

REGENERASITANAMAN PEPAYA HASIL TRANSFORMASI DENGAN GEN ACC OKSIDASE ANTISENSE

[Regeneration of Transforman Papaya Plant with ACC Oxidase Antisense Gene]

Ragapadmi Purnamaningsih ✉, Ika Mariska dan Sri Hutami

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Jin Tentara Pelajar No 3 A, Cimanggu, Bogor. Tlp. 0251 -337975

ABSTRACT

Papaya is climacteric fruit. As the other climacteric fruit, papaya has hight speed ripening, so papaya fruit can not stored in **long** period. Genetic engineering is one alternative technology to solve the problem by introducing antisense oxidase ACC gen to **the** papaya plant genome to get delay ripening characteristic. Success of genetic engineering technology depend on plant regeneration system. There were two ways of plant regeneration: organogenesis and somatic embryogenesis. The aim of this experiment was to induce root formation of papaya planlet which trasformed by ACC oxidase antisense gene. The former experiment showed that explant which transformed by ACC oxidase antisense gene can regenerated to be shoot/planlet with P6 medium. But when the shoot transferred to root induction medium the root was difficult to formed, callus was formed at the base of shoot, the leaves turn to yellow and fall down. Many media formulations were tried in this experiment with different basic medium for root induction and development. MS (1, Vi) DKW (1, 'A) and WPM (1, Vi) were used as basic media combined with sucrose (2 % and 3 %) and plant growth regulators (kinetin, IAA, and paclobutrazol) adding with some organic compound. Result of the experiment showed that MS Vi + paclobutrazol 0.5 mg/l induced root formation 80 %, inhibited callus formation and decreased yellowing and falling of the leaves.

Kata Kunci: Tanaman pepaya, transformasi gen, kultur *in vitro*, regenerasi.

PENDAHULUAN

Pepaya (*Carica papaya* L.) merupakan salah satu tanaman yang penting di daerah tropis dan sub tropis. Di Indonesia pepaya sangat populer karena pepaya dapat dipergunakan untuk berbagai keperluan antara lain buahnya dapat dikonsumsi sebagai buah segar, daunnya dapat digunakan sebagai sayuran dan juga mengandung papain dan chymopapain yang dapat dipergunakan dalam pembuatan makanan, obat-obatan dan industri tekstil.

Pepaya merupakan buah klimakterik yang mempunyai fase klimakterik yang tajam diiringi dengan laju pemasakan buah yang sangat cepat. Hal tersebut menyebabkan buah pepaya tidak dapat disimpan dalam waktu yang lama. Secara konvensional masalah tersebut belum ditemukan pemecahannya. Dengan berkembangnya teknik rekayasa genetika, maka penundaan pemasakan buah dapat dilakukan dengan menghambat produksi etilen yaitu dengan mengintroduksi gen ACC oksidase antisense ke dalam genom tanaman melalui proses transfer gen. Pada buah-buah klimakterik proses pemasakan buah dikendalikan oleh etilen.

Etilen dihasilkan dari methionin melalui S-adenosilmethionin (SAM) dan 1-aminopropana 1 asam karboksilat (ACC). ACC sintase dan ACC oksidase merupakan dua gen yang terlibat dalam jalur biosintesis etilen. (Pauziah *et al.*, 2003).

Regenerasi tanaman merupakan salah satu tahap penting yang menentukan keberhasilan proses transformasi genetik. Menurut Petri dan Burgos (2005) keberhasilan regenerasi tanaman transforman bersifat spesifik genotipe, dimana metoda regenerasi pada satu kultivar akan berbeda dengan kultivar lainnya. Regenerasi tanaman dapat dilakukan melalui dua jalur yaitu organogenesis dan embriogenesis somatik. Dalam perbaikan tanaman jalur embriogenesis somatik lebih disukai karena tanaman yang diperoleh berasal dari satu sel sehingga kemungkinan untuk memperoleh tanaman transforman lebih besar.

