

Hibridisasi Somatik Lada Liar dengan Lada Budi Daya

Ali Husni, Ika Mariska, dan Suci Rahayu

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

ABSTRAK

Hibridisasi seksual untuk mentransfer sifat ketahanan dari lada liar (*Piper colubrinum*) ke lada budi daya (*Piper nigrum*) sukar dilakukan. Untuk mengatasi masalah tersebut bioteknologi kultur jaringan dapat digunakan melalui hibridisasi somatik dengan cara teknik fusi protoplas. Melalui teknik ini dapat dihasilkan hibrida baru dari hasil persilangan antardua tetua yang mempunyai kekerabatan yang jauh yang secara seksual inkompatibel. Untuk mendapatkan protoplas digunakan daun yang ditoreh melintang ± 1 mm yang diinkubasikan dalam 10 ml larutan enzim selulase R-10 2% + macerozim R-10 0,5% selama 16 jam. Masing-masing protoplas lada budi daya dengan lada liar dengan kerapatan 10^5 difusikan dengan PEG 6000 pada konsentrasi 30% selama 25 menit. Protoplas hasil fusi ditabur dalam beberapa komposisi media padat. Perkembangan protoplas diamati secara periodik di bawah mikroskop sampai terbentuk mikro kalus. Mikro kalus yang terbentuk kemudian disubkultur pada beberapa komposisi media baru untuk mendorong pertumbuhan mikro kalus menjadi kalus. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi enzim selulase R-10 2% dengan macerozim R-10 0,5% dapat mengisolasi protoplas lada dengan kerapatan dan viabilitas yang tinggi. Larutan PEG 6000 30% selama 20 menit dapat menginduksi terjadinya fusi dengan keberhasilan 26%. Protoplas hasil fusi mengalami pembelahan sel dan membentuk mikro kalus pada minggu pertama setelah pembelahan sel dan membentuk mikro kalus pada $\frac{1}{2}$ LV+ABA 0,01 mg/l+BA 4,5 mg/l+sukrosa 3% dapat menghasilkan mikro kalus yang berwarna hijau. Pemberian selapis tipis media cair MS+2,4-D 2 mg/l+thiadiazuron 0,1 mg/l di atas media padat dapat mendorong pertumbuhan mikro kalus menjadi kalus.

Kata kunci: *P. colubrinum*, *P. nigrum*, protoplas, hibridisasi somatik dan mikro kalus.

ABSTRACT

Sexual hybridization of wild and cultivated pepper is difficult to be carried out. To solve this problem, somatic hybridization may be applied through protoplast fusion. By this technique a new hybrid from two parents of different species, that are sexually incompatible, could be produced. Protoplast was produced by cutting a leaf of pepper transversally, and incubating it for 16 hours in 10 ml cellulase enzyme R-10 2% + macerozyme R-10 0.5%. The protoplasts of cultivated and wild pepper with a density of 10^5 were fused in PEG 6000 30% for 25 minutes. The fused protoplasts were planted in different solid media. Protoplast development was observed periodically until micro callus was formed. The micro callus was then sub cultured in different new media to form callus. Results showed that the combination of cellulase R-10 2% with macerozyme R-10 0.5% produced high density of protoplast with high viability. Fusion in PEG 6000, 30% produced 26% fusion for 20 minutes. The fused protoplast formed microcallus at the first week after sub culture. The protoplast planted on solid medium $\frac{1}{2}$ LV+ABA 0.01 mg/l+ sucrose 3% produced a green micro callus. Adding a thin layer of liquid medium MS+2,4-D 2 mg/l+ thiazuron 0.1 mg/l on the solid medium promoted the growth of microcallus to callus.

Key words: *P. colubrinum*, *P. nigrum*, protoplast, somatic hybridization and micro callus.

