

PELESTARIAN TANAMAN PANGAN DENGAN TEKNIK KULTUR *IN VITRO*

Oleh : Netty Widyastuti^{*)}

Abstrak

Saving the world genetic germplasm has been world community's concern. It is a must to find a way to preserve Indonesian's food plant biodiversity. In vitro technique culture is a proper alternative conservation of food plants. The technique is suitable for short viable seeds and vegetative multiplying plants. Based on storage length, in vitro technique can be divided into two categories. First short or medium term storage which intends to suppress the growth of the seed temporarily and secondly long term storage proposes to halt metabolic activity, however, the cells are still viable.

There are some advantages of in vitro preservation such as saving distinctive plants, foliage, plant without seeds, free pathogens, free disruption of environments. It is preserved free pathogen, and working on relative small room enough.

Keywords : *genetic diversity, germplasm, food plant, in vitro.*

I. PENDAHULUAN

Meskipun penduduk dunia mengkonsumsi kira-kira 7000 species tanaman, hanya 150 species tanaman yang betul-betul dikomersialkan, dan kira-kira 90% dari 103 species merupakan tanaman pangan dunia. Pada saat ini hanya 3 jenis tanaman pangan yakni padi, gandum dan jagung yang digunakan untuk memenuhi kebutuhan 60% kalori dan 56% protein nabati. Dengan pola tanam sistim *monocropping*, dan ditunjang keberhasilan irigasi, pupuk dan pestisida maka panen terus meningkat. Namun dengan berkurangnya keragaman dalam pola tanam sering pula meningkatkan perubahan/gangguan iklim dan stres-stres yang lain, yang mengganggu risiko para petani dan dapat mengganggu stabilitas pertanian.

Di Bangladesh sebagai contoh, pengenalan penanaman padi *monoculture* HYV (*Higher Yielding Varieties*) telah menurunkan keragaman, hampir 7000 varietas padi dan species ikan. Produksi padi HYV per-ha turun 10% pada tahun 1986 dibanding tahun 1972, dan ini memerlukan peningkatan bahan kimia pertanian sampai 300% yang digunakan per-ha. Di Filipina, HYV ditumpangsarikan dengan 300 species padi tradisional yang secara prinsip merupakan generasi sumber makanan. Di India, pada tahun 1968 yang populer disebut

miracle, benih HYV telah menghilangkan sekitar setengah varietas, tetapi benih tersebut tidak menghasilkan panen yang tinggi, meskipun irigasi dan pupuk yang tinggi, dimana sering memiskinkan para petani sehingga peningkatan produksi tidak menguntungkan. Penanaman satu varietas yang sama akan memperbanyak serangga yang menimbulkan hama penyakit terutama pada perkebunan besar. Sebagai contoh *potato famine* dari Irlandia selama abad ke-19 yang disebut bercak coklat menyerang sampai Perancis dan Amerika. Sedangkan *sigatoka* yakni virus yang merusak perkebunan pisang di Amerika Tengah, dimana pada saat yang sama penyakit tersebut diinfeksi oleh jamur jagung di Zambia.

Indonesia sebagai salah satu negara tropis yang kaya akan plasma nutfah merupakan pusat keanekaragaman genetik bagi banyak tanaman seperti buah-buahan, umbi-umbian, palem-palem, padi-padian, sayur-sayuran dan berbagai jenis anggrek. Keanekaragaman plasma nutfah yang sangat diperlukan dalam pemuliaan tanaman ini terus menerus terkikis habis karena beberapa faktor, diantaranya adalah : perusakan lingkungan hutan, introduksi varietas unggul, tidak dipopulerkannya jenis tanaman tersebut sehingga lama kelamaan akan punah, banyaknya hama penyakit dan sebagainya.

^{*)} *Peneliti pada Direktorat Teknologi Bioindustri – TAB*

Tabel 1. Contoh kegagalan panen yang disebabkan oleh keseragaman genetik.

