



## STRUKTUR DAN PENGEMBANGAN EMBRIO SOMATIK EKSPLAN DAUN *Dyera lowii* Hook.f. MELALUI TEKNIK IN-VITRO

Tri Suwarni Wahyudiningsih<sup>1\*</sup>, Issirep Sumardi<sup>2</sup>

- <sup>1)</sup> Fakultas Pertanian, Jurusan Kehutanan, Universitas Palangka Raya, Indonesia  
Jl. Yos Sudarso, Kampus UPR, Palangka Raya, 73111
- <sup>2)</sup> Faculty of Biology, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia  
[tri.s.w.basuki@gmail.com](mailto:tri.s.w.basuki@gmail.com)

### ABSTRACT

The propagation of tree plus *Dyera lowii* can be anticipated by micropropagation via somatic embryogenesis. The study was aimed: 1). to determine the composition of growth regulators for induction of somatic embryos from leaf explant, 2). To study of the structure and development of somatic embryo *D. lowii*. The first leaf of seedling was utilized as sources of explants. The base leaf explant growth roots directly on MS (Murashige & Skoog) medium with 2 mg/l Kinetin + 7.5 mg/l IBA, but indirectly via callus phase at IBA 5 mg/l. The middle leaf explant produced somatic embryo resulting yellowish-white and compact texture on MS medium with 0.2 mg/l Benzyl Adenin + 0.5 mg/l IBA. Embryogenic callus cells have formed proembryonic stage: 2-cells, 4-cells, round, globular and heart phase.

**Keywords:** Micropropagation, explant, somatic embryo, pro-embryo, suspensor

### I. PENDAHULUAN

Pantung (*Dyera lowii*) adalah jenis pohon endemik hutan rawa gambut, rentan punah, dan Hasil Hutan Non Kayu (HHBK) unggulan Kalimantan Tengah. Pohon *D. lowii* di hutan rawa gambut berukuran sangat tinggi dan besar, biji masak sangat mudah terbang, bersifat rekalsitran dan lokasi sulit dijangkau. Kendala tersebut dapat diantisipasi dengan teknik mikropropagasi melalui embriogenesis somatik. Menurut Costanza & McCard (2009), sel-sel yang menyusun tubuh tumbuhan selain polen dan sel-sel telur disebut sel-sel soma. Tahapan embriogenesis somatik mirip dengan proses perkembangan embrio zigotik secara alami. Aplikasi embriogenesis

somatik pada masa yang akan datang untuk multiplikasi skala besar dalam waktu singkat, pembuatan biji sintetik, konservasi *germplas* dan transformasi genetik.

Studi mengenai embriogenesis somatik secara *in vitro* pada tanaman bergetah telah sukses dilakukan pada tanaman *Hevea brasiliensis* hingga tahap kotiledon (Cailloux *et al.*, 1996). Pada tumbuhan *D. lowii* yang juga termasuk tumbuhan bergetah belum dilakukan penelitian mengenai embriogenesis somatik, sehingga perlu dikaji bagaimana struktur dan perkembangan embrio somatik. Tujuan penelitian ini adalah 1). Mengetahui komposisi zat pengatur tumbuh untuk induksi embrio somatik dari eksplan daun *D. lowii*, 2). Mengkaji

struktur dan perkembangan embrio somatik *D. lowii*.

## II. METODE PENELITIAN

### Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan mulai Desember 2012 sampai November 2013. Tempat penelitian di laboratorium Bioteknologi Fakultas Biologi UGM.

### Bahan dan Alat

Bahan: semai *D. lowii* berumur 6 bulan sebagai sumber eksplan daun. Semai tersebut dikecambahkan dari biji yang diambil di tegakan hutan tanaman jalan Cilik Riwt Km 9 Palangka Raya, Kalimantan Tengah. Daun urutan pertama dari semai sebagai sumber eksplan. Bahan-bahan kimia penyusun medium Murashige dan Skoog/MS (George & Sherington, 1984), *Indol butiric acid* (IBA), *Benzyl adenin* (BA), dan Kinetin. Peralatan yang digunakan adalah *laminar air flow cabinet* untuk menanam eksplan, autoklaf untuk sterilisasi alat, timbangan analitik, *hot-plate*, seperangkat alat gelas dan logam.

