

**EFEKTIVITAS POLIETILENA GLIKOL DAN MANITOL SEBAGAI AGENS  
PENYELEKSI IN VITRO UNTUK CEKAMAN KEKERINGAN  
TERHADAP PERTUMBUHAN EMBRIO SOMATIK KACANG TANAH**

***EFFECTIVENESS OF POLYETHYLENE GLYCOL AND MANITOL AS IN VITRO  
SELECTIVE AGENS FOR DROUGHT STRESS AGAINST PEANUT SOMATIC EMBRYO GROWTH***

**Sumarjan dan A. Farid Hemon<sup>1)</sup>**

<sup>1)</sup> Dosen Program Studi Pemuliaan Tanaman, Fakultas Pertanian Universitas Mataram

**ABSTRAK**

Penggunaan seleksi in vitro merupakan alternatif untuk mendapatkan tanaman toleran cekaman kekeringan. Seleksi in vitro dapat dilakukan dengan menggunakan polietilena glikol (PEG) atau manitol sebagai *selective agent* untuk mengidentifikasi sel atau jaringan tanaman kacang tanah yang insensitif karena PEG atau manitol. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh polietilena glikol (PEG) atau manitol terhadap pertumbuhan embrio somatik kacang tanah. Kalus embriogen dan ES kacang tanah diseleksi pada media selektif MS dengan penambahan agens penyeleksi polietilena glikol (0, 10, 15, 20 %) dan manitol (0, 1, 3, 5%). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan embrio somatik kacang tanah bervariasi tergantung konsentrasi PEG dan manitol yang digunakan. Semakin tinggi konsentrasi agens penyeleksi, semakin terhambat pertumbuhan ES.

Kata Kunci : embrio somatik, polyetilena glikol, manitol

**ABSTRACT**

*Using of somaclonal variation method that followed in vitro selection at plant breeding program could be used as alternative method to create drought tolerant plant. In- vitro selection could be done with apply polyethylene glycol (PEG) or manitol as selective agent to identify peanut plant cell/tissue that insensitive to selective medium containing PEG or manitol. Objective of this research was to know effectiveness of polyethylene glycol and manitol as in vitro selective agents for drought stress against peanut somatic embryo growth. The experiment was initiated with induction of somaclonal variation in MS medium containing picloram 16  $\mu$ M. Medium of MS-P16 that added PEG (0, 10, 15, 20%) and manitol (0, 1, 3, 5%) was used as selective agent for drought stress. Embriogenic calli were placed on PEG and manitol medium during two. Results of the experiment showed somatic embryos (SE) growth in selective medium depended on PEG and manitol concentration. The higher concentration selective agent would be more inhibit SE growth.*

*Keywords : somatic embryo (SE), polyethylene glycol, manitol*

**PENDAHULUAN**

Penggunaan teknik variasi somaklonal yang diikuti dengan seleksi in vitro dalam program pemuliaan tanaman dapat digunakan sebagai alternatif untuk mendapatkan tanaman toleran cekaman kekeringan (Mohamed, Harris, dan Henderson. 2000). Kultur in vitro dapat menginduksi variasi somaklonal dan penggunaan seleksi in vitro pada tingkat sel dan jaringan dengan agens penyeleksi diharapkan dapat diperoleh karakter yang diinginkan (Jain 2001).

Seleksi in vitro dapat dilakukan dengan menggunakan polietilena glikol (PEG) atau manitol

sebagai *selective agent* untuk mengidentifikasi sel atau jaringan tanaman kacang tanah yang tidak mati karena PEG atau manitol. Senyawa ini merupakan senyawa osmotikum untuk perlakuan cekaman air pada tanaman (va der Weele, Spollen, Sharp, dan Baskin, 2000). Polietilena glikol dan manitol dapat menurunkan potensial air dan dapat ditambahkan dalam media untuk seleksi in vitro. Penggunaan larutan PEG atau manitol diharapkan untuk mendapatkan tekanan seleksi yang homogen sehingga kesalahan identifikasi individu yang peka sebagai toleran cekaman kekeringan dapat dihindari.

