

PENGARUH PERLAKUAN PRA-KULTUR TERHADAP EFISIENSI REGENERASI IN VITRO LIMA VARIETAS KEDELAI

The Effect of Pre-Culture Treatment on The Efficiency of In Vitro Regeneration of Five Soybean Cultivars

Oleh

Yesi Safitri¹, Akari Edy², dan Setyo Dwi Utomo²

¹Alumni Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Lampung,

²Dosen Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Lampung,
Jl.Prof. Soemantri Brodjonegoro, No.1, Bandar Lampung 35145

Alamat korespondensi: Setyo Dwi Utomo (setyo_du@unila.ac.id)

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh perlakuan pra-kultur (imbibisi atau pengecambahan) terhadap efisiensi regenerasi in vitro lima varietas kedelai. Percobaan dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, dari bulan November 2011 sampai dengan Maret 2012. Percobaan ini disusun dalam rancangan acak kelompok yang terdiri atas 6 ulangan. Perlakuan disusun secara faktorial (5x2); faktor pertama adalah varietas kedelai sebagai sumber eksplan (Anjasmoro, Willis, Kaba, Sinabung, dan Seulawah); dan faktor kedua adalah perlakuan pra-kultur (imbibisi dan pengecambahan). Setiap satu satuan percobaan terdiri atas lima eksplan yang dikulturkan dalam satu botol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata jumlah tunas adventif per eksplan (RJTA) nyata dipengaruhi oleh perlakuan pra-kultur; tetapi tidak nyata dipengaruhi oleh varietas dan interaksi antara varietas dan perlakuan pra-kultur. RJTA perlakuan imbibisi yaitu 15,4 tunas per eksplan nyata lebih tinggi daripada perlakuan pengecambahan yaitu 12,9 tunas per eksplan. Presentase eksplan yang menghasilkan tunas adventif (PEMTA) pada 30 hari setelah tanam perlakuan imbibisi dan pengecambahan tidak berbeda nyata jika digunakan eksplan varietas Wilis, Sinabung, dan Seulawah. Jika menggunakan eksplan varietas Anjasmoro, PEMTA perlakuan imbibisi nyata lebih tinggi daripada pengecambahan; sebaliknya pada varietas Kaba, perlakuan pengecambahan nyata lebih tinggi daripada imbibisi. Pada perlakuan imbibisi, PEMTA varietas Anjasmoro (87%) nyata lebih tinggi daripada Kaba (67%); sebaliknya pada perlakuan pengecambahan, PEMTA Anjasmoro (67%) nyata lebih rendah daripada Kaba (87%). Disimpulkan bahwa prosedur regenerasi menggunakan pra-kultur imbibisi atau germinasi termasuk efisien.

Kata kunci: buku kotiledon, kedelai, imbibisi, pengecambahan, organogenesis

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate effect of pre-culture treatment on the efficiency of in vitro regeneration of five soybean cultivars. The study was conducted in tissue culture laboratory, College of Agriculture, University of Lampung from November 2011 – March 2012. The experiment was arranged in completely-randomized block design with six replications. Treatments consisted of two factors; the first was soybean cultivars as the source of explants (Anjasmoro, Willis, Kaba, Sinabung, dan Seulawah); the second was pre-culture treatment (imbibitions for 20 hours and germination for 6 days). The results showed that the means of adventive shoots per explants (MASPE) was significantly affected by pre-culture treatment; but not affected by the cultivars and the interaction of the two factors. MASPE of imbibitions treatment (15,4 shoots per explants) was significantly higher than than that of germination (12,9 shoot per explants). The percentage of explants producing adventive shoots (PEPAS) observed on 30 days after planting was not significantly different for the explants of cultivar Wilis, Sinabung, and Seulawah. If using Anjasmoro as the source of explants, PEPAS of imbibitions treatment was significantly higher than that of germination; on the other hand, if using Kaba the germination treatment was significantly higher than that of imbibition. At imbibition treatment, PEPAS Anjasmoro (87%) was significantly higher than that of Kaba (67%); on the other hand, at germination treatment, PEPAS Anjasmoro (67%) was significantly lower than that of Kaba (87%). It was concluded that this procedure of in vitro regeneraton using imbibition or germination was efficient.

