

PENINGKATAN KERAGAMAN GENETIK PURWOCENG MELALUI IRADIASI SINAR GAMMA DAN SELEKSI *IN VITRO*

Improvement of Genetic Variation of Pruatjan through Gamma Irradiation and In Vitro Selection

IKA ROOSTIKA¹⁾, IRENG DARWATI²⁾, dan YUDIWANTI³⁾

¹⁾ Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Jalan Tentara Pelajar 3A Bogor, 16111

²⁾ Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Jalan Tentara Pelajar 3 Bogor, 16111

³⁾ Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian-IPB, Bogor
Kampus IPB Dramaga

e-mail: ikatambunan@yahoo.com

(Diterima Tgl. 8- 3-2013 - Disetujui Tgl. 28-5-2013)

ABSTRAK

Peningkatan keragaman genetik purwoceng memerlukan aplikasi teknologi alternatif yang mampu membentuk keragaman baru. Tujuan penelitian adalah untuk meningkatkan keragaman genetik dan toleransi purwoceng terhadap cekaman suhu tinggi melalui iradiasi dan seleksi *in vitro*. Tahapan penelitian meliputi induksi mutasi kalus embriogenik dengan sinar gamma, seleksi *in vitro* dengan cekaman suhu tinggi, induksi perakaran somaklon putatif, analisis keragaman genetik secara *flowcytometry*, dan aklimatisasi somaklon putatif. Iradiasi dilakukan pada dosis 0, 1, 2, 3, 4, dan 5 Krad sedangkan seleksi *in vitro* dilakukan pada tiga level suhu (20, 25, dan 30°C). Induksi perakaran dilakukan dalam dua tahap, dengan menggunakan media DKW atau MS yang mengandung sukrosa 3-6% dengan penambahan IBA atau NAA taraf 0,5-1,5 ppm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kalus purwoceng mampu bertahan hidup pada dosis iradiasi tertinggi (5 Krad). Meningkatnya dosis iradiasi cenderung meningkatkan pendewasaan embrio somatik. Pada tahap seleksi *in vitro*, kalus purwoceng mampu tumbuh pada kondisi suhu tertinggi (30°C). Tingkat proliferasi kalus yang tinggi dan jumlah embrio somatik terbanyak diperoleh dari perlakuan suhu 25°C. Embrio somatik yang terbentuk dari perlakuan suhu tinggi tersebut merupakan kandidat somaklon yang toleran suhu tinggi pada lingkungan dataran rendah. Diantara embrio somatik yang terbentuk, hanya embrio yang berasal dari perlakuan suhu 20°C saja yang berhasil membentuk planlet. Media yang terbaik untuk induksi perakaran adalah media MS yang mengandung sukrosa 4% dengan penambahan NAA 1,5 ppm. Analisis ploidi pada daun embrio somatik menunjukkan terbentuknya varian yang bersifat tetraploid (4x).

Kata kunci: *Pimpinella pruatjan*, iradiasi sinar gamma, seleksi *in vitro*, keragaman genetik, suhu tinggi

ABSTRACT

To improve new pruatjan genetic variations, the alternative technology should be applied. The objective of the research was to increase pruatjan genetic variation and tolerance to the high temperature through induced mutation and *in vitro* selection. The steps of this study were induced mutation of embryogenic callus by gamma irradiation, *in vitro* selection, root induction of putative somaclones, genetic variation analysis by flowcytometer, and putative somaclones acclimatization. The dosages of gamma irradiation were 0, 1, 2, 3, 4, and 5 Krad. *In vitro* selection was conducted at three temperatures (20, 25, and 30°C). The root induction was conducted in two steps by using DKW or MS media containing of 3-6% sucrose with addition of 0.5-1.5 ppm IBA or NAA. The result showed that embryogenic

calli could survive after treatment of the highest gamma irradiation dose. It tends to increase the maturation of somatic embryos. During *in vitro* selection, embryogenic calli could grow at the highest temperature but the highest callus proliferation and the number of somatic embryos were obtained from 25°C. The somatic embryos survived and grew at the high temperature are assumed as somaclones which considered as the candidates of tolerant plants to high temperature that can be developed in the of low altitude area. Among the regenerated somatic embryos, only the 20°C-derived embryos were successfully form plantlets. The best medium for root induction was MS basal medium containing of 4% sucrose supplemented with 1.5 ppm NAA. The ploidy analysis of somatic embryos leaf showed a tetraploid (4x) variant.

Key words: *Pimpinella pruatjan*, gamma irradiation, *in vitro* selection, genetic variation, high temperature

PENDAHULUAN

Purwoceng (*Pimpinella alpina* KDS atau *Pimpinella pruatjan* Molk.) adalah tanaman obat asli Indonesia yang hidup secara endemik di daerah pegunungan. Tanaman tersebut bernilai ekonomis tinggi yang berkhasiat obat sebagai afrodisiak (meningkatkan gairah seksual dan menimbulkan ereksi), diuretik (melancarkan saluran air seni), dan tonik (meningkatkan stamina tubuh). SUZERY *et al.* (2004) melaporkan bahwa akar purwoceng mengandung senyawa stigmasterol berdasarkan data spektroskopi dengan UV-Vis, FTIR, dan GC-MS. Di lain pihak, HERNANI dan ROSTIANA (2004) melaporkan adanya senyawa kimia yang teridentifikasi secara kualitatif dalam akar purwoceng, yaitu bergapten, marmesin, 4-hidroksi kumarin, umbeliferon, dan psoralen. Hasil uji praklinik menunjukkan bahwa ekstrak akar purwoceng dapat meningkatkan derajat spermatogenesis testis, serta jumlah dan motilitas spermatozoa tikus Sprague Dawley (JUNIARTO, 2004).

Purwoceng merupakan komoditas herbal yang mahal dan banyak dicari oleh industri jamu. Oleh karena itu, peluang pengembangan purwoceng masih terbentang luas.

Hasil analisis ekonomi usahatani menunjukkan bahwa usahatani purwoceng sangat layak dan menguntungkan. Penerapan teknologi budidaya sederhana untuk luasan sebesar 1.000 m² dapat menghasilkan pendapatan bersih lebih dari tiga puluh juta rupiah setiap tahun (JUHONO, 2004; ERMIATI *et al.*, 2005).

Berdasarkan status erosi genetik, tanaman purwoceng dikategorikan genting (*endangered*) atau hampir punah (RIVAI *et al.*, 1992). RAHARDJO (2003) dan SYAHID *et al.* (2004) melaporkan bahwa saat ini tanaman tersebut hanya tersisa di areal petani yang sangat sempit, yaitu di Desa Sekunang, Dataran Tinggi Dieng. Langkanya budidaya di tingkat petani disebabkan antara lain oleh sulitnya membudidayakan purwoceng di luar habitatnya karena tanaman ini membutuhkan persyaratan agroklimat tertentu.

