

Peningkatan Toleransi Kedelai Sindoro terhadap Kekeringan Melalui Seleksi *In Vitro*

Improvement of Soybean (Sindoro) Tolerance to Drought Stress Through In Vitro Selection

Ali Husni^{1*}, M. Kosmiatin¹⁾ dan I. Mariska¹⁾

Diterima 6 Mei 2005/Disetujui 22 Pebruari 2006

ABSTRACT

In vitro selection of embryogenic cell mass is one alternative to improve drought tolerance in plants. Embryogenic cell callus of soybean were radiated by Gamma ray (400 rad) to produce mutation. The radiated cell were tested with PEG (0, 10, 20 and 30 %) for drought stress tolerance. After selection, cells which tolerant to PEG were regenerated to produce somatic embryo structure, somatic seed and plantlet. Acclimatization was done in a greenhouse and analysis of proline was done at generation 1 (G₁). The purpose of the experiment was to get soybean somatic seed which tolerant to drought stress. Results of experiment showed that 39.7 % embriogenic callus were produced. The higher the concentration of PEG, the higher the death of cell/callus. The rate of producing somatic embryo structure was 4.9 at 0 % PEG; 2.85 at 10 % PEG; 1.6 at 20% PEG and 0.6 at 30% PEG. Number of somatic seed which developed in regeneration medium (S11) were 79 from 0% PEG; 35 from 10% PEG; 29 from 20% PEG, and 15 from 30% PEG. Somatic seed produced 15 planlets from PEG 0%; 6 planlets from PEG10%; 4 planlets from PEG 20%. Based of proline content, all of G₁ somaclones were more tolerant than the mother plant.

Key words : Soybean, *in vitro* selection, PEG, regeneration, acclimatization and dry land.

PENDAHULUAN

Salah satu upaya yang perlu dilakukan untuk meningkatkan produksi pertanian di Indonesia khususnya tanaman kedelai adalah melalui perluasan areal tanam secara ekstensifikasi di lahan kering. Potensi sumberdaya lahan kering yang dapat dimanfaatkan bagi ekstensifikasi cukup luas terdapat di luar pulau Jawa seperti pulau Sumatera dan Kalimantan (Arsyad, 2004). Untuk mendukung upaya pengembangan areal tersebut diperlukan ketersediaan varietas yang sesuai pada wilayah atau agroekosistem yang bersangkutan.

Keragaman genetik yang tinggi merupakan salah satu syarat yang diperlukan dalam perbaikan genetik tanaman. Salah satu teknik yang dapat digunakan untuk meningkatkan keragaman genetik adalah melalui keragaman somaklonal. Teknik iradiasi terhadap bahan somaklonal dilaporkan cukup efektif meningkatkan keragaman genetik populasi sel somatik. Teknik seleksi *in vitro* dapat mengurangi mutasi yang tidak diinginkan (Witjaksono dan Litz, 2003 dan Husni *et al.*, 2004).

Embriogenesis somatik memberikan peluang yang tinggi untuk mendapatkan mutan tanpa kimera karena

berasal dari sel tunggal (Witjaksono dan Litz, 2003). Kombinasi perlakuan fisik (iradiasi) dan kimiawi (PEG) terhadap populasi sel embriogenik yang berjumlah jutaan dapat menyaring sel-sel mutan yang toleran terhadap cekaman kekeringan. Penggunaan PEG dalam induksi cekaman kekeringan pada tanaman sudah digunakan sejak lama (Krizek, 1985). PEG dengan berat molekul lebih dari 4000 dapat menginduksi cekaman kekeringan pada tanaman dengan mengurangi potensial air pada larutan nutrisi tanpa menyebabkan keracunan (Lawyer, 1970). Short *et al.* (1987) menyatakan bahwa kultur *in vitro* PEG dapat menginduksi cekaman kekeringan dan berkorelasi positif dengan yang terjadi di lapang atau rumah kaca. Konsentrasi PEG 10, 20 dan 30% merupakan konsentrasi yang biasa digunakan untuk simulasi cekaman kekeringan dilapang (Salisbury dan Ross, 1992). Toleransi yang diperoleh dari seleksi *in vitro* dengan embriogenesis dapat dipertahankan pada tanaman somaklonnya (Jayasankar *et al.*, 2001). Toleransi tersebut berkaitan dengan kemampuan individu tersebut mengeluarkan senyawa tertentu dalam proses fisiologis.

