

# Regenerasi Kedelai secara *In Vitro*

Saptowo J. Pardal<sup>1</sup>, Dwi R. Untari<sup>1</sup>, A. Sisharmini<sup>1</sup>,  
D. Rijadi<sup>2</sup>, dan M. Herman<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

<sup>2</sup>Mahasiswa Jurusan Biologi FMIPA-IKIP, Jakarta.

## ABSTRAK

Regenerasi tanaman pada dasarnya dapat ditempuh melalui dua jalur, yaitu organogenesis (pembentukan organ langsung) dan embriogenesis (pembentukan embrio somatik). Percobaan bertujuan untuk mendapatkan sistem regenerasi tanaman kedelai yang terbaik untuk penelitian transformasi. Tiga varietas, yaitu Wilis, Tampomas, dan Krakatau dicoba untuk diregenerasikan melalui eksplan embrio muda, kotiledon muda, dan kotiledon tua. Hasil percobaan menunjukkan bahwa ketiga varietas tersebut dapat diregenerasikan baik melalui jalur organogenesis ataupun embriogenesis. Sejumlah tunas dapat dihasilkan dari eksplan embrio muda dan kotiledon tua melalui proses multiplikasi tunas/organogenesis. Demikian pula sejumlah embrio somatik dapat dihasilkan dari eksplan kotiledon muda melalui proses embriogenesis. Tunas dan embrio somatik ini selanjutnya berhasil diakarkan membentuk planlet/tanaman regenerasi dan beberapa di antaranya berhasil diaklimatisasikan ke media tanah/pot. Tanaman regenerasi ini mampu tumbuh normal di rumah kaca hingga dewasa dan berpolong. Varietas Wilis menunjukkan respon pertumbuhan eksplan tertinggi pada ketiga eksplan yang digunakan. Pada eksplan kotiledon tua varietas ini menghasilkan persentase jumlah tunas yang tinggi (88,3%). Sedangkan varietas Krakatau menunjukkan respon embriogenesis tertinggi (84,2%). Jumlah planlet terbanyak didapatkan dari eksplan embrio muda kedelai varietas Wilis (22,9%).

**Kata kunci:** Kedelai, regenerasi, *in vitro*.

## ABSTRACT

Plant regeneration, in general, can be conducted in two ways, namely organogenesis (direct organ formation) and embryogenesis (somatic embryo formation). The objective of the research was to find out the best regeneration system for soybean transformation research. Three varieties were used in this study, Wilis, Tampomas, and Krakatau. Three kinds of explants young embryo, young cotyledone, and old cotyledone were regenerated. The research results showed that the three soybean varieties can be regenerated both through organogenesis and embryogenesis. Some shoots were successfully produced from the explants of young embryo and old cotyledone through shoots multiplication process/organogenesis. Some somatic embryos were also produced successfully from the explants of young cotyledone through embryogenesis. The shoots and the somatic embryos were able to form roots and grew into plantlets/regenerated plants, and some of the were successfully acclimatized in soil medium/pot. These regenerated plants could grow normally in the green house and they were fully grown and produced beans. Wilis variety gave the highest explant growth in the three explants used. Furthermore, old cotyledone of this variety produced high percentage (88.3%) of shoots. Whereas Krakatau variety gave the highest embryogenesis response (84.2%). The highest number of plantlets were produced from young embryo of Wilis variety (22.9%).

**Key words:** Soybean, regeneration, *in vitro*.

## PENDAHULUAN

Penggunaan varietas tahan adalah cara pengendalian yang paling ekonomis dan aman dari pencemaran lingkungan. Karena kelangkaan sumber gen ketahanan kedelai terhadap hama penggerek polong di plasma nutfah maka alternatif penggunaan bioteknologi melalui rekayasa genetik merupakan pilihan yang paling menarik (Soekarna dan Harnoto, 1985).

Kehadiran teknologi transformasi memberikan wahana baru bagi pemulia tanaman untuk memperoleh kelompok gen baru yang lebih luas. Suatu gen yang tidak terdapat pada suatu spesies tanaman tertentu dimungkinkan untuk dapat diperoleh dari organisme lain, seperti bakteri, virus, binatang, dan tanaman lain dan dipindahkan ke tanaman (Herman, 1996). Hal ini menggambarkan kekuatan dari rekayasa genetik dalam memperlebar lingkup atau kisaran pemindahan gen di luar pemuliaan konvensional. Teknik rekayasa genetik dapat digunakan sebagai mitra dan pelengkap teknik pemulia tanaman yang sudah mapan dan telah digunakan dengan sukses selama bertahun-tahun (Sticklen, 1990).

