

INDUKSI MUTASI DENGAN IRADIASI SINAR GAMMA DAN SELEKSI IN VITRO UNTUK MENDAPATKAN EMBRIO SOMATIK KACANG TANAH YANG TOLERAN POLIETILENA GLIKOL

A. Farid Hemon

Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Mataram

Korespondensi: email: faridhemon_1963@yahoo.com

ABSTRACT

INDUCTION OF MUTATION USING GAMMA RAYS AND IN VITRO SELECTION TO DEVELOP SOMATIC EMBRYOS OF PEANUT TOLERANT TO POLYETHYLENE GLYCOL. *The objectives of this experiment were to evaluate effectiveness of Gamma ray to somatic embryos culture to increase frequency of obtaining polyethylene glycol (PEG) insensitive somatic embryos (SE) of cv. Local Bima peanut. The experiment was initiated with induction of peanut SE. Mutation induction was done on SE culture. Somatic embryos that have been irradiated with Gamma ray were selected in medium containing polyethylene glycol 15% (PEG 6000). Results of the experiment achieved, namely: 1) Gamma ray dosage affected peanut SE growth. Higher Gamma ray dosage used, it was more inhibited peanut SEs growth. Use of 15 Gy dosage gave SEs growth better than up dosage, 2) embryogenic calli irradiated with Gamma ray dosage 15 and 20 Gy showed high SE proliferation, high number of SE per explant, high SE total when selected in medium containing PEG 15%, and lower SE growth occurred on SE calli without irradiation and dosage 25 Gy.*

Key words: 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 juga 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 Bima 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. 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. Induksi variasi somaklonal dan diikuti seleksi in vitro dimungkinkan masih dijumpai banyak galur yang peka terhadap cekaman kekeringan. Hal ini terjadi karena masih kurangnya keragaman genetik yang ditimbulkan dan mutasi in vitro, sehingga dalam penelitian ini, selain mutasi in vitro juga dilakukan dengan induksi mutasi melalui sinar Gamma pada kultur embrio somatik. Menurut Maluszynski dkk. (1995), 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 variasi embrio somatis (ES) perlu dievaluasi. Mempelajari pengaruh iradiasi sinar Gamma terhadap keberhasilan mengisolasi ES yang insensitif polietilena glikol (PEG) merupakan langkah awal yang harus dilakukan. Berdasarkan uraian tersebut, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efektivitas iradiasi sinar Gamma dalam meningkatkan keberhasilan frekuensi ES kacang tanah cv. Lokal Bima yang toleran terhadap cekaman media PEG

BAHAN DAN METODE

Induksi kalus embriogenik dan 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 NaOCl (Clorox) 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 dan poros embrio diisolasi dan digunakan sebagai eksplan untuk menginduksi pembentukan embrio somatik.

Media induksi ES terdiri atas media dasar MS (Murashige dan Skoog, 1962), vitamin 135 (Gamborg dkk., 1968), gula sukrosa (30 g/l), 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 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 diiradiasi dengan sinar Gamma berumur 4 bulan.

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 dengan iradiasi Gamma pada iradiator Gamma Chamber 4000 A (sumber ⁶⁰Co). 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.

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 dan 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 dan Rahayu et al., 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.

Hemon: Induksi mutasi dan seleksi in vitro untuk identifikasi embrio somatik kacang tanah

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-P 16 untuk meningkatkan biomasa ES.

Maturasi dan perkecambahan

ES yang lolos dari tekanan media seleksi cekaman PEG perlu diregenerasikan menjadi tanaman kacang tanah lengkap. Proses regenerasi tanaman lengkap dan 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) agar ES yang terbentuk berkembang sempurna (*mature*).

Embrio somatik hasil seleksi *in vitro* pada media PEG 15% yang telah melewati tahapan maturasi dikecambahkan dalam media MS dengan penambahan BAP (22 µM). Penanaman ES dalam media perkecambahan dilakukan sampai terbentuknya tunas yang berkembang dan 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 penyiangan (1000 lux) menggunakan lampu TL selama 24 jam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh dosis iradiasi sinar gamma terhadap pertumbuhan ES kacang tanah

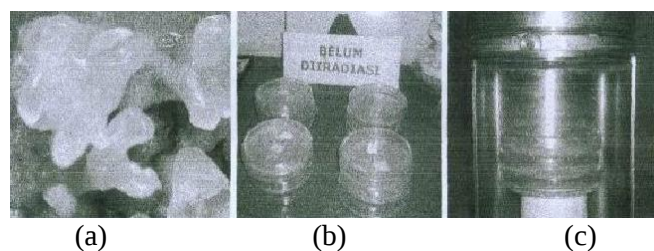
Kalus embriogenik yang digunakan untuk iradiasi yaitu embrio somatik sekunder yang telah berumur 4 bulan. Gambar 1 menunjukkan kalus embriogenik siap untuk diiradiasi pada chamber sinar Gamma. Kalus embriogenik yang telah diiradiasi diproliferasi untuk menambah biomassa sel-sel kalus. Kemampuan kalus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

Pada 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

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

Dosis Sinar Gama (Gy)	Jumlah Eksplan Hidup (%)	Eksplan yang Membentuk ES (%)	Jumlah ES/ Eksplan	Penurunan Jumlah Eksplan ES/ (%)*)
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 $= 1(X_0Y_0 - X_tY_t) / X_0Y_0 \times 100\%$. 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



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

Hemon: Induksi mutasi dan seleksi in vitro untuk identifikasi embrio somatik kacang tanah

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 insensitiv terhadap PEG dan diharapkan ES insensitiv ini akan berkembang menjadi tanaman kacang tanah

