

## Induksi Embriogenesis Somatik Menggunakan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) dan Kinetin pada Eksplan Gulungan Daun Muda Tanaman Tebu

### *Induction Somatic Embryogenesis Used 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) and Kinetin in Spindle Leaf Explant Sugarcane*

Wardatus Sholeha<sup>1,2</sup>, Bambang Sugiharto<sup>1\*,2</sup>, Dwi Setyati<sup>1</sup>, Parawita Dewanti<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Jember

<sup>2</sup>Center for Development of Advanced Science and Technology (CDAST), Universitas Jember

<sup>3</sup>Jurusan Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember

\*E-mail: sugiharto.fmipa@unej.ac.id

#### ABSTRACT

Induction of somatic embryogenesis in sugarcane requires the composition Plant Growth Hormone (PGH) appropriate. Utilizing of PGH (2,4-D and kinetin) is expected to induce sugarcane somatic embryogenesis. The purpose of this study was to obtain the concentration of 2,4-D and kinetin that effective for the multiplication of sugarcane var. NXI 1-3 through somatic embryogenesis. This study consists of four stages: callus induction, callus proliferation, regeneration of shoots and encapsulation. The plant material used is a spindle leaf sugarcane var. NXI 1-3. Callus induction used 2,4-D with different concentration (2 ppm, 3 ppm and 4 ppm). Callus proliferation used 2,4-D with concentration 1 ppm and 2 ppm. Regeneration of shoots used kinetin 0,5 ppm. The results are showed that the optimal induction of embryogenic callus on medium MS + sucrose 30 g / L + CH 300 ppm + 300 ppm PVP + 2,4-D 4 ppm as indicated by the high percentage of explants forming embryogenic callus that is equal to 40% and the respective concentration 2 ppm and 3 ppm is 33,3% and 37,5%. In proliferation stage, the development callus optimal on medium MS + sucrose 30 g / L + CH 300pm + PVP 300 ppm + 2,4-D 2 ppm and formulations for regeneration shoot on medium MS + sucrose 30 g / L + kinetin 0.5 ppm. The result of encapsulation can be shaped 100 sythetic seed.

Keywords: Somatic embryogenesis, spindle leaf, kinetin, 2,4-D

#### PENDAHULUAN

Perbanyakan tanaman secara *in vitro* dengan embriogenesis somatik banyak mendapatkan perhatian karena jumlah propagulan yang dihasilkan lebih banyak dan diperoleh dalam waktu singkat (Purnamingsih, 2002). Embriogenesis somatik adalah perbanyakan tanaman yang berasal dari sel haploid atau diploid untuk membentuk tanaman baru tanpa melalui peleburan sel gamet (Dixon, 1985).

Eksplan yang digunakan untuk perbanyakan tanaman melalui embriogenesis somatik adalah gulungan daun (*leaf roll*) muda tanaman tebu varietas NXI 1-3. Keunggulan tanaman tebu varietas NXI 1-3 antara lain mempunyai daya tahan keprasa, tahan terhadap hama penyakit tanaman dan mampu beradaptasi dengan mudah terhadap lingkungan (Rasullah *et al.*, 2013).

Keberhasilan embriogenesis somatik juga ditentukan oleh beberapa faktor antara lain adalah Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) (Purnamingsih, 2002). ZPT merupakan senyawa organik yang berperan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Davies, 1995) dan (Gaba, 2005). Jenis ZPT yang banyak digunakan

pada perbanyakan tanaman melalui embriogenesis somatik adalah dari golongan auksin dan sitokinin (Utami *et al.*, 2007). Hal ini telah dibuktikan dari beberapa penelitian sebelumnya diantaranya pada tahap induksi kalus embriogenik tanaman tebu (*Saccharum Officinarum* L.) *in vitro* mampu tumbuh optimal dalam media MS yang dilengkapi dengan 2,4-D (0,5-3,5 mg/l) + 1 mg/l kinetin (Ali & Iqbal, 2010); tahap proliferasi embriogenesis somatik dan regenerasi padi (*Oryza sativa*) *in vitro* mampu tumbuh optimal pada media MS + 2,4-D (0,4  $\mu$ M) + kinetin (2,0  $\mu$ M) (Verma *et al.*, 2011).