Dalam metode perbanyakan melalui kultur *in vitro* pertumbuhan dan perkembangan eksplan sangat dipengaruhi oleh jenis media dasar dan zat pengatur tumbuh. Media MS merupakan media dasar yang umumnya digunakan untuk perbanyakan sejumlah besar spesies tanaman. Media dasar tersebut kaya

akan mineral yang merangsang terjadinya organogenesis. Demikian pula untuk perbanyakan berbagai tanaman obat dan tanaman hias. Walaupun demikian, pada beberapa spesies tanaman pemakaian media dengan kandungan garam mineral yang kaya dapat menghambat pertumbuhan kultur. Modifikasi kadar makro dan mikro dapat lebih menguntungkan. Dengan demikian banyak media dasar yang mempunyai kandungan hara total yang lebih rendah daripada media MS dan lebih efektif dalam memacu proses diferensiasi, misalnya media WPM (Woody Plant Medium) yang banyak digunakan pada perbanyakan tanaman berkayu. Media tersebut mempunyai kandungan total ion yang lebih rendah daripada medium MS. Disamping media dasar MS dan WPM, media dasar DKW (Driver&Kuniyaki) sering pula digunakan pada mikropropagasi berbagai spesies tanaman. Selain hara makro dan mikro dalam kultur *in vitro* zat pengatur tumbuh sitokinin dan auksin berperan dalam pertumbuhan dan morfogenesis. Keseimbangan kedua zat pengatur tumbuh tersebut menentukan pola diferensiasi eksplan.

Pada banyak jenis tanaman, perakaran sering menjadi faktor krisis. Pada perbanyakan melalui kultur jaringan, baik pada pertanaman berdingk lunak maupun tanaman tahunan berkayu (Kool *et al.*, 1999). Zat pengatur tumbuh yang sering digunakan dalam memacu pertumbuhan akar adalah IAA, IBA dan NAA. Pada tanaman kapulaga pemberian IAA ke dalam media MS memberikan hasil yang lebih baik untuk perakaran (Mariska *et al.*, 1992). Pada tanaman pule pandak (*Rauvolfia serpentina*) mendapatkan bahwa pengenceran garam makro dari media dasar MS sampai 0.5-nya dan diberi IBA menghasilkan jumlah akar yang lebih banyak daripada media MS sesuai formulasi dasar (Seswita *et al.*, 1993). Untuk menginduksi perakaran pepaya secara *in vitro*, Yie dan Liaw (1977) menggunakan media dasar MS dengan penambahan IAA 5 mg/l serta intensitas cahaya 3000 - 4000 lux. Selanjutnya Minh dan Thu (2001) menggunakan media dasar MS tanpa zat pengatur tumbuh untuk menginduksi perakaran tanaman pepaya. Walaupun sudah ditemukan berbagai formulasi media untuk menginduksi perakaran pepaya, namun banyak kasus ditemukan bahwa tanaman

sebelum dirransformasi dapat membentuk akar dengan baik ternyata setelah disisipkan gen tertentu daya regenerasinya berkurang sehingga perlu dicoba formulasi media lainnya (Lowe *et al.*, 1994).

Tujuan dari percobaan ini adalah untuk menginduksi pembentukan akar pada biakan pepaya hasil transformasi dengan gen ACC oksidase antisense.

BAHENDAN METODA

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian.

Eksplan yang digunakan adalah kalus embriogenik yang berasal dari embriozigotik pepaya. Transformasi dilakukan dengan menggunakan "particle bombardment" (Biolistic PDS 1000/He Biorad) dengan tekanan 1100 psi, 27 inHg dengan jarak tembak 5 dan 7 cm. Plasmid yang digunakan adalah pGA643SM4(ACC oksidase antisense, nptII). Embrio yang ditransformasi kemudian dipindahkan ke media M4C (MS +2.4-D 20 mg/l+ sukrosa 30 g/l) atau P6 (MS + BA 0,4 mg/l + kinetin 0,1 mg/l) dengan penambahan kanamicin 150 mg/l selama 1 bulan. Kalus yang bertahan hidup kemudian di sub kultur dan diregenerasikan pada media yang sama dengan penurunan konsentrasi kanamicin menjadi 100 dan 50 mg/l. Setelah eksplan beregenerasi membentuk tunas, maka selanjutnya tunas dipindahkan ke media baru untuk menginduksi pembentukan akar. Masalah yang dihadapi pada tahap ini adalah akar sulit terbentuk dan tumbuhnya kalus pada bagian pangkal batang, selain itu juga terjadi penguningan dan perontokan daun.