Key words: cotyledonary node, soybean, imbibition, germination organogenesis

PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.) merupakan salah satu dari enam tanaman pangan terpenting di dunia. Produksi kedelai nasional tahun 2010 sebanyak 851.647 ton dan impor kedelai tahun 2010 sebanyak 1,7 juta ton (BPS, 2011). Dengan demikian produksi kedelai perlu ditingkatkan, antara lain melalui penggunaan varietas unggul. Varietas unggul dapat dirakit melalui pemuliaan konvensional dan non-konvensional yaitu menggunakan rekayasa genetik atau transformasi genetik. Regenerasi *in-vitro* yang efisien diperlukan dalam rekayasa genetik tanaman untuk memperoleh atau meregenerasikan tanaman transgenik dari sel atau jaringan transgenik. Regenerasi *in-vitro* kedelai dapat ditempuh melalui jalur embriogenesis somatik dan organogenesis. Embrio somatik kedelai yang diproduksi melalui embriogenesis menggunakan eksplan hipokotil (Phillips dan Collins, 1981; Gamborg *et al.*, 1983), kotiledon muda (Lippmann dan Lippmann, 1984; Lazzeri *et al.*, 1985; Pardal *et al.*, 1997) dan biji masak (Widoretno *et al.*, 2003). Regenerasi *in-vitro* kedelai melalui organogenesis dapat menggunakan eksplan buku kotiledon (*cotyledonary nodes*) (Cheng *et al.*, 1980; Wright *et al.*, 1986; Utomo, 2005; Marveldani *et al.*, 2006), daun muda (Wright *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 1990), poros embrio (McCabe *et al.*,

1988), potongan hipokotil (Dan dan Reichert, 1998), dan belahan benih masak yang diimbibisi (Paz *et al.*, 2006; Joyner *et al.*, 2010).

Prosedur transformasi genetik kedelai menggunakan *Agrobacterium* telah dilaporkan; prosedur yang menggunakan eksplan buku kotiledon antara lain dilaporkan oleh Zhang *et al.*, (1999); Clemente *et al.*, (2000); Olhoft dan Somers (2001); Utomo (2004); dan Marveldani *et al.* (2007). Utomo (2004) melaporkan bahwa tanaman kedelai transgenik yang fertil berhasil diperoleh dari eksplan varietas Wilis, Slamet, Tampomas, dan Ijen dengan efisiensi 3,3 – 4,5%. Prosedur transformasi genetik kedelai yang menggunakan belahan embrio masak yang diimbibisikan dulu dilaporkan oleh Paz *et al.*, (2007). Agar diperoleh prosedur transformasi genetik kedelai varietas unggul nasional yang efisien, diperlukan prosedur regenerasi *in-vitro* melalui organogenesis yang efisien menggunakan eksplan varietas unggul nasional. Sebelum dikulturkan pada media tumbuh, eksplan buku kotiledon disiapkan dari benih yang dikecambahkan selama 6 hari; dalam hal ini eksplan mendapat perlakuan pra-kultur berupa pengecambahan. Eksplan belahan embrio masak disiapkan dari benih masak yang diimbibisikan selama 20 jam sebagai perlakuan pra-kultur. . Walaupun belum

banyak digunakan, perlakuan pra-kultur berupa imbibisi tersebut membutuhkan waktu lebih singkat daripada perlakuan pengecambahan. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh perlakuan pra-kultur (imbibisi atau pengecambahan) terhadap efisiensi regenerasi *in-vitro* lima varietas kedelai.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, dari bulan November 2011 - Maret 2012. Percobaan menggunakan rancangan faktorial 5×2 yang disusun dalam rancangan acak kelompok. Faktor pertama adalah varietas kedelai sebagai sumber eksplan (Anjasmoro, Kaba, Willis, Sinabung, dan Seulawah). Faktor kedua adalah perlakuan pra-kultur (imbibisi 20 jam dan pengecambahan 6 hari). Setiap unit percobaan terdiri atas lima eksplan yang dikulturkan dalam satu botol dan setiap perlakuan diulang 6 kali.

