

# PENINGKATAN PEMBENTUKAN EMBRIO SOMATIK PADA WORTEL (*Daucus carota* L) MENGGUNAKAN *N6-benzylaminopurine* (BAP)

Rusdianto<sup>(1)</sup> dan Indrianto A.<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>SMP Unggulan Darussalam Maros

Jl. Raya Mesjid Barandasi No.5, Kabupaten Maros 90511

<sup>(2)</sup>Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

Jl. Teknika Selatan, Sekip Utara, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281

email: [rusdianto1478@yahoo.co.id](mailto:rusdianto1478@yahoo.co.id)

**Abstract: Improvement of Somatic Embryo Formation in Carrot (*Daucus carota* L) Using *N6-benzylaminopurine* (BAP).** One process of plantlets formation in plant tissue culture techniques is somatic embryogenesis, a process of formation of embryos from explants in the form of somatic cells that have undergone de-differentiation. This research was conducted in three phases; (1) Phase germination in vitro, using ¼ MS medium; (2) Phase callus induction and maintenance, using the medium MS + 2,4-D 2 mg / l; (3) Phase induction of somatic embryos. The results showed that carrot seeds can germinate well at ¼ MS medium with an average percentage reached 98% germination and hypocotyl length of 3.84 cm. The efficiency of callus formation reached 90.83%, callus color generally translucent white or yellowish with friable or crumb texture. Treatment of 0.5 mg / l BAP is the most appropriate concentration increases the formation of somatic embryos, with the average number of globular embryos phase 54.00; 5,33 cardiac phases; and phase torpedo 4.66, compared with other concentrations of BAP treatment.

**Abstrak: Peningkatan Pembentukan Embrio Somatik pada Wortel (*Daucus carota* L) Menggunakan *N6-benzylaminopurine* (BAP).** Salah satu proses pembentukan planlet dalam teknik kultur jaringan tumbuhan adalah embriogenesis somatik, yaitu suatu proses pembentukan embrio dari eksplan yang berupa sel-sel somatik yang telah mengalami dediferensiasi. Penelitian ini bertujuan meningkatkan pembentukan embrio somatik pada wortel (*Daucus carota* L) menggunakan BAP. Penelitian ini dilakukan dalam 3 tahap yaitu; (1) Tahap perkecambahan in-vitro, menggunakan medium ¼ MS; (2) Tahap induksi dan pemeliharaan kalus, menggunakan medium MS + 2,4-D 2 mg/l ; (3) Tahap induksi embrio somatik. Hasil penelitian menunjukkan biji wortel dapat berkecambah dengan baik pada medium ¼ MS dengan rata-rata persentase perkecambahan mencapai 98 % dan panjang hipokotil 3,84 cm. Efisiensi pembentukan kalus mencapai 90.83 %, Warna kalus umumnya putih bening atau putih kekuningan dengan tekstur friable atau remah. Perlakuan 0,5 mg/l BAP merupakan konsentrasi yang paling tepat meningkatkan pembentukan embrio somatik, dengan rata-rata jumlah embrio fase globuler 54,00; fase jantung 5,33; dan fase torpedo 4,66, dibandingkan dengan konsentrasi perlakuan BAP yang lain.

**Kata kunci:** 4 - *Dichlorophenoxyacetic Acid* (2,4-D), *N6-benzylaminopurine* (BAP) kalus embriogenik, embrio somatik, *Daucus carota* L.

## A. PENDAHULUAN

Kultur jaringan tumbuhan merupakan suatu metode untuk mengisolasi bagian-bagian tanaman seperti sel, jaringan atau organ kemudian menumbuhkannya secara aseptis (suci hama) di atas suatu medium budidaya sehingga bagian-bagian tanaman tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap (plantlet). Salah satu proses pembentukan planlet dalam teknik kultur jaringan adalah embriogenesis somatik, yaitu suatu proses pembentukan embrio dari eksplan

yang berupa sel-sel somatik yang telah mengalami dediferensiasi. Sel-sel somatik yang telah mengalami dediferensiasi selanjutnya ditransfer ke dalam medium yang sesuai dan jika proses induksi dediferensiasinya benar, maka gen-gen yang bertanggung jawab terhadap totipotensi akan berfungsi, pembelahan sel-selnya menjadi terkendali, dan akhirnya terbentuk embrio. Embrio yang terbentuk dari sel-sel somatik akan tumbuh dan berkembang menjadi tanaman utuh melalui proses yang

identik dengan proses embryogenesis zigotik (Indrianto, 2003).