Percobaan terdiri atas 3 tahap. Percobaan *pertama* bertujuan untuk mengetahui pengaruh penggunaan media dasar MS dan pengenceran garam makro hingga V_i dari formulasi dasar (MS 1/2) dikombinasikan dengan penambahan kinetin 0.1 mg/l serta sukrosa pada taraf 2% dan 3%. *Percobaan kedua* bertujuan untuk mengetahui pengaruh penggunaan media dasar MS (1, 'A) dan WPM (1, $\frac{1}{2}$) dikombinasikan dengan IAA (0,1 dan 0,5 mg/l) dan AgNO₃ 5 mg/l. Sedangkan *percobaan ketiga* bertujuan untuk mengetahui penggunaan media dasar

MS (1, Vi) dan DKW (1, Vi) dengan penambahan IAA (0,1 dan 0,5 mg/1); IBA (0,1 dan 0,5 mg/1) serta dikombinasikan dengan paclobutrazol 0,5 mg/1 dan arginin 100 mg/1.

Tunas yang dapat berakar selanjutnya diaklimatisasi di rumah kaca dengan menggunakan campuran media tanah : pupuk kandang dengan perbandingan 1:1. Pengamatan dilakukan terhadap keadaan visual biakan dan persentase tanaman yang dapat berakar.

HASIL

Kalus embriogenik yang ditransformasi dapat beregenerasi setelah dipindahkan pada media M4C atau P6. Foto 1 memperlihatkan proses pertumbuhan

dan perkembangan embriosomatik membentuk bibit somatik. Namun demikian walaupun dapat membentuk bibit somatik, ternyata tidak semua bibit tersebut dapat membentuk tunas yang normal (Foto 2), sedangkan tunas yang tumbuh normal menghadapi masalah penguningan dan perontokan dan sulit membentuk akar(Foto3).

Percobaan pertama

Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa penggunaan media MS 1/2 dan kinetin 0.1 mg/1 dengan konsentrasi sukrosa 3% dapat menginduksi pembentukan akar sebesar 44% (Tabel 1), tetapi pada bagian pangkal batang terbentuk kalus yang cukup besar sehingga dapat mengurangi keberhasilan proses aklimatisasi.