### Cara Kerja:

#### Induksi Embrio Somatik

Medium I: MS + 6 kombinasi perlakuan zat pengatur tumbuh ( $K_0IB_0$ ,  $K_2IB_{0,5}$ ;  $K_4IB_1$ ;  $K_6IB_{1,5}$ ;  $K_8IB_2$ ;  $K_{10}IB_{2,5}$ ). Keterangan: K = Kinetin, IB = IBA, dan angka menandakan konsentrasi (mg/l). Ulangan perlakuan sebanyak 5. Setiap cawan petri terdapat 9 eksplan daun yaitu bagian ujung, bagian tengah, dan bagian

pangkal, masing-masing 3 eksplan. Keseluruhan sampel terdapat 270 eksplan.

Medium II: MS + 3 kombinasi perlakuan ( $IB_0B_0$ ;  $IB_{2,5}B_{0,5}$ ;  $IB_5B_1$ ). Keterangan: IB = IBA, B = *Benzyl adenin*, dan angka menandakan konsentrasi (mg/l). Ulangan perlakuan sebanyak 5. Setiap cawan petri terdapat 9 eksplan yaitu 3 eksplan bagian ujung, 3 eksplan bagian tengah, dan 3 eksplan bagian pangkal. Seluruh sampel 135 eksplan. Kultur dipindah pada medium yang sama setiap 2 minggu sekali. Pengamatan perkembangan embrio somatik dilakukan seminggu sekali menggunakan mikroskop stereo dan menggunakan mikroskop optik.

#### Pembuatan Preparat Anatomi

Sampel: jaringan kalus embriogenik dimasukkan ke dalam larutan FAA (formalin : asam asetat : etanol absolut = 5: 45: 45 v/v) selama 24 jam pada suhu ruang. Sampel kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dan air yang tersimpan dalam sampel dihilangkan dengan menggunakan konsentrasi etanol bertingkat. Infiltrasi xilol dilakukan selama satu malam pada suhu 37°C kemudian diselubungi dengan parafin pada suhu 56°C. Sampel yang telah terselubungi parafin dipotong menggunakan mikrotom putar dengan ketebalan 5-8  $\mu$ m. Irisan tersebut diwarnai dengan safranin. Irisan diletakkan di atas gelas benda dan ditutup gelas penutup. Bagian tepi diberi perekat. Setelah kering, preparat diamati dan difoto dengan menggunakan mikroskop optilab.

#### Analisis Data

Pengamatan kualitatif berupa morfologi dan fisiologi kalus, embrio somatik (tahap pembelahan dua sel, empat

sel, fase globuler, fase hati). Respon jumlah eksplan yang mengalami pertumbuhan dan perkembangan hanya sedikit, sehingga tidak memenuhi syarat untuk dilakukan uji statistik.

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

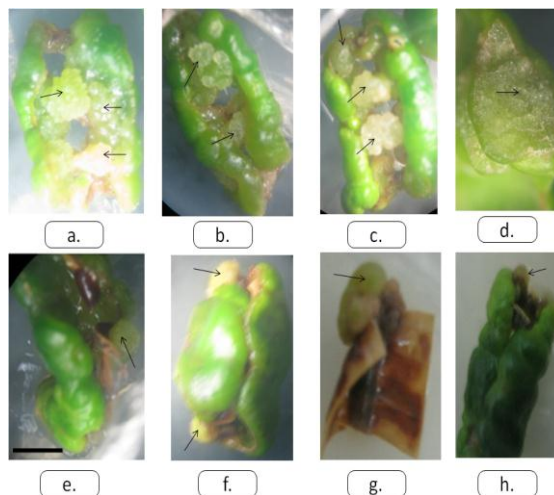
#### Hasil Penelitian

Eksplan adalah bagian kecil jaringan atau organ yang diambil atau dipisahkan dari tanaman induk kemudian dikulturkan. Pemilihan eksplan daun dari semai bertujuan supaya eksplan mempunyai kemampuan regenerasi tinggi dan getah lebih sedikit dibanding sumber eksplan dari pohon. Pada medium I respon hanya satu eksplan pangkal daun tumbuh akar secara langsung pada perlakuan  $K_2IB_{7,5}$  dan eksplan daun bagian tengah tumbuh akar secara tidak langsung melalui tahap kalus pada perlakuan  $K_2IB_5$ . Pada medium II, perlakuan  $I_{0,25}B_{0,1}$  eksplan mengalami browning 90 %, kontaminasi jamur 10 %. Eksplan daun bagian tengah yang dikultur pada media perlakuan  $I_{0,5}B_{0,2}$  tumbuh kalus 80%, eksplan pangkal daun dan ujung daun hanya tumbuh kalus 10 %.

