

SELEKSI *IN VITRO* EKSPLAN SETENGAH BIJI KEDELAI VARIETAS TAHAN TANAH KERING MASAM MENGGUNAKAN KANAMISIN

Aisyah[✉] YU Anggraito

Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Negeri Semarang, Indonesia

Info Artikel

Sejarah Artikel:
Diterima Februari 2015
Disetujui Maret 2015
Dipublikasikan April 2015

Keywords:
Seleksi In Vitro, Glycine max L., Kanamisin

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi yang optimal untuk seleksi *in vitro* kedelai varietas tahan tanah kering masam dan mengetahui respon pertumbuhan kedelai varietas tahan tanah kering masam terhadap berbagai konsentrasi antibiotik kanamisin. Jenis eksplan yang digunakan adalah setengah biji. Rancangan penelitian yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap dengan dua faktor yaitu konsentrasi kanamisin (0 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, dan 200 mg/L), dan varietas kedelai yang tahan tanah kering masam (Gepak kuning, Tanggamus, Gema, Grobogan, dan Burangrang). Parameter yang diukur adalah hari muncul tunas, jumlah eksplan yang tumbuh tunas, jumlah tunas yang tumbuh dan jumlah eksplan yang hidup. Data dianalisis menggunakan Anava dua jalur dan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi kanamisin optimal berdasarkan LD_{50} (*Lethal Dosis 50%*) untuk setiap varietas memiliki sensitivitas yang berbeda. Varietas Gema, Gepak Kuning dan Tanggamus pada 150 mg/L, varietas Grobogan pada 100 mg/L, sedangkan varietas Burangrang sensitif pada konsentrasi 200 mg/L. Semakin meningkatnya konsentrasi kanamisin menyebabkan penurunan jumlah eksplan hidup, jumlah tunas dan eksplan yang membentuk tunas, serta penundaan munculnya tunas.

Abstract

This research aimed to determine the optimal concentration for in vitro selection of dry acid soil resistance soybean variety and evaluate the growth response of dry acid soil resistance soybean variety to various concentrations of the kanamycin antibiotic. The half-seed explants were used. The research used completely randomized design with two factors: the concentration of kanamycin (0 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, and 200 mg/L), and soybean varieties which are resistant to dry acid soil (Gepak kuning, Tanggamus, Gema, Grobogan, and Burangrang). Parameters measured were: the emerging shoot day, number of explants emerging shoots, number of shoots, and the number of survive explants. Data were analyzed used two-way ANOVA and Duncan test. The result of research showed that optimal concentration of kanamycin based on LD_{50} (Lethal Dose 50%) in each variety were different. Gema, Gepak Kuning, and Tanggamus variety were 150 mg/L, Grobogan variety in 100 mg/L, while Burangrang variety has its sensitivity on concentration 200 mg/L. The increasing of kanamycin concentration caused a decrease in the number of survive explants, the number of shoots, and explants forming shoots, and delaying of shoots emerging.

© 2015 Universitas Negeri Semarang

[✉] Alamat korespondensi:
Gedung D6 Lantai 1, Kampus Unnes Sekaran,
Gunungpati, Semarang, 50229
E-mail: aisyahthaf@rocketmail.com

ISSN 0215-9945

PENDAHULUAN

Kedelai adalah komoditas utama kacang-kacangan, memiliki kandungan protein nabati tinggi dan merupakan andalan pangan Indonesia yang mendukung ketahanan pangan nasional. Kebutuhan kedelai terus meningkat seiring dengan meningkatnya permintaan untuk bahan industri pangan. Biji kedelai digunakan sebagai bahan pembuatan tempe, tahu, susu kedelai, tauco, dan olahan kedelai lainnya. Bertambahnya jumlah penduduk Indonesia juga menyebabkan kebutuhan kedelai meningkat seiring berkembangnya industri pangan (Rukmana & Yuniarsih 2009).