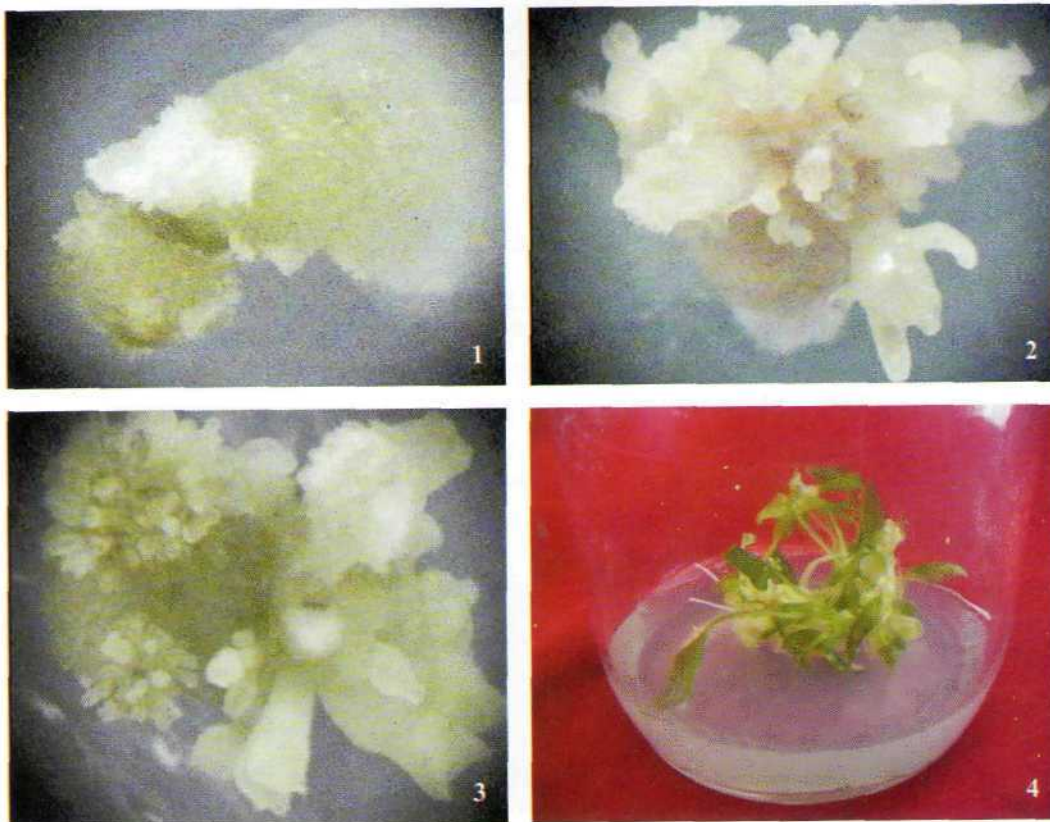


Foto 1. Pertumbuhan dan perkembangan embriosomatik membentuk bibit somatik

1 = struktur globular

2 = struktur hati

3 = struktur torpedo — — —

4 = bibit somatik



Foto 2. Penampakan tunas yang tidak normal.

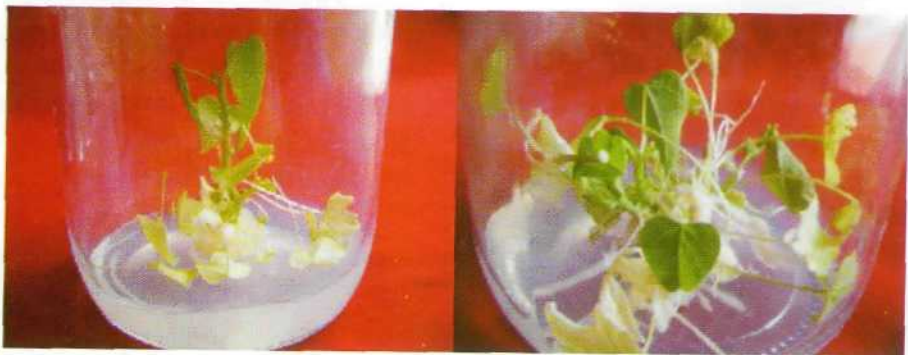


Foto 3. Masalah penguningan dan pengguguran daun pada biakan.

Tabel 1. Induksi akar pada berbagai formulasi media

No.	Perlakuan	% perakaran	Visual biakan
1.	MS + sukrosa 2 %	25	Daun rontok
2.	MS 'A + sukrosa 2 %	0	daun rontok
3.	MS + sukrosa 3 %	30	Berkalus, daun rontok
4.	MS 'A + sukrosa 3 %	22	Berkalus, daun rontok
5.	MS + Ki 0,1 + sukrosa 2 %	0	Berkalus, daun rontok
6.	MS V ₂ + Ki 0,1 + sukrosa 2 %	0	Berkalus, daun rontok
7.	MS + Ki 0,1 + sukrosa 3 %	10	Berkalus, daun rontok
8.	MS 14 + Ki 0,1 + sukrosa 3 %	44	Berkalus, daun rontok

Percobaan kedua

Untuk mengatasi permasalahan tersebut maka dicoba formulasi media dasar dengan kandungan unsur hara yang lebih rendah yaitu WPM dikombinasikan dengan penggunaan auksin serta dengan penambahan AgNO₃ untuk mengurangi penguningan daun. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa penggunaan formulasi media MS + IAA 0,1

mg/1 + AgNO₃ 5 mg/1 dapat menginduksi pembentukan akar sebesar 40%. Pemakaian AgNO₃ nampaknya dapat mengurangi pengguguran daun, akan tetapi biakan terlihat kurang segar dimana batangnya sangat kurus dan daunnya berukuran kecil (Tabel 2). Pemakaian media dasar WPM tidak dapat meningkatkan pembentukan akar, selain itu tunas yang tumbuh pendek.