Tanaman	Negara	Jumlah varietas
Padi	Sri Lanka	Dari 2000 varietas pada tahun 1952, kurang lebih tinggal 100 saat
Padi	Bangladesh	62% varietas yang ada berasal dari 1 varietas yang umum
Padi	Indonesia	74% varietas yang ada berasal dari 1 varietas yang umum
Gandum	USA	50% dari tanaman terdiri dari 9 varietas
Kentang	USA	75% dari tanaman terdiri dari 4 varietas
Kedelai	USA	50% dari tanaman terdiri dari 6 varietas

Sumber : World Conservation Monitoring Centre. 1992. *Global Biodiversity : Status of the Earth's Resources* (Brian Groombridge, ed). London : Chapman & Hall

Tabel 2. Berkurangnya keragaman Buah-buahan dan Sayur-sayuran, dari tahun 1903 sampai 1983 (Varietas pada NSSL Collection)

Tanaman	Nama taxonomi	Jumlah tahun 1903	Jumlah tahun 1983	Hilang (%)
Asparagus	<i>Asparagus officinalis</i>	46	1	97.8
Kedelai	<i>Phaseolus vulgaris</i>	578	32	94.5
Bit	<i>Beta vulgaris</i>	288	17	94.1
Wortel	<i>Daucus carota</i>	287	21	92.7
Bawang	<i>Allium ampeloprasum</i>	39	5	87.2
Letus	<i>Lactuca sativa</i>	487	36	92.8
Bawang merah	<i>Allium cepa</i>	357	21	94.1
Parsnip	<i>Pastinaca sativa</i>	75	5	93.3
Pea	<i>Pisum sativum</i>	408	25	93.9
Lobak	<i>Raphanus sativus</i>	463	27	94.2
Bayam	<i>Spinacia oleracea</i>	109	7	93.6
Timun-timun	<i>Cucurbita spp.</i>	341	40	88.3
Kobis	<i>Brassica rapa</i>	237	24	89.9

Sumber : Carry Flower, and Pat Mooney. 1990. *The Threatened Gene – Food Politics, and the Loss of Genetic Diversity*. Cambridge : The Luthworth Press

Melihat Tabel 1 dan Tabel 2, maka perlu dipikirkan cara penyelamatan keragaman genetik dunia dan khususnya keragaman genetik yang ada di Indonesia.

A. Pelestarian Plasma Nutfah secara *in vitro*

Pelestarian plasma nutfah tanaman dapat dilakukan sesuai habitatnya dan pelestarian diluar habitat. Pelestarian diluar habitat dapat berupa kebun koleksi, kebun raya, penyimpanan benih, ataupun pelestarian *in vitro*. Pelestarian *in vitro* terutama pada tanaman yang mempunyai viabilitas benih yang singkat dan tanaman yang diperbanyak secara vegetatif.

Seperti dinyatakan oleh Sastrapradja (1990) bahwa Indonesia diharapkan segera mulai melaksanakan pelestarian plasma nutfah dengan menggunakan bioteknologi. Pentingnya

hak paten hasil-hasil penelitian bioteknologi Indonesia, diantaranya Hak Pemulia Tanaman (*Plant Breeders Right*), yang di negara-negara maju dapat menjadi rangsangan untuk perakitan varietas-varietas yang baru.

Dalam kaitannya dengan konservasi *in vitro*, Imelda dan Soetisna (1992) membagi cara tersebut menjadi 2 bagian yakni :

1. Kelompok yang diperbanyak dengan biji (berbiji rekalsitran) seperti kelapa, kakao, rambutan, mangga dan alpukat.
2. Kelompok yang diperbanyak secara vegetatif meliputi yang tidak berbiji (steril), hanya berbiji pada saat tertentu, biji heterozigot, dan tanaman umbi-umbian seperti ubi kayu, talas, pisang, kentang dan uwi.

Sehubungan dengan lamanya penyimpanan teknik *in vitro* ini dapat dibagi menjadi

dua yakni : penyimpanan jangka pendek/menengah dengan tujuan hanya menekan pertumbuhan untuk sementara dan penyimpanan jangka panjang dengan tujuan dalam waktu cukup lama dimana aktifitas metabolisme betul-betul dihentikan tetapi sel-sel tidak mati.