Pendekatan yang umum digunakan dalam menginduksi embrio somatik adalah mengkulturkan jaringan tanaman dalam medium yang mengandung auksin, misalnya *2,4-dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D). Respon awal eksplan terhadap 2,4-D adalah pembentukan kalus sebagai wujud dediferensiasi. Kalus merupakan massa sel yang tidak terorganisir yang awalnya merupakan jaringan penutup luka, dimana sel-sel yang pada awalnya dorman (*quiescent*) terdiferensiasi kembali (dediferensiasi). Dediferensiasi terjadi karena sel-sel tumbuhan (jaringan), yang secara alamiahnya bersifat autotrof dikondisikan menjadi heterotrof dengan cara memberikan nutrisi yang cukup kompleks di dalam medium kultur, sehingga sel-sel membelah secara tidak terkendali membentuk massa sel yang tidak terorganisir (kalus).

Sebagian sel-sel kalus yang terbentuk bersifat embrionik, yaitu kalus yang hanya memiliki kemampuan untuk terus membelah (proliferasi) menghasilkan sel-sel kalus yang baru, sebagian lagi bersifat embriogenik yaitu kalus yang dapat berkembang menjadi embrio somatik setelah kalus tersebut ditransfer ke dalam medium yang sesuai dan tidak mengandung auksin atau 2,4-D (Kikuchi *et al.*, 2006). Embrio somatik dapat terbentuk melalui dua jalur, yaitu secara langsung maupun tidak langsung (melewati fase kalus). Keberhasilan akan tercapai apabila kalus atau sel yang digunakan bersifat embriogenik yang dicirikan oleh sel yang berukuran kecil, sitoplasma padat, inti besar, vakuola kecil-kecil dan mengandung butir pati (Wiendi *et al.*, 1991).

Beberapa laporan hasil penelitian menunjukkan bahwa, eksplan yang ditanam pada medium yang mengandung senyawa-senyawa yang bersifat stressor selain 2,4-D, seperti beberapa *heavy metal ions* ( $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , dan  $Co^{2+}$ ), tekanan osmotik yang tinggi (sukrosa, NaCl), dan temperatur tinggi ( $37^{\circ}C$ ) juga dapat menginduksi terbentuknya kalus embriogenik (Kikuchi *et al.*, 2006).

Penelitian ini menggunakan tanaman wortel (*Daucus carota* L) yang dikultur pada medium dasar MS (Murashige & Skoog, 1962), diberi perlakuan *2,4 dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D) untuk menginduksi terbentuknya kalus embriogenik dan *N6-benzylaminopurine* (BAP)

untuk meningkatkan efisiensi pembentukan embrio somatik.

Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan pembentukan embrio somatik pada wortel (*Daucus carota* L) menggunakan perlakuan *N6-benzylaminopurine* (BAP) dengan konsentrasi bervariasi.

## B. METODE

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain biji wortel (*Daucus carota* L) cultivar New Nantes. Medium dasar Murashige and Skoog (1962). Zat pengatur tumbuh *2,4-Dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D) dan *N6-benzylaminopurine* (BAP). Alat yang digunakan antara lain Autoklaf, untuk sterilisasi medium dan botol kultur serta alat-alat lain seperti pinset, scalpel, pisau, dan petridish. *Laminar air flow cabinet* (LAF), sebagai tempat steril penanaman eksplan. Mikroskop dan kamera digital Nikon (Nikon Coolpix 5000, Tokyo Japan) untuk pengamatan dan pengambilan gambar.