PENDAHULUAN

Salah satu masalah dalam pengembangan lada budi daya adalah penyakit yang disebabkan *Phytophthora capsici*. Sampai saat ini varietas lada budi daya yang tahan terhadap penyakit tersebut belum ditemukan. Sifat ketahanan terhadap penyakit tersebut terdapat pada lada liar *P. colubrinum*, *P. hirsutum*, *P. aurifolium*, dan *P. cubeba* (Kasim, 1987). Salah satu usaha untuk menanggulangi masalah penyakit secara efektif dan efisien adalah penggunaan varietas yang tahan. Hibridisasi seksual secara konvensional untuk mentransfer gen ketahanan dari lada liar ke dalam lada budi daya yang berbeda spesiesnya sulit dilakukan. Hibridisasi somatik dengan teknik fusi protoplas merupakan salah satu teknologi alternatif yang dapat digunakan untuk mengatasi kelemahan hibrida seksual seperti permasalahan inkompatibilitas. Melalui fusi somatik dapat dihasilkan hibrida dari persilangan antarspesies yang secara seksual inkompatibel (Gleba dan Shlimukov, 1990; Groser *et al.*, 1990). Kultur protoplas hibrid hasil fusi antara *Solanum khasianum* dengan *S. aculeatissimum* telah berhasil diregenerasi membentuk tanaman (Statmann *et al.*, 1994) demikian pula antara *S. khasianum* dengan *S. mammosum* (Priyanto, 1996). Fusi protoplas antara *Solanum tuberosum* dengan *S. brevidens* yang resisten terhadap berbagai penyakit virus telah menghasilkan tanaman baru yang tahan terhadap penyakit tersebut (Shepard *et al.*, 1980).

Melalui fusi protoplas diharapkan sifat ketahanan dari lada liar dapat dipindahkan ke dalam lada budi daya yang produktivitasnya tinggi. Selain itu, melalui fusi protoplas, sel hibrid yang dihasilkan mempunyai gabungan sitoplasma dari kedua tetuanya. Keadaan ini merupakan satu hal yang menarik untuk dipelajari karena sifat genetik yang diturunkan didapatkan pula pada sitoplasma. Langkah awal dalam hibridisasi somatik adalah degradasi dinding sel dua tetua yang berbeda dengan menggunakan larutan enzim. Untuk menghilangkan dinding sel digunakan enzim seperti selulase, pektinase, maserase, maserozim, dan pektiolas (Mabanza, 1984). Untuk mendorong terjadinya fusi protoplas dapat digunakan NaNO_3 atau PEG (Carlson *et al.*, 1972; Kao dan Michayluk, 1974) atau secara fisik melalui elektrofusi (Shinchakr *et al.*, 1989; Mollers, 1990; Priyanto, 1996).

Aplikasi teknik fusi protoplas pada tanaman lada telah dilaporkan oleh Husni *et al.* (1996). Dari penelitian tersebut telah diperoleh teknik isolasi dan fusi, namun tingkat keberhasilan pembentukan mikro kalus dari protoplas hasil fusi masih rendah.

Penelitian bertujuan untuk mendapatkan metode hibridisasi somatik untuk pembentukan kalus dari protoplas hasil fusi antara lada liar dan lada budi daya.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di laboratorium Reproduksi dan Pertumbuhan, Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor, dari bulan Mei 1996 - Februari 1997. Sebagai sumber protoplas yang digunakan adalah daun muda lada budi daya (*Piper nigrum*) dan lada liar (*Piper colubrinum*) yang diperbanyak secara *in vitro*. Media perbanyakan yang digunakan adalah media MS yang diperkaya dengan BA 0,3 mg/l + thidiazuron 0,01 mg/l (untuk lada budi daya) dan BA 0,1 mg/l (untuk lada liar). Ke dalam media tersebut ditambahkan sukrosa sebanyak 20 g/l dengan pH 5,8. Penelitian dilakukan dalam tiga tahap sebagai berikut.

Isolasi Protoplas

Isolasi protoplas dilakukan dalam larutan kombinasi enzim selulase Onozuka R-10 (Yakult) dengan maserozim R-10 (yakult) dalam larutan CPW atau MS (Tabel 1) yang diinkubasikan selama 16 jam dalam keadaan gelap pada suhu 21-25°C. Protoplas disaring dengan nilon filter ukuran 45 dan 64 milimikron dalam tabung sentrifus kapasitas 15 ml. Kemudian disentrifus dengan kecepatan 400 rpm selama lima menit untuk mendapatkan protoplas. Pencucian dilakukan dengan larutan pencuci untuk menghilangkan larutan enzim dan mempertahankan viabilitas protoplas (Tabel 1). Pengamatan densitas dan viabilitas protoplas dilakukan secara mikroskopis dengan menggunakan haemocytometer Neubauer. Purifikasi protoplas dilakukan dengan menggunakan larutan sukrosa 110 g/l dengan pH 5,6.