Toleransi tanaman terhadap ketahanan terhadap cekaman kekeringan secara fisiologis berkaitan dengan

¹ Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Jl. Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111, Telp (0251) 337975 Fax (0251) 338820
(* Penulis untuk korespondensi)

perubahan aktivitas metabolisme yang antara lain ditunjukkan oleh perubahan akumulasi prolin dalam jaringan daun (Bates *et al.*, 1973). Prolin pada kondisi cekaman kekeringan berperan sebagai penetralisir racun amoniak bebas yang diproduksi berlebihan dalam daun dan berfungsi juga sebagai substrat selama respirasi serta sumber energi selama penyembuhan tanaman setelah cekaman.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan metoda seleksi *in vitro* untuk meningkatkan toleransi tanaman kedelai Sindoro terhadap kekeringan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di laboratorium Kultur *in vitro* Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan dan Rumah Kaca Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor dari bulan Januari 2003 sampai bulan Juli 2004.

Produksi kalus embriogenik

Bahan tanaman yang digunakan sebagai eksplan adalah embrio zigotik muda umur 16-19 hari yang berasal dari kedelai varietas Sindoro. Tiga ratus sembilan puluh lima embrio steril diisolasi dan dikulturkan dalam media MS tanpa zat pengatur tumbuh kemudian diradiasi dengan sinar gamma di BATAN, Jakarta dengan dosis 400 rad. Setelah diradiasi, embrio zigotik dipindahkan pada media pengkalusan M4C sampai terinduksi kalus embriogenik (Hutami *et al.*, 2001), selama 8-12 minggu di ruang kultur yang diberi cahaya fluorescen \pm 1000 lux 16 jam/hari dengan suhu 21 – 25^oC.

Seleksi populasi sel embriogenik

Populasi massa sel embriogenik diseleksi dalam botol yang berisi media M4C yang mengandung larutan PEG 6000 dengan konsentrasi 0, 10, 20 dan 30% selama 8 minggu. Masing-masing perlakuan diulang 20 populasi massa sel embriogenik. Biakan dipindahkan pada media S10 tanpa komponen seleksi sampai populasi sel beregenerasi membentuk struktur embrio somatik (Hutami *et al.*, 2001), selama 2 - 6 minggu.

Penelitian dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap dengan 20 ulangan pada setiap perlakuan.

Regenerasi sel setelah seleksi

Pendewasaan dan perkecambahan struktur embrio somatik dilakukan dengan sub kultur struktur embrio somatik yang masih hidup ke media S11 sampai struktur tersebut berkecambah membentuk plantlet (Hutami *et al.*, 2001), selama 2 – 8 minggu.

Plantlet yang berhasil berkecambah disubkultur pada media MS + IBA 5 mg/l + Sarkoal 1.5%. Plantlet dipelihara sampai memiliki daun dan akar yang sempurna (plantlet – G₀), selama 2 – 4 minggu.

Aklimatisasi

Plantlet G₀ diaklimatisasi di rumah kaca pada media tanah yang dicampur dengan kompos pada perbandingan 1:1. Untuk menjaga kelembaban lingkungan dilakukan penyungkupan sampai tanaman menjadi tegar (2-4 minggu setelah tanam).

Tanaman yang berproduksi, dipanen kemudian bijinya (G₁) ditanam kembali dan dianalisa kandungan prolinnya pada kondisi cekaman kekeringan.

Analisis kandungan prolin

Tanaman G₁ yang berumur 4 minggu diberikan perlakuan cekaman kekeringan dengan cara tanpa penyiraman selama 1 minggu. Kemudian daun ketiga dan keempat dari pucuk diisolasi dan disimpan dalam lemari es. Masing-masing daun tanaman somaklon dan asal (Sindoro - *mother plant*) ditimbang sebanyak 0.5 g, kemudian dianalisa secara kimia kandungan prolinnya dengan metode Batest *et al.* (1973). Hasil penghitungan dari masing-masing sample dibandingkan dengan prolin standar.

