

Seleksi *In Vitro* Tanaman Lada untuk Ketahanan terhadap Penyakit Busuk Pangkal Batang

Ali Husni dan Mia Kosmiatin

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

ABSTRACT

***In Vitro* Selection for *In Vitro* Resistance of Pepper to Root Rot. Ali Husni and M. Kosmiatin.** Root rot caused by *Phytophthora capsici* is one of the most important diseases of pepper, it can decrease yield up to 52%. Planting resistant plants is an efficient way to control the disease. *In vitro* selection is a method that can be utilized for selection of resistant plants. The objective of the study was to obtain pepper plants resistant to root rot disease through *in vitro* selection. The study consisted of four experiments, i.e., (1) induction of embryogenic calli, (2) production of filtrate of *P. capsici*, (3) *in vitro* selection and shoots regeneration, and (4) root induction. The results showed that leaf tissue was the best explants for production of embryogenic calli in a medium of Gamborg (macro nutrient) + MS (micro nutrients and vitamins) with 2,4-D 0.1 or 0.5 mg/l. The best filtrate of *P. capsici* culture used for the selection was that from the 5 day-old inoculum in the V8 medium. In general, addition of *P. capsici* culture filtrate into the regeneration media influenced the percentage of live calli. The addition of 50% and 75% of *P. capsici* filtrate was enabling to screening for adaptive calli based on brownish-yellow or yellowish-brown color. These calli produced 32 shoots in the regeneration media without the *P. capsici* filtrate. Root induction was successfully performed in the MS medium with 0.01 mg/l of NAA.

Key words: *Piper nigrum*, *in vitro* selection, root rot resistance.

PENDAHULUAN

Penyakit busuk pangkal batang (*root rot*) yang disebabkan oleh *Phytophthora capsici* Linn. merupakan masalah utama dalam budi daya tanaman lada (*Piper nigrum* Linn). Menurut Semangun (1991), penyakit ini dapat menimbulkan kerugian sampai 52% dari produksi lada. Selain menyerang pangkal batang, penyakit ini juga dapat menyerang akar, daun, dan buah (Kasim 1987). Menanam tanaman yang tahan terhadap penyakit merupakan salah satu cara untuk memecahkan masalah tersebut. Namun demikian, sifat ketahanan terhadap penyakit busuk pangkal batang hanya terdapat pada spesies liar (*Piper colibrinum*) yang sulit dipindahkan ke lada budi daya melalui hibridisasi seksual karena adanya inkompatibilitas secara genetik. Pemandangan sifat ketahanan ke tanaman lada budi

daya dapat dilakukan melalui hibridisasi somatik dengan metode fusi protoplas (Husni *et al.* 1997a). Metode tersebut dapat digunakan untuk menghasilkan kalus hasil fusi protoplas liar dengan protoplas lada budi daya. Namun demikian, kalus yang dihasilkan dari fusi belum dapat diregenerasi membentuk tunas.

Selain metode fusi protoplas metode lain yang dapat digunakan untuk mendapatkan sifat tahan di antaranya adalah metode seleksi *in vitro*. Metode seleksi *in vitro* pada beberapa tanaman telah digunakan untuk meningkatkan sifat tahan baik ketahanan terhadap faktor biotik dan abiotik (Stavarek dan Rains 1984; Ahlowalia 1986). Menurut Van den Bulk (1991), metode seleksi *in vitro* sangat efektif karena perubahan yang terjadi lebih terarah pada sifat yang diinginkan. Pada metode seleksi ini dapat dilakukan menggunakan toksin atau filtrat dari patogen sasaran sebagai agen penapis (*selecting agent*) pada sel yang mengalami mutasi akibat perlakuan *in vitro* atau berasal dari satu atau beberapa sel dari kalus yang dihasilkan. Dengan metode ini dapat diperoleh korelasi positif antara sifat ketahanan terhadap toksin atau filtrat dengan ketahanan terhadap penyakit. Protoplas, sel tunggal, kalus, dan jaringan dapat digunakan sebagai bahan keragaman dalam metode ini.

Metode seleksi *in vitro* telah dimanfaatkan pada berbagai tanaman untuk menghasilkan kultivar atau varietas baru dengan sifat yang baru dan diwariskan pada turunannya. Individu baru hasil seleksi *in vitro* antara lain tanaman tomat, pisang, dan seledri tahan penyakit bakteri layu (Van den Bulk 1991), gladiol tahan Fusarium (Remotti *et al.* 1995), panili tahan Fusarium (Kosmiatin *et al.* 2000), abaka tahan Fusarium (Sukmadjaja *et al.* 2002) dan kedelai tahan lahan masam (Mariska *et al.* 2002).

Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan tanaman lada yang tahan terhadap penyakit busuk pangkal batang dengan seleksi *in vitro* menggunakan filtrat toksin *Phytophthora capsici*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorim Kultur Jaringan Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan

Sumberdaya Genetik Pertanian, mulai April 1995 sampai dengan Desember 2000.

Bahan tanaman yang digunakan adalah lada budi daya varietas daun lebar (LDL), yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Bogor. Komponen penyeleksi yang digunakan adalah filtrat *Phytophthora capsici* Linn dari koleksi Dr. Diah Manohara di Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Bogor.

Induksi Kalus Embriogenik

Pada tahap ini dilakukan penelitian untuk mendapatkan jenis eksplan dan komposisi media yang terbaik untuk produksi kalus embriogenik. Perlakuan eksplan yang digunakan adalah jaringan batang, tangkai daun, dan helaian daun dari lada budi daya. Komposisi media yang digunakan adalah Gamborg B5 (makro nutrien), MS (mikro nutrien + vitamin) 0,3 mg/l BA. Perlakuan pada media ini adalah penambahan 2,4-D dengan konsentrasi masing-masing 0,01; 0,05; 0,1; dan 0,5 mg/l, 30 g/l sukrosa serta gelrite sebanyak 2 g/l. Keasaman media (pH) dibuat menjadi 5,8, dan media disterilkan dengan otoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

Jaringan eksplan dipotong-potong dengan panjang 1 cm, kemudian dikulturkan dalam botol sesuai perlakuan, satu eksplan dalam satu botol. Kultur disimpan dalam ruang kultur dengan suhu antara 19-21°C dan diberi cahaya dengan lampu neon intensitas 1500-2000 lux selama 16 jam.

Parameter yang diamati adalah persentase pembentukan eksplan yang dapat membentuk kalus, kalus embriogenik, serta warna dan tipe kalus.

Produksi Filtrat *P. capsici* Linn

Biakan jamur ditumbuhkan pada media cair V8 (*Clarified V8 juice*) (Ribeiro 1978). Ke dalam tabung erlenmeyer dimasukkan 50 ml media cair V8 steril, diinokulasi dengan biakan *P. capsici* yang berumur 4 hari. Perlakuan inokulum yang diberikan masing-masing adalah 2, 4, 5, 6, dan 8 potongan inokulum yang berdiameter 0,5 cm sebagai perlakuan. Kemudian kultur diinkubasi selama 15 hari dengan pemberian cahaya terus-menerus. Filtrat *P. capsici* Linn diperoleh dengan membebaskan cairan media tersebut dari miselum jamur dengan cara menyaring menggunakan saringan bertingkat dari 100 μm sampai 0,2 μm . Filtrat *P. capsici* digunakan sebagai komponen penyeleksi.

Parameter yang diamati adalah gejala serangan (bercak) pada daun *in vitro* akibat pengaruh toksin dari filtrat pada masing-masing perlakuan 3, 4, dan 5 hari setelah inokulasi.

Seleksi *In Vitro* dengan Filtrat Toksin *P. capsici*

Filtrat dari *P. capsici* dibuat menurut metode (Ribeiro 1978) biakan *P. capsici* yang berumur 5 hari dalam medium V8. Sterilisasi filtrat dilakukan melalui penyaringan menggunakan saringan dengan ukuran millifore 0,2 μm . Filtrat steril dimasukkan ke dalam media seleksi.

Seleksi dilakukan pada populasi sel (kalus) yang berasal dari jaringan daun hasil percobaan sebelumnya (induksi kalus). Media seleksi yang digunakan adalah media terbaik yang menghasilkan kalus embriogenik dari penelitian induksi kalus embriogenik.

Filtrat toksin diperoleh dari inokulum terbaik yang menghasilkan filtrat dengan gejala serangan yang sama dengan gejala di lapang. Konsentrasi filtrat toksin yang digunakan untuk seleksi *in vitro* lada masing-masing adalah 0, 25, 50, 75, dan 100%. Penambahan filtrat dilakukan dengan dua cara, yaitu cara pertama adalah mencampur filtrat dengan media induksi kalus dalam keadaan hangat-hangat kuku setelah diotoklaf. Cara kedua adalah menambahkan filtrat pada media induksi kalus yang telah diotoklaf sebanyak 10 ml setiap botol.