Pelestarian *in vitro* mempunyai beberapa keuntungan, yakni :

- Dapat menyimpan tanaman langka yang hampir punah
- Dapat menyimpan tanaman yang tidak menghasilkan biji
- Bebas gangguan hama penyakit
- Bebas gangguan yang disebabkan oleh alam
- Dapat disimpan dalam keadaan bebas penyakit
- Cukup dikerjakan dalam ruangan yang relatif kecil

Sebagai contoh pelestarian plasma nutfah telah dilakukan di Punjab Agricultural University (PAU), Ludhiana, pemulia tanaman di Universitas tersebut mempunyai koleksi plasma nutfah tanaman sebanyak 30244 yang terdiri : 28193 tanaman pangan, 1350 tanaman sayuran dan 701 tanaman hortikultura lainnya. Sumber plasma nutfah tanaman dievaluasi dan dipergunakan dalam program pemuliaan tanaman oleh tim yang terdiri dari pemulia tanaman dan pakar penyakit tanaman, entomologi, dan agronomist untuk tiap-tiap jenis tanaman. Dalam jangka waktu 25 tahun tim pakar dari PAU itu telah melepaskan 135 varietas tanaman pangan, 42 varietas sayuran dan 55 varietas tanaman hortikultur lainnya. Pelepasan varietas-varietas tanaman tersebut merupakan pemakaian langsung ataupun tidak langsung dari koleksi plasma nutfah di PAU tersebut. Varietas-varietas tanaman pangan dan sayuran kebanyakan dari penyeleksian dari landras yang ada, hibridisasi dari koleksi dalam negeri dan luar negeri serta hanya sedikit silangan jarak jauh (*wide crosses*). Pada tanaman buah-buahan kultivar yang dikembangkan diseleksi dari hasil koleksi dalam negeri maupun dari koleksi eksotik.

II. BAHAN DAN METODA

Pada intinya konsep penyimpanan plasma nutfah tanaman adalah tanaman budidaya, sedangkan kerabat liarnya merupakan

penunjang. Untuk memudahkan , penggolongan plasma nutfah dibagi dalam :

- Bibit unggul masa kini
- Bibit unggul masa lalu
- Bibit tradisional
- Bibit sebagai sumber sifat khusus
- Kerabat liar bibit tradisional

Hal-hal yang harus diperhatikan dalam penyimpanan plasma nutfah secara *in vitro* adalah

Pengaturan lingkungan tempat penyimpanan

Penyimpanan jangka pendek tanaman tropik menghendaki suhu sekitar 15 °C – 20°C, subtropik 0°C – 6°C. Penyimpanan jangka panjang (*cryopreservation*) menggunakan suhu sangat rendah yakni -196°C pada keadaan nitrogen cair.

Caranya :

1. Dimulai dengan suhu yang tidak terlalu dingin, kemudian suhu dingin sampai akhirnya dingin sekali (*slow cooling*)
2. Pembekuan cepat, sekaligus ditempatkan pada suhu yang sangat rendah sekali (*vitrification*).

Dalam penyimpanan diusahakan agar tanaman/bagian tanaman dalam keadaan dorman, atau sekalipun tumbuh seolah-olah terhambat. Penyinaran dilakukan di dalam ruang simpan atau laboratorium, sekitar 5 – 10% dari keadaan luar (radiasi matahari).

Zat Pengatur Tumbuh

Untuk teknik penyimpanan plasma nutfah secara *in vitro* digunakan berbagai zat pengatur tumbuh yang sifatnya menghambat atau inhibitor. Zat pengatur tumbuh yang digunakan adalah ABA (Absisic Acid), Cycocel, Ancymidol, Phospon D, Malic hidrazide, Diaminiazide, Selain itu digunakan pula gula alkohol seperti manitol dan sorbitol atau mioinositol.