Bagan alir penelitian mulai dari isolasi embrio zigotik muda sampai analisis kandungan prolin ditampilkan pada Gambar 1.

HASIL DAN PEMBAHASAN

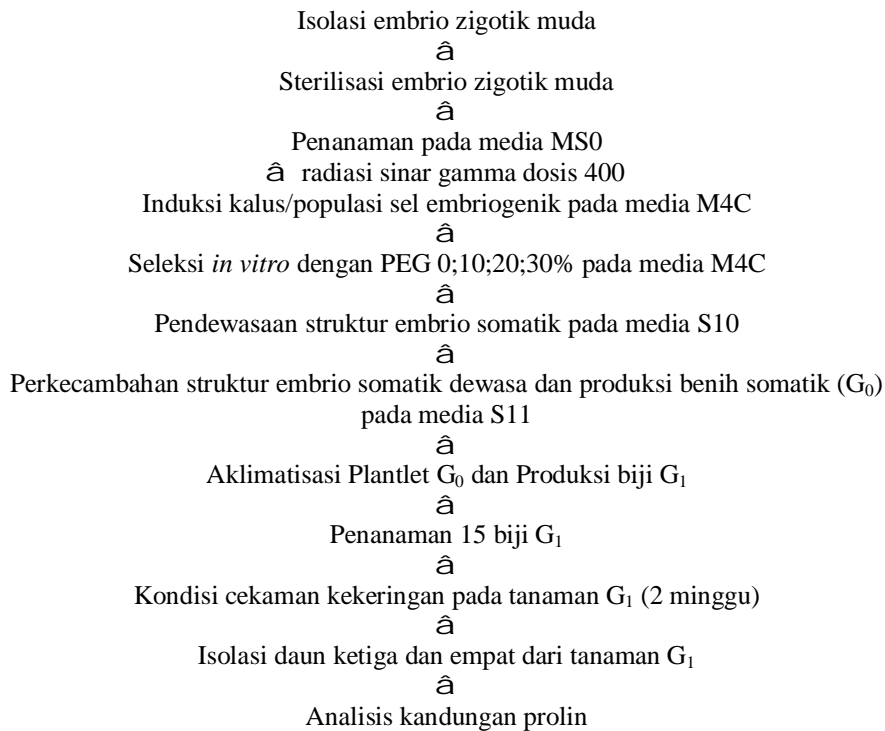
Hasil

Produksi, seleksi dan regenerasi populasi sel embriogenik

Dari hasil pengamatan 395 eksplan yang ditumbuhkan 34.9% eksplan yang steril. Eksplan yang dapat membentuk kalus sebanyak 56.5% dan menjadi kalus embriogenik 39.7%. Penampakan kalus embriogenik yang dihasilkan mempunyai struktur globular yang mengkilap dengan warna putih kehijauan.

Kalus embriogenik yang terbentuk diseleksi pada media dengan penambahan PEG. Hasil pengamatan diperoleh bahwa semakin tinggi konsentrasi PEG, semakin sedikit jumlah struktur embrio somatik yang terbentuk (Tabel 1). Pada media tanpa PEG diperoleh sebanyak 98 struktur embrio somatik dengan rata-rata 4.9 embrio/eksplan. Pada media dengan PEG 10% diperoleh sebanyak 57 struktur embrio somatik dengan rata-rata 2.85 embrio/eksplan dan 32 struktur embrio somatik pada PEG 20% dengan rata-rata 1.6 embrio/eksplan serta 12 struktur embrio somatik pada PEG 30% dengan rata-rata 0.6 embrio/eksplan.