Penelitian dilakukan dalam 3 tahap yaitu;

1. Tahap perkecambahan biji wortel in-vitro. Biji wortel (*Daucus carota* L) cultivar New Nantes disterilisasi dengan cara merendam di dalam larutan sodium hipoklorit (Sunklin) yang diencerkan dengan aquadest steril perbandingan 1:1 selama 10 menit sambil sesekali digoyang-goyangkan, selanjutnya dicuci dengan cara merendam dalam aquadest steril sebanyak 2 kali masing-masing selama 5 menit. Biji wortel yang telah disterilisasi ditanam pada medium  $\frac{1}{4}$  MS (Murashige & Skoog, 1962) selama 9 hari. Parameter yang diamati pada tahap ini adalah persentase perkecambahan dan panjang hipokotil kecambah wortel.
2. Tahap induksi dan pemeliharaan kalus. Bagian hipokotil kecambah wortel dipotong dengan ukuran 1 cm, kemudian dikulturkan pada medium MS dengan perlakuan 2,4-D 2 mg/l, selama 5 minggu. Parameter yang diamati selama masa kultur adalah efisiensi pembentukan dan kenampakan visual kalus (tekstur dan warna).
3. Tahap induksi embrio somatik. Kalus embriogenik yang dihasilkan dari tahap (2), disubkultur ke medium induksi embrio somatik menggunakan medium MS dengan perlakuan BAP dengan konsentrasi (0; 0,5; 1; 1,5) mg/l. Jumlah embrio somatik yang

dihasilkan dari perlakuan BAP dianalisis menggunakan uji statistik dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) yang dilanjutkan dengan DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) pada taraf uji 5% menggunakan program SPSS 11,5.

### C. HASIL DAN PEMBAHASAN

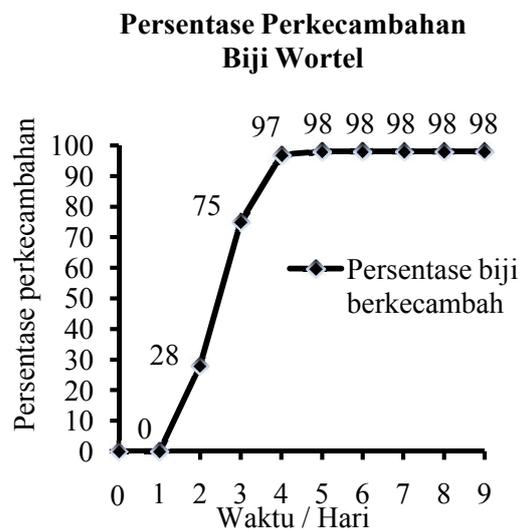
Perkecambahan biji wortel in-vitro merupakan tahapan awal dari penelitian ini untuk menghasilkan kecambah wortel steril (gambar 1), yang selanjutnya digunakan sebagai eksplan pada tahap induksi kalus. Keuntungan dari eksplan yang berasal dari biji yang dikecambahkan secara in-vitro diantaranya adalah kondisi eksplan yang dihasilkan steril sehingga tidak perlu disterilisasi lagi sebelum dikultur pada medium induksi kalus, selain itu pada umumnya semua bagian dari kecambah menunjukkan responsifitas yang tinggi untuk diinduksi menjadi kalus karena sifatnya yang masih meristematik. Indrianto (2003), menyatakan bahwa eksplan terbaik untuk induksi kalus adalah jaringan dari bagian-bagian semai (*seedling*) yang dikecambahkan secara in-vitro.



