

INDUKSI MUTASI DENGAN IRADIASI SINAR GAMMA DAN SELEKSI IN VITRO UNTUK IDENTIFIKASI EMBRIO SOMATIK KACANG TANAH CV. LOKAL BIMA YANG TOLERAN PADA MEDIA POLIETILENA GLIKOL

INDUCTION MUTATION WITH GAMMA RAY IRRADIATION AND IN VITRO SELECTION OF PEANUT SOMATIC EMBRYO, CV LOCAL BIMA THAT POLYETHYLENE GLYCOL TOLERANT

A. Farid Hemon

Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Mataram
Korespondensi: email: faridhemon_1963@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas sinar Gamma untuk meningkatkan frekuensi diperolehnya embrio somatik (ES) kacang tanah cv. Lokal Bima yang toleran terhadap cekaman larutan polietilena glikol (PEG). Percobaan diawali dengan menginduksi ES kacang tanah. Induksi mutasi dengan sinar Gamma dilakukan pada kultur ES. Embrio somatik yang telah diiradiasi dengan sinar Gamma diseleksi dalam media yang mengandung PEG 15%. Hasil penelitian yang diperoleh adalah 1) dosis sinar Gamma berpengaruh terhadap pertumbuhan ES kacang tanah. Penggunaan dosis sinar Gamma 15 Gy memberikan pertumbuhan ES yang lebih baik dibanding dosis yang lebih tinggi, 2) Kalus embriogenik yang diiradiasi dengan dosis sinar Gamma 15 Gy dan 20 Gy menghasilkan proliferasi ES, jumlah ES per eksplant, dan total ES yang lebih tinggi ketika diseleksi dalam media yang mengandung PEG 15%. Pertumbuhan ES pada kalus embriogenik yang tidak disinari dengan sinar Gamma dan dosis sinar Gamma 25 Gy lebih rendah ketika diseleksi dalam media yang mengandung PEG 15%.

Kata kunci: embrio somatik, mutasi, sinar Gamma

ABSTRACT

The objective of this experiment was to evaluate effectiveness of Gamma ray to increase the frequency of obtaining polyethylene glycol (PEG) insensitive somatic embryos (SE) from peanut cv. Local Bima. The experiment was initiated with induction of peanut SE followed by induction mutation with Gamma ray on SE culture. Somatic embryos that had been irradiated with Gamma ray were selected in medium containing 15% of PEG 6000. The results of experiment show that: 1) Gamma ray irradiation influenced the growth of SE. Irradiation with the dosage of 15Gy resulted in better SE growth than higher dosages, 2) Embriogenic calli irradiated with 15 and 20 Gy of Gamma ray demonstrated higher number of total SE when selected in medium containing 15% of PEG 6000, and 3) lower SE growth occurred on SE calli without irradiation or with 25 Gy Gamma irradiation.

Key words: somatic embryo, mutation, Gamma ray

PENDAHULUAN

Salah satu program pemuliaan tanaman kacang tanah adalah meningkatkan keanekaragaman genetik. Plasma nutfah kacang tanah di Indonesia sangat terbatas dibanding jenis tanaman lain. Upaya yang mungkin dilakukan untuk memperluas variasi genetik tanaman adalah hibridisasi, mutagenesis, dan induksi variasi somaklonal dalam kultur in vitro (Pattee dan Stalker, 1995).

Induksi mutasi dapat terjadi secara alamiah atau melalui teknik kimia atau fisik. Induksi mutasi secara kimia atau fisik dapat memperluas keragaman genetik tanaman melalui perubahan susunan gen yang berasal dari tanaman itu sendiri. Mutasi spontan (alamiah) tidak mampu memberikan keragaman genetik secara cepat dan akurat. Oleh karena itu, metode untuk menginduksi mutasi merupakan masalah yang penting untuk diketahui dalam upaya perbaikan tanaman dan meningkatkan produktivitas tanaman (Ahloowalia dan Maluszynsky, 2001).

