Kombinasi 2,4 D Dan BAP Untuk Induksi Kalus Embriogenik Beberapa Varietas Kedelai (*Glycine Max* (L.) Merrill) Pada Kondisi Hipoksia Secara In Vitro

The Combination 2,4-D and BAP to Induce Embryogenic Callus from Some Varieties of Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) *on Hypoxic and In Vitro Condition*

Bertryda Hastipa Manurung, Revandy Iskandar Damanik*, Eva Sartini Bayu
Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian USU, Medan 20155
**correspondingauthor* : d_revandy@hotmail.com

ABSTRACT

The purpose of this research was to determinate the growth response of embryogenic callus from some varieties of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) on hypoxic and in vitro condition.The research was conductedat The Tissue Culture Laboratory of Agriculture FacultyinUniversity of Sumatera Utara on April until December 2016. This research had two stages, induction of embryogenic callus and analysis metabolism of callus after hypoxic condition with t-test. This analysis used factorial Completely Randomized Design with two factors. The first factors were varieties of soybean and the second factors werecombination of Plant Growth Regulator (PGR)(5 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BAP, 10 mg/l 2,4-D + 1,5 mg/l BAP, and 15 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP). The result showed the varieties, combination of PGR, and interaction of varieties and PGR give significant effect to weight callus. The result of T-test showed that in hypoxic condition, POD enzyme exercise on Gepak Kuning's callus in 5 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BAP was different before and after hypoxic condition.

Keywords :2,4-D, BAP, embryogenic callus, hypoxic,soybean

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respon pertumbuhan dan perkembangan kalus emberiogenik pada berbagai varietas kedelai dengan pemberian kombinasi 2,4-D dan BAP pada kondisi hipoksia secara *in vitro*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Universitas Sumatera Utara, pada bulan April sampai Desember 2016. Metode penelitian dilakukan dengan 2 tahapan yaitu induksi kalus embriogenik dan uji-t terhadap analisis aktivitas metabolit kalus setelah penggenangan. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan dua faktor perlakuan. Faktor pertama adalah varietas yang diuji (Baluran, Gepak Kuning, dan Grobogan). Faktor kedua adalah kombinasi Zat Pengatur Tumbuh (5 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BAP, 10 mg/l 2,4-D + 1,5 mg/l BAP, dan 15 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP). Hasil analisis data menunjukkan bahwa varietas, kombinasi ZPT, dan interaksi vaerietas dan ZPT berpengaruh nyata terhadap induksi kalus pada peubah amatan bobot kalus. Berdasarkan analisis uji-t, aktivitas enzim POD pada varietas Gepak Kuning yang diinduksi media 5 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BAP memberikan respon yang berbeda nyata sebelum dan sesudah penggenangan.

Kata kunci : 2,4-D, BAP, hipoksia, kalus embriogenik, kedelai

PENDAHULUAN

Produksi kedelai tahun 2015 meningkat 4,5 % berdasarkan ARAM I Badan Pusat Statistik (BPS) mencapai 998.870 ton biji kering kedelai. Peningkatan produksi ditopang oleh penambahan luas areal panen (Badan Pusat Statistik, 2015).Kedelai merupakan tanaman asli daratan Cina dan merupakan komoditas pangan penghasil protein nabati yang sangat penting. Tanaman kedelai peka terhadap genangan. Genangan menyebabkan penuaan dini sehinggadaun

klorosis, nekrosis, gugur dan pertumbuhan tanaman terhambat, yang pada akhirnya menurunkan hasil. Kehilangan hasil pada fase vegetatif lebih kecil dibandingkan pada fase reproduktif, yaitu 17−43% pada fase vegetatif dan 50−56% pada fase reproduktif (Hapsari dan Adie, 2010). Tanaman yang tergenang dalam waktu singkat akan mengalami kondisi hipoksia (kekurangan O_2) (Dennis *et al*., 2000).

Metode seleksi untuk memilih varietas toleran terhadap genangan dapat dilakukan di lapangan atau di laboratorium (Hapsari dan Adie, 2010). Dengan cara*in vitro*, diharapkan dapat memberi solusi varietas yang tahan, toleransi ataupun peka terhadap genangan dan diharapkan dapat mempertahankan integritasnya dan tumbuh menjadi tanaman lengkap (Yunita, 2009).

