

Regenerasi Kedelai melalui Kultur Epikotil dan Teknik Aklimatisasi

Slamet, Saptowo J. Pardal, M. Herman, dan Wartono

Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Jl. Tentara Pelajar 3A Bogor 16111

ABSTRACT. Soybean Plant Regeneration from Epicotyl Culture and Its Acclimatization Technique. Regeneration of induced callus growth into whole plants is an important step in genetic transformation. Soybean is a recalcitrant plant regeneration process which can not always be repeated often (irreproducible). Therefore, the standard soybean callus regeneration method is difficult to obtain. This research was conducted to obtain a suitable medium for the regeneration and acclimatization techniques for soybean plant. The regeneration experiment used soybean sprouts of Sindoro cultivar on five kinds of media, with MS and B5 basal media plus a few types and concentrations of growth regulators, arranged on completely randomized design with three replications. Each replication consisted of five explants per bottle. Observations were made on the number of explants forming shoots, number of shoots of each explant, number of roots, and shoots length. Results showed that the culture of epicotyl had a high regeneration rate (> 90%), and B5 media was the most suitable for plant regeneration of callus derived from epicotyl explants of soybean. Acclimatization of plantlet derived from epicotyl and one putative transgenic (TO) plant resulted in 99% degree of success. Plantlets from epicotyl culture of soybean Sindoro cultivar and putative transgenic plants were successfully grown in the greenhouse and subsequently produced pods.

Keywords: Soybean, regeneration, epicotyl, acclimatization

ABSTRAK. Regenerasi tanaman merupakan tahapan penting dalam transformasi genetik. Kedelai tergolong tanaman rekalsitran, sehingga regenerasi sering tidak dapat diulang (*irreproducible*), karena itu sulit mendapatkan metode regenerasi kedelai yang baku. Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan media yang cocok untuk regenerasi dan penguasaan teknik aklimatisasi pada tanaman kedelai secara cepat dan efisien. Penelitian terdiri atas dua tahap: Tahap pertama regenerasi. Pada percobaan ini digunakan bahan kecambah kedelai Sindoro dan lima macam media dengan media dasar MS dan B5 yang ditambah beberapa jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh. Percobaan menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga ulangan, tiap ulangan lima eksplan per botol. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah eksplan yang membentuk tunas, jumlah tunas tiap-tiap eksplan, jumlah akar dan tinggi tunas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kultur epikotil memiliki daya regenerasi yang tinggi (>90%), dan media B5 paling cocok untuk regenerasi berasal dari eksplan epikotil kedelai. Tahap kedua aklimatisasi menggunakan planlet hasil dari percobaan pertama, dan putatif transgenik (T_0). Pengamatan dilakukan terhadap jumlah tanaman hidup. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanaman hidup dari kultur epikotil maupun dari tanaman putatif transgenik kedelai mencapai 99,9% dan selanjutnya tanaman berhasil dirawat di rumah kaca hingga pemanenan polong.

Kata kunci: Kedelai, regenerasi, epikotil, aklimatisasi

Perakitan varietas unggul kedelai dengan pendekatan teknik rekayasa genetik masih terhambat oleh (1) penguasaan teknik regenerasi yang kurang efektif dan kurang efisien karena sulit diulang, keberhasilan transformasi sangat rendah, berkisar antara 3-5% (Pardal 2002), dan (2) kegagalan dalam aklimatisasi tanaman merupakan masalah yang banyak dijumpai di laboratorium di Indonesia saat ini. Permasalahan tersebut sering merupakan pangkal dari kegagalan dalam perakitan tanaman kedelai transgenik.

Dalam kegiatan transformasi genetik pada tanaman diperlukan teknik regenerasi planlet yang baku, teknik transformasi yang efektif dan efisien (Herman 1996), dan penguasaan teknik aklimatisasi tanaman. Regenerasi tanaman secara umum dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu organogenesis dan embriogenesis. Organogenesis adalah pembentukan organ tubuh tanaman secara langsung atau morfogenesis (Pardal 2002) dan secara tidak langsung melalui fase kalus (Purnamaningsih 2002). Embriogenesis somatik adalah regenerasi tanaman melalui pembentukan struktur serupa embrio dari sel-sel somatik, baik langsung dengan membentuk embrio, maupun tidak langsung yang diawali dengan induksi masa kalus (Purnamaningsih 2002).