Pembentukan tanaman purwoceng adaptif pada lingkungan dataran rendah telah dilakukan secara konvensional. Namun demikian, hasilnya masih kurang memuaskan karena tanaman mengalami stagnasi selama 2–3 tahun sebelum mampu bereproduksi. RAHARDJO (2003) melaporkan bahwa tanaman purwoceng yang telah diadaptasikan, dapat tumbuh di daerah dengan ketinggian 800 m dpl. Tanaman tersebut hanya mampu bertahan hidup selama tiga bulan. Dengan demikian, diperlukan terobosan teknologi untuk merakit varietas baru yang toleran dataran rendah. Pembentukan varietas baru melalui kegiatan pemuliaan secara konvensional sulit dilakukan karena terbatasnya keragaman genetik purwoceng di lapang. Oleh karena itu, diperlukan aplikasi teknologi alternatif yang mampu meningkatkan keragaman genetik, seperti teknik mutagenesis pada sel-sel somatik yang disebut sebagai teknik variasi somaklonal.

Variasi somaklonal merupakan hasil kumulatif dari mutasi genetik pada eksplan yang diinduksi oleh kondisi *in vitro*. Perubahan genetik dapat terjadi selama periode kultur *in vitro* atau karena adanya sel-sel yang bermutasi (AHLUWALIA, 1986). DAUD (1996) menyatakan bahwa mutasi spontan pada sel somatik berkisar 0,2-3%. Keragaman tersebut dapat ditingkatkan dengan berbagai perlakuan, antara lain pemberian mutagen baik fisik seperti iradiasi sinar gamma (DAMAYANTI, 2002; ARUNYANART dan SOONTRONYATARA, 2002; KOSMIATIN *et al.*, 2006; LESTARI *et al.*, 2006), kimiawi seperti EMS (LUAN *et al.*, 2006) dan kolkisin (KOSMIATIN *et al.*, 2000), maupun kondisi stres pada kumpulan sel somatik yang bersifat embriogenik. KOORNNEEF (1991) menyebutkan bahwa perubahan jumlah kromosom dan tingkat ploidi serta aberasi kromosom dapat terjadi selama periode *in vitro*, yang disebabkan oleh mekanisme aktivasi elemen loncat (transposon), amplifikasi gen, dan pindah silang mitotik. KUMAR dan BENNETZEN (1999) menambahkan bahwa retrotransposon diaktivasi oleh stres biotik dan abiotik. Iradiasi merupakan salah satu bentuk dari stres abiotik.

Perubahan sifat dapat dideteksi secara dini dengan menerapkan teknik seleksi *in vitro*. Seleksi *in vitro* merupakan metode seleksi secara dini yang diterapkan pada

sekumpulan sel-sel somatik sehingga kegiatan seleksi akan lebih efektif dan efisien karena perubahan sifat menjadi lebih terarah pada sifat tertentu melalui penggunaan agen penyeleksi (*selecting agent*). Frekuensi diperolehnya somaklon yang diinginkan dapat meningkat karena massa sel diberikan seleksi dengan intensitas yang efektif dan homogen (SPECHT dan GRAEF, 1996). Seleksi *in vitro* telah terbukti dapat menghasilkan varietas baru yang lebih tahan terhadap faktor biotik dan abiotik dengan sifatnya yang diwariskan (VAN DEN BULK, 1991; REMOTTI *et al.*, 1995). Seleksi *in vitro* untuk peningkatan toleransi terhadap suhu tinggi telah dilakukan pada tanaman kentang. Melalui teknik tersebut, pengumbian kentang dapat dilakukan pada musim yang berbeda ketika suhu lingkungan lebih tinggi (GOSAL *et al.*, 1998).

Untuk menerapkan metode variasi somaklonal diperlukan penguasaan teknik regenerasi. Saat ini, teknik regenerasi purwoceng telah dikuasai. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kultur purwoceng dapat diregenerasikan melalui jalur organogenesis dan embriogenesis somatik (ROOSTIKA *et al.*, 2005; ROOSTIKA *et al.*, 2007). Aplikasi induksi mutasi yang dikombinasikan dengan seleksi *in vitro* diharapkan dapat menghasilkan varietas baru tanaman purwoceng yang toleran terhadap cekaman suhu tinggi pada lingkungan dataran rendah. Tujuan penelitian ini adalah untuk meningkatkan keragaman genetik dan toleransi tanaman purwoceng terhadap lingkungan bersuhu tinggi melalui aplikasi induksi mutasi dan seleksi *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan pada tahun 2007-2009 di Laboratorium Kultur Jaringan Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor. Tahapan penelitian meliputi (1) induksi mutasi kalus embriogenik dengan sinar gamma, (2) seleksi *in vitro* dengan cekaman suhu tinggi, (3) induksi perakaran somaklon putatif, (4) analisis keragaman genetik secara *flowcytometry*, dan (5) aklimatisasi somaklon putatif. Bahan tanaman yang digunakan adalah purwoceng merah.

Induksi Mutasi Kalus Embriogenik dengan Sinar Gamma

Kalus embriogenik diinduksi dari eksplan yang berupa potongan daun berukuran sekitar 0,25 cm² yang ditanam pada media MS dengan penambahan 2,4D 2 ppm dan pikloram 0,5 ppm (ROOSTIKA *et al.*, 2005). Kalus, yang berumur sekitar satu bulan setelah tanam, diiradiasi dengan sinar gamma pada dosis 0, 1, 2, 3, 4, dan 5 Krad. Iradiasi dilakukan di Badan Tenaga Atom Nasional (BATAN), Jakarta. Setiap perlakuan diulang sebanyak lima kali dan setiap ulangan terdiri dari empat kumpulan kalus yang masing-masing berasal dari satu eksplan. Setelah iradiasi, kalus embriogenik langsung dipindahkan ke media maturasi

(pendewasaan) embrio somatik, yaitu media DKW (DRIVER dan KUNYAKI, 1984) dengan penambahan IBA 5 ppm (ROOSTIKA *et al.*, 2005) untuk dipulihkan pasca-iradiasi. Respon yang diamati adalah persentase daya hidup dan persentase kalus yang mengalami maturasi serta pengamatan visual lainnya, seperti struktur kalus (kompak atau friabel) dan warna kalus (coklat, kuning, atau hijau). Data ditampilkan dalam rerata dan standar deviasi.

Seleksi *In Vitro* dengan Cekaman Suhu Tinggi

Setelah dua bulan masa pemulihan pasca-iradiasi, kalus embriogenik diseleksi dengan perlakuan suhu 20, 25, dan 30°C yang masing-masing berada di ruang kultur, inkubator, dan *growth chamber* pada kondisi gelap. Setiap perlakuan diulang sebanyak enam kali. Pada kondisi cekaman suhu tersebut, kalus diinkubasi selama 3 bulan pada media maturasi untuk pendewasaan struktur embrio somatik yang masih berada pada tahap globular. Selama masa inkubasi tersebut, kalus yang mengalami proliferasi dibagi menjadi tiga bagian dan disubkultur kembali ke media yang sama. Untuk embrio somatik yang telah membentuk struktur kotiledon, biakan disubkultur pada media DKW tanpa penambahan zat pengatur tumbuh. Respon yang diamati adalah persentase daya hidup, jumlah embrio somatik yang terbentuk, dan penampilan visual biakan.