Salah satu teknik kultur jaringan adalah embriogenesis somatik, yaitu suatu proses pembentukan embrio dari eksplan yang berupa sel-sel somatik yang telah mengalami dediferensiasi. Sel somatik yang telah mengalami dediferensiasi ditransfer ke dalam medium yang sesuai dan gen-gen totipotensi akan berfungsi, pembelahan sel-selnya menjadi terkendali, dan akhirnya terbentuk embrio yang akan tumbuh dan berkembang menjadi tanaman utuh (Indrianto, 2003).

Jenis dan konsentrasi ZPT yang digunakan menentukan keberhasilan teknik kultur jaringan. Zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin dibutuhkan untuk merangsang pembelahan sel dan pembentukan kalus (Yusnita, 2003). Auksin mempunyai peranan terhadap pertumbuhan sel, dominasi apikal dan pembentukan kalus. Sitokinin adalah zat pengatur tumbuh yang berperan dalam mengatur pembelahan sel serta mempengaruhi diferensiasi tunas pada jaringan kalus (Zulkarnain, 2009).

Pemberian beberapa kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4-*Diklorofenoksiasetat* (2,4-D) dan *Benzylaminopurine* (BAP) ke dalam media kultur mampu memacu terbentuknya kalus pada eksplan. Penelitian Khumaida dan Handayani (2010) melaporkan bahwa, eksplan kotiledon muda tanaman kedelai mulai berkalus pada umur 1-2 minggu setelah kultur dengan persentase eksplan berkalus 75%, pada perlakuan 10 mg/l2,4-D + 10 mg/l NAA. Penelitian yang dilakukan oleh Manurung (2007) pada kultur *in vitro* buah Makasar menyatakan bahwa BAP 1,5 mg/l merupakan konsentrasi yang optimum dalam pertumbuhan biji buah makasar secara *invitro* untuk tujuan perbanyakan.

Salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk menghasilkan kedelai toleran genangan yaitu melalui teknik *in vitro* secara embriogenesis sehingga penulis tertarik untuk melakukan penelitian terhadap kombinasi ZPT 2,4-D dan BAP dalam menginduksi kalus embriogenik beberapa varietas kedelai dan toleran secara *in vitro.*

BAHAN DAN METODE

Penelitianini dilakukandi Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara, Medan pada bulan Mei sampai dengan Desember 2016dengan 2 tahapan kegiatan yaitu pembentukan kalus embriogenik menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial dan uji aktivitas metabolisme kalus pada kondisi hipoksia menggunakan analisis uji-t Minitab Portabel 16. Rancangan Acak Kelompok Faktorial terdiri dari 2 faktor yaitu varietas kedelai Baluran (V_1), Gepak Kuning (V_2), Grobogan (V_3) dan perlakuan ZPT dengan kombinasi 5 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BAP (Z_1), 10 mg/l 2,4-D + 1,5 mg/l BAP (Z_2), dan 15 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP(Z_3). Bahan yang digunakan adalah kotiledon biji kedelai, media *Murashige and Skoog*, zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BAP, aquades, alkohol, PVPP, dan nitrogen cair. Alat yang digunakan yaitu botol kultur, alat diseksi, mikroskop, *micropipet*, spectrometer Perkin Elmer Lambda 25 UV-vis, *centrifuge*, kamera.

Penelitian ini dimulai dengan sterilisasi alat dengan autoclave. Semua alat seperti botol kultur, cawan petri, gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri, pipet ukur, pinset, scalpel, dan alat-alat gelas lainnya terlebih dahulu direndam dalam deterjen dicuci bersih dan dibilas dengan air mengalir, selanjutnya dikeringkandan alat-alat dimasukkan kedalam autoclave pada tekanan 17,5 psi, dengan suhu 121 ^oC selama 60 menit. Kemudian alat-alat tersebut dimasukkan ke dalam oven kecuali botol kultur. Selanjutnya dilakukan pembuatan media. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media MS dengan

menggunakan zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BAP. Semua larutan stockdisiapkan diatas meja kerja. Media MS yang digunakan sebanyak 1 liter dengan komposisi 30 gram sukrosa, 0,1 *myo-inositol*, 50 ml stok hara makro, 5 ml stok hara mikro, 10 ml iron, 5 ml vitamin. Masing-masing media yang dipanaskan dicampur dengan 7 gram agarose lalu diatur pH media dengan kisaran 5,8-6 dengan menggunakan NaOH dan HCl.Setelah media siap, media dimasukkan kedalam botol kultur yang telah disterilkan sebanyak 25 ml dan mulut botol ditutup dengan aluminium foil. Media disterilisasi dengan autoclave pada tekanan 17,5 psi, dengan suhu 121 ^oC selama 20 menit. Setelah itu media didinginkan didalam laminar dan disimpan di ruang kultur untuk diamati sebelum digunakan.