Pengaturan formula media

Dalam pelaksanaan kultur *in vitro* akan digunakan bahan-bahan berupa garam anorganik dan vitamin, sukrosa dan zat pengatur tumbuh. Komposisi zat-zat tersebut , biasanya garam-garam anorganik (unsur makronya) dikurangi, kisarannya antara ½ - 1/10 dari formula dasar. ZPT yang bersifat promotor (auksin, giberelin, sitokinin) dikurangi bahkan

tidak digunakan sama sekali. Yang diutamakan kelompok inhibitor atau retardan.

Contoh :

- Penyimpanan tanaman kentang : Tanaman ini dapat tumbuh sampai 12 bulan bila pada media diberi manitol 4%, gula 0.5% ditempatkan pada suhu 10°C. Sedang yang diberi ABA 1.25 mg/l pada suhu 15°C hanya tahan dua bulan.
- Ubi kayu pada suhu -20°C sampai -22°C dapat tahan >24 bulan.
- Pisang pada suhu kurang dari 15°C menjadi mati, sedang pada 15°C dapat tahan sampai 17 bulan..
- *Solanum khasianum* dalam kultur potongan akar pada media ditambah ABA dapat bertahan sampai 96 bulan.

Pelestarian plasma nutfah kentang (*Solanum tuberosum*) :

Pelestarian plasma nutfah pada kentang secara *in vitro* harus didahului oleh pembebasan virus baru dipreservasi dengan metode pertumbuhan lambat dan *cryopreservation*. Pembebasan virus dilakukan dengan kombinasi terapi suhu, terapi kimia dan kultur meristem. Perlakuan suhu panas dilakukan pada stek, suhu 30°C – 40°C selama 8-12 minggu yang ditanam secara *in vitro*. Sesudah itu meristem sebesar 0.3 – 0.6 mm diambil dari tanaman tersebut. Pada viroid kentang PSTV dilakukan dengan suhu dingin 5 – 6°C. Planlet yang dikultur secara *in vitro* selama 6 bulan baru diambil meristem, maka sekitar 50% dari meristem tersebut telah bebas PSTV.

Medium yang digunakan : Medium Murashige dan Skoog (MS), Casein hidrolisat 1 g/l, Sukrosa 30 g/l, IAA 2 mg/l, GA₃ 1.0 mg/l, Kinetin 4.0 mg/l, Adenin Sulfat 50.0 mg/l, Agar 6.0 g/l, dan Mioinositol 100.0 mg/l.

Kultur pucuk pada media antiviral yang mengandung senyawa antiviral yang disubkultur beberapa kali akan menghasilkan tanaman yang bebas virus dan telah teruji untuk virus PVX, PVY, PVS dan PVM. Senyawa antiviral yang digunakan adalah α -Azaquanine, 5-fluorouracil, 2-thiomacil, parafluorophenylalanine, dan virazole (ribavirin). Konsentrasi virazole terbaik 205 μ M terbaik.

Pelestarian plasma nutfah kentang di Indonesia :

Untuk di Indonesia, penyimpanan tanaman kentang dengan metode pertumbuhan

minimal adalah yang terbaik tetapi bukan dengan kultur tunas melainkan dengan umbi mikro. Pembuatan umbi mikro dapat dilakukan dengan sistim cair-cair . Didalam penelitian selama sekitar 7 tahun telah ditemukan berbagai metode pembuatan umbi mikro dan telah terseleksi. Cara terbaik dinamakan cara S2L2S (*Static Shallow Liquid Liquid System*) (Wattimena, 1989).

Eksplan yang akan digunakan untuk pembuatan umbi mikro harus sudah terindeks bagi penyakit virus berbahaya seperti PVX, PVY dan PLRV. Kultivar-kultivar tersebut diantaranya : Red Pontiac, Katahdin, Russet Burbank, Norchip, Nooksack, Eba, Atlantic dan Diamant. Metode S2L2S terdiri dari media pertunasan cair dan media pengumbian cair.

- *Media pertunasan terdiri dari media* : Murashige dan Skoog (mineral dan organik), Sukrosa 4%, Ancymidol 0.5 mg/l dan Ca Pentotenat 5 mg/l.