Regenerasi tanaman yang optimal dan efisien sangat menentukan kesuksesan dalam mentransformasi tanaman dengan gen yang diinginkan. Regenerasi tanaman melalui kultur jaringan dapat dilakukan baik secara organogenesis atau embriogenesis. Regenerasi tanaman yang berasal dari berbagai eksplan akan menghasilkan embrio somatik atau tunas *adventitious* (Langridge dan Szalay, 1985). Produksi struktur seperti embrio dari sel somatik disebut embriogenesis somatik. Sedangkan organogenesis dapat didefinisikan sebagai transformasi dari sel tunggal kalus, atau jaringan menjadi struktur seperti "organ".

Kendala yang dihadapi dalam rekayasa genetika tanaman kedelai di Indonesia adalah proses regenerasi tanaman. Pada tanaman kedelai, kultur embrio muda telah berhasil dilakukan untuk penyelamatan embrio dari proses keguguran (Pardal *et al.*, 1994; Pierik, 1987). Beberapa peneliti di luar negeri berhasil melakukan proses somatik embriogenesis pada beberapa jaringan tanaman kedelai (Christou, 1989; Finer dan Nagasawa, 1988; Kurniawan dan Jumanto, 1996; Langridge dan Szalay, 1985).

Tujuan percobaan ini adalah untuk mendapatkan sistem regenerasi tanaman kedelai yang terbaik dan efisien untuk penelitian transformasi kedelai.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dimulai pada tahun anggaran 1996/97. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Seluler/Kultur Jaringan, Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor. Percobaan ini dilakukan untuk mempelajari respon regenerasi dari tiga varietas kedelai (Wilis, Tampomas, dan Krakatau) menggunakan tiga jenis eksplan, yaitu embrio muda, kotiledon muda, dan kotiledon tua.

## Regenerasi Kedelai melalui Organogenesis

### Eksplan Embrio Muda

Tanaman kedelai ditumbuhkan dalam pot dan dipelihara di dalam rumah kaca untuk digunakan sebagai sumber eksplan. Untuk penyediaan eksplan yang cukup, penanaman dilakukan secara bertahap dengan selang waktu lima hari.

Setelah tanaman mulai berbunga, dilakukan penandaan bunga untuk memastikan umur polong muda kedelai. Sumber eksplan berupa polong muda diambil/dipanen pada umur 14-15 hari setelah penandaan/bunga mekar.

Polong muda dicuci dengan air sabun, dibilas dengan air leding hingga bersih. Selanjutnya polong disterilisasi ke dalam larutan clorox 20%, dikocok selama 30 menit, dan dibilas dengan air suling 3-4 kali. Embrio muda yang diambil dari polong steril ditumbuhkan pada medium kultur. Embrio muda diinduksi untuk memperbanyak tunas dengan media padat MS (10) + B5 (4) vitamin + BAP 1,15 mg/l (Christou dan Yang, 1989) dan diletakkan di ruang gelap. Dua sampai tiga minggu kemudian, eksplan yang mengalami memperbanyak (eksplan yang responsif) dipindahkan ke medium yang sama, hanya kadar BAP dikurangi menjadi 0,4 mg/l. Eksplan yang responsif tersebut diletakkan di ruang kultur terang bersuhu  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  selama 4-5 minggu. Eksplan selanjutnya dipindahkan ke medium MS + B5 vitamin + GA3 0,5 mg/l untuk memacu pemanjangan tunas selama 4-5 minggu. Tunas-tunas yang berukuran 2-3 cm dipisahkan satu per satu, lalu ditanam ke medium perakaran, yaitu 1/2 MS + B5 vitamin + IBA 0,5 atau 1 mg/l dan diletakkan di ruang kultur terang.

Tunas yang telah berakar, disebut planlet, yang tumbuh baik segera diaklimatisasikan dengan sistem hidroponik selama seminggu. Planlet kemudian dipindahkan ke pot yang berisi tanah dan pasir (1:1) steril selama seminggu. Setelah tanaman cukup kuat dan normal dipindahkan ke rumah kaca. Pengamatan dilakukan pada persentase eksplan yang responsif, persentase tunas dan planlet yang terbentuk.

### Eksplan Kotiledon Tua

Biji kedelai varietas Wilis dicuci dengan air sabun dan dibilas dengan air leding hingga bersih. Kemudian biji disterilisasi dengan larutan clorox 50% selama 30 menit, lalu dibilas dengan air suling steril 3-4 kali. Biji direndam dalam larutan Chaptan 10 g/l selama satu jam. Biji selanjutnya dikecambahkan pada media kapas+air steril yang telah disiapkan sebelumnya.