Sebelum penanaman dilakukan sterilisasi eksplan dengan perendaman benih kedelaiselama 60 menit dengan aquades. Biji kedelai kemudian direndam 30 menit dengan deterjen sambil digojok,dan dibilas dengan air mengalir sebanyak 3 kali. Kegiatan selanjutnya dilakukan di *Laminar Air Flow* (LAF). Eksplan yang sudah bersih direndam dalam larutan fungisida Dithane M-45 2 g/l, dan digojok selama 30 menit, selanjutnya direndam dengan larutan bakterisida Benlate 2 g/l, dan digojok selama 30 menit, eksplan direndam dalam larutan klorox 5% dan 15% masing-masing selama 10 menit sambil digojok, kemudian setiap perlakuan dibilas dengan aquades steril minimal 3 kali.

Penanaman eksplan dilakukan di LAF yang telah disemprot dengan alkohol 70%. Eksplan yang ditanam adalah kotiledon biji kedelai, Pertama-tama eksplandiletakkan di petridish lalu dipisahkan embrio dan bagian endosperm dengan menggunakan pinset dan scalpel. Kemudian eksplan ditanam kedalam botol kultur dengan media yang telah disiapkan sesuai perlakuan. Setiap botol kultur terdiri dari 1-2 eksplan dan setelah penanaman selesai botol kultur diletakkan di rak kultur dibawah sinar lampu cahaya.

Botol-botol kultur yang telah ditanami eksplan disemprot dengan alkohol 70% setiap hari agar bebas dari mikroorganisme(bakteri dan jamur) yang menyebabkan terjadinya kontaminasi. Suhu ruang kultur yang digunakan adalah 18-22 ^oC dan intensitas cahaya sebesar 2000 lux.

Peubah amatan yang diamati adalah persentase eksplan membentuk kalus (%), bentuk dan warna kalus, bobot kalus, konsentrasi protein (mg/l).

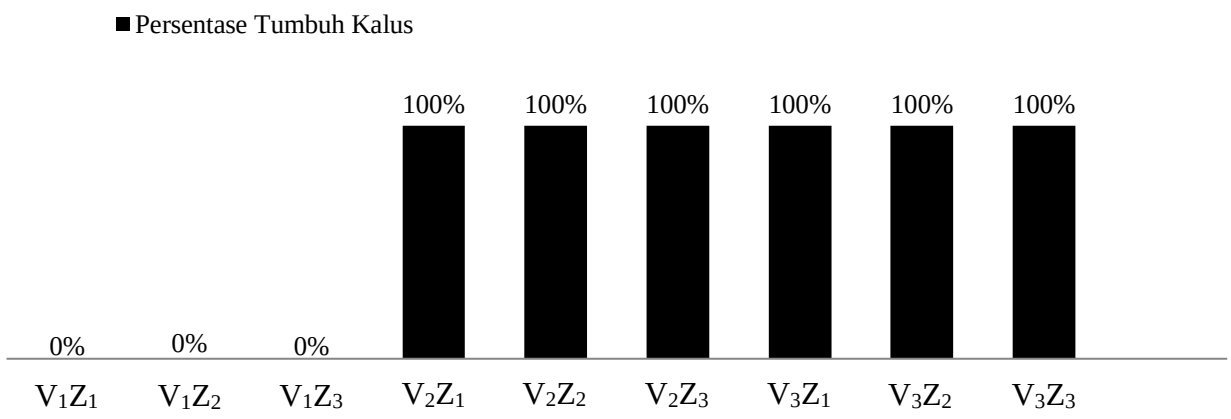
HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase Pertumbuhan Kalus