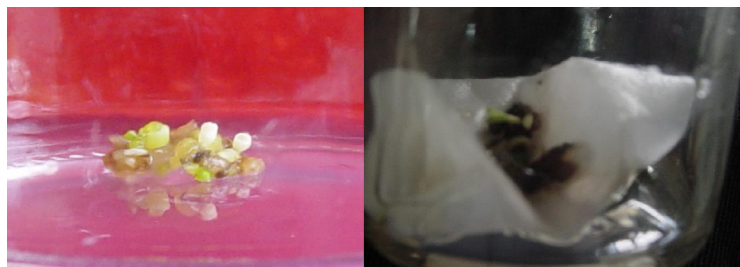
Penampakan kalus pada perlakuan cekaman kekeringan dengan PEG berwarna coklat kehitaman dan teksturnya lembek berair sementara kalus tanpa perlakuan PEG teksturnya berbentuk nodul dan berwarna hijau kekuningan (Gambar 1).



Gambar 1. Bagan alir penelitian peningkatan toleransi kedelai sindoro terhadap cekaman kekeringan melalui seleksi *In vitro*

Tabel 1. Rata-rata embrio somatik dan plantlet yang hidup setelah diseleksi dalam media seleksi (PEG) selama 2 bulan

| Konsentrasi PEG (%) | Jumlah embrio somatik/20 populasi | Rata-rata embrio somatik/eksplan | Jumlah plantlet somatik/20 populasi | Rata-rata plantlet/eksplan |
|---------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| 0 | 98 | 4.90 ± 0.89 | 79 | 3.95 ± 0.76 |
| 10 | 57 | 2.85 ± 2.67 | 35 | 1.75 ± 2.82 |
| 20 | 32 | 1.60 ± 2.83 | 29 | 1.45 ± 2.91 |
| 30 | 12 | 0.60 ± 5.91 | 15 | 0.75 ± 6.89 |



Gambar 2. Kenampakan pertumbuhan dan perkembangan kalus kedelai yang tidak diberi perlakuan stres dengan PEG dan yang diberi stres dengan PEG (a= kalus yang tidak diberi stres PEG dan b= kalus yang diberi stress PEG 20%).

Hasil pengamatan terhadap daya regenerasi sel/kalus yang toleran terhadap cekaman kekeringan akibat perlakuan PEG terlihat bahwa peningkatan konsentrasi PEG menurunkan pembentukan plantlet (Tabel 1). Penurunan kemampuan untuk menghasilkan plantlet akibat perlakuan PEG sangat tajam dibandingkan dengan tanpa perlakuan PEG. Jumlah plantlet yang dihasilkan dari perlakuan PEG 10% adalah sebanyak 35 plantlet dengan rata-rata 1.75 plantlet/ eksplan dan 29 plantlet untuk PEG 20% dengan rata-rata 1.45 plantlet/ eksplan serta 15 plantlet untuk PEG 30% dengan rata-rata 0.75 plantlet/eksplan.

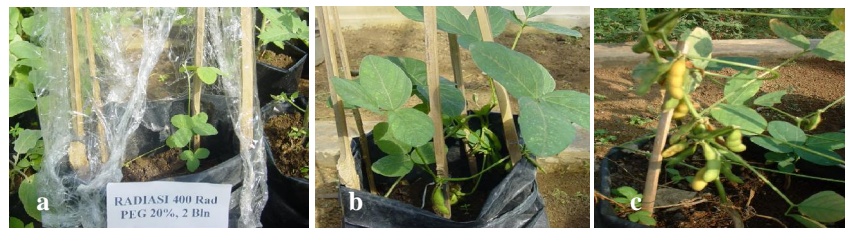
Aklimatisasi

Plantlet yang diaklimatisasi adalah embrio somatik yang berkembang secara sempurna dan diberi tanda G₀.

Jumlah plantlet yang diaklimatisasi adalah 25 plantlet dan yang berasal dari PEG 0% sebanyak 15 plantlet, PEG 10% sebanyak enam plantlet dan PEG 20% sebanyak empat plantlet. Sedangkan perlakuan PEG 30% tidak menghasilkan plantlet yang sempurna. Dari 25 plantlet yang diaklimatisasi, hanya satu plantlet yang dapat hidup setelah satu bulan aklimatisasi, yaitu dari perlakuan PEG 20% (Tabel 2). Somaklon yang hidup dipelihara dengan cara penyiraman dan pemberian pupuk sehingga dapat tumbuh dan berkembang menghasilkan polong dan biji G₁(Gambar 2). Keragaan tanaman G₀ yang diperoleh dari perlakuan PEG 20% disajikan pada Tabel 3.