Induksi Perakaran Somaklon Putatif

Sebelum induksi perakaran, embrio somatik dielongasi dan diproliferasi pada media DKW dengan penambahan BA 4 ppm dan TDZ 0,4 ppm. Karena jumlah embrio somatik yang mengalami elongasi dari perlakuan kontrol cukup memadai, namun dari perlakuan lainnya masih terbatas, maka eksplan yang digunakan dalam percobaan induksi perakaran adalah yang berasal dari perlakuan kontrol (0 Krad dan 20 °C). Induksi perakaran dilakukan dengan menggunakan media DKW yang mengandung auksin NAA 1,5 ppm atau kombinasi antara NAA dan IBA (0,5 dan 1,0 ppm) dengan kandungan sukrosa 4, 5, dan 6%. Setiap perlakuan diulang sebanyak enam kali. Selanjutnya, perlakuan yang terbaik diterapkan untuk menginduksi akar embrio somatik dari kombinasi perlakuan iradiasi dan seleksi *in vitro* (somaklon putatif). Peubah yang diamati adalah pembentukan akar, pembentukan kalus, dan rasio daun segar (jumlah daun segar dibagi dengan jumlah total daun dikalikan 100%).

Analisis Keragaman Genetik secara *Flowcytometry*

Sampel yang digunakan adalah daun *in vitro* dari planlet (dari perlakuan suhu 20°C) dan embrio somatik

(dari perlakuan suhu 25 dan 30°C), yang dihasilkan pasca-iradiasi. Sekitar 1 cm² daun dicacah dengan pisau silet tajam dalam cawan petri yang telah dibasahi dengan 1 ml larutan bufer *UV Cystain Ploidy*. Selanjutnya, cairan tersebut disaring dengan Celltrix berukuran 20 µM dan ditampung dalam *cuvette*. Analisis *flowcytometry* dilakukan dengan menggunakan alat *Cell Counter Analysis (CCA)* produk Partec. Pembacaan *peak* dilakukan pada *Gain 350*. Sebagai kontrol, digunakan sampel daun yang berasal dari biakan induk.

Aklimatisasi Somaklon Putatif

Planlet yang terbentuk dari perlakuan suhu 20°C diaklimatisasi pada media arang sekam dalam polibag. Media tanam disiram terlebih dahulu dengan akuades kemudian planlet ditanam dan disiram dengan menggunakan cairan yang mengandung pupuk Rosasol N. Polibag diatur rapi dalam wadah plastik dan kemudian wadah tersebut disungkup dengan plastik *clingwrap*. Inkubasi dilakukan di ruang kultur dengan suhu 20–25°C dan intensitas cahaya 800–1000 lux. Respon yang diamati adalah persentase bibit yang hidup.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi Mutasi Kalus Embriogenik dengan Sinar Gamma

Kalus yang digunakan sebagai eksplan adalah yang berumur satu bulan dan mempunyai ciri-ciri spesifik yang menyerupai *pro-embryogenic mass (PEM)* dengan tingkat proliferasi yang tinggi. Setelah perlakuan iradiasi, sebagian dari kalus berstruktur remah dan mampu berproliferasi lebih lanjut, sedangkan sebagian lainnya berstruktur kompak dan bahkan ada yang mengalami pencoklatan hingga 100%, yaitu kalus yang berasal dari perlakuan 2 dan 4 Krad (Tabel 1). Hasil tersebut mengindikasikan bahwa pengaruh iradiasi bersifat acak dan dosis iradiasi lebih dari 1 Krad kemungkinan memacu aktivitas enzim polifenol oksidase. Pencoklatan disebabkan oleh oksidasi fenol setelah degradasi membran sel atau disorganisasi sel yang dilanjutkan dengan degradasi klorofil. Proses tersebut merupakan indikator dari terbentuknya quinon sebagai hasil dari aktivitas enzim tersebut (LAUKKANEN *et al.*, 2000). Kemungkinan lain, pencoklatan disebabkan oleh adanya keragaman pada tingkat seluler. Keragaman tersebut diduga dipengaruhi oleh tahap pertumbuhan atau status fisiologis sel atau jaringan dari eksplan yang digunakan dalam percobaan ini.

Tabel 1. Pengaruh dosis iradiasi terhadap daya hidup, pencoklatan, dan maturasi kalus purwoceng pada umur dua bulan setelah subkultur (BST)
 Table 1. The effect of irradiation doses to the survival, browning, and maturation rate of pruatjan calli at two months after planting (MAP)

Dosis iradiasi Irradiation doses (Krad)	Daya hidup Survival (%)	Pencoklatan Browning (%)	Maturasi Maturation (%)	Penampilan visual Visual performance
0	100	0	0	Remah (<i>friable</i>)
1	100	0	0	Remah (<i>friable</i>)
2	11	100	11	Kompak (<i>compact</i>)
3	11	89	11	Kompak (<i>compact</i>)
4	0	100	0	Kompak (<i>compact</i>)
5	33	33	33	Kompak (<i>compact</i>)

Pada Tabel 1 juga terlihat bahwa pertumbuhan kalus berkebalikan dengan maturasi. Pada kalus yang bertahan hidup dan tidak mengalami pencoklatan (dari perlakuan dosis iradiasi 0 dan 1 Krad), kalus tidak mengalami maturasi. Sebaliknya, pada kalus yang terhambat pertumbuhannya dan mengalami pencoklatan (dari perlakuan dosis iradiasi 2, 3, dan 5 Krad), maturasinya semakin terpacu. Kondisi tersebut menunjukkan terjadinya mekanisme pembentukan embrio somatik yang dipicu oleh kematian sel-sel di sekitarnya melalui *programmed cell death* (PCD). Menurut VAN DOORN *et al.* (2011), PCD merupakan bagian integral dari perkembangan tanaman selama morfogenesis jaringan, organ, atau embrio yang disebabkan oleh rusaknya vakuola (*vacuolar cell death*) atau sebagai respon terhadap stres biotik dan abiotik yang menyebabkan terjadinya nekrosis. Kemungkinan lain penyebab PCD adalah adanya perbedaan rasio auksin dan sitokinin endogen di dalam kalus. Dugaan tersebut diperkuat dengan laporan FILONOVA *et al.* (2000) yang mengatakan bahwa pembentukan PEM dan embrio somatik sangat erat hubungannya dengan penggunaan auksin dan sitokinin. Pada penelitian ini, kalus purwoceng yang berasal dari perlakuan 0 dan 1 Krad diduga memiliki kandungan auksin yang lebih tinggi daripada sitokinin sehingga kalus mengalami proliferasi terus-menerus dan sangat lambat dalam maturasi. Tingginya rasio auksin sitokinin tersebut juga dapat dideteksi dari tekstur kalus yang remah. Sebaliknya, pada kalus yang berasal dari perlakuan dosis iradiasi lebih dari 1 Krad, diduga kandungan sitokinin lebih tinggi daripada auksin sehingga persentase maturasi lebih

tinggi. Rendahnya rasio auksin sitokinin tersebut juga dapat dideteksi dari tekstur kalus yang kompak (Tabel 1).