Histogram (Gambar 1) menunjukkan bahwa persentase pertumbuhan kalus varietas Baluran (V_1Z_1, V_1Z_2, V_1Z_3) adalah 0%, varietas Gepak Kuning (V_2Z_1, V_2Z_2, V_2Z_3) adalah 100% dan varietas Grobogan (V_3Z_1, V_3Z_2, V_3Z_3) adalah 100%. Persentase pertumbuhan kalus diamati pada 4 MST. Varietas Baluran mengalami stagnasi (tidak ada pertumbuhan). Pada umur 4 MST dilakukan subkultur dan perlakuan V_3Z_1 dan V_3Z_2 terkontaminasi sehingga tidak dapat diteruskan untuk tahap lanjutan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa varietas Baluran tidak menginduksi kalus selah dilakukan beberapa percobaan. Eksplan dari varietas Baluran mengalami stagnasi yaitu dari mulai tanam sampai waktu tertentu tidak mati tetapi juga tidak tumbuh. Ada beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur jaringan salah satunya adalah eksplan. Pertumbuhan kalus merupakan hasil interaksi yang sangat kompleks antara eksplan, komposisi medium dan kondisi lingkungan selama periode inkubasi.Di dalam penelitian ini tindakan lanjutan tidak dilakukan.

Berdasarkan pengamatan diketahui bahwa varietas Grobogan mampu membentuk kalus pada 1 MST dan varietas Gepak Kuning mampu membentuk kalus pada 2 MST. Eksplan yang berkalus ditandai dengan pertumbuhan sel dimana jaringan eksplan mengalamipertumbuhan dan timbul gumpalan-gumpalan massa sel yang berwarna putih kekuningan. Kalus yang terbentuk umumnya berwarna putih kekuning-kuningan dan bertekstur friabel. Media yang paling cepat menginduksi kalus pada penelitian ini yaitu 15 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP (Z_3). Pembentukan kalus terjadi setelah 2 MST.



Gambar 1. Histogram persentase pertumbuhan kalus dengan kombinasi ZPT yang berbeda pada umur 4 MST

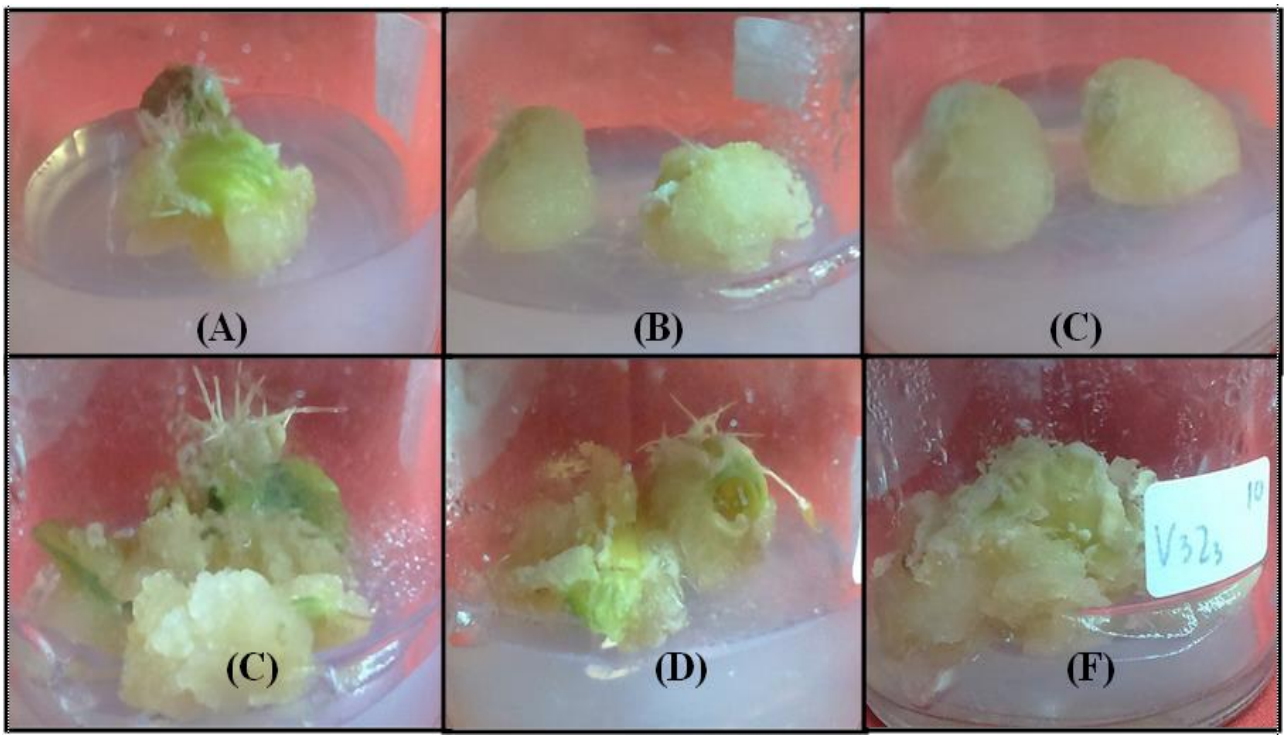
Zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin merangsang pembelahan sel dan pembentukan kalus. Hal ini sesuai dengan literatur Khumaida dan Handayani (2010) yang melaporkan bahwa eksplan kotiledon muda tanaman kedelai mulai berkalus pada umur 1-2 minggu setelah kultur dengan persentase eksplan berkalus 75% pada perlakuan 10 mg/l 2,4-D + 10 mg/l NAA maupun pada media 40 mg/l 2,4-D. Penelitian yang dilakukan oleh Manurung (2007) pada kultur *invitro* buah makassar, pemberian sitokinin BAP dan auksin 2,4-D dengan berbagai taraf konsentrasi telah memberikan respon yang berbeda terhadap pertumbuhan eksplan biji buah makasar. Semakin tinggi konsentrasi BAP maupun 2,4-D maka semakin tinggi pula persentase pembentukan kalus. BAP 1,5 mg/l merupakan konsentrasi yang optimum dalam pertumbuhan biji buah makasar secara *invitro* untuk tujuan perbanyakan.