Tiga faktor penting yang mempengaruhi regenerasi tanaman adalah genotipe, sumber eksplan, dan kondisi kultur termasuk lingkungan dan media kultur yang digunakan (Ritchie and Hodges 1993). Untuk keberhasilan regenerasi tanaman kedelai melalui embriogenesis somatik diperlukan varietas yang responnya tinggi. Namun varietas kedelai Indonesia yang dilaporkan responsif lebih bersifat sporadik, sehingga sulit untuk diulang. Sulitnya meregenerasikan tanaman kedelai tersebut karena kedelai tergolong dalam kelompok tanaman dikotil rekalsitran (Hutami *et al.* 1999; Pardal 2002).

Keberhasilan regenerasi kedelai mencapai 25-45% dengan menggunakan eksplan embriyo, kotiledon muda dan tua (Lippmann and Lippmann 1993; Kurniawan dan Jumanto 1996; dan Husni *et al.* 2004). Sistem regenerasi kedelai dapat diperbaiki hingga lebih 87% dari fase embrio somatik yang diregenerasikan

menjadi planlet (Widoretno *et al.* 2003). Namun aklimatisasi tanaman kedelai yang berasal dari hasil regenerasi embrio somatik masih sulit dilakukan, karena jaringannya rapuh dan sistem pembuluh belum terbangun sempurna (Gunawan 1988).

Pardal *et al.* (1997) melaporkan hasil aklimatisasi dari percobaan yang diawali dengan merendam planlet ke dalam air selama 5 hari, selanjutnya dipindahkan pada media tanah-pasir (1:1) dan berhasil diperoleh beberapa tanaman hidup dari planlet hasil regenerasi biasa (non-transgenik). Pada tahun 1999 percobaan aklimatisasi langsung menggunakan media tanah dan kompos (1:1), di tempat yang tidak kena matahari langsung dan diberi sungkup plastik, berhasil memperoleh tanaman hidup 25% (Pardal *et al.* 1999).

Pada tahun 2005 percobaan aklimatisasi kedelai diulang dari bibit kultur hasil regenerasi *in vitro* biasa dan hasil transformasi dari dua kultivar Wilis dan Tidar yang dilakukan melalui sistem hidroponik, namun tingkat keberhasilannya sangat rendah yaitu pada planlet nontransformasi sebesar 10% dan 0,1% untuk planlet hasil transformasi (Pardal *et al.* 2005). Hal ini menunjukkan bahwa aklimatisasi tanaman kedelai dari regenerasi *in vitro* biasa maupun transgenik sangat sulit dilakukan, terlebih aklimatisasi kedelai hasil transformasi. Hal serupa juga dilaporkan oleh Husni *et al.* (2004) pada tanaman yang sama bahwa keberhasilan aklimatisasi, dari empat bibit somatik kedelai yang diaklimatisasi hanya 25% tanaman yang hidup, sama dengan hasil aklimatisasi kedelai yang dilakukan sebelumnya.

Epikotil adalah bagian dari axis atau pucuk kecambah, dimana jaringan meristematis yang terdapat sel meristem apeks maupun adventif, sebagai titik tumbuh tanaman yang mengendalikan pertumbuhan. Beberapa keuntungan yang dapat dipertimbangkan dalam regenerasi tanaman melalui kultur epikotil adalah lebih efektif karena daya regenerasinya tinggi, efisien karena dapat dilakukan dalam waktu singkat tidak melalui fase kalus, murah karena membutuhkan media yang sederhana tanpa ZPT, dan aklimisasinya cenderung mudah dilakukan karena sistem pembuluhnya terbangun lebih sempurna. Namun, potensi ini belum banyak dilaporkan atau dimanfaatkan pada tanaman kedelai. Karena itu, perlu dilakukan penelitian regenerasi kedelai melalui kultur epikotil dan teknik aklimatisasi.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan media yang cocok dalam meregenerasi eksplan yang berasal dari epikotil, dan penguasaan teknik aklimisasinya untuk mendukung perakitan tanaman kedelai transgenik.