Meningkatnya kebutuhan kedelai tidak searah dengan produksi kedelai dalam negeri. Pada tahun 2012 kebutuhan kedelai di Indonesia mencapai 2,4 juta ton, namun produksi kedelai dalam negeri hanya dapat mencukupi 30% (779.800 ton) dari kebutuhan tersebut, dan sisanya 70% (1,25 juta ton) harus impor (BPS 2012). Untuk menekan laju impor kedelai dapat diupayakan melalui berbagai strategi, yaitu peningkatan produktivitas, perluasan areal tanam, peningkatan dan efisien produksi. Penggunaan varietas unggul dan penerapan teknologi budidaya dapat meningkatkan produktivitas kedelai dengan laju peningkatan 1,03% per tahun (Litbang Pertanian 2015).

Lahan pertanian di Indonesia semakin menyempit dikarenakan banyaknya lahan yang digunakan sebagai pemukiman, perkantoran maupun yang lainnya. Lahan pertanian terdiri dari lahan optimal yang tergolong subur dan lahan sub optimal dengan kendala agronomis yang beragam. Penerapan teknologi budidaya pertanian mendominasi pada lahan optimal, sedangkan lahan sub optimal kurang dimanfaatkan. Oleh karena itu, untuk memenuhi kebutuhan kedelai, perluasan area tanam lebih diarahkan ke lahan sub optimal atau lahan marginal seperti lahan masam, lahan kering, atau lahan yang kesuburannya rendah (Savitri 2010). Menurut data BBSDL (2013) Indonesia mempunyai lahan marginal yang cukup luas, diantaranya adalah lahan kering masam dengan luasan mencapai \pm 102,8 juta hektar. Lahan kering masam 67,5% dari luas total lahan pertanian tersebar di luar Jawa, diantaranya Kalimantan, Sumatra, Sulawesi, dan Papua. Lahan kering masam di Jawa diantaranya di daerah

Grobogan, Banyuwangi, Cisarua, Mojokerto, dan Bantul (Mulyani 2006). Namun pengembangan pertanian di lahan kering masam mempunyai banyak kendala karena kondisi lingkungan yang kurang optimal (Harsono 2008).

Permasalahan yang dihadapi dalam budidaya kedelai di tanah masam adalah berkurangnya hasil produksi akibat lingkungan yang kurang optimal karena pH rendah, keracunan Al, dan rendahnya unsur hara di dalam tanah (Agustina 1990). Upaya mempercepat pemulihan lahan kering masam sudah banyak dilakukan menggunakan berbagai cara, diantaranya dengan bahan amelioran seperti kapur. Namun ameliorant umumnya masih bersifat sementara. Pengapuran area tanam membutuhkan biaya yang mahal, serta menyebabkan pepadatan tanah dan pencucian. Oleh karena itu, mengembangkan varietas kedelai yang tahan tanah kering masam merupakan cara yang lebih tepat (Mariska *et al.* 2004). Untuk mendapatkan varietas kedelai yang tahan tanah kering masam dapat dilakukan dengan pemuliaan tanaman menggunakan teknik transformasi genetik. Teknik transformasi genetik ada dua cara yaitu transformasi genetik secara langsung dengan *particel bombardment* dan transformasi genetik menggunakan perantara *Agrobacterium* (Acquaah 2007).

Teknik transformasi genetik dengan *Agrobacterium* terdiri dari beberapa tahap yaitu infeksi, kokultivasi, seleksi, regenerasi, dan aklimatisasi (Hoa *et al.* 2008). Seleksi terhadap sel-sel transforman merupakan faktor kunci dalam keberhasilan metode yang dikembangkan untuk transformasi genetik. Seleksi bertujuan untuk memisahkan sel transforman dan sel non transforman. Seleksi sel-sel transforman dilakukan secara *in vitro* menggunakan antibiotik sebagai agen seleksi (Arencibia 2000).