Kultivar kacang tanah yang biasa ditanam di daerah ini adalah cv. Lokal Bima. Penanamannya dilakukan setelah padi yaitu pada musim menjelang kemarau dengan kondisi air tanah yang sangat minim yang berpotensi menimbulkan cekaman kekeringan. Air merupakan pembatas utama untuk produksi tanaman kacang tanah di lahan kering. Untuk itu, salah satu upaya untuk mengatasi masalah cekaman kekeringan adalah penggunaan kultivar yang toleran terhadap cekaman kekeringan. Upaya untuk mendapatkan cv. Lokal Bima yang toleran terhadap cekaman kekeringan dan berdaya hasil tinggi dapat dilakukan dengan menggunakan metode induksi mutasi melalui iradiasi sinar Gamma.

Teknik induksi mutasi sangat baik digunakan untuk tanaman yang mengalami masalah karena tidak tersedianya sumber tetua (*land race*) untuk hibridisasi. Khususnya di Indonesia, kacang tanah termasuk tanaman yang sumber keragaman genetiknya kurang sehingga untuk mendapatkan karakter baru unggul dengan teknik hibridisasi menjadi sulit dilakukan (Micke dan Donini, 1993).

Induksi mutasi secara *in vitro* pada kacang tanah telah juga dilakukan (Hemon, 2006). Mutasi *in vitro* dilakukan dengan melakukan induksi variasi somaklonal dan diikuti dengan seleksi *in vitro* pada PEG, namun masih dijumpai banyak galur yang peka terhadap cekaman kekeringan. Hal ini terjadi karena masih kurangnya keragaman genetik yang ditimbulkan dari mutasi *in vitro*, sehingga dalam penelitian ini, selain mutasi *in vitro* juga dilakukan induksi mutasi melalui perlakuan dengan sinar Gamma pada kultur embrio somatik. Menurut Maluszynski *et al.* (1995) bahwa untuk mendapatkan mutan solid, iradiasi dapat dilakukan pada kalus, embrio somatik, suspensi sel atau protoplast.

Untuk meningkatkan efektivitas iradiasi terhadap kultur embrio somatik perlu ditentukan dosis optimum. Dosis yang terlalu rendah menyebabkan berkurangnya mutan yang terbentuk sedangkan dosis yang terlalu tinggi akan mematikan bahan yang dimutasi atau mengakibatkan sterilitas (Anonymous, 1997). Induksi mutasi dengan aplikasi dosis iradiasi sinar Gamma yang tepat diharapkan dapat meningkatkan keragaman genetik tanaman kacang tanah dan melalui metode seleksi *in vitro* akan diperoleh galur kacang tanah yang toleran cekaman kekeringan. Teknik induksi mutasi dengan sinar Gamma untuk mendapatkan ES varian perlu dievaluasi. Mempelajari pengaruh iradiasi sinar Gamma terhadap keberhasilan mengisolasi ES yang insensitif PEG merupakan langkah awal yang harus dilakukan. Berdasarkan uraian tersebut, maka penelitian ini dilakukan untuk

mengetahui efektivitas iradiasi sinar Gamma dalam keberhasilan meningkatkan frekuensi ES kacang tanah cv. Lokal Bima yang toleran terhadap cekaman media polietilena glikol (PEG).

METODE PENELITIAN

Induksi Kalus Embriogenik dari Eksplan Leaflet Embrio Aksis Kacang Tanah

Iradiasi sinar Gamma dilakukan pada jaringan tanaman kacang tanah yang bersifat embriogenik. Untuk itu sejumlah besar ES perlu disiapkan sebagai bahan yang diperlukan untuk kegiatan penelitian selanjutnya. Benih kacang tanah dikupas dari polong kacang tanah tua yang telah dipanen minimal dua bulan sebelumnya dan disterilkan dengan perendaman dalam larutan *Clorox* (NaOCl) 25% selama 20 menit.

Poros embrio kacang tanah cv. Lokal Bima diisolasi dari benih kacang tanah yang telah disterilkan dan digunakan sebagai sumber eksplan. Bagian leaflet dari poros embrio diisolasi dan digunakan sebagai eksplan untuk menginduksi pembentukan embrio somatik.