BAHAN DAN METODE

Bahan berupa kecambah steril kedelai varietas Sindoro diperoleh dari biji kedelai yang terbebas dari serangan hama penyakit. Biji direndam dalam air detergent selama 5 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir/kran hingga bersih. Setelah itu, biji disterilisasi dengan ethanol 70% selama 1 menit, dan larutan bayclin 30% selama 25 menit, kemudian biji dibilas dengan air steril 3-5 kali. Biji dikecambahkan pada media B5 (Gamborg *et al.* 1968) padat sebanyak 15 biji per botol dan disimpan di rak kultur pada suhu kamar 25-27°C dengan intensitas cahaya 1300-2000 lux.

Kecambah umur 3-5 hari atau tinggi kecambah 2-6 cm (daun tunggal belum keluar dari celah kotiledon) diisolasi bagian epikotilnya dengan cara mengeluarkan kecambah dari dalam botol dan meletakkan pada cawan petri berlapis kertas saring steril. Bagian kotiledon dipotong satu per satu dengan pisau skalpel sehingga tertinggal hipokotil dan kuncup aksis yang terdiri atas sepasang daun tunggal dan sepasang kelopak tunas, dan dua inisial kuncup adventif. Kemudian sepasang daun tunggal, sepasang kelopak daun, dan dua kuncup adventif dibuka dengan cara dipotong menggunakan pisau skalpel (dibantu dengan mikroskop binokuler), sehingga hanya tertinggal daerah meristematis yang terdapat sel meristem apeks dan meristem adventif. Eksplan (epikotil) dipotong dengan ukuran 0,5 cm ± 1 mm, selanjutnya eksplan siap ditanam. Media yang digunakan terdiri atas lima macam yaitu MS0 (Murashige and Skoog 1962); MS + 0,5 mg/l kin + 01 mg/l GA3; MSB5 vit + 0,1 mg/l GA3; B5 + 1,2 mg/l BAP, dan B5 (Gamborg *et al.* 1968).

Percobaan menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga ulangan. Setiap ulangan terdiri atas lima eksplan per botol, masing-masing eksplan berbeda satu dengan lainnya. Subkultur dilakukan satu kali pada media yang sama hingga planlet cukup besar. Pengamatan pertumbuhan eksplan dilakukan dengan interval 5 hari, parameter yang diamati adalah persentase eksplan beregenerasi, jumlah tunas per eksplan, tinggi tunas, dan jumlah akar per eksplan.

Aklimatisasi Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan adalah bibit kultur (planlet) hasil regenerasi tanaman, dan bibit kultur (planlet) putatif transgenik (dari penelitian perakitan tanaman transgenik). Pengamatan dilakukan terhadap persentase tanaman hidup.

Bibit kultur (planlet) setinggi 5-6 cm diaklimatisasi dengan cara sebagai berikut: tiga hari sebelum bibit kultur dipindahkan ke media tanah, bibit diberi

perlakuan penyinaran matahari pagi hingga pukul 10.00 dan sore hari mulai pukul 15.00. Bibit kultur dicabut dari dalam botol menggunakan pinset, bibit ditempatkan pada saringan dan dicuci dengan air keran selama 3-5 menit hingga bibit terbebas dari sisa-sisa media. Setelah itu bibit dipindahkan ke pot plastik (volume 200 ml) yang diberi dua lubang dengan ukuran 0,5 x 0,5 cm yang berisi 2/3 media tanah kering dengan komposisi 5:1 (tanah : pupuk kandang). Pot yang berisi media tanah diairi dengan sistem imbibisi dengan merendam pot ke dalam bak berisi air dengan kedalaman 1-2 cm. Perendaman dilakukan hingga seluruh permukaan media tampak basah. Selanjutnya bibit ditanam dengan sedikit diangkat supaya akar tergerai, bagian akar bibit dibenamkan dengan menambahkan sepertiga media tanah dari volume pot yang tersisa, sehingga tanaman terbenam pada bagian pangkal batang saja. Sepertiga media tambahan berupa tanah kering segera disiram dengan sedikit air hingga permukaannya basah. Pot diletakkan di tempat teduh yang tidak terkena sinar matahari langsung, sampai terbentuknya tunas atau akar baru, selanjutnya tanaman dipindahkan dan dirawat di rumah kaca. Sungkup plastik berlubang diberikan pada pukul 11.00-15.00 ±30' selama 3 hari jika cuaca panas dan atau jika tanaman tampak layu. Pengairan dengan cara imbibisi pada minggu pertama dan kedua diberikan setelah 5-6 hari sekali, setelah tanaman agak besar frekuensi pengairan diberikan 3 hari sekali atau pengairan diberikan jika kondisi permukaan tanah tampak mengering.