Sebelum diberi perlakuan pra-kultur, benih disterilisasi permukaannya. Sterilisasi eksplan dilakukan dengan cara menaruh satu lapis benih kedelai pada cawan petri terbuka yang ditempatkan dalam desikator. Desikator ditempatkan di rumah kaca. Gas klorin diproduksi di dalam desikator dengan cara menambahkan tetes demi tetes 3,3 ml 12 N

HCl ke permukaan dinding bagian dalam gelas piala berisi 100 ml chlorox atau sunklin. Desikator kemudian ditutup dan dibiarkan dalam lemari asam selama 48 jam. Kemudian desikator dibuka yang segera diikuti dengan penutupan cawan petri berisi benih kedelai yang sudah disterilkan. Selanjutnya cawan petri dikeluarkan dari desikator, dan ditempatkan pada *laminar air flow hood* selama 30 menit untuk menurunkan konsentrasi gas klorin.

Dalam perlakuan pra-kultur berupa imbibisi, benih kedelai sebanyak 25 – 30 benih direndam dalam cawan petri berisi air akuades selama 20 jam pada suhu 24°C dan 18/6 jam terang/gelap. Perlakuan pra-kultur kedua berupa pengecambahan. Benih kedelai dikecambahkan dalam botol berdiameter 8 cm yang berisi medium MS₀ (medium MS tanpa zat pengatur tubuh) yang mengandung 2% sukrosa dan dipadatkan dengan 0,8% agar. Sebanyak 5 benih kedelai per botol dikecambahkan selama 5-6 hari dalam ruang kultur (24°C dan 18/6 jam terang/gelap).

Setelah diberi perlakuan pra-kultur, eksplan disiapkan untuk selanjutnya dikulturkan pada media inisiasi tunas. Benih yang sudah diimbibisi 20 jam kemudian dibelah vertikal di antara dua kotiledon sehingga diperoleh dua buku kotiledon. Selanjutnya dibuat 5-7 goresan sepanjang 2-3 mm sejajar dengan poros

embrio pada buku kotiledon menggunakan pisau skalpel no. 15. Penyiapan eksplan dari benih yang dikecambahkan dilakukan sebagai berikut. Kecambah dipisahkan dari akarnya dengan cara memotong horizontal hipokotil 3-4 mm di bawah buku kotiledon. Selanjutnya kecambah dibelah vertikal di antara dua kotiledon sehingga diperoleh dua eksplan buku kotiledon. Pucuk poros embrio di atas buku kotiledon dibuang. Terakhir, dibuat 7-12 goresan sepanjang 3-4 mm sejajar dengan poros embrio pada buku kotiledon menggunakan pisau skalpel no. 15.