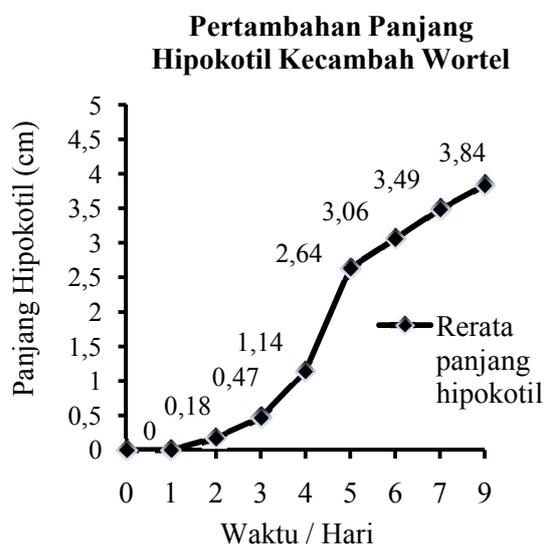
**Gambar 1. Kecambah Biji Wortel Umur 9 Hari. Skala = 1 cm.**

Persentase perkecambahan biji wortel pada medium  $\frac{1}{4}$  MS mencapai 98% (gambar 2) dan rata-rata panjang hipokotil 3,84 cm (gambar 3) setelah dikecambahkan selama 9 hari. Hal ini menunjukkan viabilitas biji cukup baik untuk berkecambah dalam medium  $\frac{1}{4}$  MS. Keuntungan dari eksplan yang dikecambahkan secara in-vitro diantaranya adalah kondisi eksplan yang dihasilkan steril, selain itu pada umumnya semua

bagian dari kecambah menunjukkan responsifitas yang tinggi untuk diinduksi menjadi kalus karena sifatnya yang masih meristematik. Indrianto (2003) menyatakan bahwa eksplan terbaik untuk induksi kalus adalah jaringan dari bagian-bagian semai (*seedling*) yang dikecambahkan secara in-vitro.



**Gambar 2. Grafik Persentase Perkecambahan Biji Wortel**



**Gambar 3. Grafik Pertambahan Panjang Hipokotil Kecambah Wortel**

Penelitian ini menggunakan bagian hipokotil dari kecambah wortel sebagai eksplan. Penelitian Kamada *et al.*, (1993) menunjukkan jaringan di sekitar meristem pucuk kecambah wortel, merupakan daerah yang banyak membentuk embrio somatik setelah diberi

perlakuan stres, bagian ini menurut Li *et al.*, (1999) merupakan daerah yang kaya auksin. Hipokotil kecambah wortel juga digunakan Nishiwaki *et al.*, (2000) untuk menginduksi pembentukan embrio somatik secara langsung dengan menggunakan asam absisat (ABA) sebagai zat pengatur tumbuh.

Pada tahap induksi dan pemeliharaan kalus, hipokotil kecambah wortel ukuran 1 cm digunakan sebagai eksplan yang dikultur selama 5 minggu pada medium MS dengan zat pengatur tumbuh 2,4-D 2 mg/l. Minggu pertama setelah dikultur, eksplan tampak mengalami penebalan terutama pada bagian yang luka dan kontak langsung dengan medium sehingga ukurannya bertambah besar. Penebalan eksplan ini merupakan hasil interaksi yang sangat kompleks antara eksplan, komposisi medium, zat pengatur tumbuh dan kondisi lingkungan selama periode inkubasi. Hasil yang sama dengan penelitian Meagher dan Green (2002) menunjukkan bahwa ukuran eksplan embrio muda tanaman saw palmetto bertambah menjadi empat kali lebih besar setelah dikultur selama dua minggu.

Pembentukan kalus mulai tampak pada kedua ujung eksplan (bagian yang luka akibat pemotongan), setelah diinkubasi selama dua minggu pada medium MS + 2,4-D 2 mg/l, meskipun tidak semua eksplan serentak membentuk kalus pada minggu kedua. Hal ini mungkin disebabkan oleh tingkat responsifitas eksplan terhadap medium kultur yang tidak sama. George *et al.*, (2008) menyatakan 2,4-D umum digunakan sebagai sumber auksin eksogen terutama untuk menginisiasi pembentukan kalus embriogenik pada proses embriogenesis somatik, tetapi embrio somatik

tidak dapat berkembang lebih lanjut sebelum konsentrasi auksin dikurangi atau bahkan dihilangkan sama sekali dari medium kultur.