Fusi Protoplas

Fusi protoplas dilakukan dengan larutan PEG 6000 menurut cara yang diterapkan oleh Husni *et al.* (1996) pada tanaman lada. Protoplas lada liar dan budi daya dengan kerapatan masing-masing $\pm 2 \times 10^5$ dalam larutan pencuci dimasukkan dalam tabung sentrifus. Kemudian larutan PEG 6000 ditambahkan ke dalam tabung tersebut untuk menginduksi terjadinya fusi. Konsentrasi PEG yang digunakan adalah 30% selama 25 menit pada suhu 21-25°C. Untuk membantu terjadinya fusi, tabung sentrifus tersebut digoyang secara perlahan sehingga suspensi menjadi homogen. Pengamatan terhadap persentase jumlah protoplas yang mengalami fusi dihitung secara mikroskopis menggunakan haemocytometer Neubaer. Kemudian dicuci kembali dengan larutan pencuci untuk menghilangkan larutan PEG dan disentrifus kembali selama 5 menit pada kecepatan 400 rpm. Kemudian densitas protoplas dibuat menjadi $\pm 2 \times 10^5$ untuk dikulturkan dalam media perlakuan.

Tabel 1. Larutan enzim dan pencuci yang digunakan untuk isolasi protoplas (lada liar dan lada budi daya).

Larutan	Konsentrasi
A. Larutan enzim	
1. - selulase R-10*	2%
- maserozim R-10	0,5%
- manitol	11%
- MES	0,5%
- pH	5,8
2. - selulase R-10*	2%
- maserozim R-10	0,5%
- 2,4-D	2 mg/l
- thidiazuron	0,1 mg/l
- manitol	11%
- MES	0,5%
- pH	5,8
3. - selulase R-10**	0,8%
- maserozim R-10	0,1%
- sukrosa	14 g
- kalium dektran	0,1 g
- Polivinil piroolidon	1 g
- Bovin serum albumin	0,13 g
- pH	5,8
B. Larutan Pencuci	
1. CaCl ₂ .2H ₂ O	147 mg/l
2. manitol	91 g/l
3. MES	0,6 g/l
4. pH	5,6
C. Larutan Purifikasi	
1. Sukrosa	110 g/l
2. pH	5,6

Keterangan: * Dalam larutan CPW

** Dalam larutan MS

Kultur Protoplas

Protoplas hasil fusi dikulturkan dalam media dasar (LV) yang konsentrasinya diencerkan sampai dengan setengahnya ($\frac{1}{2}$ LV). Ke dalam media tersebut ditambahkan ABA 0,01 mg/l dan casein hidrolisat 50 mg/l. Media dibuat agak semisolid dengan penambahan gelrite 1,8% dengan pH 5,8. Perlakuan yang diuji dalam tahap ini adalah penambahan BA 4,5 mg/l kombinasi dengan sukrosa 2 dan 3%. Pada masing-masing media tersebut ditaburkan tiga tetes protoplas dengan kerapatan $\pm 2 \times 10^5$. Kultur ditempatkan dalam ruang kultur pada suhu 21-25°C yang disinari dengan lampu TL selama 16 jam. Pengamatan dilakukan terhadap waktu

pembentukan mikro kalus, jumlah koloni mikro kalus, dan visual koloni mikro kalus. Untuk mendorong pertumbuhan selanjutnya, mikro kalus yang terbentuk kemudian di subkultur pada media baru dengan komposisi media yang sama dengan media awal. Di atas media padat tersebut kemudian diberi selapis tipis media cair MS + 2,4-D 2 mg/l + thidiazuron 0,1 mg/l. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah mikro kalus yang membentuk kalus dan visual kalus.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Protoplas

Kombinasi enzim selulase R-10 macerozim R-10 dengan inkubasi selama 16 jam pada suhu 21-25°C dapat mengisolasi protoplas lada budi daya dengan lada liar. Perilaku konsentrasi enzim, larutan (CPW dan MS) dan penambahan zat pengatur tumbuh dalam larutan enzim menghasilkan densitas protoplas yang berbeda (Tabel 2).