Setelah satu minggu, kecambah yang baik dikeluarkan dari botol kultur dan dilakukan isolasi eksplan kotiledon tua. Bagian epikotil dan hipokotil kecambah dihilangkan, lalu potongan kotiledon ditumbuhkan pada media multiplikasi, yaitu MS + B5 vitamin + L-glutamin 30 mg/l + L-asparagin 30 mg/l + BAP 1,15 mg/l + sukrosa 20 g/l sesuai dengan metode dari Hinchee *et al.* (1988). Setelah tiga minggu eksplan

yang mengalami perbanyak tunas dipindahkan ke medium MS + B5 vitamin + sukrosa 20 g/l untuk pemanjangan tunas. Setiap tunas selanjutnya dipindahkan ke medium ½ MS + B5 vitamin + IBA 0,5 mg/l untuk perakaran.

Tunas yang telah berakar dengan baik (planlet), segera diaklimatisasi dengan metode seperti pada eksplan embrio muda. Pengamatan meliputi persentase eksplan yang responsif, persentase tunas dan planlet yang terbentuk.

### **Regenerasi Kedelai melalui Embriogenesis Somatik**

Percobaan ini menggunakan eksplan kotiledon muda dari tiga varietas (Wilis, Tampomas, dan Krakatau). Cara penyiapan polong muda dan isolasi kotiledon muda menggunakan metode yang sama dengan eksplan embrio muda. Eksplan kotiledon muda diambil dari polong muda umur 14-15 hari setelah penandaan/bunga mekar.

Eksplan kotiledon muda ditumbuhkan pada media padat MS (10) + B5 (4) vitamin + NAA 10 mg/l untuk menginduksi kalus embriogenik (Kurniawan dan Jumanto, 1996). Lebih kurang 4-6 minggu dihasilkan bentukan kalus yang embriogenik (embriogenesis). Eksplan yang mengalami embriogenesis (eksplan yang responsif) dipindahkan ke medium yang sama dengan kadar NAA 1 mg/l untuk pendewasaan embrioid. Embrio somatik yang telah berkembang dipisahkan dari eksplan kotiledon, lalu dikecambahkan pada medium 1/2 MS + B5 vitamin. Planlet/tanaman regenerasi yang dihasilkan selanjutnya diaklimatisasikan dengan metode yang sama pada eksplan embrio muda dan kotiledon tua. Pengamatan meliputi persentase eksplan yang responsif/mengalami embriogenesis, persentase jumlah embrio somatik dan jumlah planlet/tanaman regenerasi yang terbentuk.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Percobaan ini merupakan kegiatan tahun pertama dari penelitian jangka panjang mengenai kultur jaringan dan transformasi tanaman kedelai untuk ketahanan terhadap hama penggerek polong. Konsekuensi dari hal tersebut, sebagian data masih belum lengkap karena ada percobaan yang sedang berlangsung. Pada percobaan ini terutama difokuskan untuk melihat respon regenerasi tiga varietas kedelai baik melalui organogenesis ataupun embriogenesis.

Hasil percobaan menunjukkan bahwa ketiga varietas kedelai yang digunakan dapat diregenerasikan melalui tiga jenis eksplan, yaitu embrio muda, kotiledon muda, dan kotiledon tua. Hal ini ditunjukkan dengan dihasilkannya sejumlah tunas dan embrio somatik dari ketiga jenis eksplan pada semua varietas yang digunakan. Tunas dan embrio somatik ini selanjutnya telah berhasil membentuk planlet/tanaman regenerasi dan beberapa di antaranya telah berhasil pula diaklimatisasikan ke media pot/tanah serta dapat tumbuh hingga dewasa/berpolong di rumah kaca.

## Regenerasi Kedelai melalui Organogenesis

### Eksplan Embrio Muda

Data hasil percobaan menunjukkan bahwa tiga varietas kedelai yang digunakan memberikan respon pertumbuhan yang baik pada medium kultur dan mampu membentuk tunas dan menjadi tanaman (*planlet*), tetapi menunjukkan respon pertumbuhan yang berbeda antarvarietas (Tabel 1, 2, dan 3). Hal ini sesuai dengan pendapat Pierik (1987) yang menyatakan bahwa setiap genotipe tanaman akan memberikan respon pertumbuhan *in vitro* yang berbeda. Respon pertumbuhan eksplan terbaik didapatkan pada varietas Wilis (58%). Varietas ini juga menghasilkan jumlah planlet terbanyak, yaitu 22,9%. Berikutnya adalah Krakatau memberikan respon 41,5% dengan pembentukan tunasnya mencapai 34,9%, tetapi menghasilkan jumlah planlet terendah (4,5%). Sedangkan Tampomas menghasilkan 41% eksplan yang responsif, tetapi dapat menghasilkan planlet lebih banyak daripada varietas Krakatau, yaitu 17,2%. Persentase tunas yang terbentuk pada tiga varietas kedelai yang digunakan dalam percobaan adalah kurang dari 50%. Hal ini disebabkan oleh adanya perbanyak tunas yang ukurannya sangat kecil, sehingga tunas sulit untuk dipisahkan satu demi satu (Gambar 1). Kalaupun bisa dipisahkan, tunas tersebut sebagian besar akan membentuk kalus pada pangkalnya sehingga sulit membentuk akar. Hal ini mengakibatkan persentase jumlah tunasnya juga rendah. Selain itu, tunas-tunas yang dipindahkan dalam ukuran kecil pertumbuhan memanjangnya sangat lambat. Walaupun tumbuh akar, pertumbuhan planlet ini sangat lambat (sulit bertambah panjang). Sebaliknya tunas yang berukuran besar (2-3 cm) berhasil membentuk akar dan tumbuh dengan baik dan cepat (Gambar 2). Planlet ini berhasil diaklimatisasikan ke dalam pot dan tumbuh menjadi tanaman (beregenerasi) kedelai yang normal dan kuat. Bahkan tanaman ini sudah dapat menghasilkan polong (Gambar 3).