Seleksi dilakukan dengan cara mengkulturkan populasi sel (kalus) selama 1 bulan pada media yang mengandung filtrat dengan konsentrasi masing-masing 0, 25, 50, 75, dan 100%. Biakan kemudian disubkultur pada media pemulihan, yaitu media regenerasi tanpa penambahan filtrat.

Pengamatan dilakukan terhadap persentase kalus yang dapat hidup, kalus yang beregenerasi, dan visual biakan selama seleksi.

Induksi Akar dari Regeneran yang Hidup

Tunas dari regeneran yang hidup setelah seleksi disubkultur dari media pemulihan ke media induksi perakaran. Media perakaran yang digunakan dalam penelitian ini adalah MS + NAA 0,1 mg/l.

Parameter yang diamati adalah jumlah akar, panjang akar, jumlah tunas, dan tinggi tunas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi Kalus Embriogenik

Jenis eksplan yang digunakan merupakan salah satu faktor yang sangat menentukan keberhasilan kegiatan kultur *in vitro*. Untuk mendapatkan kalus yang embriogenik sebagai bahan dalam seleksi *in vitro* dilakukan percobaan terhadap penggunaan jenis eksplan daun dan perlakuan media untuk induksi kalus. Jaring-

an daun yang digunakan berasal dari biakan *in vitro* tanaman lada (LDL).

Dari hasil penelitian yang dilakukan diperoleh bahwa ketiga jenis eksplan mampu menginduksi pembentukan kalus, tetapi kalus yang diinduksi dari jaringan daun merupakan kalus yang bersifat embriogenik (Tabel 1). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Husni *et al.* (1997b), jaringan daun dapat digunakan untuk menghasilkan kalus embriogenik lada liar (*Piper colibrinum*) dan dapat diregenerasikan melalui jalur embriogenesis somatik. Hal yang sama juga terjadi pada tanaman nilam, di mana jaringan daun sangat baik digunakan untuk induksi kalus embriogenik dan dapat diregenerasi menjadi tanaman (Mariska *et al.* 1997).

Media dan zat pengatur tumbuh juga merupakan faktor yang sangat berpengaruh terhadap keberhasilan regenerasi. Penggunaan media dasar Gamborg B5 sebagai makro nutrisi dan MS sebagai mikro nutrisi serta kombinasi 2,4-D dengan BA sangat baik digunakan dalam induksi kalus lada (Husni *et al.* 1998). Demikian juga hasil penelitian Ranch *et al.* (1986) pada tanaman kedelai di mana kombinasi BA dengan 2,4-D sangat baik digunakan untuk menginduksi kalus embriogenik. Eksplan yang dikultur pada semua media yang digunakan dapat menghasilkan kalus (100%). Sedangkan persentase kalus embriogenik yang dihasilkan berbeda antara konsentrasi 2,4-D yang digunakan, kecuali pada konsentrasi 0,1 dan 0,5 mg/l. Pada kedua konsentrasi tersebut, semua eksplan dapat menghasilkan kalus embriogenik (100%). Sedangkan 2,4-D 0,01 mg/l menghasilkan kalus embriogenik sebanyak 5,7 kalus embriogenik/30 kalus (19%) serta 8,1 kalus embriogenik/30 kalus (21%) untuk 2,4-D 0,05 mg/l (Tabel 2).

Gejala awal terbentuknya kalus ditandai dengan eksplan yang membengkak pada minggu pertama setelah kultur. Hal ini karena sel-sel yang terdapat pada eksplan terangsang untuk melakukan pembelahan sehingga volumenya bertambah. Pertumbuhan sel-sel

tersebut disebabkan karena adanya auksin yang mampu menstimulasi dediferensiasi sel-sel penyusun jaringan eksplan. Pertumbuhan tersebut terus berlangsung dan mengadakan proliferasi membentuk kalus. Kalus eksplan mulai muncul pada bagian jaringan yang luka, kemudian meluas sampai menutupi semua eksplan setelah kultur berumur 1 bulan. Kalus yang dihasilkan bersifat embriogenik dengan tekstur kalus yang bernodul dengan warna kuning kehijauan. Menurut Maftuchah dan Loedin (2000), terbentuknya *green spot* pada kalus merupakan salah satu tanda awal terjadinya induksi tunas.