Efektivitas seleksi in vitro ditentukan dengan keberhasilan menghambat pertumbuhan sel/jaringan normal yang tidak diinginkan dan memproliferasikan sel/jaringan varian yang diinginkan menggunakan agens penyeleksi (*selective agents*) tertentu. Seleksi in vitro dengan menggunakan media selektif polietilena glikol (PEG) telah dilakukan untuk mengembangkan galur yang toleran cekaman kekeringan (Rahayu, Guhardja, Ilyas, dan Sudarsono, 2005; Widoretno, Guhardja, Ilyas, dan Sudarsono, 2003a). Dalam penelitian tersebut, seleksi in vitro hanya dilakukan terhadap embrio somatik (ES) dalam media selektif yang mengandung PEG 15%. Sebagian besar tanaman kedelai hasil seleksi in vitro dengan PEG atau kacang tanah masih peka terhadap cekaman kekeringan (Widoretno, Harran, dan Sudarsono 2003b). Diduga kondisi selektif yang digunakan belum cukup efektif untuk menghambat sel/jaringan normal dan memproliferasikan sel/jaringan varian.

Penggunaan *selective agents* dan letal dosis tertentu diduga berpengaruh terhadap efektivitas seleksi in vitro. Penggunaan agens penyeleksi PEG dan manitol dan letal dosis yang lebih tinggi diharapkan lebih efektif untuk mengidentifikasi sel/jaringan varian.

Konsentrasi agens penyeleksi mempengaruhi identifikasi sel/jaringan varian. Konsentrasi yang terlalu rendah akan sulit mengidentifikasi sel/jaringan varian. Sedangkan konsentrasi yang terlalu tinggi akan menghilangkan sel/jaringan varian karena tidak mampu untuk hidup (Widoretno *et al.* 2003a).

Kemampuan PEG dan manitol untuk memberikan potensial air yang negatif dapat berfungsi sebagai bahan tapisan untuk menduga respon jaringan yang ditanam terhadap cekaman kekeringan. Efektivitas metode penapisan yang digunakan tergantung kepada kemampuan metodenya untuk mengelompokkan genotipe tanaman dalam kelompok toleran dan peka (El-Sahed dan Kirkwood, 1992). Pada kultur suspensi sel kedelai, perlakuan stres air dalam media in vitro menyebabkan terjadinya penurunan bobot basah dan bobot kering sel yang ditanam. Menurut Nabors dan Dykes (1985), media tumbuh yang digunakan untuk seleksi in vitro sebaiknya mempunyai tekanan seleksi pada tingkat sub-letal, yaitu tekanan seleksi yang dapat membatasi pertumbuhan jaringan yang ditanam hingga mencapai lebih dari 95%. Penentuan konsentrasi sub-letal penting dilakukan untuk mencegah terjadinya adaptasi dari sel atau jaringan yang diseleksi dan untuk mempertahankan agar sel yang toleran tetap hidup dan berkembang. Berdasarkan uraian tersebut, maka penelitian ini dilaksanakan untuk mengetahui efektivitas agens

penyeleksi PEG dan manitol terhadap pertumbuhan embrio somatik kacang tanah.

## METODE PENELITIAN

### Induksi populasi varian somaklonal embrio somatik (ES)

Induksi ES perlu dilakukan sebelum kegiatan seleksi in vitro dapat dilaksanakan. Hal ini perlu dilakukan mengingat seleksi in vitro akan dilakukan pada jaringan tanaman kacang tanah yang bersifat embriogenik (mampu membentuk embrio somatik).

Media induksi terdiri atas media dasar MS (Murashige dan Skoog, 1962), vitamin B5 (Gamborg, Miller, dan Ojima, 1968), gula sukrosa (30 g/L), agar-agar (8 g/L), dan zat pengatur tumbuh (auxin 16-20  $\mu$ M). Media diatur dengan pH 5,6 sebelum sterilisasi. Media yang telah disiapkan disterilkan dengan pemanasan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 20 menit. Setelah didinginkan, media regenerasi yang dibuat siap digunakan.

