minggu sampai dengan umur enam minggu. Embrio somatik dinyatakan berkecambah apabila telah mempunyai akar atau tunas dengan panjang lebih dari 2 mm (Gambar 1C). Pembentukan embrio sekunder pada benih sintetik juga diamati setiap minggu sampai dengan umur enam minggu.

Analisis statistik

Data pengamatan dianalisis dua-arah dengan sidik ragam (*analysis of variance* = ANOVA) menggunakan program SPSS Statistics 22. Apabila hasil analisis menunjukkan adanya perbedaan yang nyata maka perbedaan antara rerata perlakuan ditentukan menurut uji jarak berganda Duncan pada $P=0,05$. Korelasi antar parameter ditentukan menurut uji korelasi Pearson.

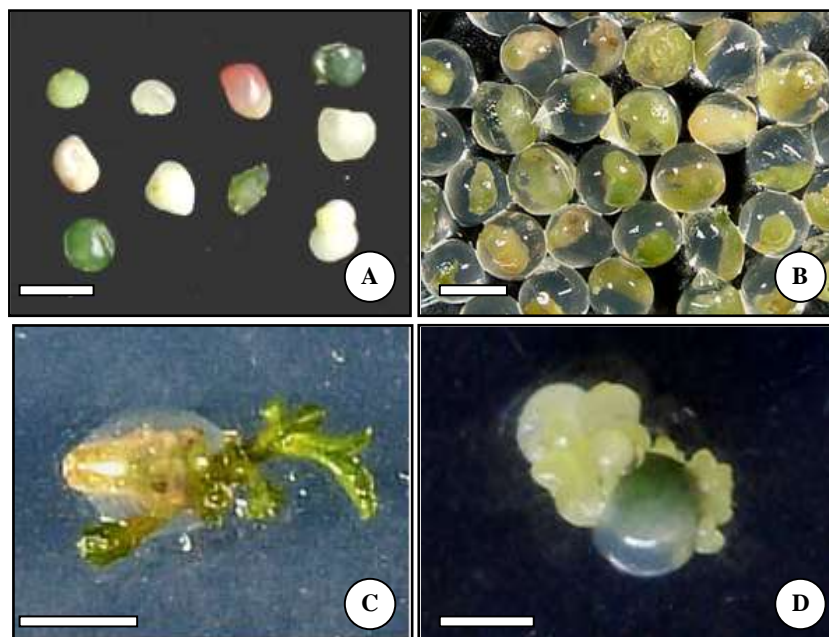
Hasil dan Pembahasan

Sifat fisik kapsul

Hasil penelitian menunjukkan bahwa natrium alginat 1, 2, dan 3% dapat membentuk kapsul yang cukup padat (*rigid*) pada larutan CaCl_2 100 mM (Gambar 1B). Pada larutan CaCl_2 50 mM, kapsul yang terbentuk lunak, mudah pecah dan lengket satu sama lainnya, baik dengan alginat konsentrasi 1% maupun 2%. Sifat fisik matriks kapsul tanpa embrio somatik memperlihatkan bahwa kekerasan kapsul tertinggi diperoleh dengan konsentrasi alginat 3% pada larutan CaCl_2 50 mM dan 100 mM. Jika konsentrasi alginat 1%, baik pada larutan CaCl_2 50 mM maupun 100 mM, kapsul yang terbentuk memiliki tingkat kekerasan yang rendah (Tabel 1). Tingkat kekerasan dapat mempengaruhi daya kecambah benih. Namun, kapsul yang terlalu lunak juga tidak diharapkan karena menyebabkan benih sintetis mudah hancur atau mengalami