Produksi Filtrat *P. capsici* Linn

Dari perlakuan jumlah potongan inokulum yang digunakan (2, 4, 5, 6, dan 8), dikulturkan dalam media cair V8 dan diinkubasikan selama 5 hari dengan pemberian cahaya terus-menerus memperlihatkan bahwa perlakuan dengan jumlah inokulum 4, 5, 6, dan 8 memberikan gejala busuk (bercak) seperti gejala di lapang setelah 3 hari inokulasi. Sedangkan perlakuan 2 potong inokulum belum terlihat adanya gejala serangan. Setelah 4 hari inokulasi terlihat gejala bercak yang lebih jelas hanya pada perlakuan 5, 6, dan 8 inokulum saja. Tetapi pada pengamatan 5 hari setelah inokulasi gejala bercak tampak semakin jelas pada perlakuan 4, 5, 6, dan 8 inokulum (Tabel 3). Penampakan daun yang 5 hari setelah inokulasi dapat dilihat pada Gambar 1.

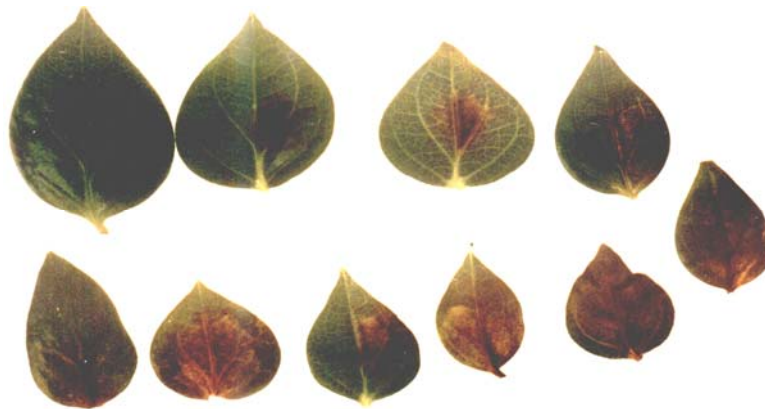
Dengan demikian, filtrat yang dihasilkan dapat digunakan sebagai bahan penyeleksi terhadap serangan penyakit busuk pada tanaman lada. Tetapi filtrat yang dihasilkan dari perlakuan 6 dan 8 inokulum menghasilkan filtrat yang sedikit sehingga kurang efisien mengingat banyaknya volume filtrat yang digunakan sebagai perlakuan. Oleh karena itu, jumlah inokulum yang digunakan untuk produksi filtrat adalah 5 potong inokulum.

Tabel 1. Pengaruh jenis eksplan terhadap induksi kalus pada tanaman lada.

Jenis eksplan	Pembentukan kalus (%)	Tipe kalus	Warna
Batang	100 (90/90)	Non embriogenik	Hijau kehitaman
Daun	100 (90/90)	Embriogenik	Hijau kekuningan
Tangkai daun	100 (90/90)	Non embriogenik	Kuning kecoklatan

Tabel 2. Pengaruh konsentrasi 2,4-D terhadap persentase keberhasilan pembentukan kalus embriogenik eksplan daun lada.

2,4-D (mg/l)	Pembentukan kalus (%)	Kalus embriogenik (%)
0,01	100 (30/30)	19 (5,7/30)
0,05	100 (30/30)	21 (8,1/30)
0,1	100 (30/30)	100 (30/30)
0,5	100 (30/30)	100 (30/30)



Gambar 1. Penampakan gejala serangan pada daun lada setelah diinokulasi dengan filtrat *P. capsici*.

Tabel 3. Pengaruh jumlah inokulum *P. capsici* Linn terhadap gejala serangan pada daun setelah inokulasi.

Jumlah potongan inokulum	Gejala serangan pada daun setelah inokulasi (hari)		
	3	4	5
2	-	-	-
4	-/+	-/+	++
5	-/+	+	++
6	-/+	+	++
8	-/+	+	++

- = tidak ada gejala, +/- = ada gejala serangan tetapi belum jelas, + = gejala serangan jelas, ++ = gejala serangan jelas sekali.