Jumlah eksplan yang membentuk kalus terus bertambah setelah minggu ke tiga inkubasi, demikian pula dengan ukuran kalus yang terbentuk pada setiap eksplan terus bertambah dan meluas menutupi permukaan eksplan. Pada tabel 2 dapat dilihat persentase jumlah eksplan yang membentuk kalus mencapai 90,83 % setelah dikultur selama lima minggu. Hal ini mengindikasikan bahwa eksplan cukup responsif terhadap zat pengatur tumbuh 2,4-D yang digunakan menginduksi terbentuknya kalus.

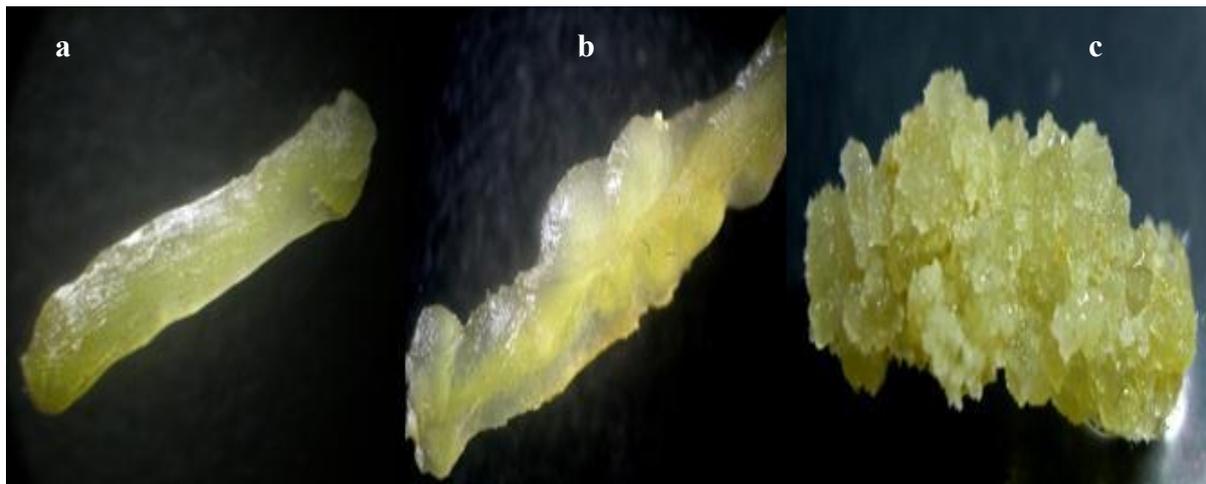
Pada akhir minggu ke lima inkubasi, secara umum kalus yang terbentuk telah menutupi seluruh permukaan eksplan, warna kalus umumnya putih bening atau putih kekuningan dengan tekstur *friable* atau remah (Gambar 3). Dari hasil pengamatan, kalus yang berwarna putih bening atau kekuningan merupakan kalus yang dapat mengikuti pola embriogenik. Hasil yang sama dari penelitian Capuana dan Debergh (1997) menunjukkan bahwa kalus yang dihasilkan dari perlakuan 2,4-D mempunyai tekstur remah dan berwarna kekuningan. Sel-sel kalus tersebut dapat berkembang membentuk embrio somatik.

Shimizu *et al.*, (1997) juga menemukan kalus yang berwarna putih atau kekuningan dengan tekstur remah merupakan kalus yang kompeten membentuk embrio somatik.

Kalus embriogenik yang dihasilkan pada tahap sebelumnya disubkultur pada medium induksi embrio somatik yaitu MS + BAP (0; 0,5; 1; 1,5) mg/l.