#### Morfologi kalus yang mempunyai potensi membentuk embrio somatik

Berbagai macam respon eksplan daun bagian tengah yang muncul kalus dapat dilihat pada Gambar 1. Respon kalus bertekstur remah, berwarna putih, transparan dan kehijauan tumbuh pada bekas irisan tulang daun di bagian tengah (1a, 1b, dan 1c). Pada Gambar 1d terlihat kalus bertekstur remah dan transparan tumbuh di daerah tepi tulang daun bekas

luka irisan. Kalus bertekstur kompak dan berwarna kehijauan tumbuh di bagian tepi daun bekas irisan membujur (Gb.1e dan 1g). Pada Gambar 1f dan 1h terlihat morfologi kalus bertekstur kompak dan berwarna kekuningan tumbuh di bagian tepi daun bekas irisan melintang.



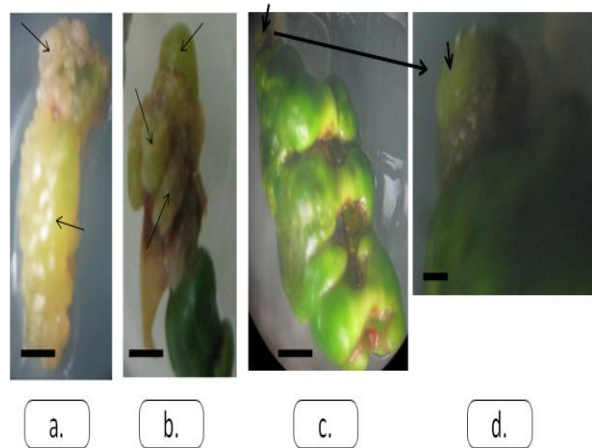
Gambar 1. Berbagai macam respon eksplan daun bagian tengah setelah dua bulan ditanam pada medium MS + BA 0,2 mg/l + IBA 0,5 mg/l. Bar = 5 mm. Tanda panah = kalus

Keterangan gambar:

- Kalus tumbuh pada bekas irisan tulang daun di bagian tengah, terdapat embrio somatik fase globuler, kalus bertekstur remah dan kompak, kalus berwarna putih, transparan dan kehijauan.
- Kalus tumbuh pada bekas irisan tulang daun di bagian tengah, sebagian besar kalus bertekstur remah, berwarna putih dan transparan.
- Kalus yang tumbuh pada bekas irisan tulang daun di bagian tengah bertekstur remah dan berwarna putih, sedang pada bekas irisan di bagian tepi

- bertekstur kompak dan berwarna putih kekuningan.
- d. Kalus hanya tumbuh pada bekas irisan tulang daun di bagian tepi bertekstur sangat remah dan berwarna transparan.
  - e. Kalus tumbuh pada bekas irisan di bagian tepi helaian, kalus bertekstur kompak dan berwarna kehijauan.
  - f. Kalus tumbuh pada bekas irisan tulang daun bagian tepi, kalus bertekstur kompak dan berwarna kekuningan.
  - g. Kalus hanya tumbuh pada salah satu sisi di bekas irisan tulang daun, terlihat eksplan mengalami *browning*.
  - h. Kalus hanya tumbuh sedikit pada salah satu sisi di bekas irisan tulang daun, terlihat eksplan masih berwarna hijau tua.