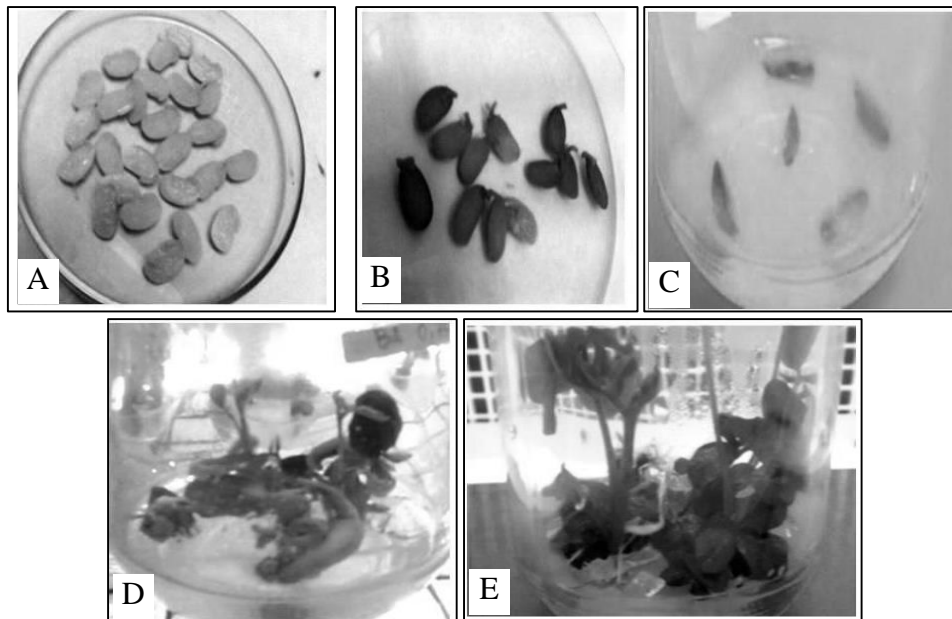
Eksplan buku kotiledon (Gambar 1 atas) dikulturkan pada media inisiasi tunas. Komposisi media tersebut berupa media MS padat (Murashige dan Skoog, 1962) yang mengandung 0,75mg/l benzil amino purin (BAP). Eksplan ditaruh condong dengan sudut 120-150⁰, permukaan adaksial menghadap ke atas, dan bagian yang dicacah dibenamkan dalam media. Dua minggu kemudian, kalus pada permukaan bawah eksplan dipotong, dan bagian atas eksplan yang meliputi bakal tunas adventif dipindahkan ke media inisiasi segar. Dua minggu berikutnya, jaringan kotiledon (menguning) dibuang, bagian dasar eksplan yang bersinggungan

dengan media dipotong, dan jaringan eksplan yang berdiferensiasi menghasilkan tunas atau bakal tunas adventif pada buku kotiledon dipindahkan ke media baru.

Untuk mengetahui efisiensi regenerasi in vitro kedelai melalui organogenesis, diamati dua peubah berikut:

1. Rata-rata jumlah tunas adventif per eksplan pada 30 hari setelah tanam (RJTA). Tunas adalah bakal cabang yang telah membentuk ≥ 1 daun trifoliat. Tunas adventif dapat dibedakan dengan tunas aksilar. Tunas aksilar terbentuk secara langsung (tanpa melalui fase kalus) dari meristem aksilar. Karena tanpa melalui fase kalus, sehingga tunas aksilar sudah terbentuk 7 hst berupa tunas tunggal yang tumbuh cepat. Sebaliknya, tunas adventif terbentuk dari kalus yang berasal dari meristem aksilar yang dicacah. Pencacahan bertujuan menghindari terbentuknya tunas aksilar dan merangsang terbentuknya tunas adventif.
2. Persentase eksplan yang menghasilkan tunas adventif (PEMTA), diamati per satuan percobaan pada 30 hari setelah tanam (hst).

$$PEMTA = \frac{\sum \text{eksplan yang membentuk } \geq 1 \text{ tunas adventif}}{\sum \text{eksplan yang dikulturkan per satuan percobaan}} \times 100\%$$



Gambar 1. Pembentukan tunas adventif kedelai melalui organogenesis dari eksplan yang diberi perlakuan pra-kultur imbibisi atau pengecambahan. A. eksplan berupa benih atau embrio masak yang diberi perlakuan imbibisi 20 jam; B. eksplan berupa buku kotiledon yang diambil dari kecambah berumur enam hari (perlakuan pengecambahan); C. eksplan pada perlakuan pra-kultur kecambah yang telah ditanam dalam media MS yang mengandung 0,75mg/l BAP; D. Mata tunas atau tunas adventif pada 2 minggu setelah dikulturkan pada media inisiasi tunas (perlakuan imbibisi); dan E. Tunas adventif pada 30 hari setelah dikulturkan pada media inisiasi tunas (perlakuan imbibisi)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini diamati presentase eksplan yang menghasilkan tunas adventif (PEMTA) dan rata-rata jumlah tunas adventif per eksplan (RJTA). Pengamatan hanya didasarkan pada pembentukan tunas adventif bukan tunas aksilar. Hal tersebut terkait dengan potensi pemanfaatan prosedur regenerasi in vitro kedelai yang sebagian besar digunakan untuk meregenerasikan tanaman transgenik dari sel atau jaringan transgenik; regenerasi in vitro kedelai bukan untuk memperbanyak tanaman. Pada umumnya tanaman transgenik kedelai yang

