

# Organogenesis dan Embriogenesis Somatik Kedelai secara *In Vitro*

Saptowo Jumali Pardal, T.I.R. Utami, dan M. Herman

*Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor*

## ABSTRAK

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Rekayasa Genetika, Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan Bogor pada tahun anggaran 1999/2000. Penelitian dilakukan untuk perbaikan sistem regenerasi tanaman kedelai hasil transformasi genetik dengan gen *proteinase inhibitor (pin1)* menggunakan metode penembakan partikel (*particle bombardment*). Penelitian ini merupakan salah satu kegiatan tahun keempat dari RPTP yang berjudul Transformasi Tanaman Kedelai dan Kacang Tanah untuk Ketahanan terhadap Hama dan Penyakit. Pada kegiatan pertama dilakukan perbaikan sistem regenerasi tanaman kedelai baik melalui tahap organogenesis maupun embriogenesis somatik. Pada tahap organogenesis telah digunakan dua media induksi multiplikasi tunas yang baru, yaitu MBTD (MS + B5 vitamin + thidiazuron + 2,4-D) dan MBTN (MS + B5 vitamin + thidiazuron + NAA). Eksplan yang digunakan kotiledon tua dari kecambah kedelai umur tujuh hari. Hasil menunjukkan bahwa media MBTN memberikan hasil multiplikasi dan kualitas tunas yang lebih baik daripada media MBTD. Tunas yang dihasilkan berhasil diakarkan dan selanjutnya diaklimatisasi di rumah kaca hingga dewasa. Pada tahap embriogenesis somatik tetap digunakan eksplan embrio muda dan kotiledon muda dari polong kedelai umur 14-15 hari setelah polinasi. Empat macam media induksi embriogenesis telah dicoba, yaitu media MS + B5 vitamin + 2,4-D (1; 1,5; dan 2 mg/l) dan MS + B5 vitamin + 2,4-D 2 mg/l + L-asparagin 50 mg/l + L-glutamin 50 mg/l. Hasil menunjukkan bahwa media dengan kadar 2,4-D 1 mg/l atau 1,5 mg/l sangat baik untuk induksi embrio somatik, tetapi jumlah planlet yang dihasilkan lebih sedikit dibandingkan dengan media dengan kadar 2,4-D 2 mg/l.

**Kata kunci:** Organogenesis, embriogenesis somatik, kedelai, *in vitro*

## ABSTRACT

Experiments were conducted at Molecular Biology and Genetic Engineering Laboratory of Research Institute for Food Crop Biotechnology, Bogor in 1999 to 2000. The objective of the research was to improve plant regeneration system of soybean resulted from genetic transformation experiments using the proteinase inhibitor II gene construct through particle bombardment method. This experiments were part of the soybean transformation for pod borer resistance project. Two kind of the plant regeneration system of soybean were evaluated in this experiments, i.e. through organogenesis and somatic embryogenesis. On the organogenesis system, two kind of media formulation were evaluated. Mature cotyledon as explants were cultured on media MBTD (MS + B5 vitamin + thidiazuron + 2.4-D) and MBTN (MS + B5 vitamin + thidiazuron + NAA). Result indicated that media MBTN was better than MBTD on shoot multiplication. Those shoots were then transferred into rooting media and acclimated on soil successfully. The plants were kept in greenhouse until maturity. While on somatic embryogenesis system, young cotyledon as explants were cultured on four type of media formulations, i.e. MS + B5 vitamin + 2.4-D (1, 1.5, and 2 mg/l) and MS + B5 vitamin + 2 mg/l 2.4-D + 50 mg/l L-asparagine + 50

mg/l L-glutamine. Result indicated that media with 1 or 1.5 mg/l 2.4-D was very good for somatic embryos induction, but it wasn't give high number of plantlet compare to media with 2 mg/l 2.4-D.

**Key words:** Organogenesis, somatic embryogenesis, soybean, *in vitro*

## PENDAHULUAN

Regenerasi tanaman transforman merupakan tahap penting dalam penelitian transformasi genetik. Tanpa sistem regenerasi tanaman yang efisien, maka akan sulit diperoleh tanaman transgenik yang diinginkan. Metode transformasi yang di-gunakan harus dapat memasukkan gen *interest* ke dalam sel tanaman yang kom-peten untuk diregenerasikan, sehingga sel tersebut dapat tumbuh dan berkembang membentuk planlet/tanaman transgenik yang diharapkan.