Percobaan ketiga

Untuk memperoleh hasil yang lebih baik maka dilakukan percobaan ketiga. Dari berbagai

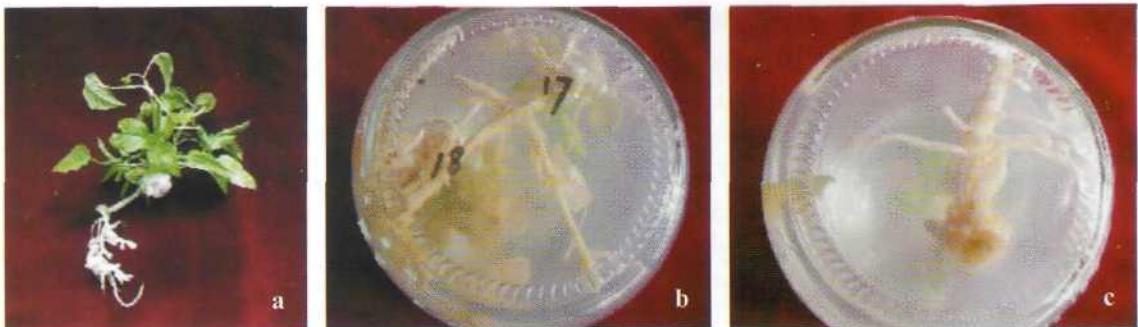
formulasi media yang digunakan, akar paling banyak terbentuk yaitu 80 % pada media MS Vi yang diberi paclobutrazol 0,5 mg/1 (Tabel 3 dan Foto 4).

Tabel 2. Induksi akar pada berbagai perlakuan media.

No.	Perlakuan	% perakaran	Visual biakan
1.	MS+IAA 0,1 + AgNO ₃ 5	40	Batang kurus, daun kecil
2.	MS'/2 + IAA 0,1+AgNO ₃ 5	25	Batang kurus, daun kecil
3.	MS + IAA 0,5 + AgNO ₃ 5	30	Batang kurus, daun kecil
4.	MS 'A + IAA 0,5 + Ag NO ₃ 5	30	Batang kurus, daun kecil
5.	WPM + IAA 0,1 + AgNO ₃ 5	16	tunas pendek
6.	WPM 'A + IAA 0,1 + Ag NO ₃ 5	0	tunas pendek
7.	WPM + IAA 0,5 + Ag NO ₃ 5	25	tunas pendek
8.	WPM 'A + IAA 0,5 + Ag NO ₃ 5	0	tunas pendek

Tabel 3. Induksi akar pada berbagai perlakuan media.

No.	Perlakuan (mg/1)	% perakaran	Visual biakan
1.	MS + paclo 0.5	30	hijau
2.	MS Vi + paclo 0.5	80	hijau
3.	DKW +paclo 0.5	50	hijau
4.	DKW Vi + paclo 0.5	50	hijau
5.	MS + IAA 0,1 + Ag NO ₃ 5 + arginin 100	66	hijau
6.	MS + IAA 0,5 + Ag NO ₃ 5 + arginin 100	20	hijau
7.	MS + IBA 0,1+AgNO ₃ 5 +arginin 100	70	hijau
8.	MS + IBA 0,5+ AgNO ₃ 5+arginin 100	25	hijau

**Foto 4.** Induksi perakaran pada biakan
A= tanaman kontrol; B, C = tanaman transforman

Tunas yang dapat berakar dan tumbuh dengan baik selanjutnya dipindahkan ke rumah kaca. Media yang digunakan adalah campuran tanah dan pupuk kandang dengan perbandingan 1 : 1. Proses aklimatisasi harus dilakukan dengan hati-hati karena tanaman masih peka terhadap kondisi lingkungan yang baru, dan setelah beberapa lama tanaman putative planlet dapat tumbuh dengan baik di rumah kaca (Foto 5).



Foto 5. Pertumbuhan tanaman putatif di rumah kaca.

