

Isolasi Protoplas Tanaman Kacang Panjang secara Enzimatis

Imron Riyadi

Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor

ABSTRACT

The technique, kind and concentration of enzyme that were appropriate and optimum affected the isolation process and rendement result of plant protoplasts. A research was conducted to enhance the protoplast rendements of long bean (*Vigna sinensis*, L.) that was isolated by enzyme Cellulase RS and Macerozyme R-10 as single and combination in a solution. Concentrations of enzyme were used as much as 2.0-3.0% w/v for Cellulase RS and 0.4-0.6% w/v for Macerozyme R-10. Those solutions contain mannitol 25 mM as osmotycum. Isolation process was done on shaker with 50 rpm (rotation per minute) speed in dark room for 3 hours. Results show that C3 treatment (concentration of Cellulase RS enzyme as much as 3.0% w/v) yielded protoplasts density 17.40×10^5 protoplasts/g fresh weight of mesophyl and M2 treatment (concentration of Macerozyme R-10 enzyme as much as 0.5% w/v) resulted 17.46×10^5 protoplasts/g. As a whole, the best treatment was achieved by C₂M₂ (combination between Cellulase RS as much as 2.5% and Macerozyme R-10 enzyme as much as 0.5% w/v) which resulted protoplasts density 32.67×10^5 protoplasts/g fresh weight of mesophyl.

Key words: *Vigna sinensis* L. protoplasts, rendement, density, isolation, enzyme, Cellulase RS, Macerozyme R-10.

ABSTRAK

Teknik, jenis, dan konsentrasi enzim yang tepat dan optimum berpengaruh dalam proses isolasi dan hasil rendemen protoplas tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan rendemen protoplas kacang panjang (*Vigna sinensis* L.) yang diisolasi dengan enzim *Cellulase RS* dan *Macerozyme R-10* secara individu dan penggabungan dua enzim dalam satu larutan. Konsentrasi enzim yang digunakan adalah 2,0-3,0% b/v untuk *Cellulase RS* dan 0,4-0,6% b/v untuk *Macerozyme R-10*. Zat osmotikum yang digunakan adalah mannitol 25 mM. Proses isolasi dilakukan di atas *gyotonic shaker* dengan kecepatan 50 ppm (putaran per menit) dalam kondisi gelap selama 3 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan C3 (konsentrasi enzim *Cellulase RS* 3,0% b/v) menghasilkan densitas $17,40 \times 10^5$ protoplas/g dan perlakuan M2 (konsentrasi enzim *Macerozyme R-10* 0,5% b/v) menghasilkan densitas $17,46 \times 10^5$ protoplas/g berat segar mesofil daun. Secara keseluruhan, perlakuan terbaik dicapai oleh C₂M₂ (konsentrasi enzim *Cellulase RS* 2,5% dan enzim *Macerozyme R-10* 0,5% b/v)

yang menghasilkan densitas $32,67 \times 10^5$ protoplas/g berat segar mesofil daun.

Kata kunci: *Vigna sinensis* L., protoplas, rendemen, densitas, isolasi, enzim, *Cellulase RS*, *Macerozyme R-10*.

PENDAHULUAN

Kacang panjang (*Vigna sinensis* L.) merupakan tanaman sayuran penting dari golongan kacang-kacangan, karena mengandung nutrisi yang relatif lengkap dan cukup tinggi, terutama protein nabati. Bagian tanaman kacang panjang yang biasa digunakan sebagai sayuran adalah polong muda, biji, dan daun muda (Irfan 1993).

Teknik isolasi protoplas diperlukan dalam pemuliaan tanaman untuk menyeleksi dan merakit varietas hibrida secara lebih cepat. Menurut Suryowinoto (1996), isolasi protoplas adalah teknik untuk menghasilkan protoplas yang utuh dan viabel dari jaringan tanaman hidup dengan cara menghilangkan dinding selnya.