Tabel 1. Persentase eksplan yang responsif, tunas dan planlet yang terbentuk dari tiga jenis eksplan kedelai varietas Wilis.

Jenis eksplan yang digunakan	Eksplan yang responsif (%)	Tunas /embrio yang terbentuk (%)	Planlet yang terbentuk (%)
Embrio muda	58,0	25,9	22,9
Kotiledon muda	9,9	34,3	11,5
Kotiledon tua	41,4	88,3	10,2*

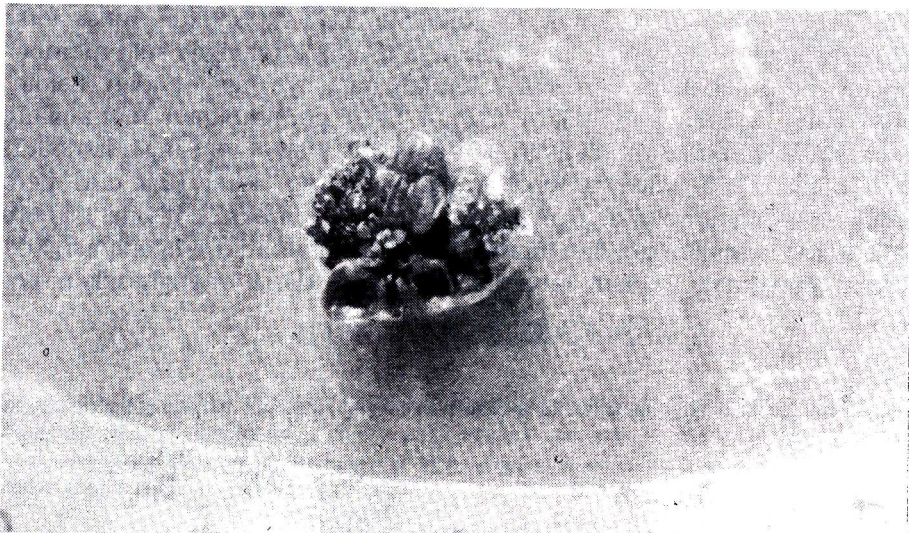
Keterangan: \*Data sementara, karena percobaan masih berlangsung.

**Tabel 2.** Persentase eksplan yang responsif, tunas dan planlet yang terbentuk dari dua jenis eksplan kedelai varietas Tampomas.

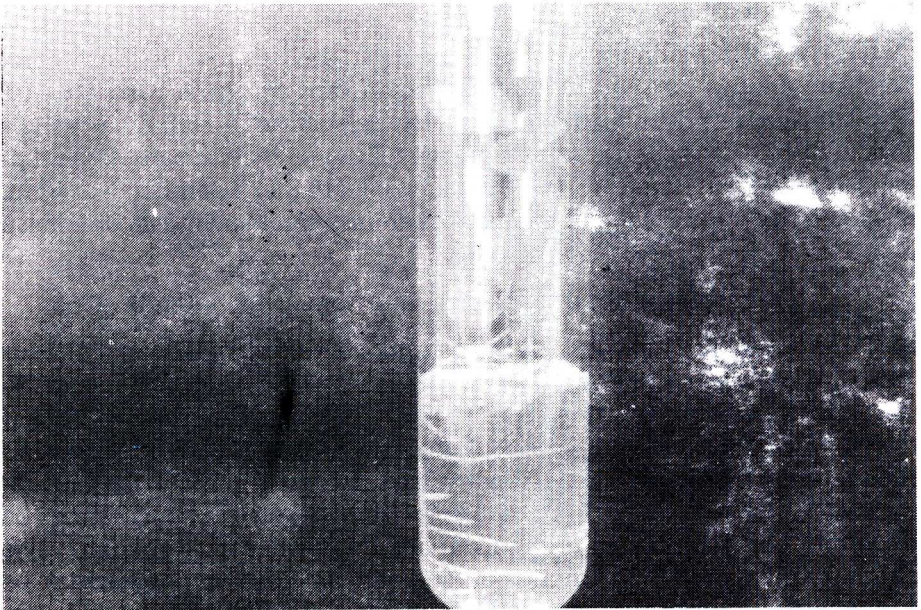
Jenis eksplan yang digunakan	Eksplan yang responsif (%)	Tunas/embrio yang terbentuk (%)	Planlet yang terbentuk (%)
Embrio muda	41	34,9	17,2
Kotiledon muda	9,6	11,7	0

**Tabel 3.** Persentase eksplan yang responsif, tunas dan planlet yang terbentuk dari dua jenis eksplan kedelai varietas Krakatau.