Seleksi *In Vitro* Kalus Embriogenik dengan Filtrat Toksin *P. capsici*

Hasil pengamatan terhadap persentase kalus yang dapat hidup setelah dikulturkan dalam media yang mengandung filtrat *P. capsici* dapat dilihat pada Tabel 4. Persentase keberhasilan kalus yang dapat hidup setelah diseleksi dalam media yang mengandung filtrat lebih tinggi berasal dari penggunaan filtrat yang diletakkan di bawah media regenerasi dibandingkan dengan cara pemberian filtrat yang dicampur dengan media. Hal ini diduga disebabkan oleh perbedaan sifat toksisitas dari filtrat akibat perbedaan kecepatan filtrat dapat diserap oleh sel/kalus dari kedua cara perlakuan. Perlakuan 0 dan 25% filtrat dalam media tidak menyebabkan adanya kalus yang mati pada kedua cara perlakuan. Tetapi pada perlakuan 50% terdapat perbedaan jumlah dan persentase kalus yang hidup selama seleksi, yaitu 80% dengan cara perlakuan filtrat di bawah media regenerasi dan 78% dengan cara perlakuan dicampur dengan media regenerasi. Perbedaan persentase kalus yang hidup semakin besar terlihat pada perlakuan 75% filtrat, yaitu 24% dengan cara perlakuan filtrat di bawah media regenerasi dan 8% dengan cara perlakuan dicampur dengan media regenerasi.

Bila dilihat dari penampakan kalus akibat adanya perlakuan filtrat terlihat adanya perbedaan warna yang dihasilkan. Hal ini juga ditemukan pada kalus kedelai yang diseleksi dengan PEG (Husni *et al.* 2003) dan diseleksi dengan Al dan pH rendah (Mariska *et al.* 2002). Penampakan kalus dengan perlakuan filtrat 25% tampak masih segar dengan warna kalus kuning kehijauan dan putih kekuningan. Adanya gejala akibat perlakuan filtrat mulai terlihat pada perlakuan filtrat 50% dengan warna kecoklatan. Sedangkan konsentrasi 75% warna kalusnya coklat kekuningan, di mana warna kuning yang dihasilkan terlihat berasal dari sel yang adaptif terhadap filtrat sehingga dapat tumbuh dan berkembang. Sedangkan kalus yang diseleksi dengan filtrat 100% warnanya hitam kecoklatan.

Pengamatan hanya dilihat dari seluruh kalus yang dapat beregenerasi setelah dilakukan seleksi dengan cara perlakuan filtrat. Kalus yang dapat beregenerasi pada perlakuan filtrat dengan cara memberi filtrat di bawah media regenerasi adalah 22/28 (78,5%) dengan jumlah tunas sebanyak 32 tunas (nomor). Sedangkan kalus yang diseleksi dengan cara mencampur filtrat dengan media sebanyak 2/28 (7,1%) dengan jumlah tunas sebanyak 5 tunas (Tabel 5). Tiap tunas merupakan satu individu sehingga diperoleh tunas lada yang toleran terhadap filtrat *P. capsici* Linn sebanyak 37

nomor. Tahapan pertumbuhan dan perkembangan kalus sebelum dan setelah diseleksi dengan filtrat sampai beregenerasi membentuk tunas dapat dilihat pada Gambar 2.

Induksi Akar dari Regenerasi yang Diperoleh

Tunas (nomor) lada yang toleran terhadap toksin filtrat diisolasi dan diklonal untuk memperbanyak duplikat dari setiap individu hasil regenerasi. Duplikat tersebut diakarkan untuk mendapatkan tanaman yang siap diaklimatisasi. Dari hasil penelitian hanya 5 nomor regenerasi yang dapat diakarkan karena nomor lainnya