Antibiotik kanamisin biasa digunakan sebagai agen seleksi pada tahap seleksi dalam transformasi tanaman (Chi-Manzanero *et al.* 2010). Pada proses transformasi, gen resistensi antibiotik yang digunakan sebagai gen penanda seleksi disisipkan ke dalam vektor ekspresi. Gen *npt2* mengkode enzim *neomycin phosphotransferase2*, yang secara ekstensif digunakan sebagai gen penanda seleksi. Enzim *neomycin phosphotransferase2* dapat mendetoksifikasi kanamisin dengan memfosforilasi gugus hidroksi dari

kanamisin (Miki & Mchugh 2004). Banyak vektor ekspresi yang mengandung gen resistensi kanamisin antara lain pG10-90 mengandung gen *npt2* untuk seleksi tembakau (Garcia-Almodofar *et al.* 2013), vektor ekspresi pBILec-GFP-FAD2 yang membawa gen *npt2* untuk transformasi kedelai kultivar *Jilin 3* (Chen *et al.* 2011), p35SGUSintnptII untuk transformasi kedelai NARC-4 dengan perantara *Agrobacterium* (Zia *et al.* 2010).

Kanamisin adalah jenis antibiotik aminoglikosida yang struktur kimianya terdiri atas satu deoxystreptamin dan dua unit glukosamin (Yu *et al.* 2003). Kanamisin berperan sebagai agen penyeleksi karena dapat membunuh sel tanaman yang tidak diinginkan melalui penghambat pertumbuhan sel tanaman dengan mengikat ribosom sub unit 40S sehingga menghambat inisiasi translasi plastid. Sel tanaman yang ditransformasi dengan gen *npt2* dapat mendetoksifikasi kelompok antibiotik dalam medium seleksi (Zhang *et al.* 2001). Famili kacang-kacangan mempunyai ketahanan alami terhadap antibiotik aminoglikosida seperti kanamisin (Christou 1994).

Ada beberapa persyaratan yang perlu diperhatikan dalam melakukan transformasi genetik, diantaranya adalah metode seleksi yang efisien (Acquaah 2007). Seleksi pra transformasi dapat memudahkan orang yang akan melakukan transformasi, dengan mengetahui konsentrasi antibiotik yang optimal sehingga proses seleksi pasca transformasi menjadi efisien. Konsentrasi kanamisin yang terlalu rendah menyebabkan sel tanaman non transforman ada yang masih dapat tumbuh dalam medium seleksi. Konsentrasi kanamisin terlalu tinggi bisa menyebabkan sel tanaman transforman mati. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui konsentrasi kanamisin yang optimal pada sel tanaman yang belum ditransformasi, agar proses-proses sebelum seleksi dalam transformasi menjadi tidak sia-sia.

METODE PENELITIAN

Biji kedelai (*Glycine max* L.) diperoleh Balai Penelitian Kacang-kacangan dan Umbi-umbian

(BALITKABI) Malang. Di dalam LAF (*Laminar Air Flow*) biji disterilisasi dengan alkohol 70% selama 10 menit, lalu digojok dengan 100% larutan klorok (5.25% NaClO) selama 10 menit. Biji dibilas dengan air steril sebanyak tiga kali. Kemudian biji diimbibisi selama 24 jam. Eksplan yang digunakan adalah setengah biji. Untuk memperoleh eksplan setengah biji, biji kedelai dibelah menjadi dua kemudian axis embrio dan kulit arinya dihilangkan. Eksplan ditanam dalam media Murashige Skoog (MS) padat yang ditambah BAP 4 mg/L, vitamin B5 1 mg/L dan berbagai konsentrasi antibiotik kanamisin (0 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, dan 200 mg/L). Antibiotik kanamisin disterilkan dengan membran filter milipor berukuran 0,22 mikrometer.

Parameter yang diamati adalah hari muncul tunas, jumlah eksplan yang tumbuh tunas, jumlah tunas yang tumbuh dan jumlah eksplan yang hidup. Perhitungan dimulai sejak awal penanaman. Tunas yang dihitung minimal setinggi 0,5 cm. Eksplan yang hidup adalah eksplan yang berwarna hijau. Pengamatan dilakukan selama satu bulan.

Data dianalisis dengan ANAVA dua jalur menggunakan perangkat SPSS versi 21 pada aras probabilitas 5% untuk melihat pengaruh perlakuan. Apabila hasil uji ANAVA dari setiap perlakuan signifikan, maka dilakukan uji lanjut menggunakan DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) dengan tingkat kepercayaan 95% untuk menganalisis perbedaan pengaruh antar kombinasi taraf perlakuan (Gomez & Gomez 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data hasil pengamatan hari munculnya tunas kedelai varietas tahan tanah kering masam pada perlakuan cekaman antibiotik kanamisin selama 1 bulan disajikan dalam Tabel 1. Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa semakin meningkatnya konsentrasi kanamisin, varietas mengalami penundaan munculnya tunas akibat toksisitas antibiotik terhadap eksplan. Saat mengalami cekaman antibiotik, untuk pertahanan eksplan berusaha mengatasi cekaman terlebih dahulu.