Seleksi *In Vitro* dengan Cekaman Suhu Tinggi

Pada tahap seleksi *in vitro*, kalus juga mampu tumbuh dari bagian yang telah mengalami pencoklatan. Mekanisme PCD juga diduga sebagai penyebabnya, dimana sebagian kalus mengalami kematian dan sebagian lainnya hidup. FILONOVA *et al.* (2000) menggambarkan terjadinya PCD yang bertipe *vacuolar cell death*, didahului dengan autolisis PEM secara progresif yang menghasilkan vakuola sentral yang berukuran besar kemudian dilanjutkan dengan degradasi sitoplasma dan segmentasi nukleus hingga sitoplasma lenyap dan hanya menyisakan dinding sel. VAN DOORN *et al.* (2011) menggambarkan terjadinya PCD yang bertipe nekrosis, didahului dengan pembengkakan mitokondria, bocornya membran sel, dan dilanjutkan dengan penyusutan protoplas.

Gambar 1 memperlihatkan daya proliferasi dari kalus yang diiradiasi pada beberapa taraf dosis. Secara umum, dapat dikatakan bahwa terpacunya maturasi embrio somatik seiring dengan penghambatan proliferasi kalus. Pada dosis tertinggi (5 Krad), embrio somatik yang terbentuk lebih banyak daripada yang dihasilkan pada perlakuan iradiasi pada dosis yang lebih rendah. Diduga, dosis iradiasi yang tinggi mampu mengubah rasio fitohormon auksin dan sitokinin sehingga mengubah pola diferensiasi sel. Tahapan induksi kalus embriogenik pasca-iradiasi dan seleksi *in vitro* hingga pembentukan planlet yang siap diaklimatisasi ditampilkan pada Gambar 2.

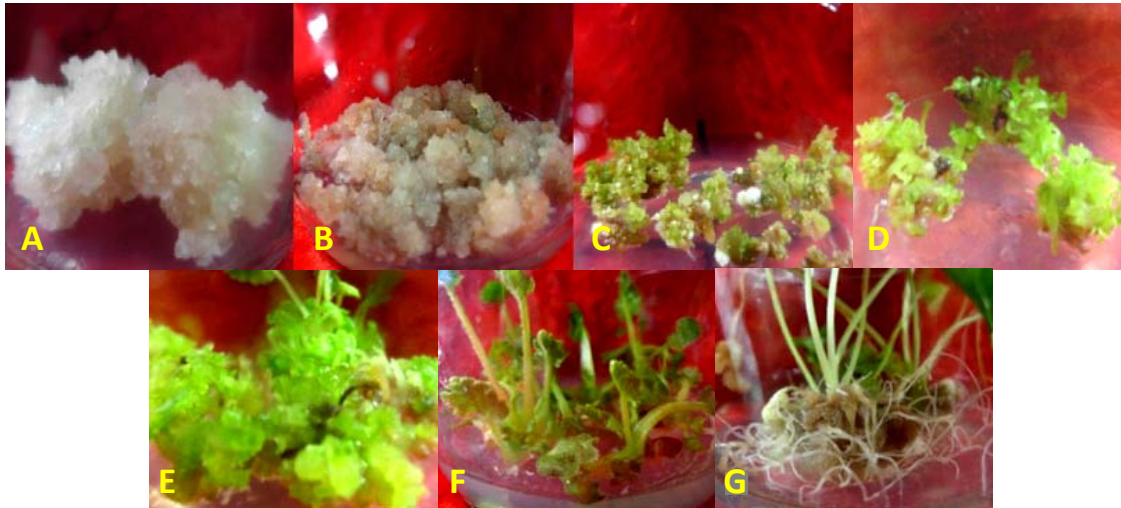


Gambar 1. Penampilan kalus purwoceng pasca perlakuan iradiasi dan seleksi *in vitro*: (A). kalus berproliferasi cepat, (B) kalus mencoklat dan diiringi dengan maturasi embrio somatik, (C) kalus yang mati, dan (D) maturasi embrio somatik yang cepat

Figure 1. The performance of embryogenic calli of pruatjan after irradiation and *in vitro* selection: (A) rapid proliferated calli, (B) browning callus followed by somatic embryo maturation, (C) unsurvived calli, and (D) rapid somatic embryo maturation (D)

Pada tahap seleksi *in vitro*, kalus yang diinkubasikan pada suhu 25°C mempunyai tingkat pertumbuhan yang lebih baik daripada kalus yang diinkubasikan pada suhu 20 dan 30°C. Hal ini mungkin disebabkan oleh tingginya tingkat kelembaban relatif di dalam *growth chamber* (80%) dibandingkan dengan ruang kultur (65%) dan inkubator

(60%). Kelembaban merupakan salah satu faktor yang berpengaruh terhadap vigoritas biakan. Biakan akan lebih vigor pada kelembaban yang lebih tinggi. Selain daya hidup yang lebih tinggi, jumlah embrio somatik yang terbentuk dari kalus yang diinkubasikan di dalam *growth chamber* juga lebih banyak (Tabel 2).



Gambar 2. Tahapan induksi kalus dan pembentukan planlet pasca perlakuan iradiasi dan seleksi *in vitro*: (A) kalus, (B) kalus embriogenik, (C) pembentukan embrio somatik, (D-E) tahapan pendewasaan embrio somatik, (F) elongasi embrio somatik, dan (G) pembentukan planlet

Figure 2. The steps of callus induction and plantlets formation after irradiation and *in vitro* selection treatment: (A) callus, (B) embryogenic callus, (C) embryo somatic formation (D-E), embryo somatic maturation, (F) embryo somatic elongation, and (G) plantlet formation

Berdasarkan Tabel 2, tampak bahwa suhu juga turut berperan dalam daya hidup dan pertumbuhan kalus. Pada tingkat kelembaban yang hampir sama (di ruang kultur dan inkubator), pertumbuhan kalus pada suhu 20°C lebih pesat daripada pertumbuhan kalus pada suhu 30°C. Beberapa kalus mengalami kematian pada suhu tinggi. Matinya kalus pada suhu tinggi didahului dengan pencoklatan. Menurut ALI *et al.* (2005), stres suhu menyebabkan hilangnya transpor elektron fotosintetik yang berakibat pada ketidakstabilan pusat reaksi fotosistem II (PSII) karena kerusakan oksidatif. Dengan demikian, kalus yang bertahan hidup dan berdiferensiasi pada kondisi suhu tinggi tersebut diasumsikan sebagai kandidat somaklon yang toleran terhadap cekaman suhu tinggi. Dilaporkan bahwa tanaman mampu mengatasi stres oksidatif dengan cara menginduksi terbentuknya protein *heat-shock*, metabolit antioksidan, dan enzim-enzim protektif (ALI *et al.* 2005). GOSAL *et al.* (1998) menyatakan bahwa pertumbuhan planlet kentang pada kondisi suhu tinggi dipengaruhi oleh perlakuan iradiasi. Planlet hasil iradiasi tersebut mampu membentuk umbi mikro, sedangkan planlet kontrol tidak mampu membentuk umbi mikro ketika diinkubasikan pada suhu tinggi.