Pada Tabel 2 terlihat bahwa kombinasi selulase konsentrasi 2% dengan macerozim 0,5% memberikan hasil yang lebih baik (densitas 10^5) dibanding kombinasi selulase konsentrasi rendah 0,8% + macerozim 0,1% (densitas 10^3). Perbedaan hasil yang diperoleh selain disebabkan oleh konsentrasi enzim yang digunakan diduga juga disebabkan oleh larutan pengencer yang digunakan (CPW dan MS). Kombinasi selulase 2%+macerozim 0,5% dalam larutan CPW merupakan komposisi yang terbaik untuk isolasi protoplas lada. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Husni *et al.* (1996) di mana pada konsentrasi tersebut dapat mengisolasi protoplas lada dengan kerapatan yang tinggi dengan cara daun diiris kecil-kecil ± 1 mm dengan masa inkubasi selama 90 menit di atas shaker. Berbeda dengan penelitian ini di mana eksplan daun hanya ditoreh dengan cara membujur ± 1 mm dan diinkubasi selama 16 jam. Densitas protoplas paling tinggi adalah $5,8 \times 10^5$ untuk lada budi daya dan $6,1 \times 10^5$ untuk lada liar dihasilkan dari selulase 2% + macerozim 0,5%. Kemudian diikuti selulase 2% + macerozim 0,5% + 2,4-D2 mg/l + Thidiazuron 0,1 mg/l.

Tabel 2. Isolasi protoplas lada liar dengan lada budi daya pada berbagai komposisi media dengan masa inkubasi selama 16 jam.

Larutan enzim	Densitas protoplas	
	Lada budi daya	Lada liar
1. Selulase R-10 2% + macerozim R-10 0,5%*	$5,8 \times 10^5$	$6,1 \times 10^5$
2. Selulase R-10 2% + macerozim R-10 0,5% + 2,4-D2 mg/l + th 0,1 mg/l *	$5,4 \times 10^5$	$5,7 \times 10^5$
3. Selulase R-10 0,8% + macerozim R-10 0,1%**	$1,2 \times 10^3$	$1,3 \times 10^5$

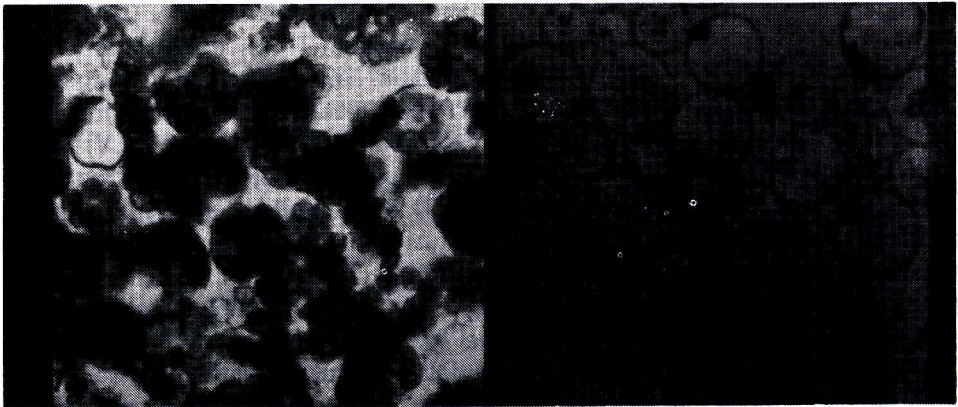
Keterangan: * Dalam larutan CPW

** Dalam larutan MS

Setelah pemurnian, tampaknya protoplas tidak hanya ditemukan pada bagian atas tetapi setelah diamati pada bagian bawah tabung sentrifus diperoleh pula protoplas. Protoplas yang berasal dari bagian bawah mempunyai sitoplasma yang padat dan klorofil menyebar merata pada seluruh sitoplasma. Sedangkan protoplas yang berasal dari bagian atas sitoplasmanya hanya terdapat di bagian pinggir dari membran dan tidak mempunyai klorofil (Gambar 1). Diduga adanya perbedaan berat jenis protoplas di mana protoplas yang mempunyai BJ-nya tinggi ditemukan di bagian bawah sedangkan protoplas yang BJ-nya lebih rendah terapung di atas larutan sukrosa. Viabilitas kedua protoplas tersebut tinggi, karena protoplas secara visual penampakkannya bulat sempurna.

