

APLIKASI TEKNIK MIKROPROPAGASI UNTUK PRODUKSI BENIH VARIETAS UNGGUL NENAS SECARA MASAL

Ika Roostika

*Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber
Daya Genetik Pertanian*

Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111, Indonesia

PENDAHULUAN

Nenas (*Ananas comosus* L. Merr.) merupakan tanaman penting di daerah tropis, termasuk di Indonesia. Berdasarkan data produksi buah-buahan, komoditas nenas menempati peringkat ketiga atau keempat setelah pisang, mangga, dan jeruk. Tanaman tersebut bersifat toleran kekeringan dan kemasaman sehingga berpeluang besar dikembangkan di lahan marginal. Dari beberapa kelompok tanaman nenas yang ada di dunia, Cayenne dan Queen merupakan kultivar yang banyak dikembangkan di Indonesia daripada Spanish, Perola, Manzana, dan Motilana.

Tanaman nenas pada umumnya diperbanyak secara vegetatif dengan menggunakan *butt* atau *stump* (batang utama dari tanaman dewasa), *ratoon* (tunas yang muncul pada pangkal batang), *sucker* (tunas yang muncul pada ketiak daun), *basal slips* (tunas yang muncul dari dasar buah), *hapas* (tunas yang muncul dari dasar tangkai buah), *crown slips* (tunas yang muncul dari ujung buah), dan *crown* atau mahkota (tunas yang tumbuh dari bagian

atas buah) (d'Eeckenbrugge & Leal 2003), namun ukuran benih yang dihasilkan bervariasi. Di antara berbagai kultivar nenas, Cayenne memiliki jumlah propagul yang terbatas dibandingkan dengan kultivar lainnya. Oleh karena itu, perbanyakan secara konvensional perlu didukung dengan teknologi kultur *in vitro* sehingga benih dapat dihasilkan secara masal, seragam, dan dalam waktu yang relatif cepat.

Teknik mikropropagasi nenas telah diterapkan secara komersial oleh pihak industri di mancanegara (Smith *et al.* 2003), tetapi industri di Indonesia umumnya masih bertahan pada teknik perbanyakan konvensional. Teknik mikropropagasi dinilai perlu diterapkan untuk menyediakan benih dalam jumlah besar, terutama untuk varietas baru hasil persilangan, seleksi, mutasi, dan rekayasa genetika (Firoozabady & Moy 2004; Nursandi *et al.* 2005).

Terdapat beberapa kendala dalam pengembangan komoditas nenas. Serangan layu fusarium di lapangan menyebabkan rusaknya pertanaman dan benih yang dihasilkan menjadi terkontaminasi oleh patogen tersebut. Demikian pula, penyakit virus terakumulasi pada jaringan nenas yang diperbanyak secara konvensional sehingga perlu dieliminasi. Teknologi yang mampu memproduksi benih yang sehat adalah kultur *in vitro*.

Dalam upaya pengujian calon varietas baru nenas, diperlukan materi tanaman dalam jumlah yang memadai untuk evaluasi daya hasil pendahuluan serta uji kebenaran dan keunggulan. Calon varietas baru hasil persilangan memiliki propagul yang terbatas dan merupakan hasil dari persilangan yang sudah diseleksi memiliki keunggulan karakter tertentu, sehingga diperlukan dukungan teknologi perbanyakan cepat. Selain itu, materi dari varietas unggul baru yang baru saja dilepas tersebut perlu disiapkan dalam jumlah yang banyak untuk keperluan diseminasi dan pengembangannya lebih lanjut. Dalam rangka peningkatan produksi nenas, populasi tanaman akan ditingkatkan dari

40.000 tanaman/ha menjadi 100.000 tanaman/ha sehingga keperluan penyediaan benih nenas akan semakin tinggi (Suminar 2010). Oleh karena itu, diperlukan teknologi perbanyakan masal.

Ulasan ini mendiskusikan potensi dan aplikasi beberapa macam teknik mikropropagasi nenas untuk produksi benih secara masal. Potensi yang dimaksud tersebut terkait dengan jumlah propagul yang mampu dihasilkan.