Sebagian dari kalus embriogenik mengalami *vitrous* atau *hyperhydricity* dan bahkan mencoklat pada media elongasi (Tabel 3). Oleh karena itu, perlu dilakukan

tindakan khusus pada biakan tersebut supaya ketegaran biakan tetap terpelihara. Untuk meningkatkan ketegaran biakan maka dilakukan subkultur secara frekuentif ke dalam media dengan kadar sukrosa yang lebih tinggi dari 4%. Sebagaimana dijelaskan oleh KARKONEN dan KOUTANIEMI (2010), pembentukan lignin ekstraseluler diinduksi oleh sukrosa. Peningkatan taraf sukrosa juga diterapkan oleh DAHAB *et al.* (2004) untuk menambah ketegaran dan memacu pertumbuhan biakan *Ruscus hypoglossum*.

Berdasarkan Tabel 3, jumlah embrio somatik yang berasal dari perlakuan suhu 20°C lebih banyak (1995 biakan) dan lebih tegar daripada yang berasal dari perlakuan 25°C (630 biakan) dan 30°C (615 biakan). Hal ini memperlihatkan besarnya pengaruh tekanan seleksi pasca-iradiasi dan seleksi *in vitro* terhadap pertumbuhan biakan purwoceng. Namun demikian, embrio somatik tersebut tidak membentuk struktur bipolar yang sempurna, dimana akar belum berkembang dengan baik sehingga hanya tampak sebagai tunas *in vitro*. Diduga, sitokinin lebih dominan dibandingkan dengan auksin sehingga pertumbuhan tajuk lebih pesat daripada pertumbuhan akar. Hal ini mengindikasikan bahwa rasio sitokinin-auksin mengalami perubahan oleh karena stres pasca-iradiasi dan seleksi *in vitro*. Fenomena ini berbeda dengan hasil

penelitian sebelumnya, karena proses regenerasi purwoceng secara embriogenesis somatik (tanpa perlakuan iradiasi dan seleksi *in vitro*) mampu menghasilkan struktur embrio somatik yang bersifat bipolar secara sempurna

(mengandung tunas dan akar) pada media yang sama (media DKW dengan penambahan IBA 5 ppm) (ROOSTIKA *et al.*, 2007). Oleh karena itu, induksi perakaran perlu dilakukan untuk memacu pembentukan planlet.

Tabel 2. Pengaruh dosis iradiasi dan suhu inkubasi terhadap daya hidup kalus dan maturasi embrio somatik purwoceng pada umur tiga BST
 Table 2. The effect of irradiation dosages and temperature incubation level to the survival rate and maturation rate of pruatjan calli at three MAP

Kondisi inkubasi <i>Incubation condition</i>	Dosis iradiasi <i>Irradiation doses</i> (Krad)	Kalus yang bertahan hidup <i>Survived calli</i> (%)	Jumlah total embrio somatik <i>Total number of somatic embryos</i>	Penampilan visual <i>Visual performance</i>
Ruang kultur/Room culture Suhu/Temperature 20±3 °C Kelembaban/ <i>Relative humidity</i> 65%	0	53,3	1	Kalus berproliferasi cepat (<i>rapid proliferated calli</i>)
	1	36,7	2	Kalus berproliferasi cepat (<i>rapid proliferated calli</i>)
	2	3,3	0	Embrio tidak dewasa (<i>no embryo maturation</i>)
	3	0	0	Kalus mencoklat (<i>calli were browning</i>)
	4	6,7	0	Embrio tidak dewasa (<i>no embryo maturation</i>)
	5	6,7	4	Pendewasaan embrio cepat (<i>rapid embryo maturation</i>)
Growth chamber Suhu/Temperature 25±2 °C Kelembaban/ <i>Relative humidity</i> 80%	0	86,7	4	Pendewasaan embrio lambat (<i>slow embryo maturation</i>)
	1	50,0	0	Embrio tidak dewasa (<i>no embryo maturation</i>)
	2	-	-	Terkontaminasi (<i>contaminated</i>)
	3	26,7	14	Pendewasaan embrio cepat (<i>rapid embryo maturation</i>)
	4	40,0	26	Pendewasaan embrio sangat cepat (<i>highly rapid embryo maturation</i>)
	5	10,0	40	Pendewasaan embrio sangat cepat (<i>highly rapid embryo maturation</i>)
Inkubator/Incubator Suhu/Temperature 30±4 °C Kelembaban/ <i>Relative humidity</i> 60%	0	26,7	0	Kalus mengering (<i>dry calli</i>)
	1	16,7	0	Kalus mengering (<i>dry calli</i>)
	2	10,0	2	Kalus mencoklat (<i>browning calli</i>)
	3	10,0	0	Kalus mencoklat (<i>browning calli</i>)
	4	10,0	0	Kalus mencoklat (<i>browning calli</i>)
	5	10,0	0	Kalus mencoklat (<i>browning calli</i>)

Induksi Perakaran Somaklon Putatif

Untuk memacu perakaran, tunas *in vitro* dipindahkan ke media perakaran. Penggunaan media DKW yang mengandung NAA atau kombinasi antara NAA dan IBA terbukti tidak dapat menginduksi perakaran. Peningkatan konsentrasi sukrosa hingga 6% juga tidak mampu memacu perakaran. Pada media tersebut, pembentukan kalus justru lebih terpacu (75-100%) daripada pembentukan akar (0%) (Tabel 4). Diduga, media DKW kaya akan unsur hara nitrogen dalam bentuk teroksidasi (NO₃⁻) sehingga proses diferensiasi tajuk lebih dominan daripada pembentukan akar. Selain itu, kandungan myo-inositol di dalam media DKW tergolong tinggi (1000 ppm). Lebih lanjut, IAA ditransportasikan, antara lain dalam bentuk ikatan ester IAA-myo-inositol, sehingga diharapkan dapat merangsang perakaran. Namun demikian, pada penelitian ini, perakaran tunas *in vitro* purwoceng tidak terpacu. Media DKW juga banyak mengandung unsur hara sulfur sehingga memicu terjadinya kelayuan daun karena terbentuknya metionin yang merupakan prasad biosintesis

etilen. Oleh karena itu, pada tahap selanjutnya perlu digunakan media dasar lainnya.

Berdasarkan rendahnya tingkat pengkalusan dan tingginya rasio daun segar, perlakuan NAA 1,5 ppm dan sukrosa 4% dianggap merupakan perlakuan yang terbaik (Tabel 4) sehingga taraf tersebut digunakan pada tahap selanjutnya. Untuk lebih memacu perakaran somaklon putatif maka digunakan media dasar MS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa formulasi tersebut mampu menginduksi terbentuknya akar walaupun dengan persentase yang rendah (Tabel 5) dengan periode inisiasi perakaran yang cukup lama, yaitu sekitar 45 hari. Beberapa penelitian melaporkan bahwa biakan purwoceng cukup sulit untuk diinduksi perakarannya (MARISKA *et al.*, 1995; SYAHID *et al.* 2004; ROOSTIKA *et al.*, 2006). Tingkat keberhasilan tertinggi dalam induksi perakaran purwoceng dilaporkan oleh ROOSTIKA *et al.* (2006) melalui penggunaan NAA 1-1,5 ppm, yaitu mencapai 100% walaupun dengan waktu inisiasi perakaran yang lama (38-55 hari).