Menurut Tan (1987), salah satu cara untuk memperoleh protoplas utuh adalah dengan perlakuan gelap pada suhu rendah (4°C) selama 6 jam pada saat isolasi protoplas. Perlakuan ini telah dicobakan pada eksplan mesofil tanaman tomat dengan hasil rendemen protoplas antara 2×10^5 sampai 6×10^5 protoplas/g eksplan.

Penghilangan dinding sel dapat dilakukan secara mekanis maupun enzimatis. Secara enzimatis, jenis dan konsentrasi enzim yang digunakan sangat mempengaruhi perolehan protoplas. Dinding sel yang masih muda biasanya tersusun dari pektin dan selulosa. Oleh karena itu, enzim yang paling cocok digunakan adalah *Pectinase* atau *Macerozyme* dan *Cellulase* (Esau 1965; Evans dan Bravo 1983; Pollard dan Walker 1990).

Enzim *Pectinase* atau *Macerozyme* berfungsi untuk menghancurkan lamela tengah yang tersusun

dan zat pektin, sehingga sel satu dengan sel lainnya terpisah. Proses ini biasa disebut maserasi sel (Sumardi dan Pudjoarinto 1992). Fungsi enzim *Cellulase* adalah menghancurkan dan melisiskan penebalan primer dari dinding sel yang tersusun atas zat selulosa. Perlakuan kedua enzim tersebut dapat dilakukan dengan dua tahap dan satu tahap. Perlakuan dua tahap adalah dengan cara memasukkan bahan ke dalam larutan enzim secara bergantian dan berurutan dari larutan enzim *Macerozyme*, kemudian dimasukkan lagi enzim *Cellulase*. Perlakuan satu tahap adalah dengan cara mencampur kedua enzim tersebut dalam satu larutan untuk mengisolasi protoplas. Pengalaman dari beberapa percobaan menunjukkan bahwa mencampur kedua enzim tersebut merupakan cara yang lebih efektif untuk mengisolasi protoplas tanaman (Evans dan Bravo 1983).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi enzim *Cellulase RS* dan *Macerozyme R-10* serta komposisi terbaik kedua enzim untuk isolasi protoplas tanaman kacang panjang.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman

Bahan tanaman benih kacang panjang hijau lokal yang berasal dari Desa Rejo Mulyo, Pakuan Ratu Blok C SP II, Lampung Utara. Benih dikulturkan dengan media kapas basah dalam botol. Pengkulturan benih dilakukan secara *in vitro* dengan kondisi aseptik dalam ruang terang selama 13 hari. Kecambah tersebut mempunyai minimal dua daun yang sudah berwarna hijau. Daun-daun ini yang digunakan sebagai donor protoplas. Sebelum dikulturkan, benih disterilisasi dengan bahan pemutih (*Baycline*) konsentrasi 30%.

Pembuatan Media

Ada dua media yang dibuat dan digunakan dalam proses isolasi protoplas, yaitu:

1. *EM-medium (elution medium)* atau media elusi, yaitu media yang telah dicampur kedua enzim dengan konsentrasi yang sesuai dengan perlakuan untuk proses isolasi protoplas dari mesofil daun kacang panjang. Macam bahan dan konsentrasinya disajikan pada Tabel 1.
2. *CPW-medium* atau medium pencuci yang biasa disebut *PM-medium (purification medium)* atau media pemurni/pembersih. Media ini digunakan untuk mencuci dan memurnikan protoplas hasil isolasi dari zat enzim, sehingga protoplas dalam kondisi bersih/murni dan siap dikulturkan atau untuk proses selanjutnya, misalnya untuk fusi atau transfer organela. Macam bahan dan konsentrasi *CPW-medium* atau *PM-medium* disajikan pada Tabel 2.