diregenerasikan melalui organogenesis berasal dari tunas adventif, bukan tunas aksilar (Utomo, 2005).

Pada 7 hari setelah tanam (hst), dilakukan pengamatan pembentukan tunas aksilar, yaitu tunas yang terbentuk secara langsung dari meristem aksilar, tanpa melalui fase kalus. Karena tanpa melalui fase kalus, tunas aksilar berupa tunas tunggal yang terbentuk jauh lebih cepat daripada tunas adventif. Tunas aksilar yang terbentuk dipotong atau dibuang. Mata tunas atau tunas adventif sudah terbentuk pada 15 hst (Gambar 1 kiri bawah). Tunas adventif berupa bakal

cabang yang telah membentuk ≥ 1 daun trifoliat dalam penelitian ini diamati pada 30 hst (Gambar 1 E; Gambar 2 dan 3; Tabel 1).

Berdasarkan hasil analisis ragam, rata-rata jumlah tunas adventif per eksplan (RJTA) nyata dipengaruhi oleh perlakuan pra-kultur (Tabel 1), tetapi tidak nyata dipengaruhi oleh perlakuan varietas dan interaksi antara kedua faktor. RJTA perlakuan imbibisi yaitu 15,4 tunas per eksplan nyata lebih tinggi daripada perlakuan pengecambahan yaitu 12,9 tunas per eksplan. Dalam penelitian ini, RJTA tidak nyata dipengaruhi oleh perlakuan varietas. Hasil tersebut identik dengan hasil yang dilaporkan Utomo *et al.* (2010) bahwa RJTA berkisar antara 9,3 (varietas Wilis) sampai 19,7 (varietas Seulawah). Hasil yang lebih rendah dilaporkan oleh Marveldani *et al.* (2006) bahwa RJTA dari eksplan varietas Sinabung, Ijen Anjasmoro berturut-turut 5,0 tunas, 4,7 tunas, dan 2,8 tunas per eksplan. Karena efisiensi regenerasi *in vitro* berkontribusi atau mempengaruhi efisiensi transformasi genetik kedelai menggunakan *Agrobacterium*, perlakuan imbibisi benih selama 20 jam lebih berpeluang meningkatkan efisiensi transformasi daripada perlakuan pengecambahan. Transformasi genetik kedelai menggunakan *Agrobacterium* dan

menggunakan eksplan dari benih yang diimbibisikan dilaporkan oleh Paz *et al.* (2006).

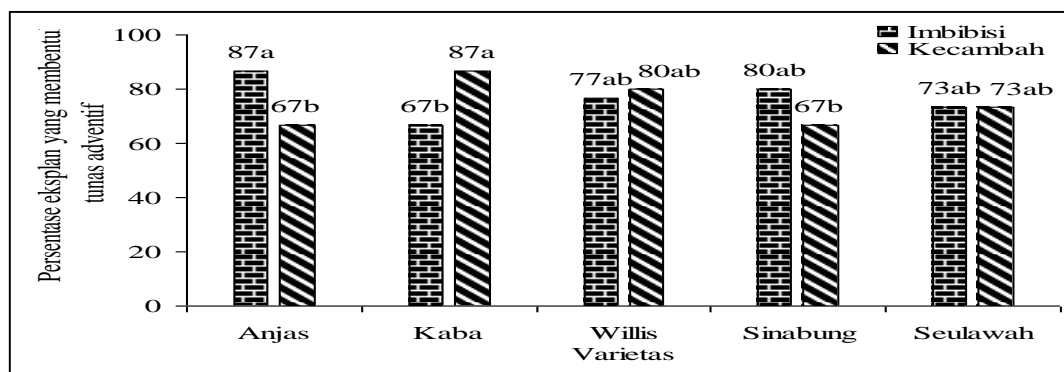
Persentase eksplan yang menghasilkan tunas adventif (PEMTA) dipengaruhi oleh interaksi antara perlakuan pra-kultur dan varietas (Gambar 2 dan 3). Jika menggunakan eksplan varietas Anjasmoro, PEMTA perlakuan imbibisi nyata lebih tinggi daripada pengecambahan; sebaliknya pada varietas Kaba, perlakuan pengecambahan nyata lebih tinggi daripada imbibisi (Gambar 2).