- *Media pengumbian terdiri dari media* : Murashige dan Skoog (Mineral dan organik), Sukrosa 9%, Cycocel (CCC) 600 mg/l dan BAP 5 mg/l. CCC dapat disubstitusi dengan retardan lainnya seperti Uniconazole atau Paclobutrazol. Demikian pula BAP (Benzil Amino Purine) dapat digantikan dengan sitokinin lainnya yaitu senyawa yang mempunyai aktivitas sitokinin seperti : Difenil Urea, Air Kelapa, Benomil dan Adenin Sulfat.

Persiapan umbi mikro sampai siap pindah ke lapang terdiri dari 4 fase, yaitu :

- Produksi tunas mikro 4 minggu
- Produksi umbi mikro 8 minggu
- Pertunasan umbi mikro 8-16 minggu
- Pembuatan seedling (semai) 4 – 6 minggu

Umbi mikro setelah dipanen disimpan terlebih dahulu selama dua minggu dalam keadaan cukup lembab dan diberi penyinaran. Perlakuan tersebut akan mendorong pertumbuhan perideum, kulit umbi mikro yang baik. Perideum ini berfungsi sebagai pelindung dan penghambatan transpirasi umbi. Jika umbi ini disimpan pada suhu 5 – 10 ° C akan bertahan sampai satu tahun lebih. Keuntungan penyimpanan dengan umbi mikro ini adalah : tidak memerlukan media, tidak memakan tempat, terjamin kestabilan genetik dan kemampuan morfogenesis yang tinggi.

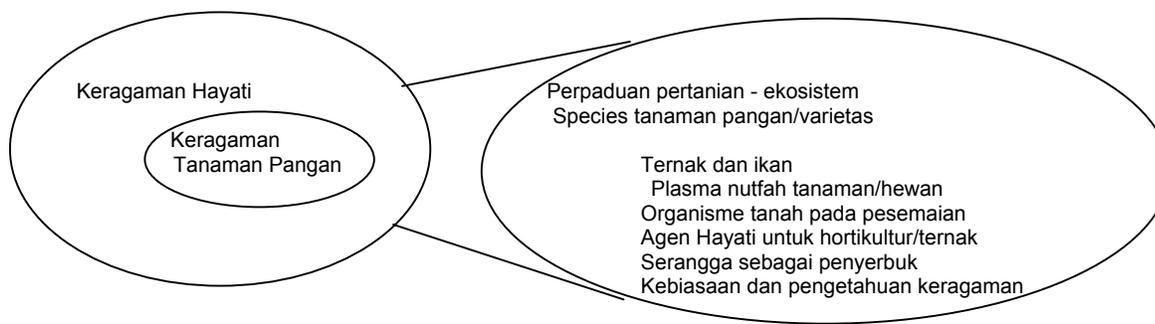
Didaerah tropis seperti Indonesia fase 4 merupakan suatu alternatif, umbi mikro yang

telah bertunas dapat secara langsung bertunas di lapang asal panjang tunas sudah mencapai 1.0 cm atau lebih. Di negara yang beriklim dingin hal tersebut tidak dapat langsung ditanam.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Melihat makin menipisnya jumlah keragaman tanaman pangan di dunia, terutama di Indonesia maka perlu langkah-langkah positif untuk mencegah pengurangan keragaman tanaman pangan yang ada. Usaha tersebut dapat secara *in-situ* ataupun *ex-situ*. Secara *in-situ* diantaranya adalah memelihara di tempat dimana tanaman tumbuh, hal ini telah

dilakukan sejak lama. Dengan cara ini tanaman tidak akan mengalami stress terhadap lingkungan yang baru. Namun demikian, keadaan alami ini akan lebih membiarkan tanaman-tanaman tersebut akan tumbuh dan berkembang secara sendiri-sendiri tanpa terlalu banyak, atau bahkan tidak ada jamahan manusia sebagai pengelola. Keadaan tersebut seperti komunitas alami, keuntungan lain adalah ekosistem akan lebih terjaga (Said Harran, 1991). Pada Gambar 1 dibawah ini, dapat dibuat suatu gagasan konsep dari keragaman tanaman pangan berbasis ekosistem (World Resources Institute, 1997).