Kedelai merupakan salah satu jenis tanaman yang masih sulit dimanipulasi atau diregenerasikan secara *in vitro* (Pierik, 1987). Meskipun telah berhasil dilaku-kan regenerasi kedelai secara *in vitro* di beberapa laboratorium, khususnya di luar negeri (Finer, 1988; Finer dan Nagasawa, 1988; Langridge dan Szalay, 1985; Parrot *et al.*, 1992), namun biasanya belum *reproducible* (tidak dapat diulang).

Regenerasi kedelai umumnya dilakukan melalui dua cara, yaitu organogene-sis (melalui pembentukan organ langsung dari eksplan) (Hinchee *et al.*, 1988) dan embriogenesis somatik (melalui pembentukan embrio somatik) (Finer, 1988). Jalur organogenesis lebih mudah dan cepat tahapannya dibandingkan dengan embrio-genesis somatik. Namun untuk keperluan transformasi genetik, cara embriogene-sis lebih dianjurkan. Embrio somatik biasanya berasal dari sel tunggal yang kom-peten dan berkembang membentuk fase globuler, hati, torpedo, dan akhirnya menjadi embrio somatik dewasa yang siap dikecambahkan membentuk planlet/ tanaman utuh (Finer dan Mc Mullen, 1991; Finer *et al.*, 1996).

Pada penelitian ini dilakukan usaha perbaikan sistem regenerasi tanaman kedelai baik secara organogenesis maupun embriogenesis somatik dari metode atau protokol yang telah ada dalam rangka memperoleh sistem regenerasi kedelai yang efisien untuk penelitian transformasi genetik kedelai.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian menggunakan dua varietas kedelai, yaitu Wilis dan Tidar. Benih diperoleh dari Kelompok Peneliti Sumber Daya Genetika, Balitbio. Kemudian ditanam di pot/ember besar dan dipelihara di rumah kaca.

### Regenerasi Kedelai melalui Organogenesis

#### a. Penyiapan sumber eksplan

Benih kedelai varietas Wilis dan Tidar dicuci dan disterilisasi dengan larutan clorox 30% selama 20-25 menit, lalu dibilas 3-4 kali dengan air suling steril. Benih dikecambahkan pada botol yang berisi kapas dan media MS (Murashige dan Skoog, 1962) ditambah vitamin B5 (Gamborg *et al.*, 1968). Botol kultur disimpan di ruang kultur selama 1 minggu.

**b. Isolasi dan penanaman eksplan**

Kecambah kedelai dikeluarkan dari botol dan diletakkan pada petridish ber-alaskan kertas saring steril di ruang laminar. Bagian kotiledon dipotong dari kecambah dengan pisau steril, lalu dihilangkan bagian aksisnya (calon tunas). Eksplan kotiledon selanjutnya dikulturkan pada medium regenerasi dengan bagian abaksial menyentuh media. Setiap botol ditanami sebanyak 5 eksplan. Medium regenerasi/organogenesis yang digunakan terdiri dari dua komposisi/ perlakuan, yaitu MBTN (MS + B5 vitamin + thidiazuron 0,05 mg/l + NAA 0,01 mg/l) dan MBTD (MS + B5 vitamin + thidiazuron 0,05 mg/l + 2,4-D 0,01 mg/l).

**c. Pemanjangan tunas dan perakaran**

Setelah tiga minggu, eksplan yang mengalami perbanyakan tunas segera dipindahkan ke media MS + B5 vitamin + IAA 100 mg/l + GA<sub>3</sub> 0,5 mg/l untuk proses pemanjangan tunas. Tunas yang telah berukuran 2-3 cm dipisahkan dan dipindahkan ke media ½ MS + B5 vitamin + IBA 1 mg/l untuk merangsang perakaran.

**d. Aklimatisasi tanaman**

Tunas yang telah memiliki akar yang baik segera dikeluarkan dari tabung dan diaklimatisasikan secara hidroponik selama 3-5 hari. Selanjutnya tanaman dipindahkan ke pot yang berisi campuran tanah dan kompos. Pot ditutup dengan kantung plastik yang telah dilubangi kecil-kecil. Pot diletakkan ditempat teduh (terlindung) selama satu minggu. Kemudian tutup plastik dibuka dan pot dibiarkan ditempatnya satu minggu lagi. Setelah tanaman tumbuh kuat segera dipindahkan ke pot yang lebih besar dan dipelihara di rumah kaca hingga dewasa (Pardal *et al.*, 1997).