Pada perlakuan imbibisi, PEMTA varietas Anjasmoro (87%) nyata lebih tinggi daripada Kaba (67%); sebaliknya pada perlakuan pengecambahan, PEMTA Anjasmoro (67%) nyata lebih rendah daripada Kaba (87%). Presentase eksplan yang menghasilkan tunas adventif (PEMTA) pada 30 hari setelah tanam perlakuan imbibisi dan pengecambahan tidak berbeda nyata jika digunakan eksplan varietas Wilis, Sinabung, dan Seulawah. Pada perlakuan imbibisi, PEMTA varietas Anjasmoro nyata lebih tinggi daripada Kaba; sebaliknya pada perlakuan pengecambahan, PEMTA varietas Anjasmoro nyata lebih rendah daripada Kaba (Gambar 3). PEMTA varietas Wilis, Sinabung, dan Seulawah tidak berbeda nyata dengan Anjasmoro maupun Kaba pada perlakuan imbibisi.

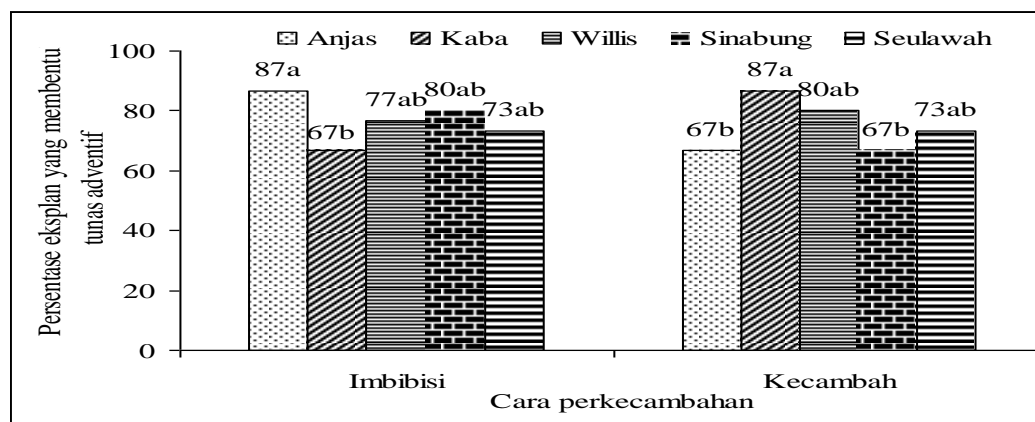
Tabel 1. Pengaruh perlakuan pra-kultur (imbibisi atau pengecambahan) terhadap menghasilkan rata-rata jumlah tunas adventif per eksplan

Perlakuan pra-kultur	Rata-rata jumlah tunas per eksplan pada 30 hari setelah tanam)
Pengecambahan	12,9 a
Imbibisi	15,4 b

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan analisis ragam atau uji BNT 5%.