Tabel 3. Jumlah somaklon putatif yang dielongasi dan diproliferasi pada media DKW dengan penambahan BA 4 ppm dan TDZ 0,4 ppm
 Table 3. The number of putative somaclones which elongated and proliferated on DKW basal media containing of 4 ppm BA and 0.4 ppm TDZ

Suhu Temperatures (⁰ C)	Dosis iradiasi Irradiation doses (Krad)	Jumlah total somaklon putatif Total number of putative somaclones	Penampilan visual Visual performance
20	0	210	Tegar (<i>vigorous</i>)
	1	405	Sebagian vitreous (<i>partly vitreous</i>)
	2	810	Sebagian vitreous (<i>partly vitreous</i>)
	3	570	Sebagian vitreous (<i>partly vitreous</i>)
	4	0	Tidak terbentuk (<i>no somatic formation</i>)
	5	0	Tidak terbentuk (<i>no somatic formation</i>)
Jumlah total		1995	
25	0	60	Sebagian vitreous (<i>partly vitreous</i>)
	1	210	Sebagian vitreous (<i>partly vitreous</i>)
	2	-	Terkontaminasi (<i>contaminated</i>)
	3	15	Sebagian vitreous (<i>partly vitreous</i>)
	4	255	Sebagian coklat (<i>partly browning</i>)
	5	90	Sebagian coklat (<i>partly browning</i>)
Jumlah total		630	
30	0	255	Sebagian vitreous (<i>partly vitreous</i>)
	1	90	Sebagian vitreous (<i>partly vitreous</i>)
	2	60	Sebagian vitreous (<i>partly vitreous</i>)
	3	15	Sebagian vitreous (<i>partly vitreous</i>)
	4	135	Sebagian coklat (<i>partly browning</i>)
	5	60	Sebagian coklat (<i>partly browning</i>)
Jumlah total		615	

Tabel 4. Pengaruh media induksi perakaran terhadap pembentukan planlet dari embrio somatik purwoceng perlakuan 0 Krad dan 20⁰C pada 30 HST
 Table 4. The effect of root induction media to the formation of plantlet from pruatjan somatic embryo with 0 Krad treatment and 20⁰C at 30 DAP

Media induksi perakaran Root induction media	Pembentukan kalus Callus formation (%)	Pembentukan akar Root formation (%)	Rasio daun segar Fresh leaf ratio (%)
NAA 1,5 ppm + sukrosa 3%	100	0	78,6
NAA 1,5 ppm + sukrosa 4%	83	0	80,8
NAA 1,5 ppm + sukrosa 5%	100	0	42,6
NAA 1,5 ppm + sukrosa 6%	75	0	47,6
NAA 1 ppm + IBA 0,5 ppm + sukrosa 4%	100	0	60,4
NAA 0,5 ppm + IBA 1 ppm + sukrosa 4%	100	0	57,5

Keterangan: media dasar adalah DKW
 Note : the basal medium was DKW

Tabel 5. Tingkat pembentukan planlet dari somaklon putatif pada media MS dengan penambahan NAA 1,5 ppm
 Table 5. The level of plantlet formation of putative somaclones on MS media with addition of 1.5 ppm NAA

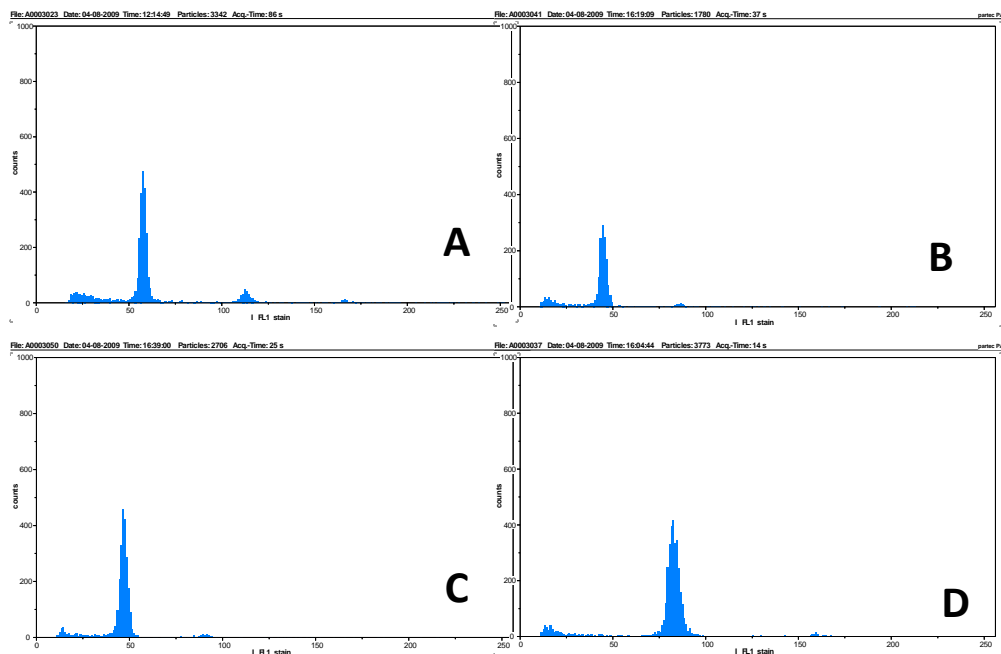
Perlakuan iradiasi dan seleksi <i>in vitro</i> Irradiation and <i>in vitro</i> selection treatments	Jumlah kultur The number of induced cultures	Jumlah planlet yang terbentuk The number of plantlets
0 Krad 20 ⁰ C	32	0
1 Krad 20 ⁰ C	8	0
2 Krad 20 ⁰ C	80	10 (12,5%)
3 Krad 20 ⁰ C	13	13 (100%)
5 Krad 25 ⁰ C	17	0
1 Krad 30 ⁰ C	7	0
2 Krad 30 ⁰ C	22	0
3 Krad 30 ⁰ C	86	0
5 Krad 30 ⁰ C	93	0

Analisis Keragaman Genetik secara *Flowcytometry*

Berdasarkan pengamatan visual, diperoleh embrio somatik (dari perlakuan suhu 25⁰C) yang memiliki keragaan morfologi yang berbeda dengan perlakuan kontrol. Sebagai contoh, petiol (tangkai daun) dari biakan tertentu berbentuk pipih (seperti sapu) dan memiliki mata tunas yang berjajar dan berlimpah. Perbedaan morfologi tersebut menimbulkan dugaan terjadinya perubahan genetik. Fenotipe merupakan interaksi antara genotipe dan lingkungan sehingga beberapa biakan yang memiliki karakteristik morfologi yang berbeda kemungkinan merupakan hasil dari keragaman somaklonal. EL-DOUGDOUG *et al.* (2007) dan ROOSTIKA *et al.* (2012) masing-masing melaporkan bahwa perubahan karakter morfologi biakan pisang dan nenas merupakan fenomena

keragaman somaklonal yang dikonfirmasi melalui analisis molekuler.

Hasil analisis ploidi secara *flowcytometry* memperkuat dugaan adanya keragaman somaklonal karena adanya perubahan pada tingkat ploidi. Di antara sampel yang diuji, beberapa biakan memiliki tingkat ploidi yang berbeda dengan tanaman kontrol (2x) bahkan tingkat ploidinya mencapai tetraploid (4x) (Gambar 3). Hal ini membuktikan bahwa induksi mutasi secara fisik dengan sinar gamma mampu menciptakan keragaman baru. Hasil penelitian JOSHI dan RAO (2009) menunjukkan bahwa perlakuan iradiasi sinar gamma menyebabkan terbentuknya somaklon padi yang terdeteksi secara morfologi dan molekuler.