PEMBAHASAN

Kalus embriogenik yang telah ditransformasi dapat beregenerasi setelah dipindahkan ke media M4C (MS+2,4-D 20 mg/l + sukrosa 30 g/l) atau P6 (MS + BA 0,4 mg/l + kinetin 0,1 mg/l). Media M4C digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus embriogenik sedangkan media P6 digunakan untuk menginduksi regenerasi kalus membentuk bibit somatik. Pada Foto 1 terlihat bahwa mula-mula kalus membentuk struktur globular dan selanjutnya terbentuk struktur hati dan torpedo dan akhirnya terbentuk bibit somatik yang dapat bergenerasi membentuk tunas. Hasil yang diperoleh sesuai dengan penelitian pendahuluan yang dilakukan pada beberapa varietas pepaya yang belum ditransformasi (Hutami *et al.*, 2002).

Namun demikian walaupun dapat membentuk bibit somatik, ternyata tidak semua bibit tersebut dapat membentuk tunas yang normal, dimana tunas yang terbentuk tidak mempunyai batang dan hanya mempunyai daun, batang terlihat sukulen dan pada bagian pangkal batang terbentuk kalus (Foto 2). Sedangkan tunas yang tumbuh normal pada umumnya mengalami masalah penguningan dan perontokan dan sulit membentuk akar (Foto 3).

Disamping itu pada beberapa perlakuan akar dapat terbentuk tetapi secara visual terlihat bahwa akar yang terbentuk sukulen, berkalus dan tidak terbentuk bulu-bulu akar. Dengan kondisi akar yang demikian pada tahap aklimatisasi menyebabkan tingkat kematian yang tinggi.

Percobaan pertama

Salah satu faktor yang menentukan keberhasilan regenerasi tanaman adalah ketersediaan sumber karbohidrat. Bagi tanaman yang dibiakkan melalui kultur jaringan karbohidrat berfungsi sebagai sumber karbon yang diperlukan untuk menghasilkan energi, juga sebagai osmotikum. Sukrosa merupakan bentuk gula yang langsung dapat diserap atau dipergunakan oleh sel. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa pengenceran garam makro dan penggunaan sukrosa sebagai sumber karbohidrat dapat meningkatkan pembentukan akar. Hasil penelitian Haque *et al.*, (2003) menunjukkan bahwa penggunaan media dasar MS dengan penambahan sukrosa 6% dapat menginduksi pembentukan akar pada tanaman bawang putih. Selanjutnya Baksha *et al.* (2003) mempergunakan media MS¹A + NAA 5 mg/l + sukrosa 50 g/l untuk menginduksi perakaran pada tanaman tebu melalui kultur jaringan.

Walaupun hasil-hasil penelitian diatas menunjukkan bahwa penggunaan sukrosa dapat meningkatkan keberhasilan pembentukan akar, akan tetapi nampaknya hal ini tidak dapat dipergunakan untuk meningkatkan pembentukan akar pada tanaman pepaya transgenik, dimana peningkatan konsentrasi sukrosa menyebabkan tumbuhnya kalus yang cukup besar pada bagian pangkal batang walaupun konsentrasi garam makro telah dikurangi hingga menjadi ¹A dari formulasi dasar, selain itu juga terjadi perontokan daun. Terbentuknya kalus ini dapat mengurangi keberhasilan dalam proses aklimatisasi (pemindahan planlet dari dalam botol ke dalam polibag di rumah kaca).

Percobaan kedua

Pada percobaan ini digunakan media dasar MS dan WPM dikombinasikan dengan zat pengatur tumbuh IAA dan senyawa AgNO₃. Media WPM mempunyai kandungan hara total yang lebih rendah

daripada MS. Media dasar WPM telah banyak digunakan untuk regenerasi tanaman berkayu, antara lain pada tanaman cengkeh (Mariska dan Purnamaningsih, 2001) dan pulai (Purnamaningsih *et al.*, 1998). Pemanfaatan senyawa organik maupun anorganik untuk menghambat penguningan dan perontokan daun telah banyak dilaporkan. Hasil penelitian Bare dan Mehta (1983) pada tanaman *Commiphora wightii* dan Swamy *et al.* (1992) pada tanaman *Dalbergia latifolia* menggunakan L-glutamin dengan konsentrasi 100 - 500 mg/l. Sedangkan pada tanaman pulai (*Alstonia scholaris*) penambahan AgNO_3 5 mg/l dan arginin 100 mg/l dapat menekan/mengurangi penguningan dan perontokan daun (Purnamaningsih *et al.*, 1998).