Prosedur Kerja

Kecambah tanaman kacang panjang yang berumur 13 hari diambil daunnya (mesofil), kemudian dikumpulkan sebagai bahan donor protoplas. Mesofil yang diperlukan per perlakuan adalah 0,2 g yang sebelumnya dipotong/diiris tipis selebar ± 1 mm, selanjutnya dimasukkan ke dalam 2 ml larutan *EM-medium* kemudian diinkubasi dalam keadaan gelap selama 3 jam sambil dikocok di atas pengocok atau *gyrotoric shaker* berkecepatan 50 rpm. Perlakuan enzim tersebut merupakan variasi konsentrasi enzim *Cellulase RS* dan *Macerozyme R-10*, masing-masing perlakuan terdiri atas tiga tingkat ditambah kontrol sehingga dalam penelitian ini terdapat 16 kombinasi perlakuan sebagai berikut:

1. C_0M_0
2. C_0M_1
3. C_0M_2
4. C_0M_3

Tabel 1. Komposisi *EM-medium* atau media untuk isolasi protoplas.

Nama bahan	Konsentrasi (sesuai perlakuan)		
	C_1M_1	C_2M_2	C_3M_3
<i>Cellulase RS</i> *	2,0%	2,5%	3,0%
<i>Macerozyme R-10</i> *	0,4%	0,5%	0,6%
Mannitol	25 mM	25 mM	25 mM
MES (Morpho-Ethana Sulfoxide)	1 mM	1 mM	1 mM
pH	5,8	5,8	5,8

* enzim yang digunakan sebagai perlakuan.

Tabel 2. Komposisi *CPW-Medium* atau media pencuci atau juga disebut medium pemurni.

Nama bahan	Konsentrasi
KH ₂ PO ₄	170,00 μ M
KNO ₃	999,00 μ M
CaCl ₂ .2H ₂ O	10,00 mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	998,00 μ M
KJ	0,96 μ M
Cu SO ₄ .5 H ₂ O	1,00 μ M
Mannitol	600,00 mM

5. C₁M₀ 6. C₁M₁ 7. C₁M₂ 8. C₁M₃
 9. C₂M₀ 10. C₂M₁ 11. C₂M₂ 12. C₂M₃
 13. C₃M₀ 14. C₃M₁ 15. C₃M₂ 16. C₃M₃

C₀ = tanpa enzim *Cellulase RS* (kontrol)

C₁ = konsentrasi enzim *Cellulase RS* sebesar 2,0% b/v

C₂ = konsentrasi enzim *Cellulase RS* sebesar 2,5% b/v

C₃ = konsentrasi enzim *Cellulase RS* sebesar 3,0% b/v

M₀ = tanpa enzim *Macerozyme R-10* (kontrol)

M₁ = konsentrasi enzim *Macerozyme R-10* sebesar 0,4% b/v

M₂ = konsentrasi enzim *Macerozyme R-10* sebesar 0,5% b/v

M₃ = konsentrasi enzim *Macerozyme R-10* sebesar 0,6% b/v

Setelah waktu inkubasi tercapai, larutan enzim beserta suspensi protoplas disaring dengan kain *Mary-Cloth* mesh 200 μ m. Suspensi protoplas yang diperoleh disentrifugasi dengan sentrifus merk *Hettich Universal* berkecepatan 1000 rpm selama 2 menit. Supernatan diambil dengan pipet dan dibuang, sedangkan endapannya ditambah larutan *CPW-Medium* 1 ml, kemudian disentrifugasi lagi dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit. Protoplas akan mengapung di permukaan larutan, kemudian diambil dengan pipet untuk ditempatkan dalam tabung tersendiri. Protoplas tersebut sudah murni, bersih dari larutan enzim dan siap dikulturkan atau difusikan. Dalam penghitungan densitas atau kerapatan rendemen protoplas hasil isolasi, suspensi protoplas tersebut ditetaskan dalam *Haemocytometer* untuk dihitung densitasnya.

Pengamatan dan Analisis Data

Pengamatan dilakukan terhadap rendemen protoplas hasil isolasi. Jumlah protoplas dihitung dengan menggunakan *Haemocytometer*. Penelitian ini menggunakan metode faktorial dengan pola dasar rancangan acak lengkap, masing-masing perlakuan diulang tiga kali. Data dianalisis dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf uji 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengecambahan Benih

Benih kacang panjang mulai berkecambah pada umur 5-7 hari setelah kultur. Daun mulai mekar (sepasang pertama) pada umur 9-11 hari setelah tanam dan warnanya sudah tampak hijau yang menandakan pembentukan klorofil sudah berlangsung (Gambar 1). Klorofil ini sangat penting karena akan digunakan sebagai *marker* atau *penanda protoplas* kacang panjang yang terisolasi. Pada umur ± 15 hari, daun-daun (bagian mesofil) tersebut diambil dan digunakan sebagai bahan atau donor protoplas yang akan diisolasi secara enzimatis.