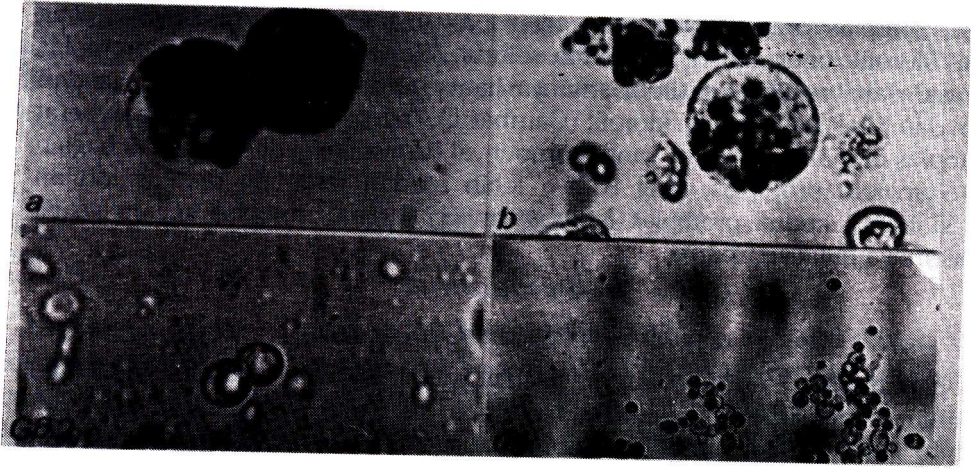
Fusi Protoplas

Protoplas dengan densitas yang tinggi baik untuk lada liar maupun lada budi daya kemudian difusikan menggunakan metode fusi yang diperoleh Husni *et al.* (1996) yaitu menggunakan PEG 6000 konsentrasi 30% selama 25 menit. Tahapan proses terjadinya fusi sampai terjadinya pembelahan protoplas dapat dilihat pada Gambar 2. Protoplas yang sudah mengalami fusi ditandai dengan bertambah besarnya volume protoplas. Keberhasilan persentase protoplas yang mengalami fusi tetap masih rendah yaitu 26%.



Gambar 1. Protoplas setelah pemurnian

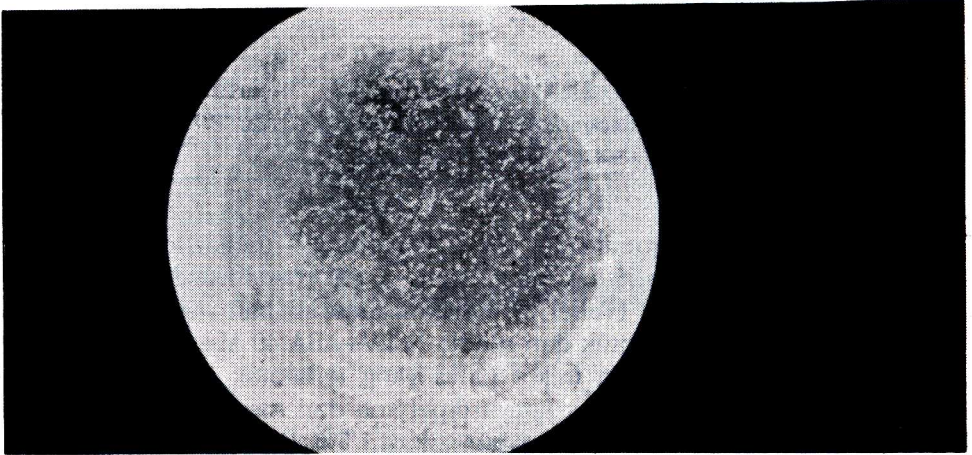
- a. Protoplas yang berasal dari bagian bawah tabung sentrifus setelah pemurnian
- b. Protoplas yang berasal dari bagian atas tabung sentrifus setelah pemurnian.