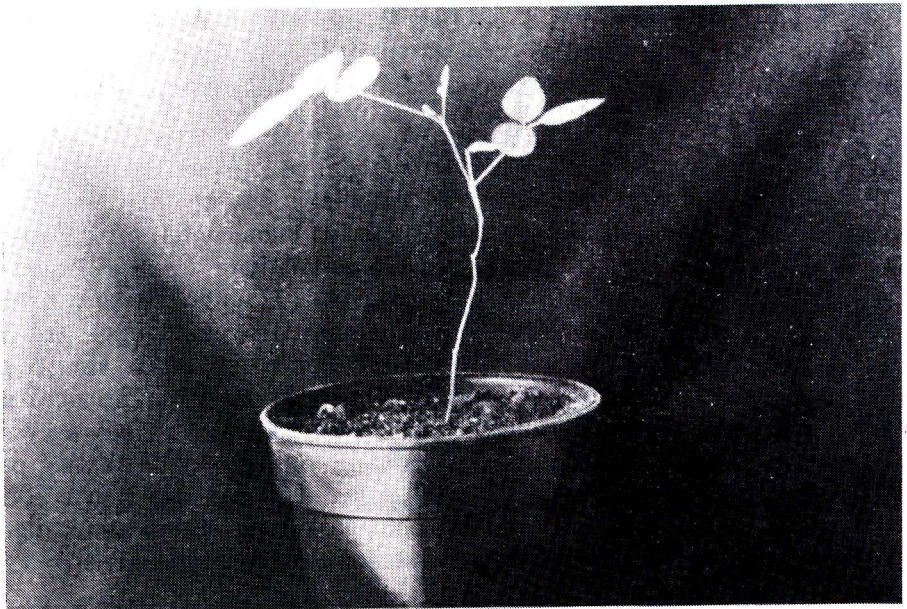
Jenis eksplan yang digunakan	Eksplan yang responsif (%)	Tunas/embrio yang terbentuk (%)	Planlet yang terbentuk (%)
Embrio muda	41,5	37,1	4,5
Kotiledon muda	8,3	84,2	6,3



**Gambar 1.** Multiplikasi tunas pada eksplan embrio muda kedelai varietas Wilis, 1,5 bulan setelah induksi pada medium MS + B5 vitamin + BAP 1,15 dan 0,4 mg/l.



**Gambar 2.** Planlet asal tunas-tunas besar yang terbentuk dari eksplan embrio muda kedelai varietas Krakatau.



**Gambar 3.** Tanaman regenerasi hasil aklimatisasi yang berasal dari eksplan embrio muda kedelai varietas Willis.

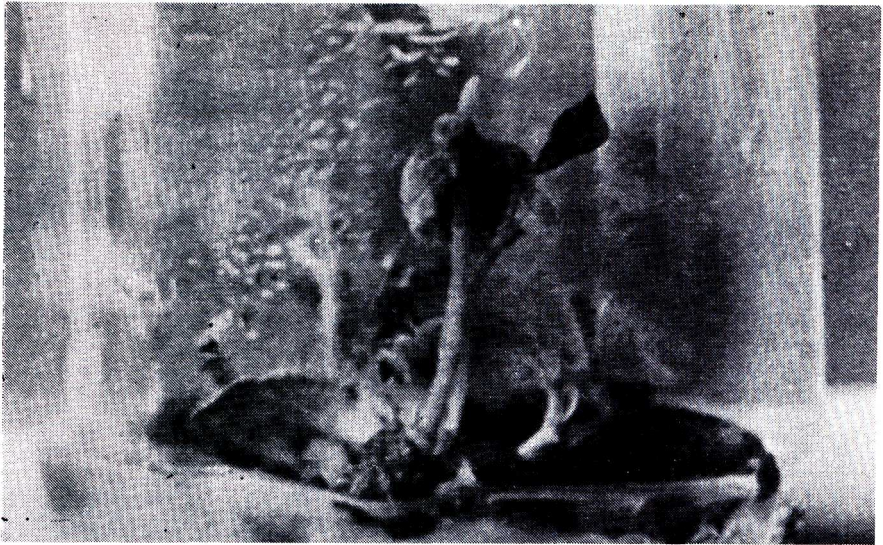
## **Eksplan Kotiledon Tua**

Pada percobaan ini hanya digunakan satu varietas, yaitu Wilis. Hasil percobaan menunjukkan adanya persentase jumlah eksplan yang responsif yang baik (41,4%). Dari eksplan yang responsif ini dapat diperoleh persentase jumlah tunas yang sangat tinggi, yaitu 88,3% (Gambar 4). Namun hingga tulisan ini dibuat, baru dapat diperoleh beberapa planlet dari tunas yang dihasilkan ini (10,2%) (Gambar 5). Jumlah ini kemungkinan besar masih akan bertambah, karena percobaan masih berlangsung.