**Regenerasi Kedelai melalui Embriogenesis Somatik**

**a. Penyiapan sumber eksplan**

Benih kedelai varietas Wilis dan Tidar ditanam di pot/ember besar di rumah kaca secara bertahap untuk penyediaan eksplan yang cukup. Setelah tanaman mulai berbunga, dilakukan penandaan bunga dengan benang berwarna (Pardal *et al.*, 1994).

**b. Isolasi dan penanaman eksplan**

Polong muda yang berumur 14-15 hari dipanen, lalu dicuci dengan air sabun dan dibilas dengan air ledeng. Selanjutnya polong disterilisasi dengan larutan clorox 30% selama 15 menit, lalu dibilas 3-4 kali dengan air suling steril (Pardal *et al.*, 1994). Eksplan embrio dan kotiledon muda dipisahkan dari biji muda secara steril di ruang laminar, lalu dikulturkan pada medium embriogenesis, yaitu MS + B5 vitamin + L-glutamin 30 mg/l + L-asparagin 30 mg/l + L-arginin 30 mg/l (Langridge dan Szalay, 1985; Trijatkiko dan Jumanto, 1996) + sukrosa 30 g/l + 2,4-D 2 mg/l. Untuk varietas Tidar digunakan kadar 2,4-D 1; 1,5; dan 2 mg/l.

#### c. Induksi embrio somatik dan perkecambahan

Setelah 4-6 minggu, kalus embriogenik yang dihasilkan dipindahkan ke medium yang sama dengan kadar 2,4-D lebih rendah (0,5 mg/l) dan ditambah dengan NH<sub>4</sub>Cl 0,5 mg/l untuk memacu pendewasaan embrioid. Embrio somatik yang telah berkembang dipisahkan dari eksplan, lalu dikecambahkan pada medium MS + B5 vitamin+ GA<sub>3</sub> 0,1 mg/l. Selanjutnya planlet dipindahkan lagi ke medium ½ MS + B5 vitamin + IBA 1 mg/l untuk memacu pertumbuhan akar yang lebih baik.

#### d. Aklimatisasi tanaman

Tunas yang memiliki akar baik segera dikeluarkan dari tabung dan diaklimatisasikan secara hidroponik selama 3-5 hari. Selanjutnya tanaman dipindahkan ke pot yang berisi campuran tanah dan kompos. Pot ditutup dengan kantung plastik yang telah dilubangi kecil-kecil. Pot diletakkan di tempat teduh (ter-lindung) selama satu minggu. Kemudian tutup plastik dibuka dan pot dibiarkan satu minggu lagi. Setelah tanaman tumbuh kuat segera dipindahkan ke pot yang lebih besar dan dipelihara di rumah kaca hingga dewasa (Pardal *et al.*, 1997).

Pengamatan regenerasi secara organogenesis meliputi parameter jumlah eksplan yang responsif (mengalami multiplikasi tunas), jumlah tunas per eksplan, dan jumlah planlet/tanaman yang dihasilkan. Sedangkan pengamatan regenerasi secara embriogenesis somatik meliputi parameter jumlah eksplan responsif (mengalami embriogenesis), jumlah embrio somatik, dan jumlah planlet/tanaman yang dihasilkan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil percobaan menunjukkan bahwa kedua 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 tersebut. Tunas dan embrio somatik ini berhasil membentuk planlet (tanaman regenerasi) dan beberapa di antaranya berhasil diaklimatisasi ke media pot/tanah serta dapat tumbuh hingga dewasa/ber-polong di rumah kaca.