Benih kacang tanah disterilkan dengan perendaman dalam larutan NaOCl (*Clorox*) 25% selama 20 menit. Poros embrio diisolasi dari benih kacang tanah yang telah disterilkan dan digunakan sebagai sumber eksplan.

Penanaman eksplan yang telah disiapkan ditanam dalam media induksi di dalam ruang tanam (*transfer box*) steril. Penanaman eksplan dilakukan dengan jumlah eksplan/botol untuk eksplan leaflet dan 5 eksplan per botol untuk embrio aksis.

Setiap empat minggu sekali eksplan yang ditanam dipindahkan ke media regenerasi yang masih segar untuk menjamin tersedianya nutrisi yang diperlukan bagi perkembangan jaringan eksplan. Sub-kultur eksplan dilakukan terus menerus sampai dengan terbentuknya embrio somatik primer dari leaflet dan poros embrio.

Induksi ES sekunder merupakan bahan tanaman yang sangat efektif untuk kegiatan induksi variasi somaklonal dan seleksi in vitro. Dengan ES sekunder, regenerasi sejumlah besar populasi ES akan lebih mudah dilakukan dibandingkan dengan ES primer. Selain itu, karena ES sekunder biasanya telah lebih lama ada dalam kultur in vitro biasanya juga akan lebih banyak mengalami variasi somaklonal dibandingkan dengan ES primer. Untuk itu, induksi pembentukan embrio somatik sekunder perlu untuk dilakukan. Pembentukan ES sekunder dapat dilakukan dengan menanam ES primer dalam media regenerasi.

Kalus embriogenik dan embrio somatik sekunder yang didapat selanjutnya diisolasi dan

ditanam kembali dalam media induksi yang masih segar selama beberapa periode sub-kultur. Penanaman kalus embriogenik dan embrio somatik sekunder selama beberapa periode sub-kultur dilakukan dengan tujuan untuk menginduksi terjadinya variasi somaklonal diantara populasi embrio somatik sekunder yang didapat. Periode sub-kultur yang lebih lama akan menghasilkan frekuensi terjadinya variasi somaklonal yang lebih tinggi lagi sehingga sebagian dari kalus embriogenik dan embrio somatik sekunder akan tetap disub-kultur dalam media regenerasi untuk tujuan memperbesar frekuensi terjadinya variasi somaklonal.

### Seleksi *in vitro* populasi ES untuk mengidentifikasi ES insensitif PEG dan manitol

Perlakuan PEG dan manitol dalam media *in vitro* dapat menghambat pembentukan embrio somatik dari kalus embriogenik dan dalam waktu yang lama akan mematikan sel/jaringan tanaman yang dikulturkan. Pada konsentrasi tersebut, sebagian kecil dari eksplan yang dikulturkan mampu membentuk satu atau dua tonjolan jaringan yang tetap hidup diantara jaringan yang mati. Secara bertahap jaringan yang tidak mati selanjutnya akan berkembang menjadi ES.

PEG yang digunakan adalah dengan berat molekul 6000. Konsentrasi PEG yang digunakan adalah 0, 10, 15, 20% (Mexal, Fisher, Osteryoung, dan.. Patric 1975; Rahayu *et al.* 2007) dan manitol 0, 1, 3, 5% (Gulati dan Jaiwal 1993; Gangopadhyay, 1998). Media selektif yang mengandung PEG atau manitol untuk kegiatan seleksi *in vitro* disiapkan sebagaimana penyiapan media induksi pembentukan embrio somatik. Dalam hal ini, untuk membuat media selektif selain komponen yang diperlukan untuk membuat media induksi juga ditambahkan PEG atau manitol yang telah disiapkan sebelumnya dengan konsentrasi seperti di atas.

Kalus embriogenik dan embrio somatik sekunder yang telah disub-kultur selama beberapa

periode sub-kultur dan diduga telah mengalami proses induksi variasi somaklonal digunakan sebagai eksplan dalam percobaan ini. Kalus embriogenik dan embrio somatik yang didapat ditanam dalam media selektif sebanyak 5 eksplan per botol. Untuk mencegah agar eksplan yang ditanam tidak tenggelam, busa dan satu lapis kertas saring diletakkan dalam media cair selektif dan eksplan yang ditanam ditebarkan di atas kertas saring.