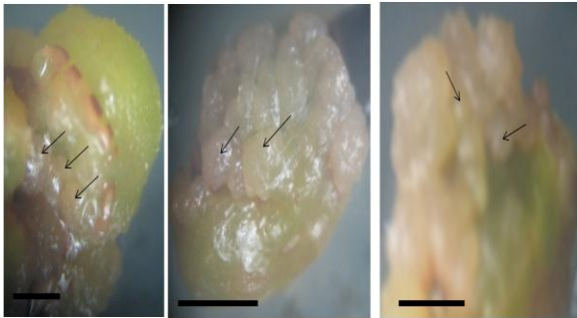
Kalus tumbuh dari eksplan pangkal daun terlihat pada Gambar 2a dan 2b. Kalus tumbuh hampir di seluruh permukaan bekas luka. Pada bagian tepi kalus terlihat beberapa nodul warna putih dan bertekstur kompak sebagai calon embrio somatik stadium globuler. Pada bagian lain kalus berwarna kekuningan (Gb. 2a). Pada Gambar 2b, kalus hanya tumbuh dekat tangkai daun. Kalus berupa tonjolan-tonjolan berwarna kehijauan, cenderung mengarah membentuk tunas. Pada eksplan ujung daun (Gb.2c) kalus tumbuh dari bekas irisan ujung tulang daun. Pada Gambar 2c diperbesar terlihat kalus bertekstur kompak dan berwarna kehijauan (Gb. 2d) cenderung membentuk primordia tunas. Pada bagian tepi kalus bertekstur kompak dan warna putih kekuningan cenderung berpotensi membentuk embrio somatik pada stadium globuler (Gb. 3).



Gambar 2. Eksplan pangkal daun (a dan b) dan eksplan ujung daun (c) setelah dua bulan ditanam pada media MS + BA 0,2 mg/l + IBA 0,5 mg/l. Bar = 5 mm. Tanda panah = kalus

Keterangan gambar:

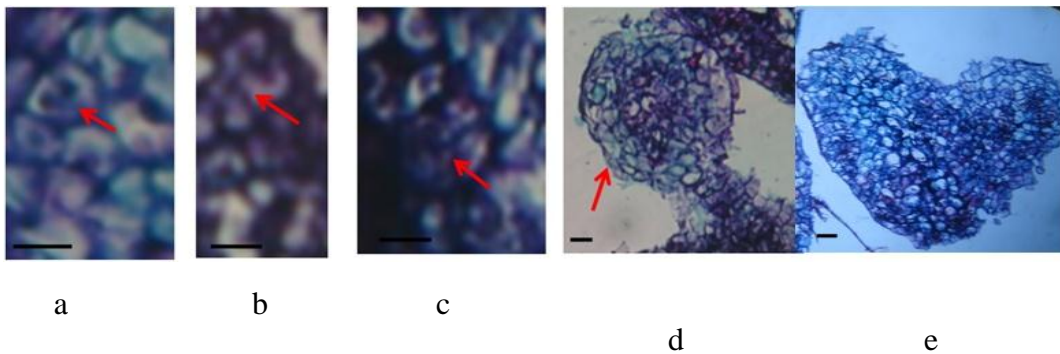
- a. Kalus tumbuh menutupi seluruh bekas luka pada eksplan. Embrio somatik stadium globuler berwarna keputihan terlihat di bagian salah satu ujung. Kalus bertekstur kompak dan berwarna kekuningan.
- b. Kalus bertekstur kompak dan berwarna kehijauan cenderung membentuk calon tunas, sedang sebagian kalus yang lain bertekstur kompak dan berwarna kekuningan.
- c. Eksplan ujung daun terlihat membentang, kalus tumbuh pada bekas irisan tulang daun hanya pada salah satu sisi.
- d. Kalus yang diperbesar dari Gb. c, tekstur kalus kompak berwarna kehijauan cenderung membentuk calon tunas.



Gambar 3. Embrio somatik bentuk globuler (tanda panah) pada eksplan daun bagian pangkal setelah dua bulan ditanam pada media MS + BA 0,2 mg/l + IBA 0,5 mg/l. Bar = 5 mm

#### Anatomi sel-sel yang mempunyai potensi embriogenik

Sel-sel embriogenik diinduksi dari sel-sel daun. Daun yang telah mengalami diferensiasi kemudian terjadi dediferensiasi membentuk sel-sel embriogenik.