Media induksi ES adalah MS P16 terdiri atas media dasar MS (Murashige dan Skoog, 1962), vitamin B5 (Gamborg *et al.*, 1968), gula sukrosa (30 g/L), agar-agar (8 g/L), dan Pikloram. Media diatur dengan pH 5,6 sebelum disterilisasi. Setelah agar-agar terlarut dalam media dengan pemanasan, media dituangkan dalam botol kultur ukuran 150 mL masing-masing sebanyak 25 mL dan ditutup dengan plastik. Media yang telah disiapkan disterilkan dengan pemanasan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 20 menit.

Penanaman eksplan dilakukan dalam media induksi dengan 8 eksplan/ botol. Kultur yang ditanam diinkubasikan dalam ruang kultur dengan temperatur yang diatur konstan 24°C siang dan malam. Ruangan tetap dijaga dalam kondisi gelap selama 24 jam.

Kalus embriogenik dan embrio somatik yang didapat selanjutnya diisolasi dan ditanam kembali dalam media induksi yang masih segar selama 3-4 periode sub-kultur. Kalus embriogenik yang berumur 4 bulan diiradiasi dengan sinar Gamma.

Iradiasi Sinar Gamma pada Kultur Embrio Somatik

Embrio somatik sekunder yang telah disiapkan diperlakukan dengan iradiasi sinar Gamma. Jumlah kalus embriogenik yang diperlukan untuk iradiasi yaitu 400 kalus tiap dosis. Kultur ES

diiradiasi dengan dosis 0, 5, 10, 15, dan 20 Gray (Gy). Induksi mutasi dilakukan di Badan Tenaga Atom Nasional dengan iradiasi Gamma pada Iradiator Gamma Chamber 4000 A (sumber ^{60}Co) dengan laju dosis 91,3786 krad/jam (pada Juni, 2009).

Kalus embriogenik dan ES yang telah diiradiasi diproliferasi kembali dalam media MS-P16 untuk meningkatkan biomasa ES. Penanaman dilakukan 3 kali sub-kultur. Selama periode sub-kultur diamati kemampuan kalus embriogenik untuk proliferasi dengan mengamati pertumbuhan kalus embriogenik seperti jumlah eksplant mati, jumlah eksplan yang membentuk ES, jumlah ES per eksplan, penurunan jumlah ES per eksplan (%) dan total ES.

Seleksi In Vitro Populasi ES Hasil Iradiasi Sinar Gamma untuk Mengidentifikasi ES Insensitif PEG

Perlakuan PEG 15% dalam media in vitro dapat menghambat pembentukan embrio somatik dari kalus embriogenik dan dalam waktu yang lama akan mematikan sel/jaringan tanaman yang dikulturkan. PEG yang digunakan adalah dengan berat molekul 6000. Konsentrasi PEG yang digunakan adalah 15 % yang setara dengan tekanan osmotik sebesar $-0,41$ Mpa (PEG 15%) (Mexal *et al.* 1975; Rahayu 2005). Media selektif yang mengandung PEG disiapkan sebagaimana penyiapan media induksi pembentukan embrio somatik. Selain komponen yang diperlukan untuk membuat media induksi juga ditambahkan PEG yang telah disiapkan sebelumnya dengan konsentrasi seperti di atas.

Kalus embriogenik dan embrio somatik sekunder hasil iradiasi sinar Gamma ditanam dalam media selektif PEG 15% sebanyak 8 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 diletakkan 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. Subkultur dilakukan sampai dengan terbentuknya embrio somatik sekunder yang dapat tumbuh dalam media selektif. Selanjutnya, embrio somatik sekunder yang berkembang dalam media selektif dipindahkan ke media selektif kembali sebanyak dua kali sebelum penentuan dan isolasi embrio somatik yang toleran dilakukan.

Kultur embrio somatik sekunder yang ditanam diinkubasikan dalam ruang kultur dengan temperatur yang diatur konstan 24°C siang dan malam. Ruangan dijaga dalam kondisi gelap selama 24 jam.