Menurut Sommer dan Coldos (1981) untuk menginduksi perakaran lebih baik digunakan kandungan total ion yang rendah. Dengan formulasi tersebut dapat mengurangi tumbuhnya kalus pada bagian pangkal tunas yang dapat menghambat terbentuknya akar. Jumlah akar yang sedikit sering menghambat keberhasilan aklimatisasi. Pengenceran garam makro pada media dasar dikombinasikan dengan IAA diharapkan dapat memacu pembentukan akar sebab pengurangan konsentrasi garam makro terutama ion nitrogen dapat mengurangi biosintesis komponen organik yang berperan dalam menginduksi pertunasan. Hasil yang diperoleh dari percobaan 2 ini berlainan dengan hasil-hasil penelitian diatas. Pemakaian media dasar WPM tidak dapat meningkatkan pembentukan akar, selain itu tunas mempunyai batang yang sangat kurus daun-daun yang kecil. Diduga hal ini disebabkan karena kandungan unsur hara yang rendah sehingga energi yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan biakan menjadi terbatas.

Percobaan ketiga

Formulasi media MS dengan paclobutrazol 0.5 mg/l dapat menginduksi pembentukan akar tertinggi. Zat penghambat paclobutrazol telah banyak digunakan untuk memacu pembentukan akar berbagai tanaman (Davies *et al.*, 1985). Hasil penelitian Purnamaningsih dan Gati (1997) menunjukkan bahwa penggunaan paclobutrazol 1 mg/l dapat menginduksi pembentukan akar pada tanaman pule pandak. Biakan

yang ditanam pada media yang mengandung paclobutrazol umumnya mempunyai tunas dan daun yang lebih hijau, selain itu tunas lebih tegar. Kandungan klorofil yang meningkat karena penggunaan paclobutrazol telah pula dilaporkan oleh Pinhero dan Fletcher (1994). Pengenceran garam makro MS sampai $\frac{1}{A}$ dari formulasi dasar pada media yang mengandung paclobutrazol dapat membentuk akar hampir 3 kali lebih banyak dibandingkan media MS penuh + paclobutrazol 0,5 mg/l.

Pembentukan akar yang tinggi diperoleh pula dari media MS + IB A 0,1 mg/l + AgNO_3 5 mg/l + arginin 100 mg/l yaitu 70 %, MS + IAA 0.1 mg/l + AgNO_3 5 mg/l + arginin 100 mg/l sebesar 66 %. Pada media DKW (1, Vi) + paclobutrazol 0,5 mg/l perakaran mencapai 50 %. Untuk tunas *in vitro* yang tidak dapat membentuk akar umumnya pada bagian pangkal tunasnya berkalus. Apabila tidak di sub kultur kalus tersebut akan menutupi tunas dengan cepat. Disamping itu pada tunas yang persentase perakarannya rendah, tunasnya mengalami vitrifikasi dan senescence. Dengan demikian untuk mendapatkan keberhasilan aklimatisasi yang tinggi lebih baik biakan berasal dari media yang diberi paclobutrazol.

KESEMPULAN

Proses transformasi genetik dapat menyebabkan berkurangnya daya regenerasi jaringan sehingga formulasi media yang digunakan sebelum proses transformasi tidak dapat digunakan pada tanaman hasil transformasi. Masalah yang dihadapi pada biakan pepaya hasil transformasi dengan gen ACC oksidase antisense adalah persentase pembentukan akar yang rendah, terbentuknya kalus pada bagian pangkal batang dan adanya penguningan dan perontokan daun. Dengan menggunakan 24 formulasi media diperoleh bahwa penggunaan media dasar MS $\frac{1}{2}$ dengan penambahan paclobutrazol 0.5 mg/l dapat menginduksi pembentukan akar sebesar 80%, menghambat pembentukan kalus dan menekan penguningan dan perontokan daun.