Mikropropagasi tanaman nenas

Salah satu manfaat aplikasi teknik kultur *in vitro* adalah untuk memproduksi benih secara masal yang secara umum disebut sebagai teknik mikropropagasi. Secara *in vitro*, tanaman nenas dapat diregenerasikan melalui beberapa teknik, yaitu proliferasi tunas aksilar, organogenesis langsung dan tidak langsung serta embriogenesis somatik tidak langsung (Firoozabady & Moy 2004; Roostika 2012). Teknik mikropropagasi bahkan dikembangkan lebih lanjut untuk produksi benih skala masal dengan menggunakan bioreaktor (Firoozabady & Moy 2004). Teknik mikropropagasi dilaporkan mampu menghasilkan benih dalam jumlah yang banyak, dalam waktu yang cepat, dalam ukuran dan kondisi yang seragam, serta bebas dari patogen.

Mikropropagasi secara proliferasi tunas aksilar

Teknik proliferasi tunas aksilar sudah banyak diteliti untuk perbanyakan tanaman nenas. Bagian tanaman atau eksplan yang dapat digunakan adalah mata tunas aksilar yang terdapat pada tunas aksilar, mahkota, *basal slip*, *crown slip*, *sucker* ataupun *rotoon* (Dal Vesco *et al.* 2000; Firoozabady & Gutterson 2003; Firoozabady & Moy 2004; Hamid *et al.* 2011; Roostika 2012; Nelson *et al.* 2015; Oktaviana & Mukarlina 2015; Mahadi 2016; Atawia *et al.* 2016; Zulkarnain & Neliyati 2017). Setiap jaringan

tersebut memiliki tingkat juvenilitas yang berbeda-beda sehingga respons *in vitro*, terutama tingkat multiplikasi tunasnya berbeda-beda pula. Di antara sumber eksplan tersebut, mahkota paling banyak digunakan untuk perbanyakan tanaman nenas secara kultur *in vitro*.

Zat pengatur tumbuh berperan sangat penting dalam teknik kultur *in vitro*, khususnya pada tanaman nenas. Beberapa hasil penelitian (Nelson *et al.* 2015; Oktaviana & Mukarlina 2015; Mahadi 2016; Atawia *et al.* 2016; Zulkarnain & Neliyati 2017) menunjukkan bahwa eksplan nenas memberikan respons *in vitro* yang baik terhadap penggunaan sitokinin yang berupa *benzyladenine* (BA) dan kinetin maupun auksin yang berupa *indole butyric acid* (IBA) dan *naphthalene acetic acid* (NAA).

Nelson *et al.* (2015) juga telah berhasil memperbanyak tanaman nenas kultivar MD2 melalui teknik proliferasi tunas aksilar dalam rangka mengatasi kendala benih terkontaminasi virus dan jamur fusarium. Sumber eksplan yang digunakan adalah *crown* atau mahkota dari tanaman nenas yang bebas jamur fusarium dan juga bebas virus setelah melalui proses indeksi virus secara *polymerase chain reaction* (PCR). Penggunaan BA 6 mg/l dilaporkan mampu memproduksi propagul sebanyak 9 tunas/eksplan dalam waktu 4 bulan.

Dalam rangka memacu pertumbuhan eksplan mata tunas aksilar dari mahkota nenas, digunakan bahan organik berupa ekstrak tomat yang dikombinasikan dengan BA. Namun demikian, hasil penelitian Oktaviana & Mukarlina (2015) menunjukkan tidak terdapat interaksi yang nyata antara ekstrak tomat dan BA. Waktu inisiasi tunas *in vitro* tercepat, yaitu 28,7 hari diperoleh dari perlakuan ekstrak tomat 10% atau 26,9 hari yang diperoleh dari perlakuan BA 2,3 mg/l.

Mahadi (2016) berhasil meregenerasikan nenas kultivar Queen menggunakan teknik proliferasi tunas aksilar dengan menerapkan kombinasi kinetin dan NAA. Berdasarkan hasil penelitian

tersebut, sebanyak 100% eksplan dapat tumbuh, sebanyak 13,7 tunas/eksplan berhasil diperoleh dari perlakuan kombinasi kinetin 3 mg/l dan NAA 0,25 mg/l. Kombinasi perlakuan tersebut juga dapat menghasilkan akar dengan jumlah yang banyak, yaitu 7,83 akar/eksplan.