Tabel 2. Persentase keberhasilan aklimatisasi plantlet, 1 bulan setelah aklimatisasi

| Konsentrasi PEG (%) | Jumlah plantlet yang diaklimatisasi | Jumlah plantlet yang hidup | %-ase plantlet yang hidup |
|---------------------|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 0 | 15 | 0 | 0 |
| 10 | 6 | 0 | 0 |
| 20 | 4 | 1 | 25 |
| 30 | 0 | 0 | 0 |



Gambar 3. Pertumbuhan dan perkembangan plantlet yang hidup setelah aklimatisasi a. 2 minggu setelah tanam b. 4 minggu setelah tanam c. 7 minggu setelah tanam

Tabel 3. Keragaan tanaman G₀ yang yang diperoleh dari perlakuan PEG 20%

| Keragaan Tanaman | Somaklon (G ₀) | Sindoro(Genotipe asal) |
|-------------------------|----------------------------|------------------------|
| Tinggi tanaman (cm) | 50.2 | 59.0 |
| Mulai berbunga (hari) | 28 | 36 |
| Jumlah polong | 19 | - |
| Biji polong | 1 – 3 | 1-3 |
| Berat kering polong (g) | 12.85 | - |
| Jumlah biji | 34 | - |
| Bobot biji (g/tanaman) | 9.80/12.85 | 12 /100 |
| Diameter biji (mm) | 0.50 – 0.62 | 0.61 |

Tabel 4. Kandungan prolin 15 galur somaklon dan varietas pembandingan yang diuji pada kondisi cekaman kekeringan

| Nomor individu G ₁ somaklon dan varietas asal | Kandungan prolin (µmol/g berat basah) |
|--|---------------------------------------|
| No.1 | 160.3 |
| No.2 | 99.2 |
| No.3 | 175.3 |
| No.4 | 1545.0 |
| No.5 | 127.6 |
| No.6 | 143.5 |
| No.7 | 155.0 |
| No.8 | 104.6 |
| No.9 | 136.9 |
| No.10 | 145.2 |
| No.11 | 175.5 |
| No.12 | 100.8 |
| No.13 | 126.9 |
| No.14 | - |
| N0.15 | 123.8 |
| Sindoro (genotipe asal) | 77.9 |

Analisa kandungan prolin

Analisis kandungan prolin tidak dilakukan pada tanaman G₀ karena hanya satu tanaman yang berhasil tumbuh dan berproduksi. Analisis kandungan prolin yang terdapat dalam daun dari 15 individu G₁ setelah diberikan perlakuan cekaman kekeringan ditampilkan pada Tabel 4. Dari Tabel tersebut dapat dilihat bahwa kandungan prolin pada semua individu G₁ lebih tinggi dibanding tanaman asalnya (Sindoro) kecuali individu No. 14 yang tidak terdeteksi. Kandungan kadar prolinnya berkisar antara 99.2 – 1545.0 µmol/g berat basah dengan peningkatan antara 1,27 – 19,83 kali. Kadar prolin paling tinggi berasal dari individu somaklon No. 4 sebanyak 1545.0 µmol/g berat basah.

Pembahasan

Produksi, Seleksi massa sel embriogenik dan regenerasinya

Rendahnya keberhasilan pembentukan kalus embriogenik disebabkan oleh rendahnya eksplan steril setelah irradiasi dan tekanan irradiasi yang dapat menyebabkan kerusakan pada jaringan eksplan serta dapat menyebabkan perubahan susunan nukleotida (Crowder, 1990).