Isolasi Protoplas

Pengaruh Perlakuan Enzim *Cellulase RS*

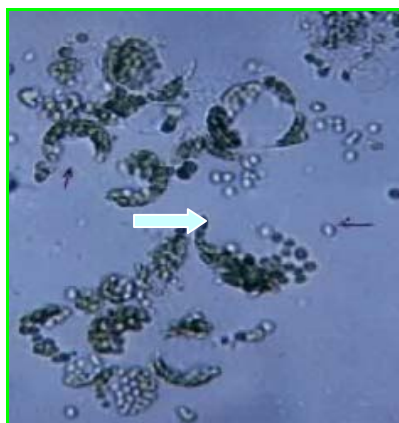
Perlakuan konsentrasi enzim *Cellulase RS* dan *Macerozyme R-10* maupun gabungan kedua enzim (interaksi) berpengaruh nyata terhadap rendemen protoplas kacang panjang hasil isolasi.

Protoplas yang terisolasi umumnya berbentuk *intact* atau bulat, utuh, dan viabel dengan membran transparan dan bening, sehingga organela atau bagian dalam sel terlihat jelas (Gambar 2). Organela yang terlihat paling jelas adalah klorofil yang menampilkan butiran warna hijau dengan jumlah relatif banyak dan berukuran relatif besar. Oleh karena itu, klorofil ini dijadikan sebagai *marker* atau penanda dalam identifikasi penghitungan rendemen protoplas hasil isolasi (Patnaik dan Cocking 1982; Suryowinoto 1989).

Protoplas yang terbentuk tampak utuh, tidak mengalami kerusakan dalam inkubasi selama 3 jam yang dikocok dalam pengocok berkecepatan 50 rpm pada kondisi gelap dengan zat osmotikum berupa mannitol 25 mM. Dengan demikian, waktu inkubasi



Gambar 1. Perkecambahan kacang panjang secara *in vitro* dengan media kapas basah pada umur ± 10 hari di dalam ruang terang.



Gambar 2. Kumpulan protoplas kacang panjang hasil isolasi asal mesofil daun.

isolasi protoplas kacang panjang asal mesofil daun selama 3 jam dapat dijadikan formula karena mampu memberikan protoplas yang baik. Mannitol 25 mM yang digunakan sebagai osmotikum atau sering disebut sebagai zat antipecah atau *anti blasting* mampu menjaga kestabilan tekanan antara sitoplasma dengan larutan enzim sehingga protoplas tidak pecah (Suryowinoto 1989). Penelitian ini sesuai dengan penelitian isolasi protoplas karet yang dilakukan oleh Nurhaimi-Haris *et al.* (1993), yang menggunakan manitol 6,5-8% sebagai osmotikum dalam larutan enzim yang dikocok pada kondisi gelap.

Rendemen protoplas hasil isolasi dengan beberapa konsentrasi *Cellulase RS* menunjukkan perbedaan yang nyata (Tabel 3). Rendemen protoplas tertinggi ditunjukkan oleh perlakuan C_3 (konsentrasi enzim *Cellulase RS* 3,0% b/v) sebesar $17,4 \times 10^5$ protoplas/g berat segar mesofil daun. Nilai ini jauh lebih tinggi daripada rendemen yang diperoleh perlakuan kontrol (tanpa enzim) yang hanya mencapai $1,72 \times 10^5$ protoplas/g. Namun perlakuan C_3 tidak berbeda nyata dengan perlakuan C_2 (konsentrasi enzim *Cellulase RS* 2,5% b/v) yang mencapai $15,19 \times 10^5$ protoplas/g.