Gambar 1. Konsep keragaman tanaman pangan pada sistim pertanian dengan memperhatikan ekosistem

Memindah tanaman dengan cara memindah tempatkan dari tempat asal tumbuhnya, yakni ada unsur kesengajaan untuk memelihara lebih intensif dengan cara mengurangi luas areal penanaman, menggunakan tenaga kerja yang cukup, sarana yang memadai, atau bahkan menggunakan bahan-bahan, alat-alat yang canggih seperti untuk kultur *in-vitro*. Namun dengan cara ini memerlukan investasi yang tinggi, harus mendidik tenaga yang terampil/terdidik dan mempunyai tanggung jawab penuh pada pekerjaannya. Pada cara ini tentu saja ada keuntungannya, yakni lebih dapat memantau penyelamatan koleksi, dapat menambah koleksi setiap saat apabila memungkinkan, dapat menjadi nara sumber bagi peneliti, khususnya catatan yang lengkap tentang tanaman koleksi.

Dalam pelaksanaan kultur *in vitro* digunakan bahan-bahan berupa garam inorganik dan vitamin, sukrosa dan zat pengatur tumbuh. Komposisi zat-zat tersebut, biasanya

garam-garam inorganik (unsur makronya) dikurangi, kisarannya antara $\frac{1}{2}$ - $\frac{1}{10}$ dari formula dasar. ZPT yang bersifat promotor (auksin, giberelin, sitokinin) dikurangi bahkan tidak digunakan sama sekali. Yang diutamakan kelompok inhibitor atau retardan. Beberapa contoh cara penyimpanan tanaman pangan secara *in vitro*, serta lamanya adalah:

Penyimpanan tanaman kentang : Tanaman ini dapat tumbuh sampai 12 bulan bila pada media diberi manitol 4%, gula 0.5% ditempatkan pada suhu 10°C, sedang yang diberi ABA 1.25 mg/l pada suhu 15°C hanya tahan dua bulan. Ubi kayu pada suhu -20°C sampai -22°C dapat tahan >24 bulan. Pisang pada suhu kurang dari 15°C menjadi mati, sedang pada 15°C dapat tahan sampai 17 bulan.. *Solanum khasianum* dalam kultur potongan akar pada media ditambah ABA dapat bertahan sampai 96 bulan (Wattimena dan Ansori, 1991).

Cryopreservation tanaman pangan khususnya tanaman kentang dilakukan melalui meristem yang dibekukan -196°C , dapat disimpan 2 tahun, kemudian dicairkan pada suhu $35 - 39^{\circ}\text{C}$. Presentasi hidup dapat ditingkatkan dengan diberi krioprotektan yang terdiri dari dimetil-sulfoksida 5%, gliserol 5% dan sukrosa 5%. Pada penyimpanan tanaman kentang di CIP Peru : kultur media MS, 14.6 mM sukrosa, 220 mM manitol, suhu $8 - 10^{\circ}\text{C}$. Dari CIAT, Cuba dilaporkan bahwa 92% kultur dapat bertahan 10-12 bulan, pada media MS, GA 0.58 μM , ABA 19 μM , sukrosa 88 mM dan disimpan pada suhu $8-10^{\circ}\text{C}$, sedangkan di Indonesia penyimpanan dengan umbi mikro yang dibuat melalui sistim cair-cair (Wattimena dan Ansori, 1991).

Pemakaian sumber gen untuk pemuliaan tanaman pangan yang diperlukan tergantung dari sifat yang diperlukan. Species liar dan kultivar primitif sebagai sumber keragaman sifat-sifat ketahanan, landras sebagai donor sifat-sifat kualitas hasil, hibrida dan kultivar-kultivar baru sebagai donor sifat-sifat agronomis. Supaya mendapatkan hasil yang lebih baik harus dimulai dari sumber keragaman yang luas dari sifat-sifat yang dikehendaki. Penggunaan metoda pemuliaan untuk perakitan kultivar tergantung dari sumber keragaman serta sifat-sifat tanaman termasuk sifat *in vitro*.