Eksplan yang telah ditanam dalam media selektif disub-kultur dalam media selektif yang sama, yang masih segar setiap empat minggu sekali. Selanjutnya, embrio somatik sekunder yang mampu berkembang dalam media selektif disubkultur kembali ke media selektif sebanyak dua kali sebelum penentuan dan isolasi embrio somatik yang toleran dilakukan. Dari penelitian sebelumnya telah diketahui bahwa jika embrio somatik sekunder mampu bertahan melewati dua kali sub-kultur dalam media selektif kemungkinan akan menjadi toleran terhadap kekeringan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Induksi populasi varian somaklonal embrio somatik (ES)

Induksi embrio somatik primer dapat dilakukan dengan menggunakan eksplan leaflet embrio biji matang yang dikulturkan dalam media induksi yang mengandung pikloram 16  $\mu\text{M}$  setelah 8 minggu. Pertumbuhan ES diawali dari pertumbuhan kalus yang berwarna putih kecoklatan atau disebut kalus embriogenik. Perubahan pertumbuhan dari eksplan membentuk kalus terjadi pada umur 3 minggu sampai 4 minggu. Pada permukaan kalus tumbuh ES fase globular, hati atau torpedo. Embrio somatik primer diperlukan untuk proses induksi pembentukan embrio somatik sekunder.



Gambar 1. Pembentukan kalus dan embrio somatik. (A) Permukaan kalus tumbuh ES, (B) Embrio somatik fase globular, dan (C) Embrio somatik fase torpedo  
(Figure 1. Calli and somatic embryos(SE) formation. (A) Calli surface grew SE, (B) SE globular, and SE torpedo)

Pembentukan ES sekunder sangat dipengaruhi oleh tingkatan perkembangan ES yang digunakan sebagai eksplan. Biasanya ES pada fase globular mempunyai kemampuan membentuk ES sekunder yang lebih baik dibandingkan dengan ES pada fase perkembangan lanjut. Eksplan ES primer fase globular berpoliferasi untuk membentuk ES sekunder. Induksi ES sekunder berlangsung pada media yang sama dengan untuk induksi ES primer yaitu media yang mengandung 16  $\mu$ M pikloram. Auksin pikloran merupakan auksin untuk menginduksi pembentukan embrio somatik. Induksi embrio somatik ini sebelumnya telah dilakukan oleh Edy (1998) dan penelitian Yusnita, Widodo, dan Sudarsono (2005) menunjukkan bahwa kacang tanah hasil kultur *in vitro* dalam media yang mengandung pikloram menghasilkan embrio somatik kacang tanah. Faktor yang ikut menyebabkan terjadinya variasi somaklonal yaitu genotipe tanaman donor (Rietvald *et al.* 1993), jenis dan konsentrasi auksin (Jain 2000), jenis kultur (Ladyzynski *et al.* 2002), dan umur kultur (Muller, Brown, Hartke, dan Lorz 1990 ; Morrish *et al.* 1990). Frekuensi terjadinya varian paling tinggi terdapat pada kultur protoplas dan kalus daun.

### Seleksi *in vitro* untuk mengidentifikasi embrio somatik toleran PEG

Embrio somatik yang telah disubkultur selama 4 kali (umur kultur 4 bulan) dikulturkan kembali dalam media selektif yang mengandung PEG 6000 dalam berbagai konsentrasi 0, 10, 15 dan 20%. Embrio somatik sekunder berada dalam media selektif selama dua bulan dan tiap bulan dikultur pada media selektif yang segar.