Tabel 1. Hari munculnya tunas setelah perlakuan kanamisin selama 1 bulan

| Varietas | Kanamisin (mg/L) | | | | |
|--------------|------------------|----|-----|-----|-----|
| | 0 | 50 | 100 | 150 | 200 |
| Gema | 8 | 11 | 11 | 11 | 14 |
| Gepak Kuning | 8 | 10 | 12 | 16 | - |
| Grobogan | 10 | 13 | 14 | 18 | - |
| Tanggamus | 9 | 11 | 12 | 13 | 16 |
| Burangrang | 6 | 9 | 10 | 10 | 11 |

Keterangan: Jumlah eksplan awal setiap perlakuan adalah 15.

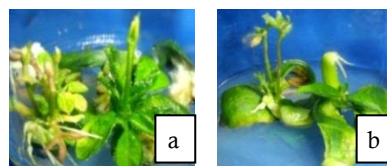
Jumlah Tunas

Meningkatnya konsentrasi kanamisin menyebabkan jumlah tunas yang terbentuk dari kelima varietas kedelai tahan tanah kering masam mengalami penurunan (Tabel 2). Hal ini dikarenakan kanamisin menghambat induksi tunas. Cekaman antibiotik menyebabkan eksplan menanggapi cekaman terlebih dahulu dibandingkan dengan kemampuan untuk membentuk tunas, meskipun dalam media sudah ditambahkan BAP 4 ppm. Berdasarkan perhitungan jumlah tunas, konsentrasi kanamisin 100 mg/L dapat dikatakan sebagai konsentrasi kanamisin yang optimal untuk seleksi *in vitro* kedelai varietas tahan tanah kering masam. Karena meskipun eksplan mengalami cekaman antibiotik yang ketat, eksplan dari beberapa varietas banyak yang mampu membentuk tunas dengan jumlah yang tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 0 mg/L yang digunakan sebagai kontrol. Tunas dari varietas Burangrang dengan konsentrasi kanamisin 0 mg/L dan 100 mg/L terlihat pada Gambar 1.

Tabel 2. Jumlah tunas setelah perlakuan kanamisin selama 1 bulan

| Varietas | Kanamisin (mg/L) | | | | |
|--------------|------------------|----|-----|-----|-----|
| | 0 | 50 | 100 | 150 | 200 |
| Gema | 5 | 3 | 4 | 3 | 1 |
| Gepak Kuning | 2 | 7 | 4 | 1 | 0 |
| Grobogan | 3 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| Tanggamus | 5 | 4 | 6 | 3 | 1 |
| Burangrang | 12 | 2 | 7 | 1 | 1 |

Keterangan: Jumlah eksplan awal setiap perlakuan adalah 15

**Gambar 1.** Tunas yang tumbuh dari beberapa varietas kedelai dalam berbagai konsentrasi kanamisin (a) Burangrang pada konsentrasi kanamisin 0 mg/L. (b) Burangrang pada konsentrasi kanamisin 100 mg/L.

Jumlah Eksplan yang Bertunas

Berdasarkan pengamatan terhadap jumlah eksplan yang mampu membentuk tunas selama perlakuan 1 bulan dalam cekaman antibiotik kanamisin, diperoleh data seperti pada Tabel 3. Tabel 3 menunjukkan bahwa antibiotik kanamisin menghambat eksplan untuk membentuk tunas. Semakin meningkat konsentrasi kanamisin, eksplan yang bertunas semakin sedikit. Konsentrasi kanamisin yang optimal pada parameter jumlah eksplan yang mampu bertunas sama dengan konsentrasi kanamisin yang optimal pada parameter jumlah tunas. Toksisitas antibiotik kanamisin menyebabkan eksplan lebih merespon cekaman dibandingkan dengan kemampuan untuk membentuk tunas.