Gambar 2. Tahapan fusi protoplas sampai terjadinya pembelahan protoplas
 a. Proses terjadinya fusi
 b. Protoplas yang telah mengalami fusi
 c. Pembelahan sel protoplas
 d. Sel-sel muda hasil pembelahan protoplas.

Kultur Protoplas

Pemilihan jenis dan komposisi media yang tepat merupakan faktor yang penting dalam kultur protoplas. Hal ini sesuai dengan pernyataan Torres (1989), bahwa jenis dan komposisi media yang digunakan merupakan salah satu faktor yang sangat penting dalam keberhasilan kultur protoplas. Penambahan sukrosa 3% pada media dasar LV yang konsentrasinya diencerkan sampai setengahnya ($\frac{1}{2}$ LV)+casein hidrolisat 50 mg/l + ABA 0,01 mg/l atau kombinasi ABA 0,01 mg/l + BA 4,5 mg/l dapat mendorong terbentuknya mikro kalus (Gambar 3). Koloni mikro kalus mulai nampak pada minggu pertama setelah protoplas hasil fusi dikulturkan dengan penampakan warna putih. Perubahan warna mikro kalus dari putih menjadi hijau terjadi pada minggu ketiga. Penggunaan sukrosa dengan konsentrasi yang lebih rendah yaitu 2% tidak berhasil membentuk mikro kalus (Tabel 3). Penambahan sukrosa pada media kultur merupakan faktor yang sangat penting dalam kultur jaringan. Sukrosa berguna sebagai sumber energi yang siap digunakan untuk membantu proses pertumbuhan dan perkembangan kultur. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Sofiari *et al.* (1996) pada tanaman *cassava*. Penambahan sukrosa 30,3 g/l dan casein hidrolisat 150 mg/l dalam media kultur dapat mendorong pertumbuhan protoplas membentuk mikro kalus. Selain itu, penambahan sukrosa 3% pada jenis dan komposisi media yang sama dapat menghasilkan embrio somatik dari kultur suspensi sel tanaman *Picea glauca* Moench (Attree *et al.*, 1995).



Gambar 3. Pertumbuhan protoplas membentuk mikro kalus.

Tabel 3. Pengaruh penambahan sukrosa dan BA pada media kultur untuk pertumbuhan sel hasil fusi membentuk mikro kalus.

Sukrosa (%)	Komposisi media	Jumlah koloni mikro kalus	Warna koloni
2	- ½ LV+ABA 0,01 mg/l+CH 50 mg/l	0	-
	- ½ LV+ABA 0,01 mg/l+CH 50 mg/l+BA 4,5 mg/l	0	-
3	- ½ LV+ABA 0,01 mg/l+CH 50 mg/l	4	hijau
	- ½ LV+ABA 0,01 mg/l+CH 50 mg/l+BA 4,5 mg/l	6	hijau.

Keterangan: CH= casein hidrolisat

Untuk mendorong pertumbuhan mikro kalus menjadi kalus dan regenerasinya maka mikro kalus yang terbentuk di subkultur pada media baru. Tabel 4 menunjukkan bahwa media sub kultur yaitu ½ LV+ABA 0,01 mg/l+CH 50 mg/l+sukrosa 3%; ½ LV+ABA 0,01 mg/l+BA 4,5 mg/l+CH 50 mg/l+sukrosa 3%; ½ LV+ABA 40 M+CH 50+sukrosa 3% dan ½ LV+2,4-D 9 M+BA 4,5 mg/l+CH 50 mg/l+sukrosa 3% dapat mendorong pertumbuhan mikro kalus menjadi kalus dengan warna yang tetap hijau. Media subkultur lainnya walaupun dapat mendorong pertumbuhan mikro kalus tetapi menghilangkan klorofil pada kalus sehingga warnanya berubah menjadi putih. Hilangnya klorofil tersebut dikarenakan penambahan 2,4-D yang dapat menghambat pembentukan klorofil.

Tabel 4. Pengaruh subkultur mikro kalus yang terbentuk dari media ½ LV + ABA 0,01 + BA 4,5 mg/l + CH 50 mg/l + sukrosa 3% terhadap pertumbuhan mikro kalus.