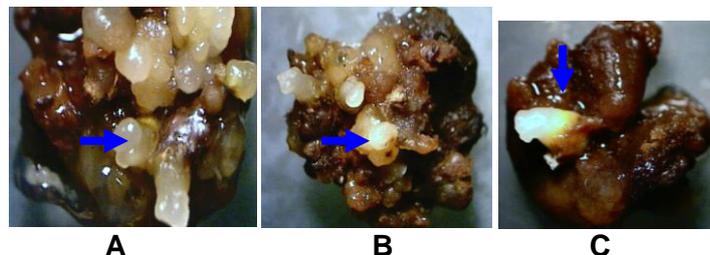
Hasil pengamatan setelah 1 bulan dalam media selektif PEG menunjukkan bahwa ES terhambat pertumbuhannya pada berbagai konsentrasi media selektif PEG. Meningkatnya konsentrasi PEG dalam media selektif menyebabkan juga peningkatan penghambatan pertumbuhan ES (Tabel 1). Pada perlakuan kontrol (PEG 0%) tidak terjadi penghambatan dan pertumbuhan eksplan membentuk ES berkisar 95-98%. Penghambatan pertumbuhan ditandai dengan eksplan menjadi coklat kehitam-hitaman dan yang tidak tahan akan mati. Persentase penurunan pertumbuhan ES yang terbesar terjadi pada media selektif PEG 15% dan 20%. Konsentrasi PEG 15% dan 20% menyebabkan penurunan persentase ES berturut-turut 96,9% dan 86,9%.

Tabel 1. Pertumbuhan embrio somatik kacang tanah dalam media selektif dengan penambahan berbagai konsentrasi PEG

(Table 1. Growth of peanut somatic embryo on selective medium containing different PEG concentration)

| Konsentrasi PEG (%) | Pertumbuhan ES     |                   |          |              |
|---------------------|--------------------|-------------------|----------|--------------|
|                     | Proliferasi ES (%) | Jumlah ES/eksplan | Total ES | PP total ES* |
| 0                   | 98 a               | 10.2 a            | 56.0 a   | 0            |
| 10                  | 78 b               | 5.6 b             | 25.0 b   | 55,4         |
| 15                  | 56 c               | 3.6 c             | 8,3 c    | 86,9         |
| 20                  | 20 d               | 1.2 d             | 1,7 d    | 96,9         |

\*Persentase penurunan (PP) total ES dihitung dengan persamaan  $PP = [(X_0 - X_t) / X_0] * 100\%$ .  $X_0$  adalah total ES pada media tanpa PEG dan  $X_t$  – total ES untuk masing-masing konsentrasi PEG. Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada peubah pengamatan, tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada  $\alpha = 5\%$ .



Gambar 2. Respons pertumbuhan ES dalam media selektif PEG (➡ = ES toleran). (A) PEG 10% (B) PEG 15% dan (C) PEG 20%

(Figure 2. Somatic embryo growth on selective medium containing PEG (➡ = tolerant SE). (A) PEG 10% (B) PEG 15% dan (C) PEG 20%)

Pada sebagian eksplan yang lain, diantara jaringan yang mati masih ada jaringan yang berkembang membentuk struktur embrio somatik atau kalus embriogen yang berwarna putih kekuningan (Gambar 1). Kalus embriogen dan embrio somatik yang masih hidup ini diduga telah berkembang dari sel/jaringan varian yang dapat hidup dalam kondisi selektif akibat penambahan PEG.

Potensial osmotik media tumbuh merupakan faktor penting yang berpengaruh terhadap proses pembentukan embrio somatik dalam kultur in vitro. Penurunan potensial air media karena penambahan PEG menyebabkan menurunnya proliferasi jaringan eksplan, pertumbuhan dan regenerasi tunas (Kong *et al.* 1998; Tewary *et al.* 2000). Keadaan tersebut terjadi antara lain diduga karena perlakuan PEG dapat mempengaruhi kandungan poliamin endogen. Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa poliamin berperan penting dalam proses morfogenesis dari sel tanaman yang ditanam secara in vitro, antara lain dalam proses pembentukan embrio somatik pada tanaman *Picea glauca* (Kong *et al.* 1998).

#### Seleksi in vitro untuk mengidentifikasi embrio somatik toleran Manitol

Embrio somatik yang telah disubkultur selama 4 kali (umur kultur 4 bulan) dikulturkan

kembali dalam media selektif yang mengandung manitol dalam berbagai konsentrasi 0, 1, 3 dan 5%. Embrio somatik sekunder yang diamati berada dalam media selektif selama satu bulan.