Beberapa penelitian sebelumnya penggunaan 2,4-D dan kinetin mampu meningkatkan aktivitas embriogenesis somatik pada tanaman tebu dan padi secara *in vitro* serta regenerasi tanaman. Tanaman hasil embriogenesis somatik memiliki tingkat regenerasi sangat tinggi sehingga dibutuhkan metode penyimpanan. Dewasa ini penyimpanan dengan metode benih sintetik (enkapsulasi) semakin berkembang. Penyimpanan tersebut sangat diperlukan agar benih mampu bertahan dalam jangka waktu cukup lama tanpa merusak viabilitas eksplan. Penelitian ini

bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi 2,4-D dan kinetin yang efektif untuk perbanyak tanaman tebu var. NXI 1-3 melalui embriogenesis somatik.

## METODE

### Bahan dan Alat

Adapun bahan dan alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain gulungan daun (*spindle leaf*) muda tanaman tebu varietas NXI 1-3, alkohol, kinetin, 2,4- *Dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D), media MS0, sukrosa 30 gr/l, mio-inositol 100 ml/l, pyridoxine 0,50 ml/l, thiamine 0,50 ml/l, casein hidrolisat 300 mg/l, polivinil piroolidon (PVP) 300 mg/l, prolin 560 mg/l, agar kuljar 11 gr/l, Na-alginat 3 gr/ 100 ml, dan CaCl<sub>2</sub> 100mM, *autoclave*, *Laminar Air Flow* (LAF), pipet Pasteur, neraca analitis, dan mikroskop stereo Leica EZ4 HD.

### Metode Penelitian

#### Pengambilan Eksplan

Eksplan yang digunakan berasal dari gulungan daun (*spindle leaf*) muda tanaman tebu varietas NXI 1-3. Gulungan daun muda disterilisasi menggunakan larutan alkohol 70% selama 5 menit lalu dibakar diatas api bunsen selanjutnya disterilisasi kembali menggunakan alkohol 96% dan dibakar diatas api bunsen. Gulungan daun yang telah steril dipindahkan ke cawan petri steril.

#### Penanaman Eksplan dan Induksi Kalus Embriogenik

Gulungan daun yang telah steril diambil pada bagian tengah yaitu 4 cm dari bagian pangkal dan dipotong dengan panjang ± 4 mm. Eksplan tersebut kemudian ditanam dalam botol kultur yang telah berisi media induksi. Penanaman eksplan bertujuan untuk menginduksi pertumbuhan kalus dan kalus embriogenik. Pada media induksi menggunakan 2,4-D dengan konsentrasi berbeda yaitu A1, A2 dan A3 (Tabel 1).

Tabel 1. Formulasi media induksi kalus embriogenik

Media	Perlakuan
A1	MS + 2,4-D 2 mg/l + kasein hidrolisat 300 mg/l + PVP 300 mg/l + sukrosa 30 g/l + agar kuljar 11 g/l.
A2	MS + 2,4-D 3 mg/l + kasein hidrolisat 300 mg/l + PVP 300 mg/l + sukrosa 30 g/l + agar kuljar 11 g/l.
A3	MS + 2,4-D 4 mg/l + kasein hidrolisat 300 mg/l + PVP 300 mg/l + sukrosa 30 g/l + agar kuljar 11 g/l.