### Regenerasi Kedelai melalui Organogenesis

Data hasil percobaan menunjukkan bahwa kedua varietas kedelai yang di-gunakan memberikan respon pertumbuhan yang baik pada kedua macam perla-kuan media kultur (MBTD dan MBTN). Selain mampu membentuk tunas dan men-jadi planlet (tanaman regenerasi), kedua varietas tersebut menunjukkan respon pertumbuhan yang berbeda (Tabel 1). Respon pertumbuhan eksplan terbaik pada media perlakuan MBTN diperoleh dari varietas Tidar (41,43%) yang menghasilkan 74 tunas dan 54 planlet. Sedangkan varietas Wilis pada media yang sama, menun-jukkan respon tumbuh sebesar 35,97% yang menghasilkan 69 tunas dan 13 planlet. Demikian pula eksplan yang ditumbuhkan pada media perlakuan MBTD, menun-jukkan bahwa varietas Tidar lebih responsif (35,97%) dibandingkan dengan varie-tas Wilis (22,86%). Hal ini sesuai dengan pendapat Pierik (1987) yang menyatakan bahwa setiap genotipe tanaman akan memberikan respon pertumbuhan *in vitro* yang berbeda. Demikian pula media yang digunakan akan memberikan respon yang berbeda pula. Persentase tunas yang terbentuk pada dua varietas kedelai yang digunakan dalam percobaan kurang dari 50%. Hal ini disebabkan oleh adanya perbanyakan tunas yang ukurannya sangat kecil, sehingga sulit untuk dipisahkan satu demi satu. Kalaupun dapat dipisahkan, tunas tersebut sebagian besar akan membentuk kalus pada pangkalnya sehingga sulit membentuk akar. Hal ini meng-akibatkan persentase jumlah tunasnya juga rendah. Selain itu, tunas yang dipindah-kan dalam ukuran kecil pertumbuhan memanjangnya sangat lambat. Walaupun tumbuh akar, pertumbuhan planlet

**Tabel 1.** Respon pertumbuhan kotiledon tua varietas Wilis dan Tidar secara organogenesis dengan variasi media *in vitro*. Balitbio, 2000

Varietas	n	Media	Jumlah eksplan	Jumlah kalus	Jumlah respon eksplan	Jumlah tunas	Jumlah planlet
Wilis	1	MBTD	70	70	27	29	12
	2	MBTD	70	70	5	5	5
			140	140	32	34	17
Wilis	1	MBTN	70	69	40	64	13
	2	MBTN	70	70	5	5	-
			140	139	45	69	13
Tidar	1	MBTD	70	69	5	7	-
	2	MBTD	70	70	45	51	40
			140	139	50	58	40
Tidar	1	MBTN	60	60	9	20	4
	2	MBTN	80	80	49	54	50
			140	140	58	74	54

n = ulangan, MBTD = media dasar + 2,4-D + thidiazuron, MBTN = media dasar + NAA + thidiazuron

ini sangat lambat (sulit bertambah panjang). Keadaan ini dimungkinkan pula ada kaitannya dengan komposisi zat yang terkandung dalam media tumbuh. Pengamatan secara visual menunjukkan bahwa beberapa tunas selain sulit untuk bertambah tinggi, juga menunjukkan gejala absisi (pengguguran daun). Keadaan ini menurut Wattimena (1988), merupakan gejala kekurangan giberelin dan berlebihan dalam pemberian konsentrasi auksin. Akan tetapi tunas yang berukuran besar (2-3 cm) berhasil membentuk akar dan tumbuh dengan baik dan cepat. Planlet ini berhasil diaklimatisasikan ke dalam pot dan tumbuh menjadi tanaman kedelai yang normal dan kuat. Bahkan tanaman ini sudah dapat menghasilkan polong.

### Regenerasi Kedelai melalui Embriogenesis Somatik

Data percobaan menunjukkan bahwa embriogenesis somatik dapat diinduksikan dari eksplan kotiledon muda dan embrio muda pada dua varietas kedelai yang digunakan. Respon eksplan dari varietas Wilis yang mengalami embriogenesis tertinggi berasal dari embrio muda (39,86%) dengan menghasilkan 171 embrio somatik, 152 tunas, dan 8 planlet. Sementara itu, eksplan yang berasal dari kotiledon muda respon pertumbuhannya sebesar 38,72% dengan menghasilkan 155 embrio somatik, 73 tunas, dan 11 planlet (Tabel 2 dan 3).

Respon eksplan yang mengalami embriogenesis tertinggi pada varietas Tidar (dari empat macam perlakuan yang dicoba), terjadi pada kotiledon muda yang ditumbuhkan pada media K2 (21,48%) dengan menghasilkan 46 embrio somatik, 32 tunas, dan 30 planlet. Sementara itu, eksplan yang berasal dari embrio muda, menunjukkan respon tertinggi pada media induksi K1 (43,75%) dengan menghasilkan 43 embrio somatik, 35 tunas, dan satu planlet (Tabel 4 dan 5).