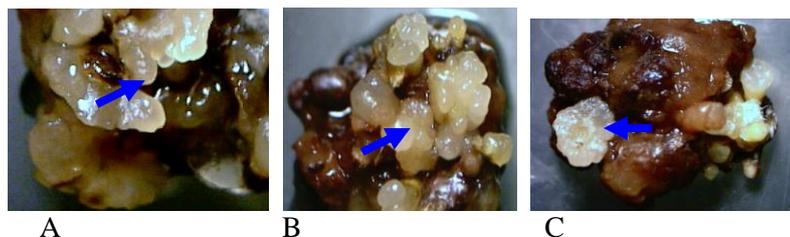
Semakin tinggi konsentrasi manitol menyebabkan pula terjadi penghambatan pertumbuhan ES. Konsentrasi manitol 5% menyebabkan kematian embrio somatik lebih banyak dibanding dengan konsentrasi 1 dan 3%. Penghambatan pertumbuhan eksplan sama seperti pada media selektif yang mengandung PEG. Pada bagian eksplan yang diseleksi dalam media manitol menunjukkan gejala coklat kehitam-hitaman. Pada sebagian eksplan yang lain, diantara jaringan yang mati masih ada jaringan yang berkembang membentuk struktur embrio somatik atau kalus embriogen yang berwarna putih kekuningan (Gambar 2).

Pertumbuhan ES kacang tanah dipengaruhi secara nyata konsentrasi manitol. Embrio somatik kacang tanah yang diseleksi pada media selektif yang mengandung manitol 5% menghasilkan persentase proliferasi ES, rataan ES per eksplan, total ES yang lebih sedikit dan persentase penurunan total ES yang lebih besar dibanding yang hanya diseleksi pada konsentrasi rendah (Tabel 2).

Tabel 2. Pertumbuhan ES kacang tanah dalam media dengan berbagai konsentrasi manitol  
(Table 2. Growth of peanut somatic embryo on selective medium containing different manitol concentration)

| Konsentrasi Manitol (%) | Pertumbuhan Embrio Somatik |                   |          |              |
|-------------------------|----------------------------|-------------------|----------|--------------|
|                         | Proliferasi ES (%)         | Rataan ES/eksplan | Total ES | PP total ES* |
| 0                       | 100 a                      | 14.5 a            | 58.5 a   | 0            |
| 1                       | 81,4 b                     | 6,9 b             | 30.2 b   | 48,4         |
| 3                       | 65,4 c                     | 3,6 c             | 14.2 c   | 75,7         |
| 5                       | 36.5 d                     | 2,1 d             | 2.4 d    | 95.8         |

\* Persentase penurunan (PP) total ES dihitung dengan persamaan  $PP = [(X_0 - X_t) / X_0] * 100\%$ .  $X_0$  adalah total ES pada media tanpa manitol (0%) dan  $X_t$  – total ES dalam media dengan penambahan agens penyeleksi (manitol 3, 5%). Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada masing-masing peubah tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak Duncan pada  $\alpha = 5\%$ .



Gambar 3. Respons pertumbuhan ES dalam media selektif manitol ( → = ES toleran). (A) Manitol 1% (B) Manitol 3% dan (C) Manitol 5%

(Figure 3. Somatic embryo growth on selective medium containing manitol ( → = SE tolerant (A) Manitol 1% (B) Manitol 3% and (C) Manitol 5%)

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Populasi variasi somaklonal embrio somatik dapat diinduksi dengan menggunakan eksplan *leaflet* embrio biji kacang tanah. Eksplan *leaflet* dalam media MS yang ditambah auksin pikloram akan membentuk embrio somatik primer dan embrio somatik sekunder.
2. Pada pengamatan satu bulan dalam media selektif, ternyata pertumbuhan embrio somatik kacang tanah bervariasi tergantung konsentrasi PEG dan manitol yang digunakan. Semakin tinggi konsentrasi agens penyeleksi, semakin terhambat pertumbuhan ES.