Perlakuan enzim *Cellulase RS* dapat mengisolasi protoplas dengan rendemen cukup tinggi (Tabel 3). Hal ini membuktikan bahwa enzim *Cellulase RS* secara individual mampu mengisolasi protoplas kacang panjang asal mesofil. *Cellulase RS* termasuk salah satu jenis enzim yang berfungsi melarutkan dinding sel berupa selulosa. Pengocokan selama 3 jam pada kondisi gelap akan mempercepat proses isolasi protoplas tersebut sehingga dapat meningkatkan rendemen protoplas (Evans dan Cocking 1977; Tan 1987).

Peningkatan densitas rendemen protoplas seiring dengan peningkatan konsentrasi enzim *Cellulase RS*. Hal ini dimungkinkan adanya proses pelarutan dinding sel selulosa dan derivat-derivatnya yang bergantung pada konsentrasi enzim *Cellulase RS* yang tepat dan optimum. Suryowinoto (1990) dan Patnaik *et al.* (1997) mengemukakan bahwa untuk melarutkan dinding sel yang tersusun dari selulosa digunakan enzim *Cellulase*. Konsentrasi enzim *Cellulase RS* yang optimum dapat mengisolasi protoplas dalam jumlah lebih banyak dengan kondisi protoplas yang baik (*intact*).

Pengaruh Perlakuan Enzim *Macerozyme R-10*

Perlakuan konsentrasi enzim *Macerozyme R-10* memberikan hasil yang berbeda nyata (Tabel 4). Rata-rata rendemen protoplas yang dicapai dari masing-masing perlakuan cukup tinggi dan yang tertinggi dicapai oleh perlakuan M₂ (konsentrasi enzim *Macerozyme R-10* 0,5% b/v), yaitu $17,46 \times 10^5$ protoplas/g berat segar mesofil, berbeda nyata dengan semua perlakuan. Tingginya rendemen protoplas dari pertanaman M₂, diduga karena konsentrasi enzim *Macerozyme R-10* 0,5% b/v merupakan konsentrasi yang tepat dan optimum untuk mesofil kacang panjang. Konsentrasi enzim *Macerozyme R-10* yang lebih tinggi (M₃ : 0,6% b/v) memberikan rendemen protoplas lebih rendah ($9,67 \times 10^5$ protoplas/g berat segar mesofil) dan hampir sama dengan perlakuan konsentrasi enzim *Macerozyme R-10* 0,4% b/v (M₁) dengan rendemen $9,71 \times 10^5$ protoplas/g eksplan. Hal ini sesuai dengan penelitian Nurhaimi-Haris *et al.* (1993), yang menggunakan enzim *Macerozym* dengan konsentrasi 0,5% untuk mengisolasi protoplas karet.

Enzim *Macerozyme R-10* adalah salah satu jenis enzim *Pectinase* yang berfungsi melarutkan dinding sel primitif yang tersusun atas zat *pectin* (Sumardi dan Pudjoarianto 1992; Kim dan Lee 1996). Enzim *Macerozyme* digunakan untuk memisahkan atau maserasi jaringan tanaman sehingga sel-sel tersebut terlepas menjadi sel-sel tunggal dan akhirnya melarutkan dinding sel yang masih tersisa sehingga terbentuk protoplas yang transparan berbentuk bulat dan utuh (Suryowinoto 1990; Patnaik dan Cocking 1982).

Pengaruh Perlakuan Interaksi antara Enzim *Cellulase RS* dengan *Macerozyme R-10*

Rendemen protoplas kacang panjang hasil isolasi dari perlakuan interaksi antara enzim *Macerozyme R-10* dengan enzim *Cellulase RS* jauh lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan enzim tersebut secara individual (Tabel 5). Suryowinoto (1988) melaporkan hal yang sama bahwa penggabungan enzim *Macerozyme* dengan *Cellulase RS* memberikan protoplas yang lebih baik.

Tabel 3. Uji jarak berganda Duncan 5% pada perlakuan konsentrasi enzim *Cellulase RS* terhadap rendemen protoplas kacang panjang (*Vigna sinensis* L.).