Tabel 3. Jumlah eksplan yang mampu membentuk tunas selama 1 bulan

| Varietas | Kanamisin (mg/L) | | | | |
|--------------|------------------|----|-----|-----|-----|
| | 0 | 50 | 100 | 150 | 200 |
| Gema | 7 | 6 | 8 | 3 | 1 |
| Gepak Kuning | 2 | 5 | 4 | 2 | 0 |
| Grobogan | 3 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Tanggamus | 6 | 3 | 7 | 3 | 1 |
| Burangrang | 5 | 2 | 7 | 1 | 1 |

Keterangan: jumlah eksplan awal setiap perlakuan adalah 15.

Kelima varietas kedelai tahan tanah kering masam menunjukkan respon yang berbeda dalam hal induksi tunas, walaupun sudah ditambahkan BAP 4 mg/L. Hal ini karena setiap varietas memiliki daya regenerasi yang berbeda. Menurut Yusnita (2003) genotip merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur *in vitro*. Hormon endogen yang dimiliki oleh eksplan dari berbagai varietas kedelai berbeda-beda, sehingga hormon eksogen yang ditambahkan belum

tentu mencukupi untuk merangsang tumbuhnya tunas atau bahkan berlebihan sehingga bersifat toksik. Oleh karena itu kelima varietas kedelai menunjukkan respon yang berbeda terhadap penambahan BAP 4 mg/L.

Pertumbuhan dan morfogenesis tanaman secara *in vitro* dikendalikan oleh keseimbangan hormon yang ada dalam eksplan. Hormon pada eksplan bergantung pada hormon endogen dan hormon eksogen yang diserap dari media tumbuh. Penambahan hormon eksogen akan berpengaruh terhadap jumlah dan kerja hormon endogen untuk mendorong pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Proses pembentukan tunas dalam kultur jaringan dibutuhkan hormon sitokinin yang lebih banyak dibandingkan hormon auksin (Zulkarnain 2009).

Jumlah Eksplan yang Hidup

Data pengamatan jumlah eksplan yang hidup dapat dilihat pada Tabel 4. Data di Tabel 4 menunjukkan bahwa toksisitas antibiotik kanamisin terhadap kelima varietas kedelai yang diuji meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi antibiotik kanamisin. Toksisitas antibiotik menyebabkan kematian sel pada eksplan (nekrotik). Semakin bertambahnya konsentrasi kanamisin, semakin sedikit jumlah eksplan yang hidup. Hal ini dikarenakan kanamisin menghambat sintesis protein, akhirnya eksplan mengalami kematian (nekrotik) (Mulwa *et al.* 2007). Pada tahap seleksi, LD₅₀ dapat sebagai patokan dalam penentuan konsentrasi optimal. Berdasarkan LD₅₀ setiap varietas memiliki sensitivitas yang berbeda-beda. Varietas Gema, Gepak Kuning dan Tanggamus sensitif pada konsentrasi 150 mg/L, varietas Grobogan sensitif pada konsentrasi 100 mg/L, sedangkan varietas Burangrang sensitif pada konsentrasi 200 mg/L.

Tabel 4. Jumlah eksplan yang hidup setelah perlakuan kanamisin selama 30 hari

| Varietas | Kanamisin (mg/L) | | | | |
|--------------|------------------|----|-----|-----|-----|
| | 0 | 50 | 100 | 150 | 200 |
| Gema | 13 | 12 | 10 | 8 | 2 |
| Gepak Kuning | 15 | 11 | 10 | 5 | 1 |
| Grobogan | 15 | 11 | 7 | 0 | 0 |
| Tanggamus | 15 | 13 | 12 | 7 | 6 |
| Burangrang | 15 | 13 | 11 | 10 | 9 |

Keterangan: jumlah eksplan awal untuk setiap perlakuan adalah 15.