Penggunaan beberapa macam media dasar juga sudah dilakukan oleh Atawia *et al.* (2016) dalam meregenerasikan eksplan nenas kultivar Smooth Cayenne melalui teknik proliferasi tunas aksilar. Hasil percobaan menunjukkan bahwa media MS lebih baik daripada media $\frac{1}{2}$ MS, WPM, dan B5. Pada subkultur pertama dan kedua, tunas yang dihasilkan sangat banyak, yaitu berturut-turut sebanyak 56 dan 42 tunas/eksplan yang diperoleh dari perlakuan BA 2 mg/l. Untuk elongasi tunas, perlakuan BA 0,25 mg/l mampu menghasilkan tunas sepanjang 5,5 cm. Untuk induksi perakaran, perlakuan IAA 1 mg/l dapat menghasilkan akar sebanyak 10,7 akar/eksplan.

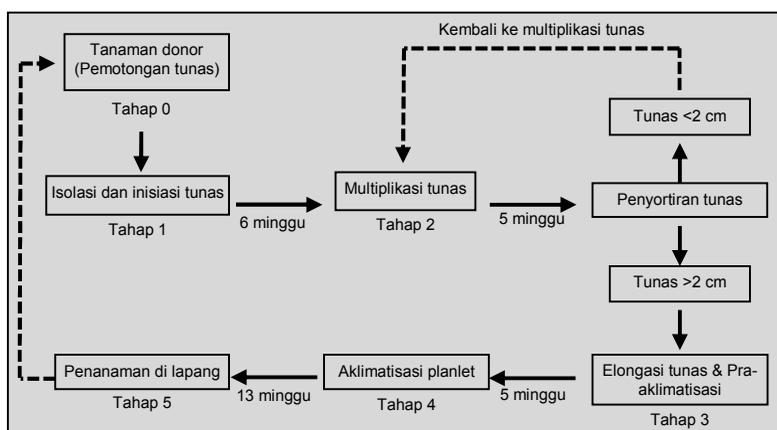
Teknik proliferasi tunas aksilar juga sudah dilakukan oleh Zulkarnain & Neliyati (2017). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa eksplan dari *basal slip* nenas Tangkit tidak memberikan respons sama sekali ketika di dalam media sama sekali tidak ditambahkan ZPT. Kombinasi perlakuan BA 1 mg/l dan NAA 1 mg/l menghasilkan propagul sebanyak 2,33 tunas/eksplan.

Sumber eksplan nenas kultivar MD2 berupa *sucker* atau anak-anak telah diteliti oleh Hamid *et al.* (2011). Teknik proliferasi tunas aksilar tersebut menghasilkan 5 tunas/eksplan dengan menggunakan BA 3 mg/l. Pada subkultur berikutnya, diperoleh tingkat multiplikasi tunas sebesar 15 tunas/eksplan dengan menggunakan kombinasi BA 3 mg/l dan NAA 1 mg/l.

Percobaan produksi benih nenas kultivar Perola secara masal telah dilakukan oleh Dal Vesco *et al.* (2000) menggunakan sumber eksplan berupa *axillary bud* atau tunas ketiak. Percobaan dilakukan dengan mengujikan beberapa macam media dasar dan ukuran eksplan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa media MS lebih

baik daripada media Lpm, N6, dan KC dalam meregenerasikan eksplan nenas dan eksplan dengan ukuran kurang dari 2 cm paling optimal untuk memultiplikasi tunas. Penggunaan BA 0,9 mg/l dan NAA 0,4 mg/l mampu menghasilkan 13,5 tunas/eksplan dalam waktu 3 minggu. Dengan asumsi jika tingkat multiplikasi tunas hanya 10 tunas/eksplan, masa subkultur setiap 45 hari, dan tingkat kehilangan sebesar 7% maka protokol tersebut diperhitungkan mampu menghasilkan benih dalam jumlah 930.000 planlet/tahun. Tahapan produksi benih nenas tersebut ditampilkan pada Gambar 2.2.

Untuk mengefisienkan produksi benih secara masal, Be & Debergh (2006) menggunakan *nethouse* dengan kelembaban alami daripada menggunakan ruang kultur yang dikontrol kelembabannya menggunakan *air conditioner* (AC). Penggunaan BA 1 mg/l dapat menghasilkan 9 tunas/eksplan dalam waktu 8 minggu. Setelah dilakukan perhitungan, modifikasi lingkungan tersebut mampu menekan biaya produksi sebesar 20%.