Pemindahan (*transplanting*) II dilakukan setelah bibit berumur 1-1.5 bulan atau sistem perakarannya sudah kuat (akar tampak tumbuh tersusun seperti jaring pada dasar pot). Bibit dipindahkan ke pot besar dengan cara membalikkan pot dan menyangga dengan tangan, kemudian pot diangkat hati-hati agar akar tidak rusak. Bibit beserta media tanah dipindahkan ke pot besar yang berisi media tanah + pupuk kandang dengan perbandingan 5:1. Tanaman atau pot diletakkan ditempat teduh selama 1-3 hari, jika tanaman tidak layu tanaman langsung dipindahkan di tempat terang atau rumah kaca. Selanjutnya tanaman tetap dirawat (sesuai prosedur budi daya) hingga menghasilkan biji.

Penyiapan Tanah

Tanah diambil dari kebun dan dikeringanginkan, setelah agak kering tanah dihancurkan dan diayak atau tanpa ayak. Tanah dicampur dengan pupuk kandang hingga rata, selanjutnya tanah dijemur di bawah sinar matahari langsung selama 3-5 hari hingga benar-benar kering.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari lima macam media yang digunakan ternyata eksplan epikotil mempunyai daya regenerasi yang sangat tinggi, yaitu berkisar antara 93,3-100% dengan rata-rata 2,3-2,7 tunas per planlet yang dihasilkan.

Hasil pengamatan pada kultur umur 5 hari pertama menunjukkan eksplan yang dikulturkan pada media B5 tumbuh normal. Tunas tumbuh memanjang dan berakar. Pada media B5+ 1,2 mg/l BAP pada hari yang sama, kultur tumbuh tidak normal, sedikit memanjang dan tampak membesar, sehingga tampak kekar tanpa pertumbuhan akar dan tunas (tunas tidak berkembang). Kondisi ini berlangsung hingga pengamatan terakhir.

Setelah 10 hari, pertumbuhan kultur pada dua macam media (B5 dan B5 BAP 1,2 mg/l) tidak menunjukkan perubahan pertumbuhan. Akan tetapi setelah 15 hari, kultur tumbuh membentuk tunas-tunas baru. Tunas adventif utuh (bagian kelopak tidak terisolasi) tumbuh dominan dibanding tunas aksis maupun tunas adventif lainnya.

Tinggi Tunas

Pengamatan dan analisis statistik menunjukkan dari lima perlakuan media yang digunakan masing-masing memberikan pengaruh yang berbeda terhadap tinggi tunas yang dihasilkan (Gambar 1). Pertumbuhan tertinggi diperoleh dari media kombinasi MS yang diperkaya vitamin B5 dan hormon giberelin. Media ini cocok untuk pertumbuhan vertikal pada tunas kedelai karena media MS memiliki kadar garam yang lebih tinggi dibandingkan dengan media B5, sedangkan B5 vitamin merupakan kombinasi vitamin kadar tinggi, dan hormon giberelin berperan dalam memperpanjang sel.

Jumlah Tunas

Regenerasi eksplan epikotil lebih cocok pada medium tanpa penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT) auksin maupun sitokinin. Penambahan ZPT justru menunjukkan penghambatan tumbuh tanaman, kecenderungan penghambatan tumbuh tanaman semakin nyata ketika salah satu ZPT diberikan (Gambar 2). Hal tersebut diduga karena penambahan *single* ZPT justru mengganggu keseimbangan hormon endogen, sehingga pertumbuhan menjadi terhambat.