Selain nekrotik, kanamisin juga menyebabkan eksplan dan tunas yang tumbuh mengalami klorosis. Hal ini dikarenakan penghambatan proses metabolisme sel tumbuhan. Penghambatan kanamisin terhadap proses metabolisme dengan cara antibiotik kanamisin mengikat ribosom 40S sehingga menyebabkan kesalahan translasi mRNA. Pada tumbuhan, ribosom 40S berada di organel kloroplas dan mitokondria (Bardhan 2012). Pada kloroplas pengikatan antibiotik pada ribosom 40S menyebabkan rusaknya klorofil dan menghambat pembentukan asam amino. Rusaknya klorofil mengakibatkan eksplan dan tunas yang dihasilkan menjadi berwarna keputihan (Bahrapour *et al.* 2012).

Menurut Sundhar dan Shaktivel (2008) antibiotik menempati situs pemanjangan polipeptida pada ribosom, sehingga pemanjangan polipeptida dan proses sintesis protein terhenti. Bila sintesis protein terhenti, maka proses metabolisme juga terhenti. Hal ini dikarenakan dalam proses metabolisme memerlukan enzim sebagai katalisator. Akibatnya sel-sel dalam eksplan mengalami kematian (nekrotik). Berbagai varietas kedelai tahan tanah kering masam pada konsentrasi kanamisin 150 ppm terlihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Berbagai varietas kedelai tahan tanah kering masam pada konsentrasi kanamisin 150 ppm (a) varietas Grobogan pada kanamisin 150 ppm, eksplan nekrotik. (b) varietas Gepak Kuning pada kanamisin 150 ppm, tunas klorosis. (c) varietas Tanggamus pada kanamisin 150 ppm, eksplan klorosis.

Eksplan yang mampu bertahan hidup adalah eksplan yang tahan terhadap toksisitas antibiotik kanamisin. Hal ini dikarenakan eksplan kedelai setengah biji mempunyai sistem detoksifikasi alami terhadap antibiotik kanamisin. Proses detoksifikasi kanamisin adalah dengan cara fosforilasi gugus

hidroksil dari kanamisin sehingga membentuk kanamisin 3'-fosfat (Kestell 2012).

SIMPULAN

Berdasarkan parameter jumlah tunas dan jumlah eksplan yang bertunas, konsentrasi kanamisin yang optimal untuk seleksi *in vitro* kedelai varietas tanah kering masam adalah 100 mg/L. Berdasarkan LD₅₀ (Lethal Doses 50%) setiap varietas memiliki sensitivitas yang berbeda, varietas Burangrang sensitif pada konsentrasi 200 mg/L, varietas Gema, Gepak Kuning, dan Tanggamus sensitif pada konsentrasi 150 mg/L, sedangkan varietas Grobogan sensitif pada konsentrasi 100 mg/L.

Semakin meningkatnya konsentrasi kanamisin menyebabkan eksplan mengalami penundaan munculnya tunas, penurunan jumlah tunas, dan jumlah eksplan membentuk tunas, serta penurunan jumlah eksplan yang hidup.