Kultur selanjutnya diinkubasi dalam ruang gelap pada suhu 22-24 °C selama 6 minggu. Setiap 2 hari sekali dilakukan pengamatan terhadap jumlah eksplan yang berkalus. Data jumlah eksplan berkalus digunakan untuk menghitung persentase eksplan yang membentuk kalus dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Persentase eksplan membentuk kalus} = \frac{\sum \text{eksplan membentuk kalus}}{\sum \text{seluruh eksplan}} \times 100$$

(Tahir *et al.*, 2011)

$$\text{Persentase kalus embriogenik} = \frac{\sum \text{kalus embriogenik}}{\sum \text{seluruh kalus}} \times 100$$

(Tahir *et al.*, 2011)

Pertumbuhan eksplan yang membentuk kalus embriogenik dengan persentase tertinggi dari media induksi terbaik dipindahkan dan ditumbuhkan pada media proliferasi.

### Proliferasi Kalus Embriogenik

Eksplan berkalus dari media induksi selanjutnya ditumbuhkan pada media proliferasi dengan konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D lebih rendah. Komposisi media proliferasi dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Formulasi media proliferasi kalus embriogenik

Media	Perlakuan
B1	MS + 2,4-D 1 mg/l + kasein hidrolisat 300 mg/l + PVP 300 mg/l + sukrosa 30 g/l + prolin 560 mg/l + agar kuljar 11 g/l.
B2	MS + 2,4-D 2 mg/l + kasein hidrolisat 300 mg/l + PVP 300 mg/l + sukrosa 30 g/l + prolin 560 mg/l + agar kuljar 11 g/l.

Setiap media proliferasi berisi satu eksplan hal tersebut bertujuan untuk memudahkan pengamatan perkembangan fase embriogenesis somatik.

Kultur selanjutnya diinkubasi dalam ruang gelap selama 6 minggu pada suhu 22-24 °C. Setiap 3 minggu sekali dilakukan pengamatan terhadap perkembangan fase embriogenik menggunakan mikroskop stereo dan jumlah embrio somatik pada setiap perlakuan. Pertumbuhan kalus embriogenesis somatik dari media proliferasi terbaik (optimum) selanjutnya

dipindahkan dan ditumbuhkan pada media regenerasi.

**Regenerasi Embriogenesis Somatik**

Embrio somatik yang telah diperoleh dari media proliferasi selanjutnya diperbanyak dengan cara ditumbuhkan ke dalam media perbanyakan (regenerasi). Satu botol kultur ditanam satu embrio somatik dewasa. Pada tahap ini digunakan formulasi media regenerasi dengan komposisi seperti yang tercantum dalam Tabel 3.

Pada media regenerasi hanya digunakan satu perlakuan konsentrasi kinetin yaitu 0,5 ppm kinetin. Kultur diinkubasi selama 6 minggu pada kondisi terang (Haq & Memon, 2012). Setiap 3 minggu dilakukan pengamatan terhadap perkembangan embrio somatik membentuk plantlet.

Tabel 3. Formulasi media regenerasi kalus embriogenik

Media	Perlakuan
C1	MS + kinetin 0,5 mg/l + sukrosa 30 g/l + PVP 300 mg/l + agar kuljar 11 g/l.

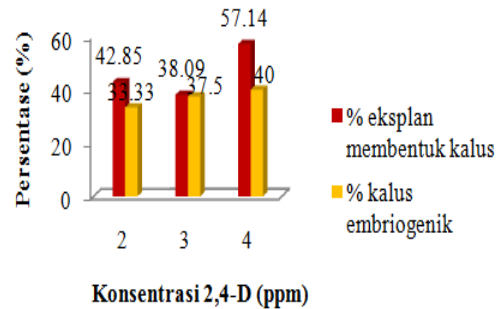
**Pembuatan Benih Sintetik (Enkapsulasi)**

Proses enkapsulasi diawali dengan mengisolasi embrio somatik yang telah memasuki fase koleoptil yang ditandai dengan terbentuknya klorofil. Bagian koleoptil yang didapatkan ditaburkan pada permukaan Na-alginat 3% yang telah mengandung media tumbuh (MS0 + Sukrosa + kinetin) selanjutnya koleoptil diambil secara tunggal. Na-alginat yang telah mengandung koleoptil diteteskan di atas larutan CaCl<sub>2</sub> 100 mM dan direndam selama 40 menit. Kapsul yang terbentuk dibilas dengan akuades steril selanjutnya dikeringanginkan dan kapsul siap untuk diinkubasi di dalam media semi solid pada kondisi remang dengan suhu 4°C.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Induksi Kalus Embriogenik**