Sebaliknya, penambahan ZPT dalam kadar berimbang menunjukkan adanya pertumbuhan tunas secara normal, walaupun dalam perkembangan selanjutnya terjadi perbedaan kecepatan tumbuh tunas (tinggi tunas, jumlah tunas) dan jumlah akar.

Dari lima macam medium yang digunakan ternyata medium B5 paling cocok dalam pembentukan jumlah tunas. Hal ini diduga karena media B5 memiliki kadar nitrogen (NO₃) yang tinggi, yang berperan penting dalam pertumbuhan vegetatif tanaman.

Jumlah Akar

Pengaruh lima media kultur terhadap pertumbuhan akar kedelai Sindoro menunjukkan bahwa media B5 paling sesuai, hal ini ditunjukkan oleh jumlah akar yang mencapai rata-rata 4,5. Analisis statistik menunjukkan bahwa hasil pertumbuhan akar pada lima media berbeda nyata pada galat 0,05 (Gambar 3).

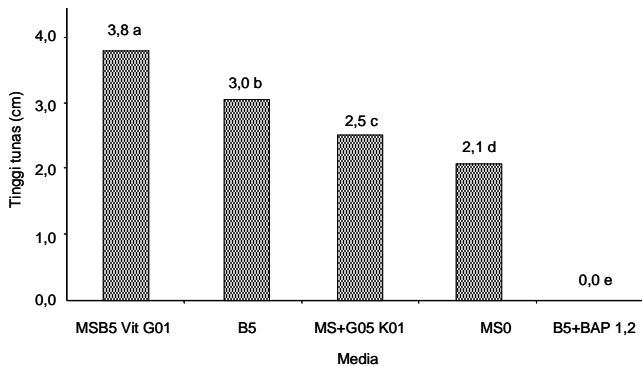
Daya Regenerasi

Hasil pengamatan terhadap daya regenerasi tunas menunjukkan bahwa eksplan epikotil kedelai Sindoro memiliki daya regenerasi yang sangat tinggi. Dari lima macam media yang digunakan, empat di antaranya

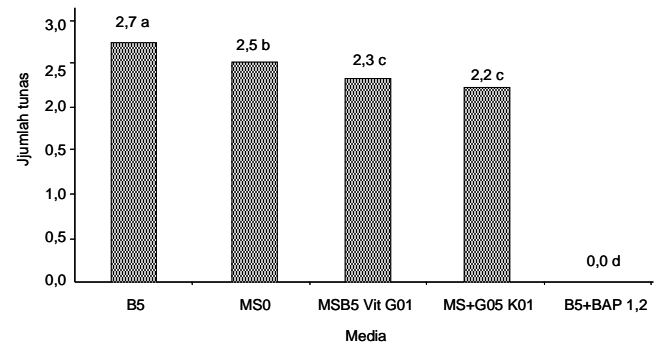
mampu menumbuhkan 93,3-100% eksplan membentuk tunas. Namun, pada medium B5 + BAP 1,2 mg/l persentase eksplan membentuk tunas sangat rendah. Analisis statistik terhadap empat media yang digunakan juga tidak signifikan terhadap persentase tumbuh eksplan, sebaliknya pada media B5+BAP 1,2 mg/l menunjukkan hasil yang signifikan pada level galat 0,05 dibandingkan dengan empat media lainnya (Gambar 4).

Fakta tersebut menunjukkan bahwa tanaman kedelai Sindoro melalui eksplan epikotil memiliki daya regenerasi yang tinggi, atau kurang dipengaruhi oleh empat macam media yang digunakan, walaupun dalam percepatan tumbuh selanjutnya ada perbedaan. Pada media B5+BAP konsentrasi 1,2 mg/l, pertumbuhan eksplan terhambat, di mana inisial tunas tidak berkembang, dan akar tidak terbentuk sama sekali (Gambar 3 dan Gambar 4).