Gambar 2. Persentase eksplan yang membentuk tunas adventif dari eksplan yang diberi perlakuan pra-kultur imbibisi atau pengecambahan. Angka yang diikuti huruf yang sama pada setiap varietas tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNT (BNT 5% = 16,27)



Gambar 3. Persentase eksplan yang membentuk tunas adventif dari eksplan yang diberi perlakuan pra-kultur imbibisi atau pengecambahan. Angka yang diikuti huruf yang sama pada setiap perlakuan pra-kultur tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNT (BNT 5% = 16,27)

PEMTA dalam penelitian ini setara dengan yang dilaporkan Marveldani *et al.* (2006), relatif lebih tinggi daripada Utomo (2005), tetapi relatif lebih rendah daripada Utomo *et al.* (2010). Menggunakan

eksplan buku kotiledon dari benih yang dikecambahkan, PEMTA varietas Anjasmoro, Sinabung, dan Ijen berturut-turut 69%, 71%, dan 78% (Marveldani *et al.*, 2006). Utomo (2005) menggunakan

eksplan buku kotiledon dari varietas Slamet, Krakatau, Tampomas, Wilis, Argomulyo, dan Jayawijaya dan melaporkan PEMTA berkisar antara 47 - 67%. Utomo *et al.* (2010) melaporkan bahwa PEMTA dari eksplan varietas, Anjasmoro, Seulawah, dan Kaba berturut-turut sebesar 86%, 90%, dan 96%.

Berdasarkan hasil penelitian ini dan hasil-hasil yang dilaporkan oleh Utomo (2005), Marveldani *et al.* (2006), dan Utomo *et al.* (2010) dapat disimpulkan bahwa prosedur regenerasi *in vitro* menggunakan eksplan buku kotiledon sesuai untuk meregenerasikan tanaman kedelai melalui organogenesis. Tunas adventif berhasil diregenerasikan dari eksplan 12 varietas unggul nasional yaitu Slamet, Krakatau, Tampomas, Wilis, Argomulyo, Jayawijaya, Anjasmoro, Sinabung, Ijen, Seulawah, Kaba, dan Sibayak.

KESIMPULAN

RJTA perlakuan imbibisi yaitu 15,4 tunas per eksplan nyata lebih tinggi daripada perlakuan pengecambahan yaitu 12,9 tunas per eksplan. Penggunaan eksplan varietas Anjasmoro, PEMTA perlakuan imbibisi lebih tinggi daripada pengecambahan; sebaliknya pada varietas Kaba, perlakuan pengecambahan lebih tinggi daripada imbibisi. Perlakuan

imbibisi, PEMTA varietas Anjasmoro (87%) lebih tinggi daripada Kaba (67%); sebaliknya pada perlakuan pengecambahan, PEMTA Anjasmoro (67%) lebih rendah daripada Kaba (87%). Presentase eksplan yang menghasilkan tunas adventif (PEMTA) belum mampu mengikat pada 30 hari setelah tanam dengan perlakuan imbibisi dan pengecambahan dengan digunakan eksplan varietas Wilis, Sinabung, dan Seulawah.

DAFTAR PUSTAKA

- BPS. 2011. Luas panen dan produktivitas kedelai Tahun 2010. Badan Pusat Statistik. www.bps.go.id.
- Cheng, T. Y., H. Saka, and T. H. Voqui-Dinh. 1980. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. *Plant Sci. Lett.* 19:91-99.
- Clemente, T., B. J. LaValle, A. R. Howe, D. C. Ward, R. J. Rozman, P. E. Hunter, D. L. Broyles, D. S. Kasten, and M.A. Hinchee. 2000. Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. *Crop Sci.* 40:797-803.
- Dan, Y. and N. A. Reichert. 1998. Organogenic regeneration of soybean from hypocotyl explants. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 34:12-21.
- Gamborg, O. L., B. P. Davis, and R. W. Stahlquist. 1983. Somatic embryogenesis in cell cultures of *Glycine* species. *Plant Cell Rep.* 2:209-202.
- Joyner, E.Y., L.S. Boykin, and M.A. Lodhi. 2010. Callus Induction and Organogenesis in Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cv. Pyramid from