Kalus embriogenik dan ES yang telah diseleksi dalam media selektif PEG diproliferasi kembali dalam media MS-P16 untuk meningkatkan biomasa ES.

Maturasi dan Perkecambahan ES

Embrio somatik yang tetap hidup pada tekanan media seleksi cekaman PEG perlu diregenerasikan menjadi tanaman kacang tanah lengkap. Proses regenerasi tanaman lengkap dari embrio somatik biasanya melalui beberapa tahapan : maturasi ES, pengecambahan ES dan tahapan regenerasi planlet (tanaman lengkap). Embrio somatik yang toleran PEG 15% ditanam dalam media MS dengan penambahan arang aktif (1 g/L) untuk pematangan atau perkembangan ES (ES *maturation*).

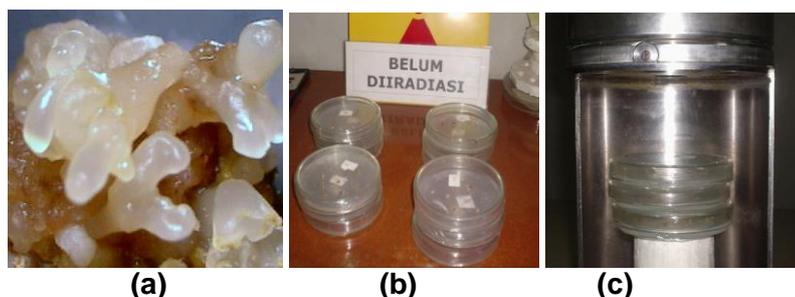
Embrio somatik hasil seleksi in vitro pada media PEG 15% yang telah melewati tahapan maturasi dikecambahkan dalam media MS dengan penambahan BAP ($22\ \mu\text{M}$). Penanaman ES dalam media perkecambahan dilakukan sampai terbentuknya tunas yang berkembang dari embrio somatik. Hal ini biasanya memerlukan waktu 1-2 bulan dalam media perkecambahan (tergantung pada perkembangan embrio somatik yang dikecambahkan).

Embrio somatik yang ditanam dalam media pengecambahan diinkubasikan dalam ruang kultur dengan temperatur yang diatur konstan 24°C siang dan malam. Ruangan dijaga dalam kondisi dengan penyinaran (1000 lux) menggunakan lampu TL selama 24 jam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Dosis Iradiasi Sinar Gamma terhadap Pertumbuhan ES Kacang Tanah

Kalus embriogenik yang digunakan untuk iradiasi yaitu embrio somatik sekunder yang telah berumur 4 bulan. Gambar 1 menunjukkan kalus embriogenik siap untuk diiradiasi pada *chamber* sinar Gamma. Kalus embriogenik yang telah diiradiasi diproliferasi untuk menambah biomassa sel-sel kalus.. Kemampuan kalus embriogenik yang diiradiasi untuk membentuk embrio somatik kacang tanah dapat dilihat pada Tabel 1.



Gambar 1. Kalus embriogenik umur 4 bulan. (a) Embrio somatik sekunder (b) kalus embriogenik sebelum diiradiasi (c) kalus embriogenik siap untuk diiradiasi

Tabel 1. Pengaruh dosis sinar Gamma terhadap induksi embrio somatik kacang tanah cv. Lokal Bima

Dosis Sinar Gamma (Gy)	Jumlah eksplan hidup (%)	Eksplan yang membentuk ES (%)	Jumlah ES/eksplan	Penurunan jumlah ES /eksplan (%) *
0	100.0	100.0	16.0	0
10	100.0	95.0	14.4	23.4
15	85.7	80.9	8.5	24.5
20	80.3	74.5	5.6	65.5
25	65.4	60.3	3.2	66.5

*) Penurunan jumlah ES dihitung dengan persamaan = $[(X_0 \cdot Y_0 - X_t \cdot Y_t) / X_0 \cdot Y_0] \cdot 100\%$. X_0 dan Y_0 adalah persentase eksplan yang ada ES dan jumlah ES per eksplan (kontrol = tanpa iradiasi) sedangkan X_t dan Y_t adalah ES yang diiradiasi dengan sinar Gamma