Media subkultur	Warna Kojoni	Keterangan
½ LV + ABA 0,01mg/l + CH 50 mg/l + sukrosa 3%	Hijau	Tumbuh
½ LV + ABA 0,01mg/l +CH 50 mg/l + BA 4,5 mg/l + sukrosa 3%	Hijau	Tumbuh
½ LV + ABA 40 M + CH 50 mg/l + sukrosa 3%	Hijau	Tumbuh
½ LV + 2,4-D 9 M + CH 50 mg/l + BA 4,5 mg/l + sukrosa 3%	Hijau	Tumbuh

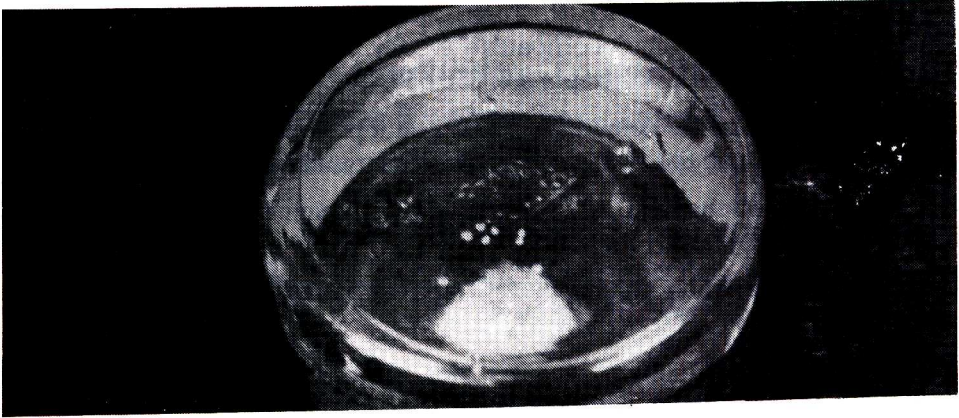
Penambahan selapis tipis media cair MS+2,4-D 2 mg/l + thidiazuron 0,1 mg/l di atas media padat yang mengandung mikro kalus dapat mendorong pertumbuhan mikro kalus yang lebih banyak (Tabel 5). Setelah penambahan media cair maka mikro kalus paling banyak terbentuk dari media ½ LV+ABA 40 M+casein hidrolisat 50 mg/l+sukrosa 3%. Namun dari mikro kalus yang terbentuk pada semua perlakuan yang dapat membentuk kalus hanya diperoleh dari media ½ LV+ABA 0,01 mg/l+BA 4,5 mg/l+casein hidrolisat 50 mg/l+sukrosa 3%. Peningkatan konsentrasi ABA nampaknya menghambat proses pembelahan sel yang terus menerus. Di samping itu, penggunaan BA tetap diperlukan sebagai pemacu terjadinya pembelahan sel untuk membentuk kalus.

Mikro kalus yang berwarna putih tetap seperti warna semula tidak berubah menjadi hijau karena media cair yang diberikan masih mengandung 2,4-D di samping thidiazuron.

Untuk lebih meningkatkan laju pertumbuhan maka dilakukan subkultur kembali mikro kalus pada media padat KM + thidiazuron 2 mg/l+BA 0,5 mg/l. Perlakuan subkultur berulang tampaknya mempercepat pertumbuhan karena secara visual kalusnya lebih besar (Gambar 4).

Tabel 5. Pembentukan mikro kalus dan kalus dari protoplas lada dengan penambahan selapis tipis media cair.

Media padat	Media cair dan media padat	Jumlah Mikro kalus	Warna	Jumlah kalus
-½ LV+ABA 0,01 mg/l+BA 4,5 mg/l + CH 50 mg/l+sukrosa 3%	MS+2,4-D 2 mg/l+th 0,1 mg/l	48	Hijau	2
-½ LV+ABA 0,01 mg/l+CH 50 mg/l + sukrosa 3%	MS+2,4-D 2 mg/l+th 0,1 mg/l	68	Hijau	0
-½ LV+ABA 40 m+CH 50 mg/l + sukrosa 3%	MS+2,4-D 2 mg/l+th 0,1 mg/l	92	Hijau	0
-½ LV+2,4-D 9 m+BA 4,5 mg/l + CH 50 mg/l+sukrosa 3%	MS+2,4-D 2 mg/l+th 0,1 mg/l	45	Putih	0



Gambar 4. Pertumbuhan mikro kalus menjadi kalus.