DAFTAR PUSTAKA

Baksha R, Alam R, Karim MZ, Mannan Sk A, Podder BP and Rahman ABMM. 2003. Effect of auxin,

- sucrose and pH level on in vitro rooting of callus induced microshoots of sugarcane (*Saccharum officinale*). *Journal of Biological Sciences* 3(10), 915-920.
- Bare DM and Mehta AR. 1993.** Clonal propagation of mature elite trees of *Commiphora weightii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 35, 237-244.
- Davies TD, Sankhala N, Walser RH and Upadhyaya A. 1985.** Promotion of adventitious root formation on cuttings by paclobutrazol. *Hort. Sci.* 20 (5), 883-884.
- Haque MS, Tomikichi W and Hattori K. 2003.** Effect of sucrose, mannitol and KH₂PO₄ on proliferation of root tip derived shoots and subsequent bulblet formation in garlic. *Asian Journal of Plant Science* 2(12), 903-908.
- Hutami S, Mariska I, Purnamaningsih R, Herman M, Damayanti D and Utami TIR. 2002.** Regeneration of papaya (*Carica papaya* L.) through somatic embryogenesis. *Proceeding of 2nd Indonesian Biotechnology Conference*, Yogyakarta, 23 - 26 Oktober 2001, 622-629.
- Kool LT, Keng CL and KhongHoc CT. 1999.** In vitro rooting of Sentong Shoots (*Azatirochta excelsa* L.) and acclimatization of the plantlets. *In vitro Plant* 35(5), 396-400.
- Mariska I dan Purnamaningsih R. 2001.** Perbanyakan vegetatif tanaman tahunan melalui kultur *in vitro*. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian* 20(1), 1-8.
- Mariska, I, Hobir dan Sukmadjaja D. 1992.** Usaha pengadaan bahan tanaman melalui bioteknologi kultur jaringan. *Pros. Temu Usaha Pengembangan Hasil Penelitian Tanaman Rempah dan Obat. Puslitbangtri, Balitro dan Pusat Pengkajian dan Pengembangan Agribisnis.* Jakarta, 2-3 Des 1992.
- Minh TV and Thu BTT. 2001.** Manipulation of embryogenesis and organogenesis culture for papaya (*Carica papaya* L). *Improvement and development in Vietnam: (2) Mass seedlings micropropagation via organogenesis culture.* International Plant & Animal Genome IX Conference. San Diego, January 13-17.
- Pauziah M, Ravindranthan P, Kwok CY, Bakar UA, Pillai V, Fatt LP, and Daud HM. 2003.** Contained field, evaluation of delayed ripening transgenic eksotika papaya. *Coordination meeting of Papaya Biotechnology Network of SEAsia.* Bangkok, 15-16 Desember.
- Petri C and Burgos L. 2005.** Advances and future perspectives in fruit tree transformation. *BwRos(a),cebas. csis. es.*
- Pinhero RG, and Fletcher RA. 1994.** Paclobutrazol and ancimidol protect corn seedling from high and low temperature stress. *Plant Growth Reg.* 15, 47-53.
- Purnamaningsih R. dan Gati EL. 1997.** Penyimpanan dan regenerasi pule pandak melalui kultur *in vitro*. *Prosiding Seminar Perhimpunan Bioteknologi Pertanian Indonesia.* Surabaya, 12-14 Maret, 252-160. Perhimpunan Bioteknologi Pertanian Indonesia.
- Purnamaningsih R, Mariska I, Gati EL, dan Rahayu S. 1998.** Penekanan masalah penguningan pada daun pulai. *Plasma Nutfah III* (1), 1-7. Komisi Nasional Plasma Nutfah. Departemen Pertanian.
- Seswita D, Mariska I dan Gati EL. 1993.** Perbanyakan tanaman obat langka *Rauwolfia serpentina* melalui kultur jaringan. *Media Komunikasi Puslitbangtri* No. 12.
- Sommer HE and Coldos LS. 1981.** In vitro method, applied to forest trees. *In: TA Thorpe (Ed.). J. Plant Tissue Culture: Methods and application in Agriculture Press*, 349-359. New York. London.
- Yie ST and Liaw SI. 1977.** Plant regeneration from shoot tips and callus of papaya. *In vitro* 13(9), 564-8.