Perlakuan	Rerata rendemen protoplas (pps/g)*
C ₃	17,40 a
C ₂	15,19 a
C ₁	8,59 b
C ₀	1,72 c

*) Angka rata-rata dikalikan 10^5

Angka-angka dalam satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda nyata pada taraf 0,05 menurut uji DMRT.

Tabel 4. Uji jarak berganda Duncan 5% pada perlakuan konsentrasi enzim *Macerozyme R-10* terhadap rendemen protoplas kacang panjang.

Perlakuan	Rerata rendemen protoplas (pps/g)*
M ₂	17,46a
M ₁	9,71b
M ₃	9,67b
M ₀	6,05c

*) Angka rata-rata dikalikan 10^5

Angka-angka dalam satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda nyata pada taraf 0,05 menurut uji DMRT.

Tabel 5. Pengaruh interaksi antara perlakuan konsentrasi enzim *Cellulase RS* dengan *Macerozyme R-10* terhadap rendemen protoplas kacang panjang.

Perlakuan	Rerata rendemen protoplas (pps/g)*
C ₂ M ₂	32,67 a
C ₃ M ₂	25,04 b
C ₃ M ₁	18,08 c
C ₃ M ₃	15,67 c
C ₂ M ₃	11,29 d
C ₃ M ₀	10,79 d
C ₁ M ₂	10,09 d
C ₂ M ₁	10,05 d
C ₁ M ₃	9,63 d
C ₁ M ₁	8,79 d
C ₂ M ₀	6,75 e
C ₁ M ₀	5,84 e
C ₀ M ₃	2,09 e
C ₀ M ₂	2,04 e
C ₀ M ₁	1,92 f
C ₀ M ₀	0,84 f

*) Angka rata-rata dikalikan 10⁵

Angka-angka dalam satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda pada taraf nyata 0,05 menurut uji DMRT.

Interaksi terbaik enzim *Cellulase RS* dengan *Macerozyme R-10* dicapai oleh perlakuan C₂M₂ yang menghasilkan nilai densitas tertinggi, yaitu $32,67 \times 10^5$ protoplas/g mesofil daun. Angka ini jauh lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan interaksi kedua enzim yang lain. Hal ini diduga interaksi kedua enzim tersebut dengan konsentrasi *Cellulase RS* 2,5% dan *Macerozyme R-10* 0,5% merupakan perlakuan kombinasi yang paling tepat dan optimum.

Tingginya rendemen protoplas kacang panjang yang terisolasi dari perlakuan interaksi kedua enzim tersebut, berarti antara enzim *Cellulase RS* dan *Macerozyme R-10* terdapat interaksi positif. Keadaan ini menyebabkan penggabungan kedua enzim tersebut akan terjadi saling tindak atau saling mempengaruhi untuk meningkatkan rendemen protoplas yang terisolasi dibandingkan dengan pengaruh kedua enzim secara individual. Hal ini sesuai dengan pernyataan Suryowinoto (1996) dan Stoldt *et al.* (1996) yang mengemukakan bahwa untuk proses isolasi protoplas akan lebih baik bila menggunakan kombinasi enzim *Cellulase* dengan *Pectinase* seperti *Macerozyme*. Kombinasi enzim ini akan meningkatkan densitas protoplas hasil isolasi.

Protoplas hasil isolasi yang kondisinya baik (bulat, utuh, dan viabel) dalam jumlah cukup siap dikulturkan atau diperlakukan lebih lanjut dengan hasil yang lebih efektif dan efisien dengan potensi keberhasilan yang lebih tinggi. Perlakuan lanjut dari protoplas hasil isolasi antara lain adalah kultur protoplas, transfer organella, fusi protoplas intragenerik, dan intergenerik (Evans dan Bravo 1983; Kao dan Michayluck 1974; Hadisantoso dan Syahrani 1988).