**Tabel 1. Efisiensi Pembentukan Kalus dan Penampakan Visual Kalus (Tekstur dan Warna) setelah Dikultur selama 5 Minggu pada Medium MS + 2,4-D 2 mg/l.**

Minggu ke...	Jumlah Eksplan yang Membentuk Kalus	% Pembentukan Kalus	Tekstur dan Warna Kalus
1	0 ± 0	0 %	-
2	33.66 ± 1.52	42,07 %	Agak kompak, Putih bening, kekuningan
3	67 ± 2.64	83,75 %	Friabel, Putih bening, kekuningan
4	72.66 ± 2.51	90,83 %	Friabel, Putih bening, kekuningan
5	72.66 ± 2.51	90,83 %	Friabel, Putih bening, kekuningan
Efisiensi pembentukan kalus		90,83 %	



**Gambar 3. Pembentukan Kalus Embriogenik pada Medium MS + 2,4 – D 2 mg/l.**

- Kalus pada awalnya terbentuk pada ujung hipokotil (umur 2 minggu);
  - Pembentukan kalus meluas keseluruhan permukaan eksplan (umur 3 minggu);
  - Kalus embriogenik menutupi seluruh permukaan eksplan (umur 5 minggu).
- Skala; a= 1,5 mm; b,c = 2 mm

Hasil uji pendahuluan menunjukkan kalus embriogenik dapat berdiferensiasi membentuk embrio somatik setelah disubkultur pada medium dengan pengurangan konsentrasi auksin (2,4-D) secara gradual atau tanpa auksin sama sekali, tetapi jumlah embrio somatik yang terbentuk rendah (data tidak ditunjukkan).

Pada penelitian ini digunakan zat pengatur tumbuh BAP dengan konsentrasi 0; 0,5; 1; dan 1,5 mg/l untuk meningkatkan efisiensi pembentukan embrio somatik. Beberapa peneliti menggunakan sitokinin untuk menginduksi pembentukan embrio somatik dari kultur kalus. Guevin dan Kirby (1997) mendapatkan embrio somatik pada tanaman paku-pakuan (*Fraser fir*) dari medium yang ditambah 2 iP, BA, dan thidiazuron. Hasil penelitian Yelnitis (2005) menunjukkan perlakuan kinetin 1,5 mg/l merupakan perlakuan paling cocok untuk menginduksi embrio fase globuler dan kotiledon pada tanaman *Shorea pinanga* Scheff.

Hasil penelitian (tabel 2) menunjukkan penambahan BAP ke dalam medium induksi embrio somatik dapat meningkatkan jumlah embrio somatik yang terbentuk setelah dikultur selama tiga minggu. Konsentrasi BAP yang terbaik menginduksi pembentukan embrio somatik adalah 0,5 mg/l dengan rata-rata jumlah embrio fase globuler 54,00; fase jantung 5,33; dan fase torpedo 4,66. Uji statistik dengan

*Analysis of Variance* (ANOVA) menunjukkan adanya beda nyata antar perlakuan (konsentrasi BAP) maupun perlakuan terhadap rata-rata jumlah embrio somatik yang dihasilkan (globuler, jantung dan torpedo). Uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) pada taraf 5 %, menunjukkan perlakuan 0,5 mg/l BAP berbeda nyata dengan perlakuan yang lain (0; 1; 1,5 mg/l BAP), sedangkan perlakuan 1 mg/l BAP tidak berbeda nyata dengan perlakuan 1,5 mg/l BAP dan perlakuan 1,5 mg/l BAP tidak berbeda nyata dengan kontrol (0 mg/l BAP). Selanjutnya uji DMRT menunjukkan rata-rata jumlah embrio tahap globuler dan torpedo yang dihasilkan dari perlakuan 0,5 mg/l BAP berbeda nyata dengan semua perlakuan (0; 1; 1,5 mg/l BAP), sedangkan perlakuan 1 dan 1,5 mg/l tidak berbeda nyata dengan kontrol. Rata-rata jumlah embrio tahap jantung tidak menunjukkan adanya beda nyata pada semua perlakuan termasuk kontrol.