Dari Tabel 1 terlihat bahwa dosis sinar Gamma dapat mempengaruhi pertumbuhan embrio somatik kacang tanah. Semakin tinggi dosis sinar Gamma yang digunakan maka semakin menghambat pertumbuhan ES kacang tanah. Penggunaan dosis mulai 20 Gy masih memberikan jumlah eksplan hidup 80.3% dan jumlah eksplan yang membentuk ES 74.5%. Namun pada dosis 20 Gy juga telah dapat menurunkan jumlah ES per eksplan melebihi dari 50% dibandingkan dengan dosis 0 Gy. Walaupun peningkatan dosis sinar Gamma telah menurunkan pertumbuhan ES, namun yang lebih perlu adalah sampai seberapa besar pengaruh dosis-dosis tersebut untuk menghasilkan variasi genetik pada tanaman kacang tanah terutama untuk sifat toleran terhadap cekaman kekeringan dan daya hasilnya.

Dari data ini dapat diketahui bahwa penggunaan dosis mulai 20 Gy ke atas telah dapat mengganggu proliferasi sel-sel kalus embriogenik.

Gaul (1977) menyatakan bahwa kerusakan fisiologis yang disebabkan oleh pengaruh iradiasi sinar Gamma, seperti pertumbuhan yang terhambat dan letalitas hanya terjadi pada generasi M1, sedangkan pada generasi selanjutnya adalah perubahan genetik saja.

Seleksi In Vitro Mutan ES Kacang Tanah terhadap Media Selektif PEG

Embrio somatik kacang tanah hasil iradiasi sinar Gamma yang telah diproliferasi, selanjutnya diseleksi dalam media selektif yang mengandung polietilena glikol (PEG). Penggunaan PEG adalah sebagai *selective agent* untuk mendapatkan ES yang insensitif terhadap PEG dan diharapkan ES insensitif ini akan berkembang menjadi tanaman kacang tanah yang toleran cekaman kekeringan. Hasil seleksi mutan ES kacang tanah dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pertumbuhan ES kacang tanah cv. Lokal Bima hasil iradiasi sinar Gamma dalam media selektif PEG 15%

ES hasil iradiasi sinar Gamma (Gy) pada dosis	Pertumbuhan Embrio Somatik			
	Proliferasi ES (%)	Rataan ES/eksplan	Total ES	PP total ES*
0	65.0 c	6,7 c	36.6 c	45.5
10	72.3 b	8.4 b	43.3 ab	39.5
15	87.1 a	10.4 a	42.4 ab	32.4
20	85.5 a	9.7 a	45.6 a	25.3
25	73.0 b	6.4 c	40.4 b	30.4

*) Persentase penurunan (PP) total ES dihitung dengan persamaan $PP = [(X_0 - X_t) / X_0] * 100\%$. X_0 adalah total ES pada media tanpa seleksi dan X_t – total ES dalam media dengan penambahan agens penyeleksi (PEG 15%). Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada masing-masing peubah tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak Duncan pada $\alpha = 5\%$.



(a)



(b)

Gambar 2. Kondisi kalus embriogenik kacang tanah hasil iradiasi sinar Gamma pada media selektif PEG. (a) diantara kalus masih ada ES yang hidup, (b) semua ES mati pada media PEG