Induksi kalus embriogenik digunakan tiga macam konsentrasi 2,4-D yaitu 2 ppm, 3 ppm dan 4 ppm. Hasil penelitian menunjukkan 2,4-D pada konsentrasi 4 ppm lebih efektif untuk menginduksi kalus dan kalus embriogenik (Gambar 1).



Gambar 1. Pengaruh konsentrasi 2,4-D terhadap persentase terbentuknya kalus.

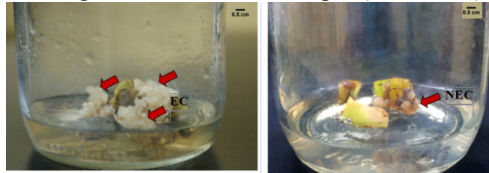
Gambar 1. menunjukkan konsentrasi 4 ppm 2,4-D memiliki kemampuan tertinggi untuk menginduksi kalus dibandingkan dengan dua konsentrasi 2,4-D lainnya yaitu sebesar 57,14%. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi 2,4-D maka persentase kalus embriogenik yang terbentuk juga semakin tinggi. Hal tersebut terbukti pada konsentrasi 4 ppm 2,4-D mampu meningkatkan pembentukan kalus embriogenik tertinggi yaitu sebesar 40%.

Penambahan 2,4-D merupakan faktor terpenting untuk induksi embriogenesis somatik hal ini disebabkan 2,4-D merupakan ZPT sekaligus herbisida yang mampu mengaktifkan hormon ABA dan etilen. Peningkatan hormon ABA mampu menginduksi ekspresi protein seperti LEA (*Leaf Embryogenesis Abundant*). LEA merupakan protein yang bertanggung jawab terhadap perkembangan embriogenesis somatik (Grosmann, 2000).

Menurut Chithra *et al.* (2005) bahwa tinggi rendahnya persentase kalus embriogenik dipengaruhi oleh konsentrasi hormon auksin sintetik yang berfungsi untuk menginduksi kalus embriogenik. Kalus embriogenik merupakan kumpulan sel yang dicirikan dengan struktur bipolar yaitu mampu membentuk dua meristem sekaligus diantaranya meristem tunas dan meristem akar (Purnamaningsih, 2002). Kalus embriogenik dapat dibedakan dengan kalus non-embriogenik. Berdasarkan hasil pengamatan kalus embriogenik dicirikan dengan struktur kalus kering, berwarna putih susu hingga bening, berstruktur remah serta mengalami proses perkembangan membentuk fase-fase embriogenesis somatik sedangkan kalus non-embriogenik memiliki struktur kalus lunak, berair, berwarna kecoklatan serta tidak mengalami proses perkembangan fase embriogenesis somatik (stagnan). Hal ini didukung oleh pendapat Gandanou *et al.*, (2005) yang menyatakan bahwa kalus embriogenik dicirikan dengan struktur kalus



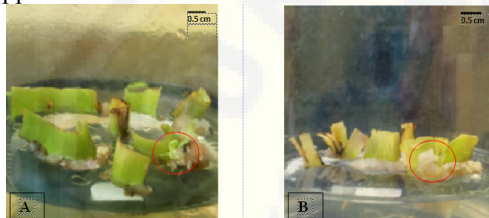
kering, berwarna putih hingga krem dan memiliki struktur remah sedangkan kalus non embriogenik dicirikan dengan struktur kalus kompak, basah, dan berwarna bening kecoklatan. Berikut perbedaan antara kalus embriogenik dan non-embriogenik secara makroskopis (Gambar 2).