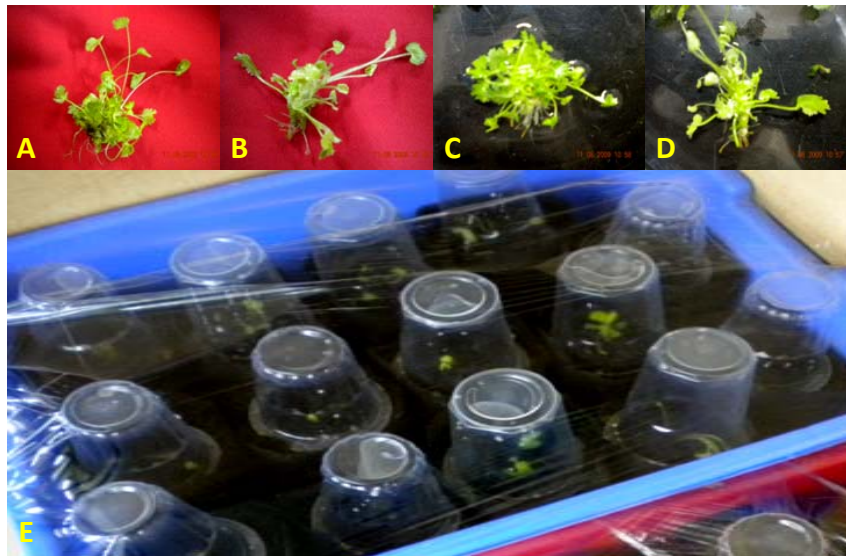
Gambar 3. Tingkat ploidi beberapa somaklon putatif purwoceng berdasarkan analisis *flowcytometry*: (A) kontrol diploid, (B dan C) somaklon putatif yang diduga bersifat diploid, dan (D) somaklon putatif yang diduga bersifat tetraploid

Figure 3. The ploidy level of putative somaclones of pruatjan based on *flowcytometry* analysis: (A) diploid control, (B and C) diploid putative somaclone, and (D) tetraploid putative somaclone

Aklimatisasi Somaklon Putatif Hasil Iradiasi dan Seleksi *In Vitro*

Pada tahap aklimatisasi, planlet diinkubasikan di dalam ruang kultur terlebih dahulu karena secara alami tanaman purwoceng hidup di daerah yang bersuhu rendah di pegunungan. Aklimatisasi di rumah kaca dihindari karena suhu di rumah kaca terlalu tinggi sehingga dikhawatirkan planlet akan cepat mengalami dehidrasi. Hasil percobaan menunjukkan bahwa planlet dapat bertahan hidup pada bulan pertama, namun kemudian

mengalami kematian (Gambar 4). Matinya planlet (kontrol maupun perlakuan) tersebut diduga karena kondisinya yang sangat lemah dengan sistem perakaran yang sangat terbatas sehingga belum siap untuk hidup secara autotrof. Untuk meningkatkan keberhasilan penelitian ini maka disarankan untuk memodifikasi media dan lingkungan tumbuh planlet selama aklimatisasi. Perlakuan semi-ototrof pada suhu rendah (kurang dari 20⁰C) dalam media cair diduga dapat meningkatkan ketegaran planlet sebelum tahapan aklimatisasi.



Gambar 4. Keragaan planlet dan bibit purwoceng setelah induksi perakaran dan pada tahap aklimatisasi: planlet (A-D) dan bibit yang aklimatisasi di dalam ruang kultur dengan suhu 20-25⁰C (E)

Figure 4. The performance of pruatjan plantlets and seedlings after root induction and during acclimatization: (A-D) plantlets and (E) acclimated seedlings in room culture with temperature of 20-25⁰C

KESIMPULAN

Kalus purwoceng mampu bertahan hidup pasca-iradiasi pada dosis tertinggi (5 Krad). Pengaruh iradiasi terhadap pertumbuhan kalus bersifat acak. Pada tahap seleksi *in vitro*, kalus embriogenik mampu tumbuh pada cekaman suhu tertinggi (30⁰C). Tingkat proliferasi kalus yang tinggi dan jumlah embrio somatik terbanyak diperoleh dari perlakuan suhu 25⁰C. Di antara embrio somatik yang terbentuk, hanya embrio yang berasal dari perlakuan suhu 20⁰C saja yang berhasil membentuk planlet. Media yang terbaik untuk induksi perakaran adalah media MS yang mengandung sukrosa 4% dengan penambahan NAA 1,5 ppm.

Analisis tingkat ploidi menunjukkan terbentuknya keragaman baru dengan ploidi yang mencapai tetraploid (4x). Embrio somatik yang terbentuk dari perlakuan suhu tinggi tersebut merupakan kandidat somaklon yang toleran suhu tinggi pada lingkungan dataran rendah. Secara umum, dapat dikatakan bahwa induksi mutasi secara fisik dengan sinar gamma pada sel-sel somatik purwoceng dapat menciptakan keragaman baru, dan seleksi *in vitro* dengan cekaman suhu tinggi mampu menyeleksi atau menskrining kandidat somaklon yang toleran terhadap suhu tinggi pada lingkungan dataran rendah.

DAFTAR PUSTAKA

AHLOOWALIA, B.S. 1986. Limitation to the use of somaclonal variation in crop Improvement. *In: Semal, J. (Ed.). Somaclonal Variation and Crop*

Improvement. Martinus Nijhoff Publ. Dordrecht. p. 15-27.

- ALI, M.B., E-J. HAHN, and K-Y. PAEK. 2005. Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation, and lipoxygenase activity in *Phalaenopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 43: 213-223.
- ARUNYANART, S. and S. SOONTRONYATARA. 2002. Mutation induction by γ and x-ray irradiation in tissue cultured lotus. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*. 70: 119-122.
- DAHAB, A.M.A., A.M.A. HABIB, Y.A. HOSNI, and A.M.M. GABR. 2004. Effect of MS-salt strength, sucrose, and IBA concentration, and acclimatization media on *Ruscus hypoglossum* L. micropropagation. *Arab J. Biotech.* 8(1): 141-154.
- DAMAYANTI, F. 2002. Seleksi *in vitro* untuk ketahanan terhadap penyakit layu *fusarium* pada tanaman abaka (*Musa textilis* Nee.). Tesis Magister. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. 47 hlm.
- DAUD, M.E. 1996. Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 24: 159-186.
- DRIVER, J.A. and A.H. KUNIYUKI. 1984. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. *Hort. Science*. 19(4): 507-509.
- EL-DOUGDOUG, Kh.A., H.M.S. EL-HARTHI, H.M. KORKAR, and R.M. TAHA. 2007. Detection of somaclonal variations in banana tissue culture using isozyme and DNA fingerprint analysis. *Journal of Applied Sciences Research*. 3(7): 622-627.