Sumber: Dal Vesco et al. (2000)

Gambar 2.2. Tahapan produksi benih nenas melalui teknik proliferasi tunas aksilar

MIKROPROPAGASI SECARA ORGANOGENESIS

Organogenesis adalah proses pembentukan organ tanaman, dalam hal ini adalah tunas *in vitro* dan bersifat unipolar (Kumar & Reddy 2011). Teknik organogenesis dapat dibedakan atas organogenesis langsung jika tidak melalui fase kalus, dan organogenesis tidak langsung jika melalui fase kalus. Kalus adalah struktur yang tak terdiferensiasi atau belum dapat dibedakan antara tunas dan akarnya (Ikeuchi *et al.* 2013). Struktur tersebut biasanya memiliki tingkat pembelahan sel yang tinggi atau cepat sehingga berpeluang menghasilkan benih dalam jumlah yang lebih banyak daripada teknik proliferasi tunas aksilar.

MIKROPROPAGASI SECARA ORGANOGENESIS LANGSUNG

Teknik organogenesis langsung sudah diteliti oleh Firoozabady & Gutterson (2003), Firoozabady & Moy (2004), juga Roostika *et al.* (2012a). Dilaporkan bahwa eksplan yang dapat digunakan untuk mikropropagasi dengan teknik organogenesis tersebut adalah daun utuh, basal daun dan potongan longitudinal daun. Menurut Firoozabady & Gutterson (2003), eksplan berupa potongan longitudinal daun lebih baik daripada basal daun. Hasil yang serupa dilaporkan oleh Roostika *et al.* (2012a) di mana eksplan potongan basal daun mempunyai respons *in vitro* yang lebih baik daripada daun utuh. Gambar 2.3 menunjukkan proses induksi organogenesis basal daun nenas.

Peran ZPT dalam mengarahkan morfogenesis dan memacu pembentukan tunas juga sangat penting. Firoozabady & Gutterson (2003) melaporkan bahwa kombinasi BA 1,5 mg/l dan NAA 0,5 mg/l merupakan perlakuan yang terbaik untuk organogenesis secara langsung dan penggunaan media cair lebih baik daripada media padat, dengan laju multiplikasi 4,8 tunas/

eksplan dalam waktu 7 bulan. Kombinasi ZPT yang sama juga digunakan oleh Firoozabady & Moy (2004), di mana penggunaan media MS dengan penambahan BA 0,2 mg/l dan NAA 5 mg/l menghasilkan respons *in vitro* basal daun nenas kultivar Moris sebesar 99%.

Teknik organogenesis dengan menggunakan media padat dan cair juga dilaporkan oleh (Roostika 2012). Perlakuan BA 3 mg/l dapat meregenerasikan 30% basal daun muda nenas Smooth Cayenne menjadi tunas sebanyak 10 tunas/eksplan dalam waktu 2 bulan jika digunakan media padat. Jika digunakan media cair maka kombinasi perlakuan BA 0,5 mg/l dan IBA 0,5 mg/l dapat meregenerasikan 18% eksplan yang sama dengan tunas sebanyak 13 tunas/eksplan dalam waktu 2 bulan. Berdasarkan hasil penelitian tersebut dan beberapa asumsi (10 mata tunas/mahkota, 7 basal daun/tunas, 30% pertunasan, jumlah subkultur 3 kali, 80% bebas kontaminasi, dan 80% tingkat keberhasilan aklimatisasi) maka diperkirakan dapat dihasilkan benih nenas lebih dari 50.000 planlet/tahun/mahkota jika diaplikasikan teknik organogenesis secara langsung (Roostika 2012).