Sesuai dengan Widoretno (2003), kalus yang diseleksi dengan PEG (0-20%) menunjukkan semakin tinggi konsentrasi PEG yang diberikan maka semakin sedikit pula jumlah struktur embrio somatik yang diperoleh. Hal ini terjadi karena pada media seleksi kekurangan atau bahkan tidak memperoleh air karena air terikat oleh PEG(>30%) dan tidak dapat dimanfaatkan oleh eksplan. Sulitnya air masuk ke dalam sel makin besar dengan meningkatnya konsentrasi PEG

yang digunakan karena semakin tinggi penurunan potensial air dalam medium (Steuer, 1981).

Kalus yang tetap hidup setelah diseleksi, diinduksi pembentukan struktur embrio somatiknya. Struktur embrio somatik yang terbentuk berasal dari sel yang toleran terhadap PEG akibat adanya perubahan sifat genetik, sedangkan sel/kalus yang mati merupakan sel yang tidak toleran terhadap PEG

Komposisi media yang digunakan sangat berpengaruh terhadap keberhasilan regenerasi. Media regenerasi S10 dan S11 adalah merupakan media yang baik digunakan untuk meregenerasikan kalus kedelai melalui jalur embriogenesis somatik setelah diperlakukan dalam kondisi cekaman A1 tinggi dan pH rendah (Mariska *et al.*, 2001).

Dari hasil pengamatan terhadap daya regenerasi sel/kalus yang toleran terhadap cekaman kekeringan akibat perlakuan PEG terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi PEG yang digunakan maka semakin sedikit jumlah plantlet yang dihasilkan (Tabel 1). Hal ini disebabkan oleh semakin tingginya penurunan potensial air akibat penambahan konsentrasi PEG. Kurangnya air tersebut menyebabkan terhambatnya pertumbuhan dan perkembangan sel/kalus embriogenik membentuk plantlet. Penurunan kemampuan untuk menghasilkan plantlet akibat perlakuan PEG sangat tajam dibandingkan dengan tanpa perlakuan PEG. Jumlah plantlet yang dihasilkan dari perlakuan PEG 10% adalah sebanyak 35 plantlet dengan rata-rata 1.75 dan 29 plantlet untuk PEG 20% dengan rata-rata 1.45 serta 15 plantlet untuk PEG 30% dengan rata-rata 0.75.

Aklimatisasi

Keberhasilan aklimatisasi akan menentukan bisa tidaknya suatu somaklon dapat diamati untuk pengujian berikutnya (Husni *et al.*, 2004). Aklimatisasi kedelai adalah tahapan yang sangat kritis dengan keberhasilan yang masih rendah, dari 25 somaklon benih somatik yang diaklimatisasi, hanya 1 benih somatik yang dapat hidup dan berproduksi, yaitu dari perlakuan PEG 25% (Tabel 2).

Analisa kandungan prolin

Prolin adalah asam amino yang proporsinya dapat bertambah lebih cepat dari pada asam amino lainnya dalam jaringan tanaman pada kondisi kekeringan. Dengan demikian tinggi rendahnya kadar prolin dalam jaringan tanaman dapat digunakan untuk mengevaluasi tingkat toleransi galur, varietas atau somaklon terhadap kekeringan (Bates *et al.*, 1973).

Liu *et al.* (1987) mengatakan bahwa kemampuan mengakumulasi prolin bebas pada varietas yang toleran kering selama kondisi cekaman kekeringan sangat nyata dibandingkan dengan varietas peka. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa kandungan prolin yang tinggi dapat dijadikan sebagai kriteria seleksi toleransi terhadap kekeringan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan prolin semua individu G1 dari somaklon yang dihasilkan lebih tinggi dari tanaman asal (Sindoro). Kandungan prolinnya meningkat antara 1.27-19.83 kali. Dari hasil ini terlihat bahwa metoda seleksi *in vitro* dapat meningkatkan toleransi kedelai terhadap kekeringan yang ditunjukkan oleh kandungan prolin dari somaklon lebih tinggi daripada tanaman asalnya.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Seleksi *in vitro* dengan penambahan PEG 20% dapat digunakan sebagai metode seleksi untuk toleransi kekeringan pada kedelai
2. Galur-galur somaklon yang berasal dari media dengan PEG 20%, memiliki kandungan prolin lebih tinggi daripada tanaman asalnya pada perlakuan cekaman kekeringan. Kandungan prolin dari galur-galur somaklonal berkisar dari 99.2 hingga 1545.0 $\mu\text{mol/g}$ berat basah atau dengan peningkatan 1.27-19.83 kali dibandingkan tanaman asalnya.
3. Perlakuan radiasi terhadap embrio zigotik dan seleksi *in vitro* dengan PEG 20% dapat meningkatkan sifat toleransi terhadap cekaman kekeringan berdasarkan kandungan prolin.