Gambar 2. Kalus embriogenik dan non-embriogenik pada tanaman tebu Var. NXI 1-3 secara makroskopis. EC = kalus embriogenik; NEC = kalus non-embriogenik.

### Proliferasi Kalus Embriogenik

Pada tahapan proliferasi kalus embriogenik, konsentrasi 2,4-D yang sesuai adalah 2 ppm.



Gambar 3. Kalus embriogenik pada umur 3 minggu pada konsentrasi 2,4-D yang berbeda: **A)** Makroskopis kalus embriogenik pada media proliferasi 2 ppm. **B)** Makroskopis kalus embriogenik pada media proliferasi 1 ppm.

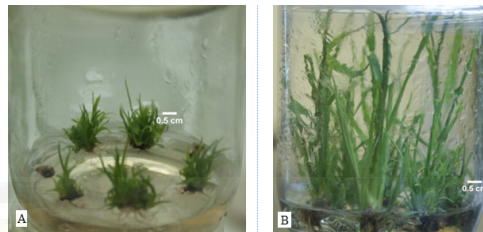
Pada umur 3 minggu konsentrasi 2,4-D 2 ppm mampu meningkatkan perkembangan kalus embriogenik dari fase globular membentuk fase skutelar (Gambar 3 A) sedangkan pada konsentrasi 2,4-D 1 ppm kondisi kalus masih berada pada fase globular (Gambar 3 B).

### Regenerasi Embrio Somatik

Regenerasi embrio somatik ditumbuhkan pada media regenerasi yang mengandung kinetin. Penambahan ZPT kinetin bertujuan untuk meningkatkan regenerasi melalui mitosis (Wan & Liang, 1988).

Berdasarkan hasil pengamatan pada Gambar 4 A terlihat bahwa pada umur 3 minggu di dalam media regenerasi embrio somatik telah membentuk tanaman tebu (*plantlet*) akan tetapi tidak seragam. Jumlah *plantlet* yang terbentuk dari satu eksplan berjumlah  $\pm 35$  sedangkan yang lain masih berada pada fase skutelar dan

koleoptilar. Pada umur 6 minggu rata-rata jumlah *plantlet* yang terbentuk mencapai  $\pm 82$ . Pembentukan fase yang tidak serempak dalam satu kalus menyebabkan jumlah *plantlet* yang ada di dalam media regenerasi berbeda.

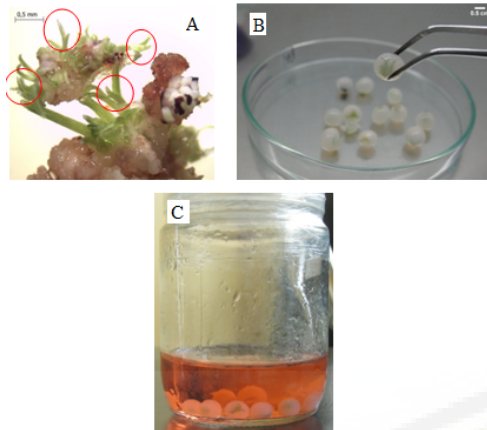


Gambar 4. Regenerasi tanaman tebu Var. NXI 1-3. **A)** umur 3 minggu. **B)** umur 6 minggu pada media MS + 0,5 ppm kin + sukrosa 30 g/l + PVP 300 mg/l + agar kuljar 11 g/l.