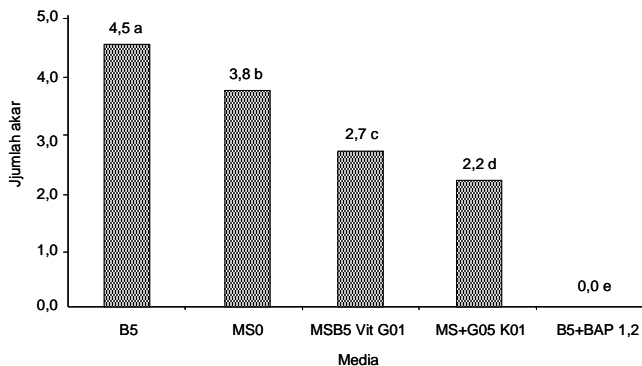
Penghambatan regenerasi pada penelitian ini tidak sesuai dengan penelitian Clemente *et. al.* (2000) di mana kadar BAP 1,2 mg/l cocok untuk pembentukan tunas



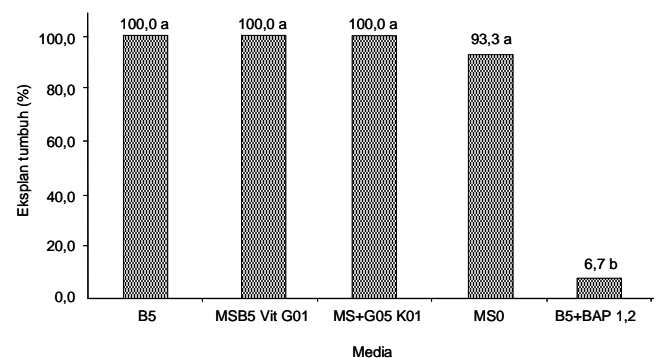
Gambar 1. Pengaruh beberapa jenis media terhadap tinggi tunas kedelai Sindoro dari eksplan epikotil. Gambar yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada galat 0,05.



Gambar 2. Pengaruh beberapa jenis media terhadap jumlah tunas kedelai Sindoro dari eksplan epikotil. Gambar yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada galat 0,05.



Gambar 3. Pengaruh beberapa jenis media terhadap pertumbuhan akar kedelai Sindoro. Gambar yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada galat 0,05.



Gambar 4. Daya regenerasi eksplan epikotil kedelai Sindoro pada beberapa jenis media. Gambar yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada galat 0,05.

Tabel 1. Aklimatisasi tanaman kedelai dari bibit kultur epikotil dan bibit kultur putatif transgenik.

Sumber tanaman	<i>Transplanting</i> I (jumlah tanaman)	<i>Transplanting</i> II (jumlah tanaman)	Keterangan
Bibit kultur epikotil	20 (99.9%)	20 (99.9%)	Tanaman normal berpolong
Bibit putatif transgenic	3 (99.9%)	2 (66.6%)	Tanaman normal berpolong

Hasil regenerasi tanaman kedelai varietas Sindoro pada media B5 Angka dalam kurung adalah persentase jumlah tanaman hidup.

(organogenesis) kedelai yang berasal dari eksplan kotiledon tua. Penghambatan ini diduga kadar BAP 1,2 mg/l terlalu tinggi untuk regenerasi kedelai dari eksplan epikotil, atau kadar hormon endogen sudah berimbang, sehingga kesetimbangan hormon endogen terganggu atau menimbulkan pengaruh antagonis. Pengaruh antagonis ini diduga terjadi antara BAP dengan hormon giberelin endogen. Hal ini sesuai dengan data bahwa pada media kontrol tanpa hormon menunjukkan hasil regenerasi yang lebih baik, dibandingkan dengan media yang disuplai dengan hormon.

Hasil aklimatisasi 20 bibit kultur kedelai yang berasal dari eksplan epikotil yang dipindahtanamkan (*transplanting*) I, yaitu dari botol kultur ke media pot kecil yang berisi media tanah, dan *transplanting* II, yaitu dari pot kecil ke pot besar, ternyata bibit tanaman hidup semua. Pada bibit kedelai *putative* transgenik, dari tiga bibit kultur yang *ditransplanting* pada tahap pertama tanaman hidup semua, tetapi satu dari bibit yang telah *ditransplanting* pada tahap II ternyata layu pada hari kedua dan akhirnya mati (Tabel 1). Sebab kematian belum diketahui, diduga bibit *putative* transgenik memiliki tingkat kepekaan lebih tinggi terhadap lingkungan tempat tumbuhnya dibandingkan dengan bibit nontransgenik.