kebocoran. Analisis korelasi menunjukkan bahwa tingkat kekerasan berbanding terbalik dengan tingkat kebocoran kapsul. Berdasarkan hasil penelitian, kapsul yang memiliki tingkat kekerasan yang rendah memiliki tingkat kebocoran yang lebih tinggi dibandingkan kapsul yang lebih keras (Tabel 1). Tingkat kebocoran juga dipengaruhi konsentrasi alginat. Konsentrasi alginat 1% memiliki rata-rata tingkat kebocoran tertinggi yaitu 84,0% pada CaCl_2 50 mM dan 87,3% pada CaCl_2 100 mM. Sedangkan konsentrasi alginat 3% memiliki rata-rata kebocoran terendah yaitu 20,7% pada CaCl_2 50 mM dan 28,0% pada CaCl_2 100 mM. Kebocoran terjadi karena kapsul yang terbentuk tidak sepenuhnya padat atau mengalami kerusakan sehingga bocor. Kebocoran menyebabkan zat hara yang ditambahkan tidak sepenuhnya dapat digunakan oleh benih, melainkan terlepas ke luar kapsul.

Prinsip dari enkapsulasi adalah terjadinya pertukaran ion Na^+ dari Na-alginat dengan Ca^{2+} ketika ditetaskan ke dalam larutan CaCl_2 , membentuk gel Ca-alginat. Banyaknya ion Na^+ yang bertukar dengan ion Ca^{2+} menentukan tingkat kekerasan kapsul. Kapsul yang terbentuk diharapkan cukup padat agar tidak mudah terjadi kebocoran. Beberapa penelitian menggunakan konsentrasi alginat 3% dan larutan CaCl_2 100 mM untuk membentuk benih sintetis yang bulat, padat, dan mampu melindungi benih (Arun Kumar *et al.*, 2005; Roostika *et al.*, 2012; Cheruvatur *et al.*, 2013a).



Gambar 1. Benih sintetis teh. (A) embrio somatik fase kotiledon, (B) embrio somatik yang telah dienkapsulasi, (C) benih sintetis sedang berkecambah, dan (D) pembentukan embrio sekunder. Bar = 5 mm.

Figure 1. Synthetic seed of tea. (A) somatic embryos at cotyledonary stage, (B) encapsulated somatic embryos, (C) a germinating synthetic seed, and (D) formation of secondary embryos. Bar = 5 mm.

Konsentrasi natrium alginat 3% baik pada larutan CaCl_2 50 mM maupun 100 mM membentuk kapsul dengan rata-rata diameter terbesar, sedangkan dengan alginat konsentrasi 1% kapsul yang terbentuk rata-rata memiliki diameter lebih kecil (Tabel 1). Konsentrasi alginat juga mempengaruhi bobot segar kapsul. Bobot segar kapsul terbesar diperoleh dengan konsentrasi alginat 3% pada larutan CaCl_2 50 mM, kemudian alginat 3% pada larutan CaCl_2 100 mM. Kapsul yang dibentuk dengan alginat konsentrasi 2 dan 3% pada larutan CaCl_2 100 mM memiliki tingkat kebundaran yang paling baik, yaitu 1,0 (Tabel 1). Sedangkan pada larutan CaCl_2 50 mM, kapsul yang terbentuk cenderung lonjong dan mudah hancur. Kapsul yang mudah hancur kemungkinan juga disebabkan tingginya kadar air matriks kapsul. Berdasarkan Tabel 1, kapsul yang dibentuk pada larutan CaCl_2 50 mM memiliki tingkat kadar air tertinggi. Semakin tinggi kadar air kapsul, kapsul yang terbentuk menjadi mudah hancur. Namun, kadar air yang mencukupi diperlukan benih untuk dapat berkecambah, juga untuk mempermudah penyerapan hara maupun zat pengatur tumbuh yang ditambahkan pada matriks kapsul.