**Tabel 2.** Respon pertumbuhan embrio muda varietas Wilis secara embriogenesis somatik. Balitbio, 2000

No.	Jumlah eksplan	Jumlah kalus	Jumlah respon eksplan	Jumlah embrio somatik	Jumlah tunas	Jumlah planlet
1.	50	49	11	21	8	2
2.	50	49	18	60	59	-
3.	50	45	28	90	85	6
	150	143	57	171	152	8

**Tabel 3.** Respon pertumbuhan kotiledon muda varietas Wilis secara embriogenesis somatik. Balitbio, 2000

No.	Jumlah eksplan	Jumlah kalus	Jumlah respon eksplan	Jumlah embrio somatik	Jumlah tunas	Jumlah planlet
1.	100	98	32	60	14	3
2.	70	53	25	38	26	6
3.	100	84	34	57	33	2
	270	235	91	155	73	11

Tabel 4 menunjukkan bahwa jumlah planlet yang berhasil diperoleh dari perkecambahan embrio somatik masih sangat rendah. Embrio somatik dari eksplan kotiledon muda varietas Tidar yang ditumbuhkan pada media K3 tidak berhasil dikecambahkan membentuk planlet. Demikian pula eksplan embrio muda yang ditumbuhkan pada media K2, K3, dan K4 mengalami hal yang sama. Rendahnya jumlah planlet ini terutama disebabkan karena kesulitan dalam taraf pendewasaan embrio somatik. Rata-rata ukuran embrio somatik yang dihasilkan kecil dengan bentuk yang tidak normal sehingga setelah dipindahkan ke media pendewasaan banyak yang mati/tidak tumbuh. Secara visual dapat dilihat bahwa embrio somatik yang berukuran kecil ketika dipindahkan ke media pendewasaan, hanya memperlihatkan respon morfologi pada pertumbuhan akar saja, sementara pemanjangan tunas tidak terjadi. Keadaan ini diduga karena pengaruh dari komposisi media induksi maupun pendewasaan yang belum sesuai dengan eksplan yang ditanam. Keadaan ini sesuai dengan pernyataan Gunawan (1992), bahwa komposisi auksin yang terlalu tinggi akan menyebabkan perkecambahan embrio somatik didominasi oleh pertumbuhan akar, demikian pula dengan pemberian giberelin dalam konsentrasi yang rendah menyebabkan embrio somatik sulit beregenerasi menjadi tunas. Sehingga planlet yang terbentuk sangat rendah. Hanya embrio berukuran besar dan berbentuk normal yang mampu tumbuh dan berkecambah membentuk planlet/tanaman regenerasi. Beberapa planlet yang dihasilkan selanjutnya berhasil diaklimatisasi ke media pot/tanah dan dapat tumbuh normal hingga dewasa/berpolong di rumah kaca.

**Tabel 4.** Respon pertumbuhan kotiledon muda varietas Tidar secara embriogenesis somatik pada beberapa variasi media *in vitro*. Balitbio, 2000

No.	Media	Jumlah eksplan	Jumlah kalus	Jumlah respon eksplan	Jumlah embrio somatik	Jumlah planlet
1.	K1	40	39	2	7	7
2.	K1	40	40	2	4	-
3.	K1	40	39	2	9	-
4.	K1	30	28	0	0	-
		150	146	6	20	7
1.	K2	40	39	6	9	9
2.	K2	40	40	12	21	2
3.	K2	40	40	9	9	12
4.	K2	30	30	5	7	7
		150	149	32	46	30
1.	K3	40	40	2	3	-
2.	K3	40	40	6	11	-
3.	K3	40	40	2	2	-
4.	K3	20	20	3	3	-
		140	140	13	19	-
1.	K4	40	40	2	12	12
2.	K4	40	40	10	14	9
3.	K4	40	39	7	14	11
4.	K4	30	29	2	3	3
		150	148	21	43	35

K1 = MS + B5 + 2,4-D 1 mg/l, K2 = MS + B5 + 2,4-D 1,5 mg/l, K3= MS + B5 + 2,4-D 2 mg/l + NH<sub>4</sub>Cl 0,5 mg/l, K4 = MS + B5 + 2,4-D 2 mg/l

**Tabel 5.** Respon pertumbuhan embrio muda varietas Tidar secara embriogenesis somatik pada beberapa variasi media *in vitro*. Balitbio, 2000