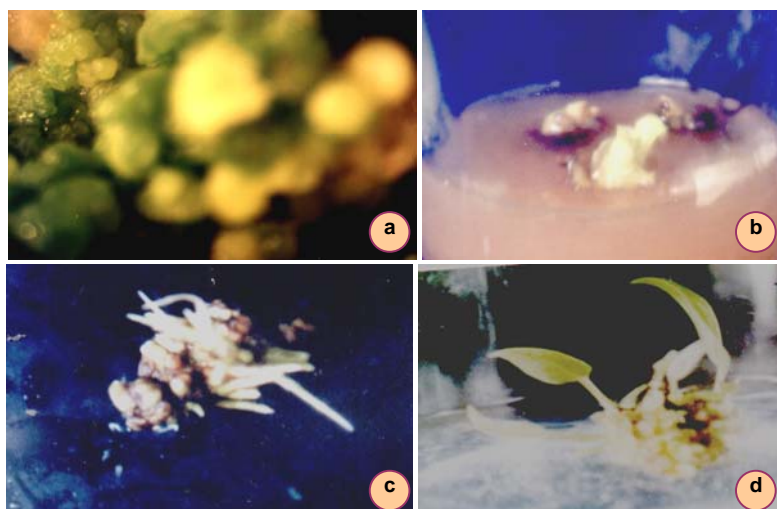
terkontaminasi kontaminasi bakteri atau jamur. Nomor regenerasi yang dapat diakarkan adalah 1, 2, 3, 7, dan 10. Jumlah akar yang dihasilkan antar nomor tidak berbeda nyata, tetapi panjang akar berbeda. Banyaknya jumlah akar yang dihasilkan berkisar antara 5,67-9,33 (Tabel 6). Sedangkan akar yang terpanjang berasal dari nomor 2 dan 10, yaitu 2,17 cm dan yang terpendek berasal dari nomor 3 dan 7, yaitu 0,80 dan 0,87. Penampakan biakan dari regenerasi yang diakarkan dalam media MS + NAA 0,1 mg/l dapat dilihat pada Gambar 3.

Tabel 4. Pengaruh cara perlakuan filtrat dalam seleksi kalus pada media yang mengandung filtrat.

Cara pemberian filtrat dalam media	Kalus hidup (%)	Warna kalus
Konsentrasi filtrat (%)		
Filtrat di bawah media regenerasi		
0	100(50/50)	Putih kehijauan
25	100(50/50)	Kuning kehijauan
50	80(40/50)	Kuning kecoklatan
75	24(12/50)	Coklat kekuningan
100	0(0/50)	Coklat kehitaman
Filtrat dicampur dengan media regenerasi		
0	100(50/50)	Putih kehijauan
25	100(50/50)	Putih kekuningan
50	78(39/50)	Kuning kecoklatan
75	8(4/50)	Coklat kekuningan
100	0(0/50)	Coklat kehitaman

Tabel 5. Jumlah dan persentase kalus yang dapat beregenerasi setelah dilakukan seleksi dengan filtrat.

Cara pemberian filtrat dalam media	Kalus yang dapat beregenerasi	Banyaknya jumlah tunas
Filtrat di bawah media regenerasi	78,5 (22/28)	32
Filtrat dicampur dengan media regenerasi	7,1 (2/28)	5



Gambar 2. Tahapan pertumbuhan kalus sebelum seleksi dan setelah seleksi dengan filtrat. a = kalus embriogenik sebelum seleksi, b = kalus pada saat seleksi, c = tahap awal regenerasi, d = induksi tunas.

Tabel 6. Induksi akar nomor-nomor lada hasil regenerasi kalus yang telah diseleksi dengan toksin/filtrat *P. capsici* dalam media MS + NAA 0,1 mg/l.

Nomor regeneran	Jumlah akar	Panjang akar
1	9,33a	1,40ab
2	6,33a	2,17a
3	6,00a	0,87b
7	5,67a	0,80b
10	7,67a	2,17a