## DAFTAR PUSTAKA

- Edy A. 1998. Induksi embrio somatik dan eksplan poros embrio pada beberapa kultivar kacang tanah secara *in vitro*. Thesis Magister Program Pasca Sarjana, IPB Bogor.
- El-Sahed H, Kirkwood RC. 1992. Response of adapted and unadapted soybean cell suspension cultures to water stress. *Phyton-Hom* 32: 263-275.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158
- Gangopadhyay G, Basu S, Gupta S. 1997. *In vitro* selection and physiological characterization of NaCl and manitol-addapted callus lines in *Brassica juncea*. *Plant Cell, Tiss. Org Cilt.* 50:151-158
- Gulati A, Jaiwal PK. 1993. Selection and characterization of manitol-toleran callus lines of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 34: 3-41.
- Jain SM. 2000. Mechanisms of spontaneous and induced mutations in plant. *Radiation Res. Vol. 2. Cong. Proc.* p. 255-258.
- Jain SM. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118 :153-156.
- Kong L, Attree SM, Fowke LC. 1998. Effect of polyethylene glycol and methylglyoxal bis (guanylhydrazone) on endogenous polyamine levels and somatic embryo maturation in white spruce (*Picea glauca*). *Plant Sci.* 133:211-220.
- Ladyzynski M, Burza W, Malepszy S. 2002. Relationship between somaclonal variation and type of culture in cucumber. *Euphytica* 125:349-356.
- Mexal J, Fisher JT, Osteryoung J, Patric RCP 1975. Oxygen availability in polyethylene glycol solution and its implications in plant-water relation. *Plant Physiol.* 55: 20-24.
- Mohamed MAH, Harris PJC, Henderson J. 2000. *In vitro* selection and characterisation of a drought tolerant clone of *Tagetes minuta*. *Plant Sci.* 159:213-222.
- Morrish FM, Hanna WW, Vasil IK. 1990. The expression and perpetuation of inherent somatic variation in regenerants from embryogenic cultures of *Pennisetum glaucum* L. *Theor. Appl. Genet.* 80:409-416.
- Muller E, Brown PTH, Hartke S, Lorz H. 1990. DNA variation in tissue culture derived rice plants. *Theor. Appl. Genet.* 80:637-679.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised media for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-493.
- Nabors MW, Dykes TA 1985. Tissue culture of cereal cultivar with increased salt, drought, and acid tolerance. *Biotechnology in International Agricultural research. Didalam : Proceeding of the Inter-Center Seminar on International Agricultural Research Center & Biotechnology* 23-27 April 1984.
- Rahayu ES, Guhardja E, Ilyas S, Sudarsono. 2007. Seleksi *in vitro* embrio somatik kacang tanah pada media dengan polietilena glikol untuk mensimulasikan cekaman kekeringan. *Majalah Ilmiah Biologi BIOSFERA.*
- Rietvald RC, Bressan RA, Hasegawa PM. 1993. Somaclonal variation in tuber disc.- derived population of potato. Differential effect of genotype. *Theor. Appl. Genet.* 87:305-313.
- Tewary PK, Sharma A, Raghunath MK, Sarkar A. 2000. *In vitro* response of promising mulberry (*Morus sp.*) genotypes for tolerance to salt and osmotic stresses. *Plant Growth Reg* 30:17-21.
- va der Weele CM, Spollen WG, Sharp RE, Baskin TI. 2000. Growth of *Arabidopsis thaliana* seedling under water deficit by control of water potential in nutrient-agar media. *J. Exp. Bot.* 51:1555-1562.

- Widoretno W, Guhardja E, Ilyas S, Sudarsono. 2003a. Reaksi embrio somatik kedelai terhadap polietilena glikol dan penggunaannya untuk seleksi in vitro terhadap cekaman kekeringan. *Hayati* 10:134 -139.
- Widoretno W, Harran S, Sudarsono. 2003b. Keragaman karakter kualitatif dan kuantitatif pada populasi tanaman somaklon kedelai dari embrio somatik hasil seleksi in vitro. *Hayati* 10:110-117
- Yusnita, Widodo, Sudarsono. 2005. In vitro selection of peanut somatic embryos on medium containing cultur filtrate of *S. rolfsii* and plantlet regeneration. *Hayati* 12:50-56.