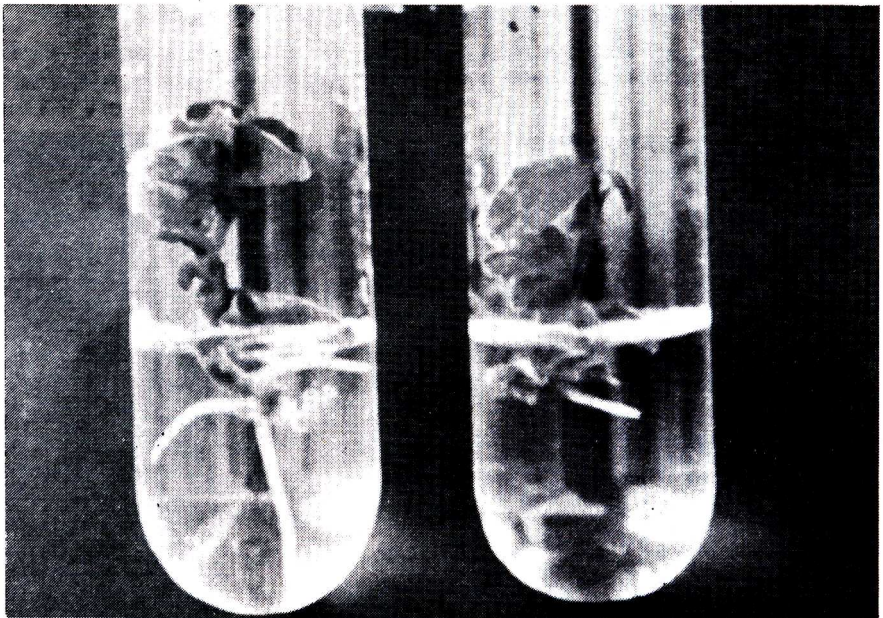
## **Regenerasi Kedelai melalui Embriogenesis Somatik**

Data percobaan menunjukkan bahwa embriogenesis somatik dapat diinduksikan dari eksplan kotiledon muda pada tiga varietas kedelai yang digunakan. Respon eksplan yang mengalami embriogenesis tertinggi terdapat pada varietas Wilis (9,9%), berikutnya Tampomas (9,6%) dan terendah pada Krakatau (8,3%). Namun varietas Krakatau mampu menghasilkan persentase jumlah embrio somatik tertinggi (84,2%), disusul Wilis (34,2%), dan Tampomas (11,7%). Jumlah planlet yang berhasil diperoleh dari perkecambahan embrio somatik ini masih sangat rendah, yaitu Wilis (11,5%) dan Krakatau (6,3%). Embrio somatik dari varietas Tampomas tidak berhasil dikecambahkan membentuk planlet. Rendahnya jumlah planlet ini terutama disebabkan adanya kesulitan pada tahap pendewasaan embrio somatik. Embrio somatik yang dihasilkan rata-rata berukuran kecil, sehingga setelah dipindahkan ke media pendewasaan banyak yang mati/tidak tumbuh. Hanya embrio yang berukuran besar yang mampu tumbuh dan dapat berkecambah membentuk planlet/tanaman regenerasi (Gambar 6 dan 7). Beberapa planlet yang dihasilkan selanjutnya berhasil diaklimatisasikan ke media pot/tanah dan dapat tumbuh normal hingga dewasa/berpolong di rumah kaca (Gambar 8).