Pengaruh alginat dan CaCl_2 terhadap daya kecambah benih dan pembentukan embrio somatik sekunder

Embrio somatik tunggal fase kotiledon (Gambar 1A) telah berhasil dienkapsulasi menggunakan alginat yang dicelupkan dalam larutan CaCl_2 membentuk benih sintetis (Gambar 1B). Embrio somatik teh sangat beragam dalam ukuran, fase perkembangan, warna dan bentuk (Sumaryono *et al.*, 2001) sehingga menyulitkan dalam produksi benih sintetis. Ukuran embrio somatik teh harus

lebih kecil dari 5 mm, dan embrio fase torpedo merupakan fase perkembangan terbaik untuk produksi benih sintetis seperti yang dinyatakan juga oleh Baskaran *et al.* (2015).

Benih sintetis rata-rata mulai berkecambah pada umur satu minggu dan dua minggu. Selanjutnya persentase daya kecambah mulai meningkat hingga mencapai nilai tertinggi pada umur lima minggu, dan enam minggu pada perlakuan konsentrasi alginat 1% dengan larutan CaCl_2 50 mM dan 100 mM (Gambar 2). Daya kecambah tertinggi yaitu pada perlakuan enkapsulasi alginat 2% dan CaCl_2 50 mM. Perlakuan enkapsulasi alginat 2% dan CaCl_2 50 mM secara signifikan meningkatkan daya kecambah dibandingkan embrio somatik tanpa enkapsulasi. Sedangkan enkapsulasi dengan alginat 1% dalam CaCl_2 50 mM dan alginat 3% dalam CaCl_2 100 mM secara signifikan menurunkan daya kecambah dibandingkan benih tanpa enkapsulasi (Gambar 2). Perbandingan konsentrasi alginat dengan CaCl_2 yang tepat membentuk matriks kapsul dengan struktur yang baik untuk melindungi benih, namun tidak terlalu padat sehingga menghambat benih untuk berkecambah (Cheruvatur *et al.*, 2013a). Konsentrasi alginat dan CaCl_2 yang terlalu rendah yaitu 1% alginat dan CaCl_2 50 mM tidak mampu membentuk kapsul yang melindungi benih, tingkat kebocoran tinggi sehingga perkecambahan benih tidak maksimal. Fungsi kapsul itu sendiri adalah sebagai sumber nutrisi untuk membantu daya hidup dan pertumbuhan benih (Arun Kumar *et al.*, 2005). Konsentrasi alginat dan CaCl_2 yang terlalu tinggi, yaitu 3% alginat dan CaCl_2 100 mM membentuk kapsul yang terlalu keras sehingga benih sulit untuk tumbuh menembus dinding kapsul.

Tabel 1. Pengaruh alginat dan CaCl_2 terhadap sifat fisik kapsul yang dibuat tanpa embrio somatik.

Table 1. Effect of alginate and CaCl_2 on physical characteristics of the capsules formed without somatic embryos.

Perlakuan Treatment	Kekerasan Hardness F(N)	Kebocoran Leaking (%)	Diameter Diameter (mm)	Kebundaran Roundness	Bobot segar Fresh weight (mg)	Kadar air Water content (%)
Alg1 CaCl_2 50*	27,7 c**	84,0 a	5,5 c	1,3 b	79,5 e	98,9 a
Alg2 CaCl_2 50	46,6 b	53,2 b	5,4 c	1,6 a	96,9 d	98,6 a
Alg3 CaCl_2 50	53,3 a	20,7 d	7,1 a	1,2 b	193,4 a	98,8 a
Alg1 CaCl_2 100	31,3 c	87,3 a	4,9 d	1,2 b	62,6 f	98,2 b
Alg2 CaCl_2 100	48,2 b	38,7 c	6,3 b	1,0 c	120,9 c	98,0 bc
Alg3 CaCl_2 100	53,2 a	28,0 cd	6,7 a	1,0 c	149,6 b	97,7 c