Gambar 3. Penampakan biakan regeneran lada yang toleran terhadap toksin/filtrat *P. capsici* sebelum dan setelah terbentuk akar. a = biakan sebelum berakar, b = biakan setelah berakar.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Jaringan daun dapat digunakan sebagai eksplan untuk mendapatkan kalus embriogenik dalam media kombinasi Gamborg B5 (makro nutrien) dengan MS (mikro nutrien dan vitamin) dengan penambahan 2,4-D 0,1 dan 0,5 mg/l + BA 0,3 mg/l.
2. Jumlah inokulum *P. capsici* yang dikulturkan untuk mendapatkan toksin filtrat yang memberikan gejala serangan busuk pada tanaman lada dalam jumlah banyak adalah 5 potong inokulum.
3. Konsentrasi filtrat toksin 50 dan 75% dapat digunakan sebagai penapis sel/kalus yang adaptif terhadap filtrat toksin tersebut dalam seleksi *in vitro* untuk mendapatkan regeneran/nomor-nomor lada yang tahan terhadap penyakit busuk pangkal batang.
4. Cara pemberian toksin/filtrat dalam media mempengaruhi kemampuan regenerasi kalus yang diseleksi membentuk tunas.
5. Telah diperoleh 37 tunas regeneran yang toleran terhadap toksin/filtrat *P. capsici*
6. Media MS + NAA 0,1 mg/l dapat menginduksi terbentuknya akar pada semua regeneran yang toleran terhadap toksin/filtrat *P. capsici*.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahlowalia, B.S. 1986.** Limitations 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.
- Husni, A., I. Mariska, dan M. Kosmiatin. 1997a.** Kultur protoplas hasil fusi antara lada budi daya dengan lada liar. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri* 11(5):24-29.
- Husni, A., I. Mariska, dan M. Kosmiatin. 1997b.** Embriogenesis somatik tanaman lada liar. *Prosiding dan Kongres III PERIPI.* Bandung, 24-25 September 1997.
- Husni, A., I. Mariska, D. Manohara, K. Mulya, R. Purnamaningsih, S. Rahayu, dan E.G. Lestari. 1998.** Seleksi *in vitro* tanaman lada dengan filtrat *Phytophthora capsici* untuk ketahanan terhadap penyakit busuk pangkal batang. *Laporan Tahunan TA 1997/98.* Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan.
- Husni, A., M. Kosmiatin, dan I. Mariska. 2003.** Regenerasi massa sel embriogenik kedelai yang diseleksi dengan polyethylen glicol (PEG). *Laporan Tahunan TA 2002.* Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan.
- Kasim, R. 1987.** Infeksi *Phytophthora capsici* pada tanaman lada. *Prosiding Seminar Penelitian Tanaman Rempah dan Obat.* hal. 117-123.
- Kosmiatin, M., I. Mariska, Hobir, M. Tombe, A. Husni, dan Y. Rusyadi. 2000.** Seleksi silang ketahanan tunas *in vitro* panili terhadap asam fusarat dan ekstrak *Fusarium oxysporum*. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 5(2):77-83.
- Maftuchah dan I.H.S. Loedin. 2000.** Induksi tunas dari kalus embriogenik padi Cisadane dalam berbagai konsentrasi IAA dan BAP. *Prosiding Seminar Nasional*

- Bioteknologi Pertanian. Yogyakarta, 7-9 November 2000. hal. 134-140.
- Mariska, I., M. Kosmiatin, dan S. Hutami. 2002.** Peningkatan toleransi terhadap aluminium dan pH rendah pada tanaman kedelai melalui kultur *in vitro*. Risalah Pertemuan Ilmiah Penelitian dan Pengembangan Aplikasi Isotop dan Radiasi. Jakarta, 6-7 Nopember 2001.
- Mariska, I., Hobir, Murgiono, D. Seswita, and E.G. Lestari. 1997.** Improvement of oil content of patchouly through *in vitro* culture and irradiation. Proc. Seminar on Mutation Breeding in Oil and Industrial Crop for Nuclear Cooperation in Asia. RDA and Japan Atomic Industrial forum. 12-18 October 1997, Suwon Korea.
- Ranch, J.P., L. Ogelsby, and A.C. Zielinski. 1986.** Plant regeneration from tissue culture of soybean by somatic embryogenesis. *In* Vasil, I.K. (Ed.). Cell Culture and Somatic Cell. Genetics of Plants 3:97-110.
- Remotti, P.C., H.J. Lofler, and L. Van Vloten-Doting. 1995.** Selection of cell lines and regeneration of plants resistant to fusaric acid from *Gladiolus grandiflorus* CV. Peter Press.
- Ribeiro, O.K. 1978.** A source book of genus phytophthora. C.J. Cramer Genter Verlag. Germany 417.
- Semangun, R. 1991.** Penyakit-penyakit tanaman perkebunan di Indonesia. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Stavarek, S.J. and D.W. Rains. 1984.** The development of tolerance cells to mineral stress. Horticulture Science 19:377-382.
- Sukmadjaja, D., M. Kosmiatin, I. Mariska, M. Tombe, E.G. Lestari, dan Y. Rusyadi. 2002.** Pengujian planlet abaka hasil seleksi terhadap *Fusarium oxysporum*. Laporan Hasil Penelitian Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian.
- Van den Bulk, R.W. 1991.** Application of cell and tissue culture an *in vitro* solution for disease resistance breeding-review. Euphytica 56:269.
-