### Benih Sintetik Tanaman Tebu Var. NXI 1-3

Embrio somatik tanaman tebu Var. NXI 1-3 selanjutnya dikapsulkan untuk pembuatan benih sintetik (enkapsulasi). Enkapsulasi dilakukan dengan mengisolasi embrio somatik yang telah membentuk fase koleoptil (Gambar 5 A). Penggunaan bagian koleoptil sebagai bahan tanaman yang dikapsulkan disebabkan bagian tersebut bersifat meristematik. Menurut Yoshida *et al.* (1993) sel tanaman yang bersifat meristematik lebih toleran terhadap penyimpanan dibandingkan sel yang telah dewasa. Bagian koleoptil selanjutnya ditaburkan pada 3% Na-alginat yang telah mengandung media tumbuh. Penggunaan 3% Na-alginat didukung dari hasil penelitian Daud *et al.* (2008) dan Geetha *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa pembuatan benih sintetik dengan 3% Na-alginat dalam 100 mM CaCl<sub>2</sub> merupakan konsentrasi optimal di dalam pembuatan benih sintetik. Benih sintetik yang dihasilkan dari proses enkapsulasi berjumlah 100 benih.

Proses selanjutnya adalah perendaman Na-alginat yang mengandung embrio somatik pada larutan 100 mM CaCl<sub>2</sub>. Menurut Taha *et al.* (2013) larutan CaCl<sub>2</sub> berfungsi untuk memadatkan kapsul. Proses perendaman Na-alginat di dalam larutan CaCl<sub>2</sub> dilakukan selama 40 menit. Hal tersebut berfungsi untuk menyempurnakan pembentukan kapsul (Ipekci & Gozukirmizi, 2003). Kapsul yang telah terbentuk kemudian diinkubasi didalam media semi solid pada intensitas cahaya  $\pm 88$  lux dengan suhu 4 °C.



Gambar 5. Metode pembuatan benih sintetik. **A)** Bagian koleoptil yang dienkapsulasi (perbesaran 8X). **B)** Benih sintetik tanaman Tebu Var. NXI 1-3 yang dienkapsulasi menggunakan 3% Na-alginat dan 100 mM CaCl<sub>2</sub>. **C)** Inkubasi kapsul pada media semi solid.

Kapsul tersebut berfungsi sebagai endosperm sintetik atau cadangan makanan pada saat benih disimpan. Inkubasi kapsul didalam media semi solid bertujuan agar kapsul tidak mudah rusak akibat proses osmosis sedangkan penyimpanan pada suhu rendah dapat mengurangi aktivitas enzim terutama enzim hidrolisis sehingga hal tersebut dapat mengurangi perombakan cadangan makanan (Syamsu *et al.*, 2003).

### KESIMPULAN

Konsentrasi 2,4-D 4 ppm lebih efektif untuk menginduksi kalus embriogenik yang ditunjukkan dengan tingginya persentase eksplan membentuk kalus embriogenik yaitu sebesar 41%. Konsentrasi 2,4-D 2 ppm adalah konsentrasi yang paling efektif untuk tahap proliferasi kalus embriogenik yang ditandai dengan terbentuknya fase skutelar pada umur 3 minggu. Penggunaan kinetin 0,5 mg/l mampu meningkatkan pertumbuhan embrio somatik dewasa (koleoptil) membentuk tanaman baru (*plantlet*). Benih sintetik yang telah berhasil dibuat menggunakan bagian koleoptil dengan menggunakan 3 % Na-alginat dan 100 mM CaCl<sub>2</sub> berjumlah 100 benih. Berdasarkan hasil penelitian perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan prosedur pembuatan benih sintetik yang mampu menyimpan eksplan dalam jangka waktu yang lebih lama tanpa mengurangi viabilitas dari eksplan.

### UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis berterima kasih atas bantuan dana penelitian melalui dana proyek Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi tahun 2014 serta

Divisi Penelitian dan Pengembangan Usaha PTPN XI Persero.