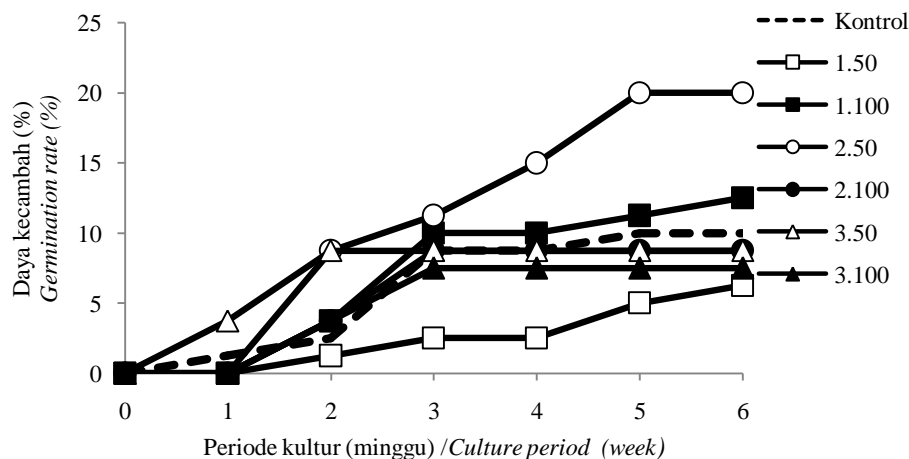
*Alg1 CaCl_2 50 menunjukkan konsentrasi alginat 1% (w/v) dan CaCl_2 50 mM.

Alg1 CaCl_2 50 represents 1% (w/v) alginate and 50 mM CaCl_2 .

**Angka rata-rata dalam kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada $P = 0,05$. (Means in the same column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $P = 0.05$).

Pada medium perkecambahan WP, benih sintetik teh juga membentuk embrio somatik sekunder (Gambar 1D). Embrio sekunder pada umumnya terbentuk dua minggu setelah kultur. Pada umur enam minggu, persentase pembentukan embrio sekunder berkisar 90% - 96% (Tabel 2). Hal ini memperlihatkan bahwa sebagian besar dari embrio somatik teh membentuk embrio sekunder tanpa terjadi perkecambahan. Persentase pembentukan embrio somatik sekunder pada embrio

yang dienkapsulasi sama dengan yang tanpa enkapsulasi. Hal ini menunjukkan bahwa pembungkusan embrio somatik dengan matriks kapsul tidak dapat menurunkan terjadinya embrio sekunder. Pembentukan embrio somatik sekunder merupakan fenomena umum yang dijumpai pada embriogenesis somatik tanaman teh (Sumaryono *et al.*, 2001). Hal ini menghambat diferensiasi embrio somatik menjadi kecambah, namun menguntungkan dalam hal proliferasi embrio somatik.



Gambar 2. Perkecambahan benih sintetik teh dengan berbagai konsentrasi alginat dan CaCl_2 selama periode kultur enam minggu. Catatan: Ktrl = kontrol, embrio tanpa enkapsulasi; 1-50 menunjukkan alginat 1% dan CaCl_2 50 mM.

Figure 2. Germination of synthetic seed of tea with different concentrations of alginate and CaCl_2 over six week culture period. Note: Ktrl = control, embryos without encapsulation; 1-50 represents 1% alginate and 50 mM CaCl_2 .

Tabel 2. Pengaruh alginat dan CaCl_2 terhadap pembentukan embrio sekunder setelah enam minggu dalam kultur.

Table 2. Effect of alginate and CaCl_2 on the formation of secondary embryos after six weeks in culture.

Perlakuan <i>Treatment</i>	Pembentukan embrio sekunder <i>Secondary embryo formation</i> (%)
Kontrol (<i>Naked embryo</i>)	96,3*
Alg1 CaCl_2 50	92,5
Alg1 CaCl_2 100	97,5
Alg2 CaCl_2 50	92,5
Alg2 CaCl_2 100	91,2
Alg3 CaCl_2 50	93,8
Alg3 CaCl_2 100	90,0

* Nilai rata-rata pada kolom tidak berbeda nyata.

Means in the column are not significantly different.