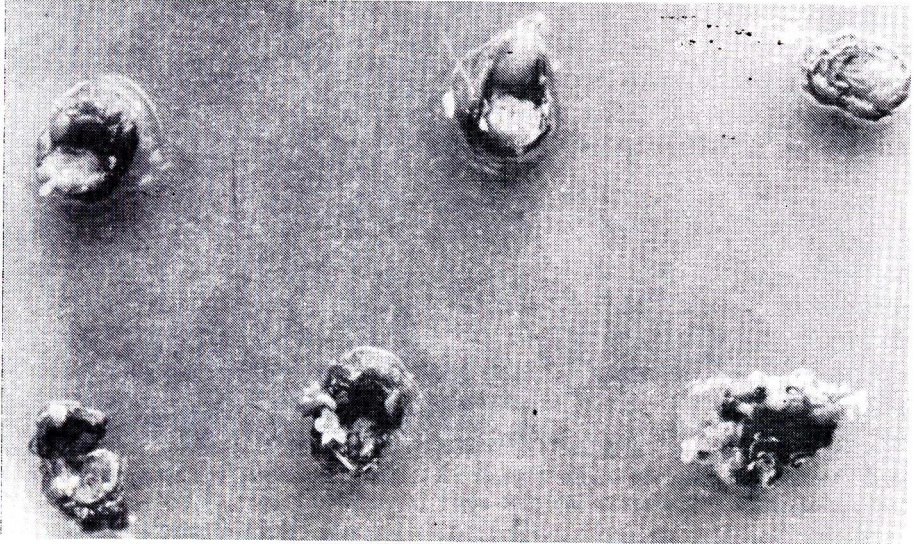
Dalam rencana percobaan transformasi kedelai yang akan datang, penggunaan eksplan kotiledon tua dan embrio muda akan lebih efisien untuk meregenerasi tanaman. Hal tersebut disebabkan waktu yang diperlukan untuk proses regenerasi pendek, di samping itu dapat menghasilkan jumlah tanaman regenerasi yang cukup. Proses regenerasi dari eksplan embrio muda dan kotiledon tua kedelai varietas Wilis adalah melalui jalur organogenesis (pembentukan organ langsung). Eksplan kotiledon muda sebenarnya sangat baik untuk bahan transformasi, karena planlet/tanaman regenerasi yang dihasilkan (Gambar 8) berasal dari perkembangan satu sel tanaman dan tumbuh menjadi embrio somatik. Namun proses regenerasinya lama/panjang, karena melalui jalur embriogenesis yang memiliki tahapan yang panjang. Selain itu, persentase pembentukan embrio somatik dan planlet dari eksplan kotiledon muda ini masih relatif rendah, sehingga kurang efisien untuk digunakan sebagai sistem regenerasi pada percobaan transformasi tanaman kedelai.



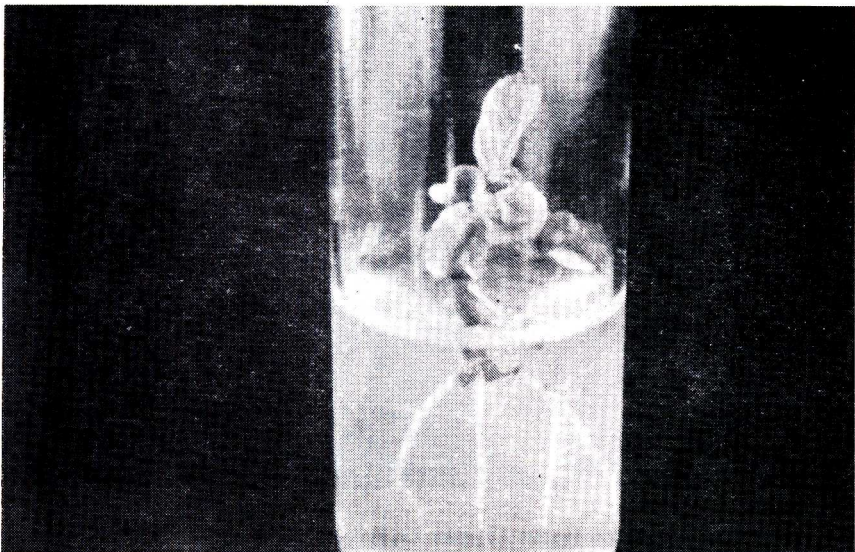
**Gambar 4.** Multiplikasi tunas pada eksplan kotiledon tua kedelai varietas Wilis, tiga minggu setelah induksi pada medium MS + B5 vitamin + BAP 1,15 mg/l.



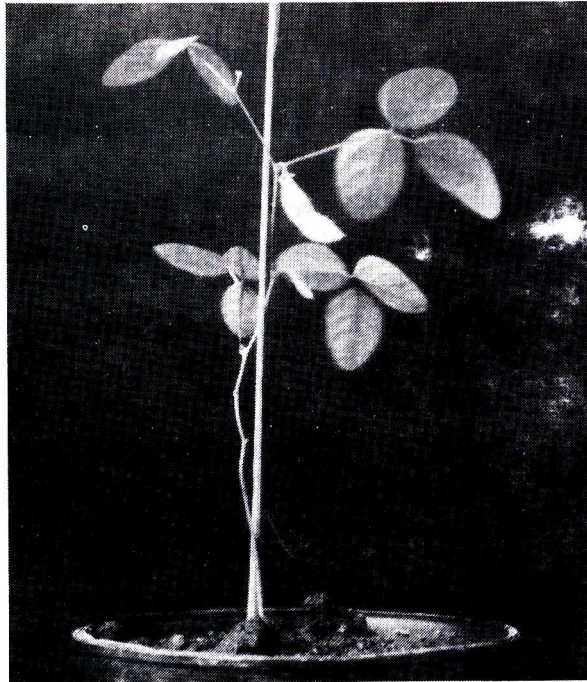
**Gambar 5.** Planlet yang berasal dari eksplan kotiledon tua kedelai varietas Wilis.