### DAFTAR PUSTAKA

- Ali, S., & Iqbal J. 2010. Facile Regeneration Through Adventive or Somatic Embryogenesis from *in vitro* Cultured Immature Leaf Segments of Elite Varieties of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Biologia* (Pakistan). Vol. 56: 55-62.
- Chithra, M., K.P. Martin, C. Sunandakumari, and P.V. Madhusoodanan. 2005. Somatic Embryogenesis, Encapsulation, and Plant Regeneration of *Rotula aquatica.*, A Rare Rhoeophytic Woody Medical Plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. Vol. 41 : 28-31.
- Daud N., Taha R.M., and Hasbullah N.A. 2008. Artificial Seed Production from Encapsulated Micro Shoots of *Saintpaulia ionantha* Wendl. (African violet). *J. Appl. Sci.* Vol. 8(24): 4662-4667.
- Davies, P. J. 1995. *Plant Hormone: Physiology Biochemistry and Molecular Biology*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Dixon, R. A. 1985. *Plant Cell Culture a Practical Approach*. Washington DC: Department of Biochemistry, Royal Holloway College. IRL Press Oxford.
- Gaba, V. P. 2005. Plant Growth Regulator. In R. N. Trigiano and DJ Gray (*eds.*) *Plant Tissue Culture and Development*. Londn: CRC Press (87-100).
- Geetha R., Gopal G.V., and Niranjana M.H. 2009. In vitro Response of Encapsulated Shoot Tips of *Spilanthes acmella*. *J. Basic Appl. Biol.* Vol. 3(1&2): 82-86.
- Grossmann, K. 2000. Mode of Action of Auxin Herbicides: A New Ending to A long, Drown Out Story. *Trends Plant Sci.* Vol. 5: 506-508.
- Haq, I. & Memon. S. 2012. Efficient Plant RegeneationThrough Somatic Embryogenesis in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *indian Journal of Biotechnology*. Vol. 11 (15): 3704-3708.
- Ipekci, Z., & Gozukirmizi, N. 2003. Direct Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed Production from *Paulownia elongata*. *Plant Cell*. Vol. 22: 16-23.

- Purnamaningsih, Ragapadmi. 2002. Regenerasi Tanaman Melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya. *Buletin AgroBio*. Vol. 5 (2): 51-58.
- Rasullah, F. F., Nurhidayati, T., Nurmalasari. 2013. Respon Pertumbuhan Tunas Kultur Meristem Apikal Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Varietas NIX 1-3 Pada Media MS dengan Penambahan Arginin dan Glutamin. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. Vol. 2 (2): 2337-3520.
- Syamsu, W., Yubiarti, N., Kurniaty, R., & Abidin, Z. 2003. *Teknik penanganan benih orthodox*. (buku 1). Bogor: Badan Penelitian dan pengembangan Kehutanan; Balai Penelitian dan pengembangan Teknologi perbenihan.
- Taha, R. M., Mahmud, N., Yaacob J. S., Abdullah, N., & Mohajer, S. 2013. Sythetic Seeds Production and Regeneration of *Oxalis triangularis* for Mass Propagation and Conservation. *International Journal of Environmental Science and Development*. Vol. 4 (5): 394.
- Tahir, M. S., Victor, K., & Abdulkadir, S. 2011. The Effect 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D) Concentration Induction in Sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Nigerian Journal of Basic and Applied Science*. Vol. 19 (2): 213-217.
- Utami, E. S. W., Sumardi, I. Taryono, & Semiarti, E. 2007. Pengaruh  $\alpha$ -Naphthaleneacetic acid (NAA) Terhadap Embriogenesis Somatik Anggrek Bulan *Phalaenopsis Amabilis* (L.) Bl. *Biodiversitas*. Vol. 8, No. 4: 295-299.
- Wan, Y. S. E. L. & Liang, G. H. 1988. The Effect of Kinetin on Callus Characters in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Euphytica*. Vol. 39: 249.
- Verma, D., Joshi, R., & Kumar, P. 2011. Protocol for *in vitro* Somatic Embryogenesis and Regeneration of Rice (*Oryza sativa* L.). *Indian Journal of Experimental Biology*. Vol. 49: 958-963.
- Yoshida, S., Y. Hattanda, and T. Suyama. 1993. Variations in Chilling Sensivity of Suspension Cultures Cell of Mung Bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) during The Growth Cycle. *Plant Cell Physiology*. Vol. 34: 673-679.