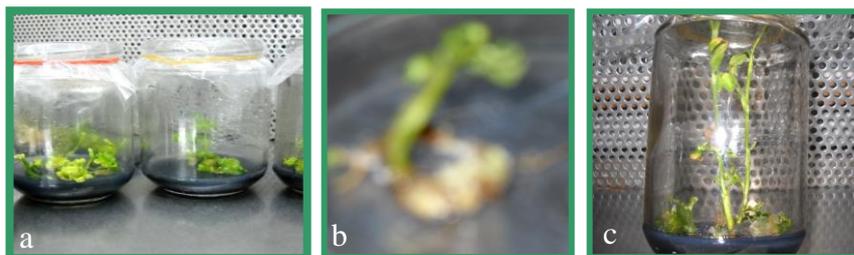
Pada Tabel 2 terlihat bahwa kemampuan proliferasi ES, rata-rata ES per eksplan, dan total ES tertinggi terjadi pada dosis sinar Gamma 15 dan 20 Gy dan terendah pada kalus embriogenik tanpa iradiasi dan dosis tertinggi (25 Gy). Dilihat pada persentase penurunan total ES ternyata penurunan terbesar teramati pada kalus embriogenik tanpa perlakuan (0 Gy). Data ini menunjukkan bahwa iradiasi sinar Gamma telah mampu menghasilkan mutan ES yang insensitif PEG (Gambar 2). Dosis 25 Gy diduga menyebabkan letal pada sebagian ES, sehingga menyebabkan hilangnya beberapa mutan yang insensitif PEG, sedangkan dosis 0 Gy menghasilkan mutan ES hanya dari kultur in vitro, sehingga jumlah mutan ES insensitif juga terbatas. Gustafson dan Ekberg (1977) menyatakan bahwa iradiasi sinar Gamma akan menyebabkan mutasi genom, mutasi kromosomal (termasuk mutasi gen) dan mutasi sitoplasma. Selanjutnya Mohr dan Schopfer (1995) menyatakan bahwa radiasi pengion (iradiasi sinar Gamma) akan menghasilkan ion dan radikal dalam bentuk hidroksi (OH). Jika radikal hidroksi menempel pada rantai nukleotida dalam DNA, maka utas tunggal DNA akan patah, sehingga akan mengalami perubahan gen. Van Harten (1998) menyatakan kerusakan DNA akibat iradiasi sinar Gamma dapat berupa transisi atau transversasi antara

purin dan pirimidin, tali utas tunggal atau ganda akan menjadi patah.

Regenerasi Planlet

Embrio somatik yang insensitif pada kondisi cekaman PEG diproliferasi untuk menambah biomassa sel-sel kalus embriogenik. Embrio somatik yang lolos dari tekanan media seleksi stres PEG perlu diregenerasikan menjadi tanaman kacang tanah lengkap. Proses regenerasi tanaman lengkap dari embrio somatik biasanya melalui beberapa tahapan antara lain : tahapan maturasi embrio somatik, tahapan pengecambahan embrio somatik dan tahapan regenerasi planlet (tanaman lengkap) dari kecambah yang diperoleh.

Embrio somatik yang insensitif hasil seleksi pada media selektif PEG dikulturkan dalam media maturasi MS dengan penambahan 2 g/l arang aktif. Embrio somatik yang telah masak ditandai dengan terbentuknya struktur embrio lengkap dengan kotiledon dan radikula. Embrio somatik yang telah masak dikecambahkan terus dalam media perkecambahan MS dengan penambahan 2 g/l arang aktif. Setelah dikecambahkan selama satu bulan dalam media perkecambahan, ES yang telah masak mengalami pemanjangan epikotil dan lebih kurang tiga bulan kecambah mulai membentuk akar dan daun primer.



Gambar 3. Produksi planlet. (a) maturasi dan perkecambahan ES, (b) kecambah abnormal, dan (c) planlet normal membentuk akar batang dan daun

Tabel 3. Perkecambahan dan regenerasi planlet dari ES kacang tanah hasil iradiasi sinar Gamma yang insensitif pada media PEG

ES hasil iradiasi sinar Gamma (Gy) pada dosis	Jumlah ES yg dikecambahkan	Persentase kecambah (%)	
		Abnormal	Normal
0	10	30	60
10	12	33	58
15	13	31	46
20	10	40	50
25	12	42	50

Embrio somatik hasil seleksi dapat membentuk kecambah normal antara 46 – 60%, kecambah abnormal 30 – 42%, dan sisanya merupakan kecambah mati (Tabel 3). Kecambah abnormal ditandai dengan ketidakmampuan untuk membentuk akar atau daun primer. Kecambah yang ditanam telah berkembang menjadi planlet, yang ditandai dengan semakin memanjangnya epikotil, terbentuknya akar dan daun baru (Gambar 3). Setelah terbentuk sistem perakaran dan daun yang baik, planlet akan diaklimatisasi pada media campuran tanah, pasir dan kompos dan disungkup dengan botol untuk menjaga kelembaban.