Hasil uji statistik yang menunjukkan adanya beda nyata rata-rata jumlah embrio somatik yang terbentuk pada beberapa konsentrasi perlakuan BAP mengindikasikan bahwa penambahan BAP dengan konsentrasi tertentu ke dalam medium induksi embrio somatik dapat memacu kalus embriogenik berdiferensiasi membentuk embrio somatik, sehingga memberi pengaruh positif terhadap peningkatan jumlah embrio somatik.

**Tabel 2. Rata-rata Jumlah Embrio Somatik Wortel pada Medium MS dengan Perlakuan BAP Konsentrasi (0; 0,5; 1; 1,5) mg/l pada Umur 3 Minggu.**

Konsentrasi BAP (mg/l)	Rata-rata Jumlah Embrio Somatik		
	Globuler	Jantung	Torpedo
0	8,33 ± 4,72 <sup>a</sup>	1,66 ± 2,08 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,57 <sup>a</sup>
0,5	54,00 ± 12,12 <sup>b</sup>	5,33 ± 2,08 <sup>a</sup>	4,66 ± 2,08 <sup>b</sup>
1	29,33 ± 16,56 <sup>a</sup>	4,33 ± 2,08 <sup>a</sup>	1,33 ± 0,57 <sup>a</sup>
1,5	15,00 ± 6,55 <sup>a</sup>	3,33 ± 3,51 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada setiap kolom tidak berbeda nyata pada taraf 5 % uji DMRT.

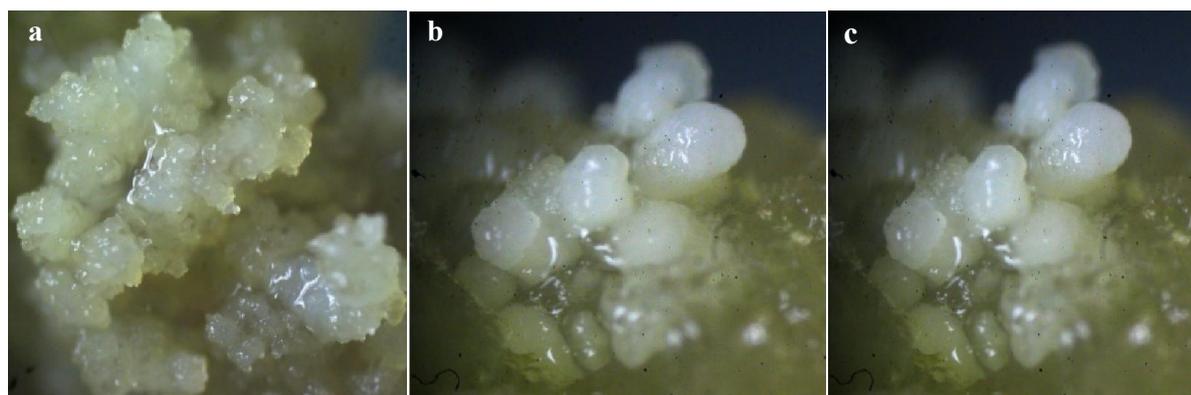
Hasil ini sejalan dengan pernyataan Wernicke *et al.*, (1989) dalam Hagio (2002) yang menyatakan bahwa penambahan sitokinin ke dalam medium regenerasi dapat meningkatkan jumlah embrio somatik. Pada penelitian ini, perlakuan 0,5 mg/l BAP merupakan konsentrasi yang paling tepat meningkatkan rata-rata jumlah embrio somatik dibandingkan dengan konsentrasi perlakuan BAP yang lain.

Pada medium induksi embrio somatik yang mengandung BAP, kalus tampak mulai terjadi diferensiasi dan embrio somatik mulai terbentuk setelah kalus embriogenik dikultur selama 2–3 minggu. Hasil penelitian menunjukkan, setelah dikultur selama dua minggu pada medium yang mengandung BAP, permukaan kalus embriogenik tampak berwarna kehijauan yang diikuti dengan munculnya tonjolan-

tonjolan berwarna putih dan hijau yang terus berkembang membentuk embrio fase globuler setelah memasuki minggu ke tiga (gambar 4).