- Mature Cotyledons and Embryos. *Open Plant Sci. J.*, 4: 18 – 21
- Kim, J., C. E. LaMotte, and E. Hack. 1990. Plant regeneration in vitro from primary leaf nodes of soybean *Glycine max* seedling. *J. Plant Physiol.* 136:664-669.
- Lazzeri, P. A., D. F. Hilderband, and G. B. Collins. 1985. A Procedure for Plant Regeneration from Immature Cotyledon Tissue of Soybean. *Plant Mol. Biol. Rep.* 3: 160 – 167.
- Lippmann, B and G. Lippman. 1984. Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean *Glycine max* L. Merr. *Plant Cell Rep.* 3:215-218
- Marveldani., Maimun, B., Kukuh, dan S., Utomo, S. D. 2007. Pengembangan Kedelai Transgenik yang Toleran Herbisida Amonium - Glufosinat dengan Agrobakterium. *Jurnal Akta Agrosia* 10(1): 49 – 64.
- Marveldani., Maimun, B., Utomo, S. D. 2007. Regenerasi In Vitro Kedelai Melalui Organogenesis Pada Tiga Konsentrasi Benziladenin. *Jurnal Penelitian dan Informasi Pertanian* 11(2): 84 – 91.
- McCabe, D. E., W. F. Swain, B. J. Martinell, and P. Christou. 1988. Stable transformation of soybean by particle acceleration. *Bio/Technol.* 6:923-926.
- Murashige ,T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Pardal, S.J., D.R. Untari, A. Sisharmini, D.Riyadi, dan M.Herman. 1997. Regenerasi kedelai secara in vitro, halaman 27-38. *Dalam* S. Moeljopawiro, M. Herman, S. Saono, I. Mariska, B. Purwantara, dan H. Kasim (eds.). *Prosiding Seminar Bioteknologi Pertanian Indonesia, Surabaya* 12-14 Maret 1997. Perhimpunan Bioteknologi Pertanian Indonesia, Bogor.
- Paz, M. M., J.C. Martinez., A. B. Kalvig.,T. M. Fonger., and K. Wang. 2006. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Rep.*, 25: 206 – 213.
- Phillips, G. C. and G. B. Collins. 1981. Induction and development of somatic embryos from cell suspension cultures of soybeans. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 1:123-129.
- Utomo, S. D. 2004. *Transformasi Genetik Lima Varietas Kedelai Menggunakan Agrobakterium.* *Jurnal Agrotropika*, 9 (2): 95 – 101.
- Utomo, S. D. 2005. *Efisiensi Regenerasi In Vitro Enam Varietas Kedelai Melalui Organogenesis.* *Jurnal Agrista*, 9 (1): 83–92.
- Utomo, S.D., A. Edy, dan F. Yelli. 2010. Regenerasi In Vitro dari Eksplan Buku Kotiledon Enam Varietas Kedelai Melalui Organogenesis Pada Medium MS. Dalam Syarif, A., J. Henri, I.G. Suka, Murhadi, N. Nurcahyani, Warji, W. Simanjuntak, G. Nugroho, Wamiliana, C.Ginting, FX Susilo, D Permata, A. Zakaria, H. Fitriawan, S.D. Yuwono, D. Asmi, A. Lubis, I.G. Swibawa (eds). *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi III. Universitas Lampung. Bandar Lampung.* 2:433-440.
- Widoretno, W., E. L. Arumningtyas., dan Sudarsono. 2002. *Metode Induksi Pembentukan Embrio Somatik dari Kotiledon dan Regenerasi Planlet Kedelai Secara In Vitro.* *Hayati*, 10: 19 – 24.
- Wright, M. S., D. V. Ward, M. A. Hinchee, M. G. Carnes, and R. J. Kaufman.

1987. Regeneration of soybean *Glycine max* L. Merr from cultured primary leaf tissue. *Plant Cell Rep.* 6:83-89.
- Wright, M. S., S. M.Koehler, M. A. Hinchee, and M. G. Carnes. 1986. Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*. *Plant Cell Rep.* 5:150-154.
- Zhang, Z., A. Xing, P. Staswick, and T. Clemente. 1999. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium* mediated transformation of soybean. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 56:37-46.