Gambar 4. Irisan melintang (a,b,c) dan membujur (d) sel-sel kalus menunjukkan beberapa tahap perkembangan pro-embrio: stadium 2 sel (a), 4 sel (b), bulat (c), stadium globuler dengan suspensor (d), dan terpedo (e). Bar = 0,1 mm

Kalus kompak yang berwarna putih kekuningan dibuat irisan melintang, kemudian preparat tersebut diamati menggunakan mikroskop optik sehingga

terlihat sel-sel yang mempunyai potensi embrio somatik. Tahapan perkembangan pro-embrio (Gambar 4) mulai dari pro-embrio stadium 2 sel (a), empat sel (b), bulat (c), kemudian membentuk embrio somatik stadium globuler yang didukung dengan suspensor (d), dan stadium terpedo (e).

#### Pembahasan

##### Komposisi zat pengatur tumbuh dan faktor lain yang mempengaruhi induksi embrio somatik

Pada tumbuhan *D. lowii*, embrio somatik dapat diinduksi dari eksplan daun. Menurut Wang & Wei (2004 dalam Liu *et al*, 2006), eksplan terbaik untuk induksi embrio somatik pada tumbuhan *Triticum aestivum* adalah eksplan daun. Eksplan daun *D. lowii* membenteng setelah tiga hari dikulturkan. Kalus embriogenik berbentuk noduler.

Pada penelitian ini digunakan medium MS (Murashige dan Skoog). Eksplan daun *D. lowii* yang dikultur pada medium MS + 0,2 mg/l BA + 0,5 mg/l

IBA membentuk embrio somatik secara tidak langsung melalui tahap kalus. Kalus yang berpotensi membentuk embrio somatik berbentuk noduler, warna putih kekuningan. Namun menurut Anjaneyulu & Giri (2008), konsentrasi IBA 1 mg/l merupakan konsentrasi yang paling optimum untuk menghasilkan embrio somatik hingga membentuk “seedling” dibanding konsentrasi lain yaitu 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mg/l. Medium MS dan ½ MS umum digunakan untuk mendorong terbentuknya hingga pemasakan embrio somatik pada spesies pohon.

Induksi embrio somatik stadium globular selain dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh (ZPT) juga dipengaruhi oleh faktor dalam (ekspresi genetik dan genotipe). Genotipe sumber eksplan yang berbeda memiliki kapasitas embriogenik yang tidak sama dan menunjukkan perbedaan dalam hal kemampuan mengaktifkan elemen-elemen kunci pada jalur embriogenik. Tiap genotipe memerlukan materi yang bersifat spesifik untuk mengoptimalkan kapasitas daya regenerasi (Komatsuda, 1991 dalam Wahyudiningsih, 2000).

Menurut Anjaneyulu & Giri (2008), pada *Terminalia chebula*, media MS + 0,5 mg/l BA menghasilkan jumlah embrio somatik paling tinggi (58±1,47). Benzyl adenin (BA) berperan pada saat induksi, pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik hingga terbentuk “seedling” pada *Castanea dentata*, *Pistacea vera*, dan *Abies alba* >> *Abies cephalonica*. Benzyl adenin termasuk sitokinin. Sitokinin selain berperan pada proses pembelahan sel, juga berperan mendorong pemanjangan sel (Salisbury & Ross, 1995b). Efek menghambat maupun efek mendorong proses pembelahan sel oleh sitokinin tergantung dari adanya fitohormon lainnya, terutama auksin (Wattimena,

1991). Auksin mempengaruhi pemanjangan suatu sel dengan cara mengaktifkan beberapa enzim yang dapat menurunkan pH pada dinding sel. Enzim tersebut bekerja memutuskan ikatan polisakarida dinding sel, sehingga terjadi pengenduran dinding sel dan pertumbuhan cepat (Salisbury & Ross, 1995b). Sitokinin pada siklus sel memiliki peranan penting yaitu memacu sitokinesis. Sitokinin mendorong pembelahan sel dengan cara meningkatkan peralihan G<sub>2</sub> ke mitosis dan meningkatkan laju sintesis protein (Fosket, 1977 & Fosket *et al.*, 1981 dalam Salisbury & Ross, 1995b). Sitokinin memperpendek fase S dengan cara mengaktifkan DNA, sehingga ukuran salinan DNA menjadi dua kali lebih besar kemudian laju sintesis DNA digandakan (Houssa *et al.*, 1994 dalam Lyndon, 1998).