- ERMIATI, C. INDRAWANTO, dan O. ROSTIANA. 2005. Kontribusi purwoceng sebagai tanaman pekarangan terhadap pendapatan petani. Makalah pada Seminar Nasional Tanaman Obat Indonesia XXVIII. 15-16 September 2005. Balitro-POKJANAS TOI. Bogor.
- FILONOVA, L.H., P.V. BOZHKOVA, V.B. BRUKHIN, G. DANIEL, B. ZHIVOTOVSKY, and S. VON ARNOLD. 2000. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *Journal of Cell Science*. 113: 4399-4411.
- GOSAL, S.S., A. DAS, J. GOPAL, J.L. MINOCHA, H.R. CHOPRA, and H.S. DHALIWAL. 1998. *In vitro* induction of variability through radiation for late blight resistance and heat tolerance in potato. Proceedings of a Final Research Co-ordination Meeting. Organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Shanghai, China, 17-21th August. p. 7-13.
- HERNANI dan O. ROSTIANA. 2004. Analisis kimia akar purwoceng (*Pimpinella pruatjan*). Makalah disampaikan pada Seminar Indonesian Biopharmaca and Excibition Conference. Yogyakarta, 14-15 Juli 2004.
- JOSHI, R.K. and G.J.N. RAO. 2009. Somaclonal variation in submergence tolerant rice cultivars and induced diversity evaluation by PCR markers. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*. 1(5): 080-088.
- JUHONO, J.T. 2004. Usahatani purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molkenb.), potensi, peluang, dan masalah pengembangannya. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat*. 15(1): 25-32.
- JUNIARTO, A.Z. 2004. Perbedaan pengaruh pemberian ekstrak *Eurycoma longifolia* dan *Pimpinella alpina* pada spermatogenesis tikus Sprague Dawley. Tesis. Pascasarjana Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro. Semarang. 63 hlm.
- KÄRKÖNEN, A. and S. KOUTANIEMI. 2010. Lignin biosynthesis studies in plant tissue cultures. *Journal of Integrative Plant Biology*. 52(2): 176-185. DOI: 10.1111/j.1744-7909.2010.00913.x
- KOORNNEEF, M. 1991. Variation and mutant selection in plant cell and tissue culture. *In: Jones, L. (Ed). Biotechnological Innovation in Crop Improvement*. London: Butterworth-Heinemann Ltd. p. 100-115.
- KOSMIATIN, M., I. MARISKA, HOBIR, A. HUSNI, Y. RUSYADI, dan M. TOMBE. 2000. Seleksi silang ketahanan tunas *in vitro* panili terhadap asam fusarat dan ekstrak *Fusarium oxysporum*. *Jurnal Bioteknologi Pertanian*. 5(20): 77-83.
- KOSMIATIN, M., I. MARISKA, I. ROOSTIKA, E.G. LESTARI. 2006. Pembentukan pisang ambon toleran terhadap penyakit layu fusarium melalui variasi somaklonal. *Zuriat* 17(1): 16-24.
- KUMAR, A. and J.L. BENNETZEN. 1999. Plant retrotransposon. *Annu. Rev. Genet.* 33: 479-532.
- LAUKKANEN, H., L. RAUTIAINEN, E. TAULAVUORI, and A. HOHTOLA. 2000. Changes in cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. *Tree Physiology*. 20: 467-475.
- LESTARI, E.G., I. MARISKA, I. ROOSTIKA, dan M. KOSMIATIN. 2006. Induksi mutasi dan seleksi *in vitro* menggunakan asam fusarat untuk ketahanan terhadap penyakit layu pada pisang ambon hijau. *Berita Biologi*. 8(1): 27-36.
- LUAN, Y-S., J. ZHANG, X-R. GAO, and L-J. AN. 2006. Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), *in vitro* screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*. 88(1): 77-81.
- MARISKA, I., R. PURNAMANINGSIH, and M. KOSMIATIN. 1995. The growth of culture of purwoceng on several basal media. Proceeding of Congress of National Science VI. September 11-15th. Jakarta. p. 250-256.
- RAHARDJO, M. 2003. Purwoceng tanaman obat aprodisiak yang langka. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri*. 9(2): 4-7.
- REMOTTI, P.C., H.J.M. LOFFER, and L. VAN VLOTEN-DOTING. 1995. Selection of cell lines and regeneration of plants resistant to fusaric acid from *Gladiolus x grandiflorus*. cv. Peter Pears. *Euphytica* 96(2): 237-245.
- RIVAI, M.A., RUGAYAH, and E.A. WIDJAJA. 1992. Thirty years of the eroded species medicinal crops. *Floribunda, Pioneer of Indonesian Plant Taxonomy*. Bogor. 28 pp.
- ROOSTIKA, I., I. DARWATI, and I. MARISKA. 2005. Micropropagation of purwoceng (*Pimpinella alpina* KDS) through organogenesis and somatic embryogenesis. Seminar on Asean Science and Technology Week. BPPT. Jakarta. August 5-7th. (tidak dipublikasikan).
- ROOSTIKA, I., I. DARWATI, dan I. MARISKA. 2006. Regeneration of pruatjan (*Pimpinella pruatjan* Molk.): Axillaries bud proliferation and encapsulation. *Agrobiogen*. 2(2): 68-73.
- ROOSTIKA, I., R. PURNAMANINGSIH, I. DARWATI, and I. MARISKA. 2007. Regeneration of *Pimpinella pruatjan* through somatic embryogenesis. *Indonesian Journal of Agricultural Science*. 8(2): 60-66.
- ROOSTIKA, I. 2012. Pengembangan Metode Organogenesis dan Embriogenesis Somatik pada Nenas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) serta Deteksi Dini untuk Mereduksi Keragaman Somaklonal. Disertasi Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. 158 hlm.
- SPECHT, J.E. and G.L. GRAEF. 1996. Limitation and potentials of genetic manipulation of soybean. *In: Verna D. P. S., and R.C. Shoemaker (eds.) Soybean: Genetic Molecular Biology and Biotechnology*. CAP International. Walling Ford. p. 91-105.

- SUZERY, M., B. CAHYONO, NGADIWIYANA, dan H. NURHASNAWATI. 2004. Senyawa stigmasterol dari *Pimpinella alpina* Molk. Suplemen. 39(1): 39-41.
- SYAHID, S.F., O. ROSTIANA, dan MIFTAKHUROHMAH. 2004. Pengaruh NAA dan IBA terhadap perakaran purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk.) *in vitro*. Jurnal Littri 11(4): 146-151
- VAN DEN BULK, R.U. 1991. Application of cell and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding. A Review. Euphytica. 56: 269-285.
- VAN DOORN, W.G., E.P. BEERS, J.L. DANGL, V.E. FRANKLINTONG, P. GALLOIS, I. HARA-NISHIMURA, A.M. JONES, M. KAWAI-YAMADA, E. LAM, J. MUNDY, L.A.J. MUR, M. PETERSEN, A. SMERTENKO, M. TALIANSKY, F. VAN BREUSEGEM, T. WOLPERT, E. WOLTERING, B. ZHIVOTOVSKY, and P.V. BOZHKOVA. 2011. Morphological classification of plant cell deaths. Cell Death and Differentiation. p. 1-6. Macmillan Publishers.