DAFTAR PUSTAKA

- Arsyad, D. M. 2004. Potensi Sumberdaya dan Inovasi Teknologi Mendukung Pengembangan Kedelai di Lahan Kering. Makalah dalam Seminar Puslit-bangtan. Bogor, 16 h.
- Bates, L.S., R.P. Waldren, I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline water stress studies. *Plant Soil* 39:205-207.
- Crowder, L.V. 1990. Genetika Tumbuhan. Universitas Gajah Mada Press. 70 hal.
- Husni, A., S. Hutami, M. Kosmiatin, I. Mariska. 2004. Seleksi *in vitro* tanaman kedelai untuk meningkatkan sifat toleran kekeringan. *Jurnal Penelitian Pertanian*. 23(2):93-100.
- Hutami, S. I. Mariska, M. Kosmiatatin, A. Husni, W.H. Adil, Y. Rusyadi. 2001. Regenerasi dan seleksi *In vitro* tanaman kedelai untuk mendapatkan sifat ketahanan terhadap aluminium pada tanaman kedelai. Laporan Hasil Penelitian. Balitbio. Bogor. 12 hal
- Jayasankar, S., R.E. Litz, R. J. Schnell, A. Cruz-Hernandez. 1998. Embryogenic mango cultures selected for resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* culture filtrate show variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *In Vitro Cell. Dev Biol-Plant* 34:112-116.
- Jayasankar, S., Z. Li, D.J. Gray. 2001. *In-vitro* selection of *Vitis vinifera* "Chardonnay" with *Elsinoe ampelina* culture filtrate is accompanied by fungal resistance enhanced secretion of chitinase. *Planta* 211:200-208.
- Krizek, D.T. 1985. Methods of inducing water stress in plant. *Hort. Sci.*(20):1028-1038.
- Lawyer, D.W. 1970. Absorption of polyethylene glycol by plants the effect on plant growth. *New Physiol.*(69):501-513.
- Liu, W.F., S.T. Ho, Y.H. Chen, W.S. Chen. 1987. Relationship between free proline accumulation in leaves and yields of sugarcane varieties under drought. *Plant Growth Regulation* 20:157-166.
- Mariska, I., S. Hutami, D. Sopandie, E. Syamsudin, A. Husni, M. Kosmiatin, V. Arief. 2001. Peningkatan ketahanan terhadap aluminium pada pertanaman kedelai melalui kultur *in vitro*. Laporan Riset Unggulan Terpadu VIII. Kantor Menteri Riset dan Teknologi dan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. 27 hal.

- Salisbury, F. B., C.W. Ross. 1992. Plant Physiology. Wadsworth Publishing Company. California. 562 p.
- Short, K.C., I. Warburton, A.V. Roberts. 1987. In vitro hardening of cultures cauliflower and chrysanthemum plantlets to humidity. Acta Hor.(2120):324-329
- Steur, A.A. 1981. Water potential of aqueous polyethylene glycol. Plant Physiol 67:18-21.
- Widoretno, W. 2003. Seleksi *in vitro* untuk toleransi terhadap cekaman kekeringan pada kedelai (*Glycine max* (L) Merr.) dan karakterisasi varian somaklonal yang toleran. Disertasi Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Witjaksono, R.E. Litz. 2003. In vitro regeneration and transformation of avocado (*Persea Americana* Mill.). In: Jaiwal P.K. and R.P. Singh (eds.) Plant Genetic Engineering (6): Improvement of fruit crops. Sci. Tech Publishing LLC, USA. Pp. 145-161.