KESIMPULAN

Kombinasi enzim selulase 2% dengan macerozim 0,5% dengan waktu inkubasi selama 16 jam dapat mengisolasi protoplas lada (liar dan budi daya) dengan kerapatan dan viabilitas yang tinggi. Larutan PEG 6000 pada konsentrasi 30% dengan waktu inkubasi selama 25 menit dapat menginduksi terjadinya fusi sebesar 26%. Protoplas hasil fusi yang dikulturkan dalam media semi solid (gelrite 1,8%) $\frac{1}{2}$ LV+ABA 0,01 mg/l+CH 50 mg/l+Sukrosa 3% (+ BA 4,5 mg/l) dapat membentuk mikro kalus dengan warna hijau. Penambahan selapis tipis media cair MS+2,4-D 2 mg/l+thidiazuron 0,1 mg/l di atas media padat dapat mendorong pertumbuhan mikro kalus menjadi kalus.

DAFTAR PUSTAKA

- Attree, S.M., M.K. Pamerory, and L.C. Fowke. 1995.** Development of white spruce (*Picea glauca* (Moench.) Voss) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmoticum, and their tolerance to drying and frozen stoge. *Journal of Experiment Botany*. 46 (285): 433-439
- Carlson, P.S., H.H. Smith, and R.D. Dearing. 1972.** Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc. Nat. Acad. Sei. USA* 69: 2292-2294.
- Gleba, Y.Y. and L.R. Shilumukov. 1990.** Somatic hybridization and cybridization. *In* S.S. Bhojwani (*Ed.*). *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations, Developments in Crop Science* 19. Elseveier, Amsterdam. pp. 316-345.

- Grosser, J.W., F.G. Gmitter, JR., N. Tusa, and T.L. Chandler. 1990.** Somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: *Citrus reticulata* and *Citropsis gilletiana*. *Plant Cell Reports* 8: 656-659.
- Husni, A., I. Mariska, dan M. Kosmiatin. 1996.** Kultur protoplas hasil fusi antara lada budi daya dengan lada liar. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*. II.
- Kao, K.N. and M.R. Michayluk. 1974.** A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* 115: 355-367.
- Kasim, R. 1987.** Ketahanan tujuh spesies lada terhadap penyakit *Phytophthora*. *Pembr. Litri*. (39): 34-38.
- Mabanza, J. 1984.** La culture *in vitro* des protoplastes de manioc etude des possibilites d'induction d'une resistance a la bacteriose provoquee par le *Xanthomonas manihotis*. These Docteur d'Etat mention Sciences. USTL. Montpellier, France. 193 pp.
- Mollers, C. 1990.** Protoplast en fusion als praxis grechte Methode fur die Kombinationszuchtung bei der Kartoffel. Dissertation, Universitat Hohenheim.
- Priyanto, B. 1996.** Studi fusi protoplas *Solanum khasianum* Clarke dengan protoplas *S. mammosum* L. Ringkasan Disertasi Thesis Doktor Program Studi Budi Daya Pertanian IPB. 37 hal.
- Shepard. J.F., D. Bidney, and E. Shahin. 1980.** Potato protoplasts in crops improvement. *Science* 219: 683-688.
- Shinchakr, D., R. Haicour, M.H. Chaput, E. Barrientos, G. Ducreux, and L. Rossiginol. 1989.** Somatic hybrid plants produced bay elecrofusion between *Solanum melongena* L. and *S. torvum* Sw. *Theor. Appl.* 77: 1-6.
- Sofiari, E., J.E.M. Bergervoet, C.J.J.M. Raemakers, E. Jacobsen, and R.G. F.Visser. 1996.** The invertigation of somatic embryos and leaves as sources for protoplast culture in Cassava. *In* E. Sofiari (*Ed.*). *Regeneration and transformation of Cassava (Manihot esculenta Crantz.)*. Thesis Wageningen Agricultural University. pp. 35-54.
- Statmann, M., E. Gerick, and G. Wenzel. 1994.** Interspecific somatic hybrids between *Solanum khasianum* and *S. aculeatissimum* produced by electrofusion. *Plant Cell Reports* 13: 193-196.