KESIMPULAN

Protoplas kacang panjang dapat diisolasi dengan enzim *Cellulase RS* dan *Macerozyme R-10* secara individual maupun kombinasi keduanya. Pada perlakuan isolasi protoplas menggunakan enzim *Cellulase RS* secara individual, hasil rendemen protoplas tertinggi dicapai oleh perlakuan konsentrasi C₃ (3% b/v) dengan densitas $17,4 \times 10^5$ protoplas/g berat segar mesofil daun. Pada perlakuan enzim *Macerozyme R-10*, hasil isolasi protoplas tertinggi sebesar $17,46 \times 10^5$ protoplas/g dicapai oleh perlakuan konsentrasi M2 (0,5% b/v).

Perlakuan interaksi atau penggabungan antara enzim *Cellulase RS* dan *Macerozyme R-10* menghasilkan rendemen protoplas yang jauh lebih tinggi. Interaksi terbaik dari kedua enzim dicapai oleh perlakuan C₂M₂ (konsentrasi enzim *Cellulase RS* 2,5% b/v dan enzim *Macerozyme R-10* 0,5% b/v) dengan densitas 32,67 x 10⁵ protoplas/g mesofil daun.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dekan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta atas izin dan bantuannya dalam melaksanakan penelitian di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan. Terima kasih juga disampaikan kepada Prof. Moeso Suryowinoto dan Dr. Susiani Purbainingsih, DEA atas bimbingan dan koreksinya.

DAFTAR PUSTAKA

- Esau, K. 1965. Plant Anatomy. Wiley Eastern Limited, New Delhi. p. 11-45.
- Evans, D. and A. Bravo. 1983. Protoplast isolation and culture, technique for propagation and breeding. Macmillan Publishing CD, New York. I:124-145.
- Evans, P.K. and E.C. Cocking. 1977. Isolated Plant Protoplast in Plant Tissue and Cell Culture. 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford. p. 103-135.
- Hadisantosa, M. dan A. Syahrani. 1988. Fusi Sel. PAU Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. hlm. 7-75.
- Nurhaimi-Haris, A. Darussamin, dan W.A. Dodd. 1993. Isolasi protoplas karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) dari kalus dan suspensi sel. Menara Perkebunan 61(2):25-31.
- Irfan. 1993. Bertanam Kacang Sayur. Penebar Swadaya. Jakarta. hlm. 1-30.
- Kao, K.N. and M.E. Michayluk. 1974. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplast. Planta (Berl.) Springer-Verlag 115:355-367.
- Kim, J.C. and E.A. Lee. 1996. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Dianthus superbis*. Plant Cell Rep. 16:18-21.
- Patnaik, G. and E.C. Cocking. 1982. A new enzyme mixture for the isolation of leaf protoplasts. Z. Pflanzenphysiol, Bd. 107(5):41-45.
- Patnaik, J., S. Sahoo, and B.K. Debata. 1997. Somatic embryogenesis and planlet regeneration from cell suspension of palmarosa grass (*Cymbopogon martinii*). Plant Cell Rep. 16:430-434.
- Pollard, J.W. and J.M. Walker. 1990. Plant cell and tissue culture, method in molecular biology. Humana Press. Clifton, New Jersey 6:237-372.
- Sumardi, I. dan A. Pudjoarinto. 1992. Struktur dan perkembangan tumbuhan. Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. hlm. 215-240.
- Suryowinoto, M. 1988. Isolation and protoplast fusion in Orchids. Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. p. 2-4.
- Suryowinoto, M. 1989. Fusi protoplas. PAU Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. hlm. 3-30, 103-260.
- Suryowinoto, M. 1990. Petunjuk laboratorium, pemuliaan tanaman secara *in vitro*. PAU Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. hlm. 213-234, 269-294.
- Suryowinoto, M. 1996. Prospek kultur jaringan dalam perkembangan pertanian modern. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. hlm. 2-18.
- Stoldt, A., X.H. Wang, and H. Lorz. 1996. Primary callus as source of totipotent barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Cell Rep. 16:137-141.
- Tan, M.L.C. 1987. Somatic hybridization and cybridization in some Solanaceae. Free University Press. Amsterdam. p. 57-93.