Kesimpulan

Enkapsulasi embrio somatik teh dengan Na alginat 2% pada larutan CaCl_2 50 mM menghasilkan benih sintetik yang cukup padat dan mampu meningkatkan daya perkecambahan dibandingkan dengan embrio somatik tanpa enkapsulasi. Enkapsulasi dengan Na alginat 1% pada larutan CaCl_2 50 mM tidak menghasilkan benih sintetik yang bagus dan bulat, sedangkan enkapsulasi dengan Na alginat 3% pada larutan CaCl_2 100 mM menghasilkan benih sintetik yang bulat namun terlalu keras sehingga menurunkan daya perkecambahan embrio somatik. Lebih dari 90% embrio somatik teh tanpa dan dengan enkapsulasi yang dikultur pada medium WP padat membentuk embrio somatik sekunder.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Balai Besar Pascapanen, Badan Litbang Pertanian atas bantuannya dalam pengukuran tingkat kekerasan benih sintetik serta kepada Sdri. Rani Puspita Sari dan Siti Wahyu atas bantuan teknisnya.

Daftar Pustaka

- Akula A & C Akula (2005) Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. *Forestry Sci* 77, 181-190.
- Arun Kumar MB, V Vakeswaran & V Krishnasamy (2005) Enhancement of synthetic seed conversion to seedlings in hybrid rice. *Plant Cell Tiss Org Cult* 81, 97-100.
- Baskaran P, A Kumari & JV Staden (2015) Embryogenesis and synthetic seed production in *Mondia whitei*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 121(1), 205-214.
- Cheruvatur MK, N Najeeb & TD Thomas (2013a). In vitro propagation and conservation of Indian sarsaparilla, *Hemidesmus indicus* LR. Br. through somatic embryogenesis and synthetic seed production. *Acta Physiol Plant* 35, 771-779.
- Cheruvatur MK, GK Kumar & TD Thomas (2013b) Somatic embryogenesis and synthetic seed production in *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz. *Plant Cell Tiss Org Cult* 113, 63-71.
- Haque SKM & B Gosh (2014) Somatic embryogenesis and synthetic seed production- a biotechnological approach for true-to-type propagation and *in vitro* conservation of an ornamental bulbaceous plant *Drimiopsis kirkii* Baker. *Appl Biochem Biotechnol* 177, 4013-4024.
- Latif Z, Idrees, A Nasir & S Riazuddin (2007) Indigenous production of synthetic seeds in *Daucus carota*. *Pak J Bot* 39(3), 849-855.
- Lloyd G & B McCown (1981) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Comb Proc Intl Plant Prop Soc* 30, 421-427.
- Nor Asmah H, HN Hasida, NM Zaimah, NA Noraliza & NN Salmi (2011) Synthetic seed technology for encapsulation and regrowth of *in vitro*-derived *Acacia* hybrid shoot and axillary buds. *Afr J Biotechnol* 10(40), 7820-7824.
- Roostika I, R Purnamaningsih, Y Supriati, I Mariska, N Khumaida & GA Wattimena. (2012) Pembentukan benih sintetik tanaman nenas. *J Hort* 22(4), 316-326.
- Seran TH, K Hirimburegama & MTK Gunasekare (2005) Encapsulation of embryonic axes of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze (tea) and subsequent *in vitro* germination. *J Hort Sci Biotechnol* 80, 154-158.
- Siong PK, S Mohajer & RM Taha (2012) Production of artificial seeds derived from encapsulated *in vitro* micro shoots of cauliflower, *Brassica oleracea* var. *botrytis*. *Rom Biotechnol Lett* 17(4), 7549-7556.
- Sumaryono, I Riyadi & JS Tahardi (2001) Morphological variations during the development of somatic embryos of tea (*Camellia sinensis* L.) *in vitro*. *Menara Perkebunan* 69(2), 46-57.
- Tahardi JS, T Raisawati, I Riyadi & WA Dodd (2000) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration in tea by temporary liquid immersion. *Menara Perkebunan* 68(1), 1-9.