Dari Tabel 3 terlihat bahwa semakin tinggi dosis iradiasi sinar Gamma yang diberikan pada ES cenderung menghasilkan kecambah normal lebih sedikit dan kecambah abnormal lebih banyak. Gangguan fisiologis akibat dosis tinggi diduga ikut mempengaruhi kemampuan perkecambahan ES. Kecambah yang telah dihasilkan ini akan berkembang menjadi planlet dan akan diaklimatisasi dan ditanam di Rumah Kaca untuk produksi benih R1 dan R2. Populasi tanaman variasi somaklonal tersebut akan dievaluasi responnya pada cekaman kekeringan.

KESIMPULAN

1. Dosis sinar Gamma dapat mempengaruhi pertumbuhan embrio somatik kacang tanah. Semakin tinggi dosis sinar Gamma yang

digunakan maka semakin menghambat pertumbuhan ES kacang tanah. Penggunaan dosis mulai 15 Gy masih memberikan pertumbuhan ES yang baik dibandingkan dengan dosis di atasnya.

2. Kalus embriogenik yang diiradiasi dengan sinar Gamma dosis 15 Gy dan 20 Gy menunjukkan kemampuan proliferasi ES, rataan ES per eksplan, dan total ES tertinggi ketika diseleksi dalam media selektif PEG 15% dan terendah pada kalus embriogenik tanpa iradiasi dan dosis tertinggi (25 Gy). Kalus embriogenik tanpa perlakuan (0 Gy) menunjukkan persentase penurunan total ES terbesar dalam media selektif PEG 15%.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahloowalia, B.S., Maluszynsky, M., 2001. Induce mutations – A new paradigm in plant breeding. *Euphytica* 118: 67-173.
- Anonimous, 1997. Irradiation of horticultural crops at Iowa State Univeristy. *Hort. Sci* 32(4): 582-585.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K., 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- Gaul, H., 1977. Mutagent effect in the first generation after seed treatment. In: *Manual on Mutation Breeding, Technical Reports Series*. No 119, IAEA, Viena.

- Gustafson, A., Ekberg., 1979. Type of mutation. *In*: manual on Mutation Breeding, Technical Report Series. No. 119, IAEA. Viena.
- Hemon, A.F., 2006. Efektivitas seleksi in vitro berulang untuk mendapatkan plasma nutfah kacang tanah toleran cekaman kekeringan dan resisten terhadap penyakit busuk batang *Sclerotium rolfsii*. Disertasi Doktor Sekolah Pascasarjana IPB, Bogor.
- Maluszynski, M., Ahlowalia, B.S., Sigurbjornsson B. 1995. Application of in vivo and in vitro mutation techniques for crop improvement. *Euphytica* 85:303-315.
- Mexal, J., Fisher, J.T., Osteryoung, J., Patric, R.C.P., 1975. Oxygen availability in polyethylene glycol solution and its implications in plant-water relation. *Plant Physiol.* 55: 20-24.
- Micke, A., Donini, B., 1993. Induce mutation. *In* : Plant Breeding Principle and Prospects (Eds. Hasyward, M.D., Bosemark, N.O., and Romagosa, I.). Chapman and Hall London.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised media for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-493.
- Mohr, H., Schopfer. 1995. *Plant Physiology*. Springer-Verlag. Berlin.
- Pattee, H.E., Stalker, H.T., 1995. Advances in peanut science. American Peanut Research and Education Society, Inc. Stillwater, USA.
- Rahayu, E.S., Guhardja, E., Ilyas S., Sudarsono, 2005. Seleksi in vitro embrio somatik kacang tanah pada media dengan polietilena glikol untuk mensimulasikan cekaman kekeringan. *Majalah Ilmiah Biologi BIOSFERA*.
- van Harten, A.V., 1998. *Mutation Breeding. Theory and Practical Application*. Cambridge University Press. London.