**Gambar 6.** Embrio somatik yang berasal dari eksplan kotiledon muda kedelai varietas Krakatau, dua bulan setelah induksi pada medium MS + B5 vitamin + NAA 10 mg/l.



**Gambar 7.** Planlet yang berasal dari perkecambahan embrio somatik kedelai varietas Krakatau.



**Gambar 8.** Tanaman regenerasi hasil aklimatisasi planlet yang terbentuk dari embrio somatik dari eksplan kotiledon muda kedelai varietas Krakatau.

## **KESIMPULAN DAN SARAN**

Dari hasil percobaan dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

- Terjadi perbedaan respon pertumbuhan antarvarietas.
- Respon pertumbuhan eksplan terbaik pada varietas Wilis (membentuk planlet terbanyak).
- Eksplan embrio muda, kotiledon muda dan tua varietas Wilis mampu memberikan respon pertumbuhan yang baik dan dapat menghasilkan sejumlah tunas dan planlet.
- Eksplan yang paling responsif adalah embrio muda.
- Pembentukan tunas tertinggi terjadi pada eksplan kotiledon tua.
- Jumlah planlet tertinggi dijumpai pada embrio muda.

Hasil percobaan tahun pertama ini merupakan awal yang baik dan menjanjikan harapan keluaran jangka panjang yaitu untuk memperoleh tanaman transgenik kedelai tahan hama penggerek polong. Oleh karena itu, disarankan bahwa penelitian ini bisa dilanjutkan untuk memenuhi target keluaran yang direncanakan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Christou, P. and N.S. Yang. 1989.** Development aspects of soybean (*Glycine max*) somatic embryogenesis. *Annals of Botany* 64: 225-234.
- Christou, P. 1994.** The biotechnology of crop legumes. *Euphytica* 74: 165-185.
- Finer, J.J. and A. Nagasawa. 1988.** Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill). *Plant Cell and Organ Culture* 15: 125-136.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller, and K. Ojima. 1968.** Nutrient requirements of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Herman, M. 1996.** Rekayasa genetik untuk perbaikan tanaman. *AgroBio*. 1(1): 24-34.
- Hicks, D.R. 1978.** Growth and development. *In* A.G. Norman (*Ed.*). Soybean physiology, agronomy, and utilization. Academic Press, Inc. pp. 17-44.
- Hinchee, M.A.W., D.V. Connor-Ward, C.A. Newell, R.E. MC. Donell, S.J. Sato, C.S. Gasser, D.A. Fischhoff, D.B.Re, R.T. Fraley, and R.B. Horsch. 1988.** Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium* mediated DNA transfer. *Bio/Tech.* 6: 915-922.
- Kurniawan R. T. dan Jumanto. 1996.** Regenerasi tanaman kedelai (*Glycine max* (L.) Merr) melalui embriogenesis somatik. *Jurnal Bioteknologi Pertanian*. 1 (2): 53-59.
- Langridge, W.H.R. and A.A. Szalay. 1985.** Somatic embryogenesis and planlet regeneration in the soybean *Glycine max*. *Plant Cell Reports* 4: 344-347.
- 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., G.A. Wattimena, M.F. Masyhudi, dan S. Harran. 1994.** Pengaruh umur embrio dan genotipe tanaman terhadap pertumbuhan kultur embrio muda kedelai. *Zuriat* 5(2): 51-56.
- Parrot W.A., M.A. Bailey, R.E. Durham, and H.V. Mathews. 1992.** Tissue culture and regeneration in legumes. *In* J.P. Moss (*Ed.*). *Biotechnology and Crop Improvement in Asia*. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru, Andhra Pradesh, India. pp. 115-148.
- Pierik, R.L.M. 1987.** *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publisher Dordrecht, Boston, Lancaster. 344 pp.
- Soekarna, D. dan Harnoto. 1985.** Pengendalian hama kedelai. *Dalam* S. Somaatmadja, M. Ismunadji, Sumarno, M. Syam, S.O. Manurung, dan Yuswadi (*Eds.*). *Kedelai*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. hal. 319-330.
- Sticklen, M.B. 1990.** Genetic engineering of plants: an alternative pesticides and a new component of integrated pest management, pp.552-566. *In* Diana L.W. (*Ed.*), *Pesticides in the next decade: The challenges ahead*. VPI Publ. Blacksburg. VA.