### **Morfologi kalus yang mempunyai potensi membentuk embrio somatik**

Embrio somatik stadium globular pada *D. lowii* berbentuk noduler, berwarna putih kekuningan (Gb 3). Hal ini seperti bentuk dan warna embrio somatik stadium globular pada *Allium cepa* (Zheng *et al.*, 1998) dan *Eucalyptus pellita* (Wahyudiningsih, 2000). Schumann *et al.* dalam Bajaj (1995) juga menyatakan bahwa ciri struktur embrio somatik adalah berbentuk noduler, berwarna putih transparan dan kekuningan. Menurut Navarro *et al.* (1997), bentuk kalus yang kompak dan globular merupakan kalus yang bersifat embriogenik. Karakteristik tekstur kalus non embriogenik pada *D. lowii* ada yang bertekstur sangat kompak dan sangat padat serta sangat friabel dan berair.

Pada stadium globular, embrio somatik berwarna putih kekuningan

setelah dua bulan dikulturkan. Namun setelah disubkultur pada medium yang sama embrio somatik hanya sampai stadium hati (*heart*) karena mengalami *browning*. Menurut Carron *et al.* (1992) dalam Piyatrakul *et al.* (2012), *browning* berkontribusi terhadap hilangnya kapasitas embriogenik meskipun kalus yang mengalami *browning* terjadi pada akhir atau selama proses perkembangan embrio. Peristiwa *browning* pada saat awal proliferasi kalus berkontribusi besar terhadap hilangnya kapasitas embriogenik terutama saat diferensiasi sel-sel aktif pada sel meristematis dan embriogenik. Pada *Hevea*, peristiwa *browning* ini berkaitan erat dengan akumulasi polifenol yang teroksidasi dan produksi etilen di dalam sel. Hal ini didukung dengan aktivasi biosintesis etilen dan signal gen pada saat proliferasi pada kalus yang mempunyai potensi embriogenik rendah dan kalus non-embriogenik (Piyatrakul *et al.*, 2012).

### **Anatomi sel-sel yang mempunyai potensi embriogenik**

Induksi embrio somatik pada *D. lowii* terjadi melalui tahap kalus. Pada Gambar 4 terlihat hasil irisan melintang (a,b,c) dan membujur (d) sel-sel kalus yang menunjukkan beberapa tahap perkembangan pro-embrio: stadium 2 sel (a), 4 sel (b), bulat (c), stadium globuler (d) dan terpedo (e). Menurut Bajaj (1995), embriogenesis secara tidak langsung melalui tahap kalus. Embrio somatik stadium globular berasal dari sel-sel kalus yang bersifat embriogenik yang akan membentuk pro-embrio, kemudian akan tumbuh dan berkembang mengikuti stadium globular, jantung/hati, terpedo dan kotiledon. Dixon (1985) menyebutkan bahwa, pembentukan pemula pro-embrio

pada umumnya terjadi pada medium dengan konsentrasi auksin tinggi yaitu 1-5 ppm. Selanjutnya kelompok sel pemula pro-embrio tersebut dipindah ke dalam medium dengan konsentrasi auksin rendah/tanpa auksin, sehingga terbentuk pro-embrio baru, sedang pro-embrio yang telah ada dirangsang untuk membentuk embrio bipolar.

Pada Gambar 4d terlihat bahwa sel bagian tepi mempunyai ukuran lebih kecil dibanding sel-sel di bagian tengah. Menurut Lyndon (1998), sel bagian tepi dan sel bagian tengah pada sel apikal berbeda dalam hal ukuran dan frekuensi pembelahan sel. Sel pada bagian tengah memiliki sel yang ukurannya lebih besar dari sel bagian tepi dan frekuensi pembelahan sel lebih rendah. Sel pada bagian tepi berukuran lebih kecil dan mengalami pembelahan lebih sering. Sel bagian tepi tersebut diduga sebagai calon meristem ujung batang. Fungsi utama meristem ujung batang sebagai sumber sel yang mengandung materi seluler yang berfungsi untuk pertumbuhan lebih lanjut membentuk primordium tunas.