KESIMPULAN

Dari hasil percobaan regenerasi kedelai melalui eksplan epikotil untuk mendukung penelitian rekayasa genetik dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Persentase regenerasi kedelai melalui kultur epikotil mencapai >90%.
2. Daya regenerasi, jumlah tunas, tinggi tunas, dan jumlah akar dipengaruhi oleh jenis media yang digunakan. Media B5 paling cocok untuk meregenerasi kedelai yang berasal dari eksplan epikotil.

3. Metode aklimatisasi bibit kultur kedelai telah berhasil diperoleh dengan persentase tanaman hidup yang tinggi (>90%).

DAFTAR PUSTAKA

- Clemente, T.E., B.J. La Vallee, A.R. Howe, D. Conner-Ward, R.J. Rozman, P.E. Hunter, D.L. Broyles, D.S. Kasten, and M.A. Hinchee. 2000. Progeni analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium* mediated transformation. *Crop Sci.* 40:797-803.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller, and D.P.S. Verma. 1968. Nutrient requirements of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- Gunawan, L.W. 1988. Teknik kultur jaringan tanaman. Pusat Antar-Universitas (PAU), Bioteknologi, IPB. Bogor. 298 p.
- Herman, M. 1996. Rekayasa genetik untuk perbaikan tanaman. *Agrobio* 1(1):46-48.
- Husni, A., S. Hutami, M. Kosmiatin, dan Ika Mariska. 2004. Kumpulan makalah Seminar Hasil Penelitian BB-Biogen 2004. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. p.159-169.
- Hutami, S., I. Mariska, M. Kosmiatin, A. Husni, W.H. Adil, dan Y. Supriyati. 1999. Regenerasi dan seleksi *in vitro* untuk mendapatkan sifat ketahanan terhadap aluminium pada tanaman kedelai. Laporan Tahunan 1999 Balitbio, Bogor.
- Kurniawan, R.T. dan Jumanto. 1996. Regenerasi tanaman kedelai (*Glycine max* L. Merr.) melalui embryogenesis somatik. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 1(2):53-59.
- Lippmann B, and Lippmann G. 1993. Soybean embryo culture factors influencing plants recovery from isolatet embryos. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 32:83-90.
- Murashige, W.H.R. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15:473-497.
- Pardal, S.J., Dwi R. Untari, A. Sisharmini, D. Rijadi, dan M. Herman. 1997. Regenerasi kedelai secara *in vitro*. *Prosiding Seminar Perhimpunan Bioteknologi Pertanian Indonesia*. Surabaya, 12-14 Maret 1997. p. 27-38.
- Pardal, S.J., A. Sisharmini, E. Listanto, dan M. Herman. 1999. Regenerasi tanaman kedelai hasil transformasi dengan gen *gus* dan proteinase inhibitor. 1999. *Prosiding Ekspose Hasil Penelitian Bioteknologi Pertanian*. 25 tahun Badan Litbang Pertanian. Jakarta, 31 Agustus-1 September 1999. p.175-189.
- Pardal, S.J. 2002. Perkembangan penelitian regenerasi dan transformasi pada tanaman kedelai. *Buletin AgroBio* 5(2):37-44.
- Pardal, S.J., G.A. Wattimena, H. Aswidinoor, dan M. Herman. 2005. Transformasi genetik kedelai dengan gen proteinase inhibitor II menggunakan teknik penembakan partikel. *AgroBio* 1(2): 53-61.
- Purnamaningsih, R. 2002. Regenerasi tanaman melalui embryogenesis somatik dan beberapa gen yang mengendalikannya. *Buletin AgroBio* 5(2):51-58.
- Ritchie, S.W. and Thomas K. Hodges. 1993. Cell culture and regeneration of transgenic plants. *In* Kung S.D. (Ed.) *Transgenic Plant* 1:147-173.
- Widoretno, W., Estri L. Arumningtyas, dan Sudarsono. 2003. Metode induksi pembentukan embriosomatik dari kotiledon dan regenerasi planlet kedelai secara *in vitro*. *Hayati* 10(1):19-24.