Pada akhir minggu ke tiga sebagian besar permukaan kalus dipenuhi embrio fase globuler terutama pada medium dengan perlakuan BAP 0,5 mg/l. Hasil yang sama dengan penelitian Veisseire *et al.*, (1994) menunjukkan bahwa kultur *Picea abies* cepat mengalami perubahan pada media yang mengandung kinetin, BA, dan 2,4-D yang selanjutnya membentuk embrio somatik fase globuler dan berwarna hijau.

Pengamatan dilanjutkan sampai minggu ke empat, embrio somatik fase globuler ada yang berkembang membentuk fase torpedo namun jumlahnya sangat sedikit (gambar 4), umumnya embrio stagnan pada fase globuler.

**Gambar 4. Pembentukan Embrio Somatik pada Medium MS + BAP 0,5 mg/l.**

a. Kalus embriogenik umur 1 minggu;

b. Embrio somatik bentuk globuler terbentuk pada permukaan kalus setelah dikultur selama 3 minggu;

c. Embrio somatik bentuk torpedo terbentuk setelah dikultur selama 4 minggu pada medium MS + BAP 0,5 mg/l. Skala = 1 mm.

## D. KESIMPULAN

Penambahan *N6-benzylaminopurine* (BAP) yang merupakan zat pengatur tumbuh kelompok sitokinin pada medium Murashige and Skoog (1962), dapat meningkatkan pembentukan kalus embriogenik pada hipokotil kecambah wortel (*Daucus carota* L) setelah dikultur selama tiga minggu. Pada penelitian ini, perlakuan 0,5

mg/l BAP merupakan konsentrasi yang paling tepat meningkatkan pembentukan embrio somatik, dengan rata-rata jumlah embrio fase globuler 54,00; fase jantung 5,33; dan fase torpedo 4,66, dibandingkan dengan konsentrasi perlakuan BAP yang lain.

## E. DAFTAR PUSTAKA

- Capuana M. and P.C Debergh. 1997. Improvement of the maturation and germination of horse chesnut somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Org.Cult.* 48:23-29.
- George E.F., Hall M.A., Jan De Clerk G. 2008. *Plant propagation by tissue culture 3rd edition. Volume 1. The background.* Springer. P: 183-197.
- Hagio T. 2002. Adventitious shoot regeneration from immature embryos of Shorgum. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 68:65-72.
- Indrianto A. 2003. Kultur jaringan tumbuhan. Fakultas Biologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Kamada H., Ishikawa K., Saga H., Harada H. 1993. Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. *Plant Tiss. Cult. Lett.* 0: 38-44.
- Kermode A. 1990. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Critical reviews in plant science* 9: 155-195.
- Kikuchi A., Sanuki N., Higashi K., Koshiha T., Kamada H. 2006. Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. *Planta* 223: 637-645.
- Li Y., Wu Y.H., Hagen G., Guilfoyle T. 1999. Expression of the auxin-inducible GH3 promoter/GUS fusion gene as a useful molecular marker for auksin physiology. *Plant Cell Physiol.* 40: 675-682.
- Nishiwaki M., Fujino K., Koda Y., Masuda K., Kikuta Y. 2000. Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. *Planta* 211:756-759.
- Shimizu K, N., Nagaike., T. Yobuya. and T. Edachi. 1997. Plant regeneration from suspension culture of Iris germica. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 50: 27-31.
- Wiendi N.M.A., G.A. Wattimena. dan L.V. Gunawan. 1991. *Perbanyakan tanaman. Bioteknologi Tanaman I.* PAU IPB. 507 hlm.
- Hagio T. 2002. Adventitious shoot regeneration from immature embryos of Shorgum. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 68:65-72.
- Veisseire P., L. Linossier. and A. Coudret. 1994. Effect of abscisic acid and cytokinins on the development of somatic embryos in *Havea brasiliensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 39: 219-223.