DAFTAR PUSTAKA

- Acquaah G. 2007. *Principle of Plant Genetic and Breeding*. Australia: Blackwell
- Agustina S. 1990. *Nutrisi Tanaman*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Arencibia AD. 2000. *Plant Genetic Engineering Toward The Third Millennium*. Cuba: Elseveir.
- Bahrapour S, Majid S, Bahram B. 2012. Assessment and determination of optimum concentration of streptomycin and kanamycin as selective agents in peppermint (*Mentha piperita* L.) transformation. *Agro Plant Prod*. 3(6) : 196-201.
- Bardhan SK, Sharma C, & Srivastava DK. 2012. Effect of kanamycin on growth of hypocotyl tissue of brinjal (*Solanum melongena* L. Cv. Pusa Purple Long). *Cell Tissue Res*.12(3): 3383-3386.
- [BPS] Badan Pusat Statistik No.43/07/Th.XV, 2 Juli 2012. Produksi padi, jagung, dan kedelai (Angka Tetap 2011 dan Angka Ramalan 2012). www.deptan.go.id. [diakses tanggal 10 Maret 2013]
- Chen W, Song K, Cai Y, Li W, Liu B & Liu L. 2011. Genetic modification of soybean with a novel grafting technique: downregulating the *FAD2-1* gene increases oleic acid content. *Plant Mol Biol Rep*. 29: 866-874.
- Chi-Manzanero BH, POM Acereto-Escoffie, E Castano, LC Rodriguez-Zapata. 2010. Optimal concentration of kanamycin as a selective agent for the transformation of *Musa* cv "Grand Nain". *Univ Y Ciencia Trop Humedo* 26(1) : 115-119.
- Christou P. 1994. The biotechnology of crop legumes. *Euphytica*. 74: 165-185.
- Garcia-Almodovar RC, Petri C, Padilla IMG, & Burgos L. 2013. Combinat ion of site-specific recombinat ion and a conditional selective marker gene allows for the production of marker-free tobacco plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 10(1): 1-11.
- Gomez KA dan AA Gomez. 1995. *Prosedur Statistik untuk Penelitian Pertanian* Ed.2. Terjemahan Endang S. & Justika S. B. Jakarta: UI Press.
- Harsono A. 2008. Strategi pencapaian swasembada kedelai melalui perluasan areal tanam di lahan kering masam. *Iptek Tanaman Pangan*. 3(2): 244-257.
- Hoa TTC, Hai TV & Thang LC. 2008. Transformation efficiencies of the soybean variety PC 19 [*Glycine max* (L.) Merrill] using *Agrobacterium tumefaciens* and the cotyledonary node method. *Omonrice* 16: 1-8.
- Kestell D, Lai S, Liang G, Waters S, Wladichuk A. 2002. Effects of kanamycin and sterptomycin on the macromolecular composition of streptomycin-sensitive and resistant *Escherichia coli* strains. *J Exp Microbio Immunol*. 2:103-108.
- Litbang Pertanian. 2015. Prospek dan arah pengembangan agribisnis kedelai. <http://www.litbang.pertanian.go.id/special/komoditas/files/0107-KEDELAI.pdf>. (diakses tanggal 23 Maret 2015)
- Mariska I, Sjamsudin E, Sopandie D, Hutami S, Husni A, Kosmiatin M, & Vivi NA. 2004. Peningkatan ketahanan tanaman kedelai terhadap aluminium melalui kultur *in vitro*. *J Litbang Pertanian*. 23(2): 46-52.
- Miki B & Mchugh S. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: application, alternatives and biosafety. *J Biotech Rev*. 107: 193-232.
- Mulwa RSM, Norton MA, Farrand SK & Skirvin RM. 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of transgenic 'Chancellor' wine grape plants expressing the *tfDA* gene. *Vitis*. 46(3): 110-115.
- Mulyani A. 2006. *Perkembangan Potensi Lahan Kering Masam*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumberdaya Lahan Pertanian. Sinar Tani Edisi 24-30 Mei 2006.
- Rukmana R. & Yuniarsih Y. 2009. *Kedelai, Budidaya dan Pasca Panen*. Yogyakarta: Kanisius.
- Savitri E.S. 2010. Pengujian *in vitro* beberapa varietas kedelai (*Glycine max* L. Merr) toleran kekeringan menggunakan polyethylene glikol (PEG) 6000 pada media padat dan cair. *El-Hayah* 1(2): 9-13.
- Sundhar IK, Sakhtivel N. 2008. Advances in selectable marker genes for plant transformation. *J Plant Physiol* 165: 1698-1716.
- Yu TA, Shyi-Dong Y. & Jiu-Sherg Y. 2003. Comparison of the effects of kanamycin and geneticin on regeneration of papaya from root tissue. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*. 74: 169-178.
- Yusnita. 2003. *Kultur Jaringan: Cara Memperbanyak Tanaman secara Efisien*. Jakarta: Agromedia Pustaka
- Zhang BH, Fang L, Zhi-Hong L, Hong-Mei W. & Chang-Bing Y. 2001. Effects of kanamycin on tissue culture and somatic

- embryogenesis in cotton. *Plant Growth Regu* 33: 137–149.
- Zia M, Rizvi ZF, Riaz-Ur-Rehman & Chaudhary MF. 2010. *Agrobacterium* mediated transformation of soybean (*Glycine max* L.): Some conditions standardization. *Pak J Bot.* 42(4): 2269-2279.
- Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman*. Jakarta: Bumi aksara.