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil uraian diatas serta pembahasan, dapat disimpulkan bahwa :

1. Melihat makin menipisnya jumlah keragaman tanaman pangan di dunia, terutama di Indonesia maka perlu langkah-langkah positif untuk mencegah pengurangan keragaman tanaman pangan yang ada.
2. Pada penyelamatan secara *in vitro* terdapat keuntungan yakni lebih dapat memantau penyelamatan koleksi, dapat menambah koleksi setiap saat apabila memungkinkan, dapat menjadi nara sumber bagi peneliti, khususnya catatan yang lengkap tentang tanaman koleksi.
3. Pelaksanaan penyelamatan kultur secara *in vitro* relatif tidak mengganggu dan merusak lingkungan, karena dilakukan diruang tertutup, kecil, dan aseptik.

4. Dalam pelaksanaan kultur *in vitro* digunakan bahan-bahan berupa garam inorganik dan vitamin, sukrosa dan zat pengatur tumbuh. Komposisi zat-zat tersebut, biasanya garam-garam inorganik (unsur makronya) dikurangi, kisarannya antara $\frac{1}{2} - 1/10$ dari formula dasar. ZPT yang bersifat promotor (auksin, giberelin, sitokinin) dikurangi bahkan tidak digunakan sama sekali. Yang diutamakan kelompok inhibitor atau retardan.
5. Untuk di Indonesia, penyimpanan tanaman kentang dengan metode pertumbuhan minimal adalah yang terbaik tetapi bukan dengan kultur tunas melainkan dengan umbi mikro. Pembuatan umbi mikro dapat dilakukan dengan sistim cair-cair.
6. Perlu dibangunnya Pusat Plasma Nutfah Tanaman Pangan Nasional, dengan berbagai cabang didaerah penting atau di Universitas, serta adanya pelatihan tentang sumber genetik tanaman pangan bagi Sarjana baru ataupun teknisi secara periodik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anonymous. 1997. *Agrobiodiversity as a Basis for Production and Survival*. World Resources Institute, 10 G Street, NE (Suite 800), Washington, DC 20002. <http://www.wri.org/sustag/lba-01b.html>
2. Carry Flower, and Pat Mooney. 1990. *The Threatened Gene – Food Politics, and the Loss of Genetic Diversity*. Cambridge : The Luthworth Press.
3. Harran, Said . 1991. *Pendahuluan dalam Bioteknologi Pertanian 2*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. IPB. Bogor. Hal 1-90.
4. Imelda, M. dan U. Soetisna. 1992. *Aplikasi Bioteknologi dalam konservasi plasma nutfah tanaman industri*. Puslitbang Bioteknologi, LIPI. Bogor. Dibawakan pada Forum Komunikasi Ilmiah Penelitian dan Aplikasi Bioteknologi Kultur Jaringan Pada Tanaman Industri, Puslitbangtri. Bogor, 29 Februari.
5. Sastrapradja, D. S. 1990. *Langkah Pengembangan Keplasma Nutfahan Untuk pembangunan Jangka Panjang II*. Saresehan Plasma Nutfah dan Bioteknologi. KPPNI. Bogor. 41-44.
6. Wattimena, G. A. dan N.A. Mattjik. 1991. *Pemuliaan Tanaman Secara in vitro dalam Bioteknologi Tanaman*. Tim Lab. Kultur – Jaringan Tanaman. PAU Bioteknologi IPB. Hal 181-377.
7. Wattimena, G.A. 1989. *In Vitro microtuber as an alternatif technology for potato* third Intern Progress Report Dept. of Agronomy, Bogor Agricultural University (IPB) (tidak dipublikasikan).
8. World Conservation Monitoring Centre. 1992. *Global Biodiversity : Status of the Earth's Resources* (Brian Groombridge, ed). London : Chapman & Hall.