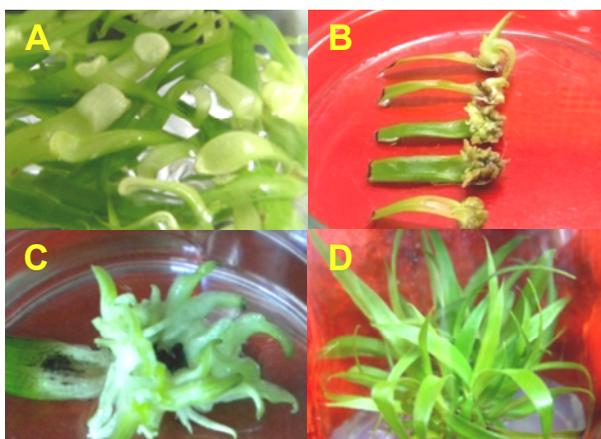
MIKROPROPAGASI SECARA ORGANOGENESIS TIDAK LANGSUNG

Organogenesis tidak langsung dicirikan dengan adanya fase kalus. Induksi kalus nenas kultivar MD2 dapat dilakukan dengan menggunakan ZPT zeatin 3 mg/l (Hamid *et al.* 2011), sedangkan untuk Smooth Cayenne dapat dilakukan dengan menggunakan 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (Roostika *et al.* 2012a). Penelitian Hamid *et al.* (2011) tersebut menghasilkan 10 embrio/*clump* kalus dalam waktu 2 bulan. Teknik tersebut diperkirakan mampu memproduksi benih sebanyak 600 planlet per 4-6 bulan.

Hasil penelitian menunjukkan formasi kalus nenas kultivar Smooth Cayenne yang tertinggi (90%) dan bobot basah kalus

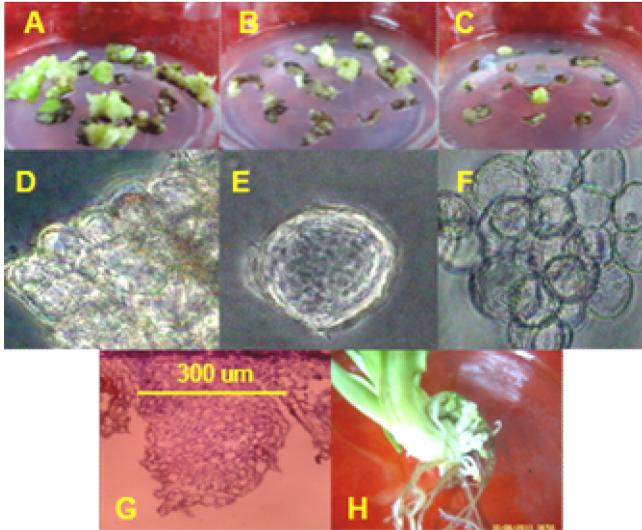
tertinggi dihasilkan dari perlakuan 2,4-D 4,6 mg/l (Roostika *et al.* 2012a). Hasil ini lebih baik daripada hasil penelitian sebelumnya (Sripaoraya *et al.* 2003), yang menghasilkan 58% formasi kalus nenas kultivar Phuket dan juga yang dilakukan oleh Firoozabady & Moy (2004) yang menghasilkan 55% untuk kultivar Smooth Cayenne.

Pengamatan mikroskopis (Gambar 2.4) menunjukkan bahwa sel yang diberi perlakuan 2,4-D menunjukkan pembelahan sel nenas yang bersifat simetris (Roostika *et al.* 2012a). Hal ini menunjukkan bahwa sel-sel tersebut bersifat non embriogenik. Sel-sel non embriogenik tersebut selanjutnya tumbuh membentuk struktur nodular dan akhirnya membentuk planlet yang mengandung akar dan kadang-kadang mengandung tunas-tunas kecil pada pangkal batangnya. Sebagaimana dijelaskan oleh Abrash & Bergmann (2009) serta Paciorek & Bergmann (2010) bahwa sel-sel non embriogenik dapat ditentukan melalui pembelahannya yang bersifat simetris.



Sumber: Roostika *et al.* (2012a)

Gambar 2.3. Tahapan morfogenesis eksplan daun nenas kultivar Smooth Cayenne: area basal daun yang responsif (A), pembentukan nodul, akar, dan tunas (B), elongasi tunas (C), dan pembentukan planlet (D)



Gambar 2.4. Organogenesis tidak langsung dari basal daun nenas kultivar Smooth Cayenne dengan perlakuan 2,4-D: 4,6 mg/l (A), 9 mg/l (B), 13,7 mg/l (C), observasi histologi jaringan (D), sel tak terpolarisasi (E), agregat sel non embriogenik (F), observasi histolog

Berdasarkan hasil penelitian Roostika *et al.* (2012a) dan beberapa asumsi (10 mata tunas/mahkota, 7 basal daun/tunas, 80% pertunasan, jumlah subkultur 2 kali, 80% bebas kontaminasi, dan 80% tingkat keberhasilan aklimatisasi) maka diperkirakan dapat dihasilkan benih nenas lebih dari 125.000 planlet/tahun/mahkota jika diaplikasikan teknik organogenesis langsung menggunakan 2,4-D 4,6 mg/l sebagai agensia penginduksi kalus dan dilanjutkan dengan penggunaan kinetin 1 mg/l untuk regenerasi tunas.