Pada penelitian ini, pembentukan akar terjadi pada minggu ke-3. Pembentukan akar berasal dari diferensiasi sel-sel dalam eksplan daun yang masih bersifat meristematis. Pemberian IBA 7,5 mg/l menyebabkan sel-sel yang masih bersifat meristematis berdiferensiasi ke arah pembentukan akar. Sel-sel pembentuk akar berturut-turut berkembang dari prokambium, kambium, perisikel, dan akhirnya membentuk akar (Fahn, 1989). Pemberian kinetin dan IBA diarahkan untuk memacu pembelahan, pembesaran, dan pemanjangan sel sehingga dapat mendorong diferensiasi membentuk akar.

#### IV. KESIMPULAN

- 1) Medium MS + BA 0,2 mg/l + IBA 0,5 mg/l dapat menghasilkan embrio somatik stadium globular bertekstur kompak serta berwarna putih kekuningan dan transparan.
- 2) Embrio somatik berasal dari sel-sel kalus embriogenik berukuran kecil yang membentuk pro-embrio stadium: 2 sel, 4 sel, bulat, globular dengan suspensor dan terpedo.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Anjaneyulu, C dan C.C. Giri. 2008. Factors influencing somatic embryo maturation, high frequency germination and plantlet formation in *Terminalia chebula* Retz. *Plant Biotechnol Rep* (2008) 2:153–161.
- Bajaj, Y.P.S. 1995. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 30. Somatic Embryogenesis and Synthetic seed 1. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York. London. Paris. Tokyo. Hongkong. Barcelona. Budapest.
- Cailloux, F., J. Julien-Guerrier, L. Linossier, A. Coudret. 1996. Long-term somatic embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. *Plant Science*, Volume 120: 185-196.
- Costanza, A dan S. McCord. 2009. Forest biotechnology and its responsible use. Institute of Forest Biotechnology. [www.forestbiotech.org](http://www.forestbiotech.org). [www.responsibleuse.org/resources/biotechtrees.pdf](http://www.responsibleuse.org/resources/biotechtrees.pdf) diakses tanggal 20 November 2013.
- Dixon, R. A. 1985. *Plant Cell Culture. A Practical Approach*. IRL PRESS. Oxford-Washington DC.
- Fahn, A. 1989. *Plant anatomy*. Diterjemahkan oleh A. Soediro & C. Kusmana. *Anatomi Tumbuhan*. Rineka Cipta
- George E.F. & P.D. Sherington, 1984. *Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories* Eversley Basingstoke. England.
- Liu, C, X. Xia, W. Yin, L. Huang, J. Zhou. 2006. Shoot regeneration and somatic embryogenesis from needles of redwood (*Sequoia sempervirens* (D.Don.) Endl.). *Plant Cell Rep* 25: 621–628.
- Lyndon, R.F. 1998. *The Shoot Apical Meristem: Its Growth and Development*. Cambridge University Press. New York.
- Navarro, C., Ma Rossa., Escobeda., and A. Mayo. 1997. In vitro plant regeneration from embriogenic culture of a diploid and a triploid, *Cavendish banana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51: 17-25. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Piyatrakul, P., R. A. Putranto, F. Martin, M. Rio, F. Dessailly, J. Leclercq, J.F. Dufayard, L. Lardet and P. Montoro. 2012. Some ethylene biosynthesis and AP2/ERF genes reveal a specific pattern of expression during somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *BMC Plant Biology* 12:244.
- Salisbury, F.B & C.W. Ross. 1995a. *Fisiologi Tumbuhan*. Jilid 2. (Diterjemahkan oleh Diah R.L dan Sumaryono). Penerbit ITB. Bandung.



- Salisbury, F.B & C.W. Ross. 1995b. *Fisiologi Tumbuhan*. Jilid 3. (Diterjemahkan oleh Diah R.L dan Sumaryono). Penerbit ITB. Bandung.
- Wahyudiningsih, T.S. 2000. Struktur dan perkembangan embrio somatik dari kalus kotiledon dan suspensi pada *Eucalyptus pellita* F. Muell. secara *In vitro*. Tesis Program Parca Sarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Wattimena, L.W. Gunawan, N.A. Mattik, E. Syamsudin, N.M.A. Wiendi dan A. Ernawati. 1992. Bioteknologi Tanaman. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Zheng, S., Henken, B., Sofiari, E., Jacobsen, E., A, Frans., Krens., Kik, C. 1998. Factor Influencing Induction, Propagation and Regeneration of Mature Zygote Embryo-Derived Callus from *Allium cepa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53: 99-105. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.