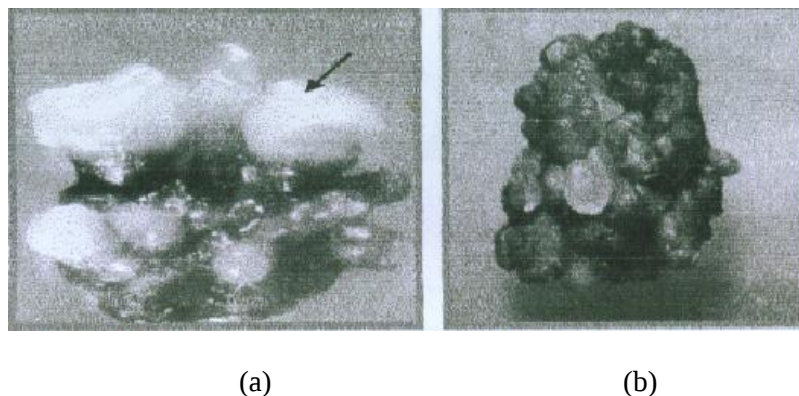
yang toleran cekaman kekeringan. Hasil seleksi mutan ES kacang tanah dapat dilihat pada Tabel 2.

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 insensitiv PEG. Dosis 25 Gy diduga menyebabkan letal pada sebagian ES, sehingga menyebabkan hilangnya beberapa mutan yang insensitiv PEG, sedangkan dosis 0 Gy menghasilkan mutan ES hanya dan kultur in vitro, sehingga jumlah mutan ES insensitiv 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,

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 $PP = [(X_0 - X_t) / X_0] \times 100\%$. 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 $\alpha = 5\%$.



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

Hemon: Induksi mutasi dan seleksi in vitro untuk identifikasi embrio somatik kacang tanah

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 transversi 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 sires PEG perlu diregenerasikan menjadi tanaman kacang tanah lengkap. Proses regenerasi tanaman lengkap dan embrio somatik biasanya melalui beberapa tahapan antara lain: tahapan maturasi embrio somatik, tahapan penkecambahan embrio somatik dan tahapan regenerasi planlet (tanaman lengkap) dan kecambah yang diperoleh.

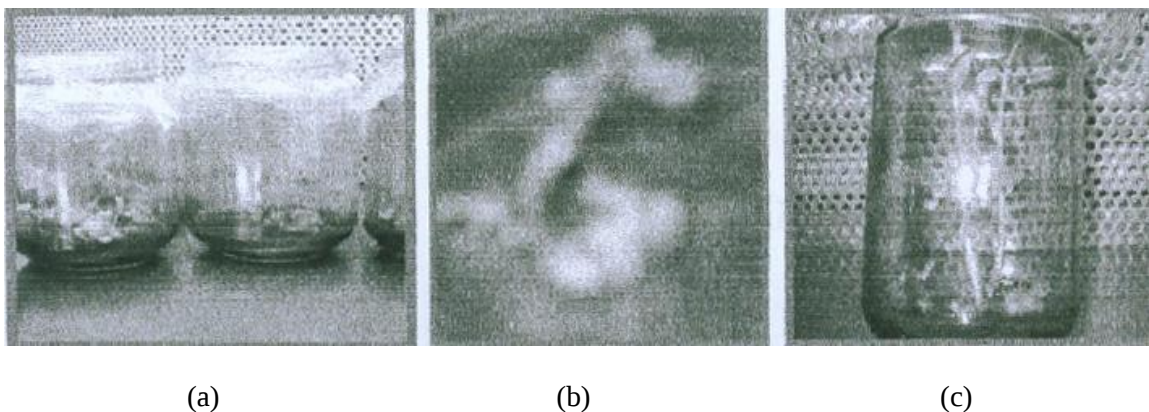
Embrio somatik yang insensitif hasil seleksi pada media selektif PEG dikulturkan dalam media maturasi MS dengan penambahan 2 g/l arang aktif. Embrio somatik yang telah masak ditandai dengan terbentuknya struktur embrio lengkap dengan kotiledon dan radikula. Embrio somatik yang telah masak dikecambahkan 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. 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. 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.

Pada 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.

Tabel 3. Perkecambahan dan regenerasi planlet dan 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



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

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 ketika 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. Irradition of horticultural crops at Iowa State Univeristy. *Hort. Sd* 32(4): 582-585.
- Gamborg, O. L., Miller R. A., and Ojima K. 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:15 1-158.
- Gaul, H. 1977. Mutagen effect in the first generation after seed treatment. In: *Manual on Mutation Breeding, Technical Reporta Series. No 119, IAEA, Viena.*
- Gustafson A, Ekberg. 1979. Type of mutation. In: *manual on Mutation Breeding, Technical Report Series. No. 119, JAEA. 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 *Scierotium rofsii*. 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 iT, Osteryoung J. Patric RCP 1975. Oxygen availability in polyethylene glycol solution and its implications in plant-water relation. *Plant Physiol.* 55: 20-24.
- Micke A and Donini B. 1993. Induce mutation. In: *Plant Breeding Principle and Prospects* (Eds. MD Hasyward, NO Bosemark and I Romagosa). Chapman and Hall London.
- Murashige T. and F. Skoog. 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. and Stalker H. T. 1995. Advances in peanut science. American Peanut Research and Education Society, Inc. Stiliwater, USA.
- Rahayu E. S., E. Guhardja, S. Ilyas, dan Sudarsono. 2005. Seleksi in vitro embrio somatik kacang tanah pada media dengan polietileria glikol untuk mensimulasikan cekaman kekeringan. *Majalah Ilmiah Biologi BIOSFERA.*
- Van Harten A. V. 1998. *Mutation Breeding. Theory and Practical Application.* Cambridge University Press. London.

— o —