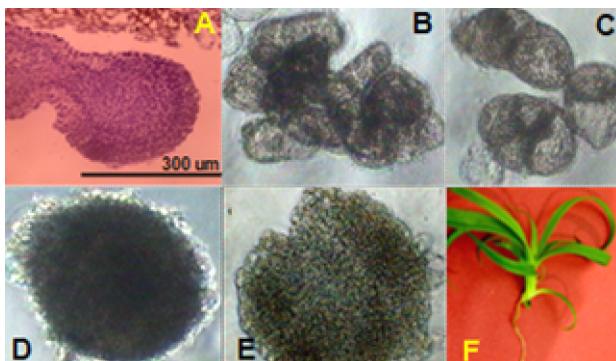
MIKROPROPAGASI SECARA EMBRIOGENESIS SOMATIK

Hasil penelitian Yapo *et al.* (2011) dan Roostika *et al.* 2012b) menunjukkan bahwa sel embriogenik dapat diinduksi dengan menggunakan 2,4-D dan 4-amino 3,5,6-trichloropicolinic acid

(pikloram). Penggunaan 2,4-D secara tunggal tidak mampu menginduksi sel embriogenik. Kalus embriogenik terbentuk ketika kalus non embriogenik diperlakukan dengan senyawa N-organik (Yapo *et al.* 2011; Roostika *et al.* 2012b).

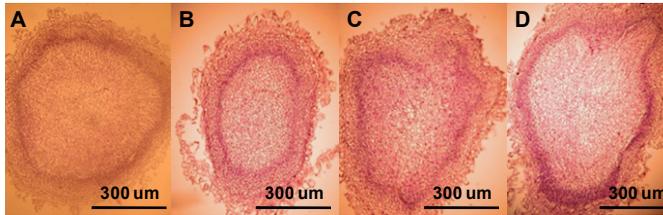
Analisis histologi mengkonfirmasi pembentukan sel-sel embriogenik nenas (Roostika *et al.* 2012b). Sel-sel tersebut bersifat isodiametrik dan meristematik yang berwarna merah tua sebagai respons diserapnya *haematoxylineosin*. Pekatnya warna tersebut disebabkan oleh pekatnya sitoplasma, besarnya ukuran nukleus (tingginya rasio nukleoplasma), dan kecilnya ukuran vakuola. Sel-sel meristematik tersebut membentuk agregat yang disebut sebagai *proembryogenic mass* (PEM) atau massa proembrio dengan tipe pembelahan sel yang asimetris dan berkembang menjadi embrio globular, skutelar, dan koleoptilar (Gambar 2.5).

Hasil penelitian Yapo *et al.* (2011) menunjukkan bahwa penggunaan pikloram 2 mg/l merupakan zat pengatur tumbuh yang terbaik untuk induksi kalus embriogenik nenas kultivar CI-9 dengan persentase sebesar 37,6%. Embrio somatik paling banyak



Sumber: Roostika *et al.* (2012b)

Gambar 2.5. Tahapan embriogenesis somatik nenas kultivar Smooth Cayenne: PEM (A), sel-sel embriogenik (B), sel yang terpolarisasi dan pembelahan asimetris (C), embrio fase globular (D), fase skutelar awal (E), dan embrio somatik dewasa yang bersifat bipolar (F)



Sumber: Roostika *et al.* (2012)

Gambar 2.6. Analisis histologi embrio somatik dari kultur suspensi sel nenas kultivar Smooth Cayenne: irisan transversal embrio fase globular (A), irisan longitudinal embrio fase globular (B), fase skutelar awal (C), dan fase skutelar akhir (D)

diperoleh dari zat pengatur tumbuh tersebut yang ditambah dengan BA 1 mg/l dan NAA 0,1 mg/l dengan jumlah 39,5 embrio/kalus. Hingga 97% embrio somatik menjadi planlet dalam waktu 4 minggu setelah dipindahkan ke media MSB (media dasar MS dengan vitamin B5) ditambah BA 1 mg/l, GA₃ 0,05 mg/l, dan glutamin 500 mg/l.