No.	Media	Jumlah eksplan	Jumlah kalus	Jumlah respon eksplan	Jumlah embrio somatik	Jumlah planlet
1.	K1	40	40	19	30	1
2.	K1	20	20	9	10	-
3.	K1	20	17	4	3	-
4.	K1	10	3	3	-	-
		90	80	35	43	1
1.	K2	10	9	4	4	-
2.	K2	20	20	2	3	-
3.	K2	20	16	4	4	-
4.	K2	10	8	2	2	-
		60	53	12	13	-
1.	K3	10	9	3	3	-
2.	K3	10	8	-	-	-
3.	K3	20	19	1	1	-

4.	K3	10	9	2	6	-
		50	45	6	10	-
1.	K4	30	29	13	14	-
2.	K4	20	18	4	8	-
3.	K4	20	15	2	2	-
4.	K4	30	28	2	4	-
		100	90	21	28	-

K1 = MS + B5 + 2,4-D 1 mg/l, K2 = MS + B5 + 2,4-D 1,5 mg/l, K3= MS + B5 + 2,4-D 2 mg/l + NH<sub>4</sub>Cl 0,5 mg/l, K4 = MS + B5 + 2,4-D 2 mg/l

## KESIMPULAN

Perbaikan sistem regenerasi tanaman kedelai secara *in vitro* telah berhasil dilakukan baik melalui cara organogenesis maupun embriogenesis somatik. Jumlah tunas dan kualitas tunas yang lebih baik dapat dihasilkan menggunakan media induksi multiplikasi tunas yang baru, yaitu MBTN (media MS + B5 vitamin + thidiazuron 0,05 mg/l + NAA 0,01 mg/l). Jumlah embrio somatik yang lebih banyak juga berhasil diperoleh dari kalus embriogenik hasil induksi pada media yang mengandung hormon 2,4-D 1 mg/l atau 1,5 mg/l.

## DAFTAR PUSTAKA

- Finer, J.J. 1988.** Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean (*Glycine max* [L.] Merril). Plant Cell Report 7:238-241.
- Finer, J.J. and A. Nagasawa. 1988.** Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* [L.] Merril). Plant Cell, Tissue, and Organ Culture 15:125-136.
- Finer, J.J. and M.D. Mc Mullen. 1991.** Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27:175-182.
- Finer, J.J., T.S. Cheng, and D.P.S. Verma. 1996.** Soybean transformation: Technologies and progress. *In* Verma, D.P.S. and R.C. Shoemaker (*Eds.*). Soybean: Genetics, Molecular Biology, and Biotechnology. Biotechnology in Agriculture No. 14. CAB International.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller, and K. Ojima. 1968.** Nutrient requirements of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- Gunawan, L.W. 1992.** Teknik kultur jaringan tumbuhan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor. hlm. 49-54.

- Hinchee, M.A.W., D.V. Connor-Ward, C.A. Newell, R.E. Mc Donell, S.J. Sato, C.S. Gasser, D.A. Fischhoff, R.T. Fraley, and R.B. Horsch. 1988.** Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium* mediated DNA transfer. *Bio/Technology* 6:915-922.
- Langridge, W.H.R. and A.A. Szalay. 1985.** Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in the soybean *Glycine max*. *Plant Cell Report* 4:344-347.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Pardal, J.P., 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.
- Pardal, J.P., D.R. Untari, A. Sisharmini, D. Rijadi, dan M. Herman, 1997.** Regenerasi kedelai secara *in vitro*. *Dalam* Moeljopawiro, S., M. Herman, S. Saono, I. Mariska, B. Purwantara, dan H. Kasim (*Eds.*). *Prosiding Seminar Perhimpunan Bioteknologi Pertanian Indonesia*. Surabaya, 12-14 Maret 1997. hlm. 27-38.
- Parrot, W.A., M.A. Bailey, R.E. Durham, and H.V. Mathews. 1992.** Tissue culture and regeneration in legumes. *In* Moss, J.P. (*Ed.*). *Biotechnology and Crop Improvement in Asia*. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru, Andhra Pradesh, India. p. 115-148.
- Pierik, R.L.M. 1987.** *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publisher Dordrecht, Boston, Lancaster. 344 p.
- Trijatmiko, K.R. dan Jumanto. 1996.** Regenerasi tanaman kedelai (*Glycine max* [L.] Merrill) melalui embriogenesis somatik. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 1(2):7.
- Wattimena, G.A. 1988.** *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor. hlm. 8-18.