Menurut Roostika *et al.* (2012b), media MS yang diperkaya dengan senyawa N-organik (glutamin 1 mg/l, kasein hidrolisat 500 mg/l, arginin 120 mg/l, glisin 2 mg/l) dan adenin sulfat 20 mg/l yang dikombinasikan dengan media MS dengan penambahan BA 4 mg/l merupakan perlakuan terbaik untuk regenerasi embrio somatik nenas (17 embrio dewasa/eksplan) dalam waktu 6,5 bulan. Teknik embriogenesis somatik dengan formulasi media tersebut diperkirakan mampu menghasilkan benih lebih dari 1.200 planlet/tahun/mahkota.

REKOMENDASI APLIKASI TEKNIK MIKROPROPAGASI TANAMAN NENAS

Aplikasi teknik mikropropagasi terkait dengan kualitas benih yang dihasilkan. Hasil penelitian Salome *et al.* (2011) menunjukkan bahwa rasio padatan total terlarut dan asam didapati paling

rendah dari buah yang dihasilkan dari tanaman nenas kultivar Smooth Cayenne klon CI-9 yang diperbanyak secara konvensional daripada melalui teknik mikropropagasi. Diduga bahwa perubahan tersebut disebabkan oleh terjadinya keragaman genetik yang disebabkan oleh proses subkultur yang frekuentif dan perlakuan selama tahapan embriogenesis somatik (Salome *et al.* 2011). Hasil uji preferensi konsumen menunjukkan bahwa panelis lebih menyukai buah yang dihasilkan dari teknik mikropropagasi. Jackson *et al.* (2016) melaporkan tidak terdapat perbedaan yang nyata antara buah yang dihasilkan dari tanaman yang diperbanyak secara konvensional dengan yang melalui teknik mikropropagasi, yaitu dengan umur panen yang sama dan kandungan nutrisi yang serupa pula. Dengan demikian, teknik tersebut direkomendasikan untuk diterapkan secara luas.

Berdasarkan hasil-hasil penelitian yang telah dibahas sebelumnya, disarankan untuk mengaplikasikan teknik organogenesis langsung karena teknik tersebut mampu menghasilkan planlet dalam jumlah yang lebih banyak dalam kurun waktu yang sama daripada teknik proliferasi tunas aksilar, organogenesis tidak langsung, dan embriogenesis somatik. Pertimbangan aplikasi teknik tersebut tidak semata-mata dikarenakan tingginya faktor multiplikasi tunas atau kemampuan memproduksi benih, melainkan juga berdasarkan tingkat kesederhanaan teknik, frekuensi subkultur, dan formulasi media yang digunakan. Media yang sederhana akan lebih efisien atau hemat dalam pembiayaan dan lebih mudah dalam preparasinya. Subkultur yang tidak frekuentif akan lebih hemat dan abnormalitas benih dapat dihindari atau ditekan.

KESIMPULAN

Teknik mikropropagasi nenas dapat dilakukan melalui proliferasi tunas aksilar, organogenesis langsung, organogenesis

tidak langsung, dan embriogenesis somatik. Setiap kultivar memberikan respons yang berbeda-beda terhadap teknik yang diterapkan, eksplan dan media yang digunakan. Dari beberapa macam teknik mikropropagasi tersebut, organogenesis langsung menjadi pilihan terbaik untuk diterapkan berdasarkan pertimbangan potensi jumlah benih yang dihasilkan tinggi, kesederhanaan teknik dan formulasi media serta frekuensi subkultur yang jarang. Teknik tersebut dapat diterapkan untuk penyediaan material tanaman dalam rangka pengujian lapang untuk pendaftaran varietas dan selanjutnya dapat diterapkan untuk produksi benih varietas unggul nenas yang baru saja didaftarkan untuk diseminasi dan pengembangannya secara komersial.

DAFTAR PUSTAKA

- Atawia IR, Abd EL-Latif FM, EL-Gioushy SF, Sherif SS, Kotb OM. 2016. Studies on micropropagation of pineapple (*Ananas comosus* L.). Middle East J Agric. 5):224-232.
- Be LV, Debergh PC. 2006. Potential low-cost micropropagation of pineapple (*Ananas comosus*). South Asian J Bot. 72:191-194.
- Coppens d'Eeckenbrugge G, Leal F. 2003. Morphology, anatomy, and taxonomy. In: Bartholomew DP, Paull RE, Rohrbach KG, Editors. The Pineapple Botany: Production and Uses. Wallingford (UK): CABI Publishing. p. 13-32.
- Dal Vesco LL, Pintoa AA, Zaffarib GR, Nodaria RO, dos Reisa MS, Guerraa MP. 2000. Improving pineapple micropropagation protocol through explant size and medium composition manipulation. Fruits. 56:143-154.
- Firoozabady E, Moy Y. 2004. Regeneration of pineapple via somatic embryogenesis and organogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 40:67-74.

- Firoozabady E, Gutterson N. 2003. Cost-effective *in vitro* propagation methods for pineapple. *Plant Cell Rep.* 21:844-850.
- Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A. 2013. Plant callus: Mechanisms of induction and repression. *Plant Cell.* 25:3159-3173.
- Jackson D, Williams S, Newby DM, Hall S, Higgins S, Francis R, Smith AM. 2016. Tissue cultured versus traditionally grown pineapples: growth and nutrient profile. *J Biotechnol Biomater.* 6:1-5.
- Kumar N, Reddy MP. 2011. *In vitro* plant propagation: A review. *J Forest Sci.* 27:61-72.
- Mahadi I. 2016. Pengaruh pemberian hormon naftalen acetyl acyd (NAA) dan kinetin pada kultur jaringan nanas Bogor (*Ananas comosus* (L.) Merr.) cv. Queen. *Bio-site.* 2:1-50.
- Nelson BJ, Asare PA, Junior RA. 2015. *In vitro* growth and multiplication of pineapple under different duration of sterilizaion and different concentration of benzylaminopurine and sucrose. *Biotechnology.* 1435-40.
- Nursandi F, Poerwanto R, Sobir, Sujiprihati S. 2003. Perbanyak *in vitro* nenas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) dengan menggunakan BAP dan TDZ. Simposium Nasional dan Konggres VIII. Bandar Lampung.
- Oktaviana MA, Mukarlina RL. 2015 Pertumbuhan tunas mahkota nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) secara *in vitro* dengan penambahan ekstrak tomat (*Solanum lycopersicum* L.) dan benzyl amino purin (BAP). *J Protobiont.* 4:109-112.
- Roostika I. 2012. Pengembangan metode organogenesis dan embriogenesis somatik nenas (*Ananas comosus* (L.) Merr) serta deteksi dini untuk mereduksi keragaman somaklonal. [Disertasi]. Bogor (Indonesia): Institut Pertanian Bogor.

- Roostika I, Khumaida N, Mariska I, Wattimena GA. 2012a. Indirect organogenesis and somatic embryogenesis of pineapple induced by dichlorophenoxy acetic acid. *AgroBiogen*. 8:8-18.
- Roostika I, Khumaida N, Mariska I, Wattimena GA. 2012b. The effect of picloram and light on somatic embryogenesis regeneration of pineapple. *IJAS*. 13:43-53.
- Salome YES, Kouakou L, Bognonkpe JPI, Kouame P, Kouakou TH. 2011. Comparison of pineapple fruit characteristics of plants propagated in three different ways: by suckers, micropropagation and somatic embryogenesis. *J Nutr Food Sci*. 1:1-4.
- Smith MK, Ko HL, Hamil SD, Sanewski GM, Graham MW. 2003. Biotechnology. In: Bartholomew DP, Paull RE, Rohrbach KG, editors. *The pineapple botany: Production and uses*. CABI Publishing. Wallingford. p. 57-68.
- Sripaoraya S, Marchamt R, Power JB, Davey MR. 2003. Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 39:450-454.
- Yapo ES, Kouakou TH, Kone M, Kouadio JY, Kouame P, Merillon JM. 2012. Regeneration of pineapple (*Ananas comosus* L.) plant through somatic embryogenesis. *J Plant Biochem Biotechnol*. 20:196-204.
- Zulkarnain, Neliyati. 2017. The Effect of NAA and BAP on tissue culture of tangkit pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr. cv. Tangkit). *Biospecies*. 10:1-10.