Bentuk dan Warna Kalus

Gambar 2 menunjukkan bahwa varietas Gepak Kuning (V_2) menghasilkan tekstur kalus yang lebih padat daripada varietas Grobogan (V_3) dan warna kalus yang lebih cerah. Kalus yang dihasilkan memiliki tahap pertumbuhan kalus tipe globular. Kalus embriogenik umumnya dapat diinduksi menggunakan zat pengatur tumbuh auksi atau dengan kombinasi dengan sitokinin. Peningkatan penggunaan 2,4-D dan BAP memberikan pengaruh yang baik terhadap struktur yang dihasilkan. Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D dan BAP yang diggunakan maka semakin friabel kalus yang dihasilkan.

Warna kalus cenderung berwarna putih kekuningan dan kalus yang kekuningan cerah. Warna kalus yang terbentuk menunjukkan adanya aktivitas pembelahan sel yang terjadi pada kalus. Kalus adalah suatu kumpulan sel *amorphous* yang terjadi dari sel-sel jaringan yang membelah diri secara terus-menerus. Hal ini sesuai dengan literatur Lizawati (2012) menyatakan bahwa indikator perkembangan eksplan pada budidaya *in vitro* berupa kalus merupakan gambaran visual kalus sehingga dapat diketahui bahwa kalus yang terbentuk sel-selnya masih aktif membelah atau mati. Kalus yang terbentuk dari suatu eksplan biasanya memunculkan warna yang berbeda-beda.

Kultur kalus pada setiap media induksi menunjukkan penampakan kalus yang hampir sama. Kalus yang terbentuk berwarna putih kekuningan, tekstur kalus yang friable, terdapat nodul, dan transparan. Dalam kaitannya dengan pembentukan kalus embriogenik maka kalus yang terbentuk merupakan kalus embriogenik karena warna kalus yang putih kekuningan dan memiliki nodul. Pada pengamatan secara visual diketahui tahap embrio merupakan stadia embrio globular. Ukuran kalus yang diinduksi dari eksplan varietas Grobogan lebih besar daripada varietas Gepak Kuning. Yelnititis dan Komar (2010) menyatakan bahwa kalus embriogenik mempunyai struktur friabel, noduler dan berwarna putih kekuningan. Menurut Indrianto (2003) inisiasi kalus embriogenik terjadi sebagai respon dari stres akibat pengaruh konsentrasi auksin yang relatif tinggi. Kalus merupakan massa sel yang tidak teroganisir.



Gambar 2. Visualisasi Kalus

Keterangan gambar:

(A). Perlakuan V_2Z_1 menghasilkan kalus berwarna putih kekuningan dengan teksur semi friabel dan tipe perkembangan globular + akar

(B). Perlakuan V_2Z_2 menghasilkan kalus berwarna putih kekuningan dengan teksur semi friabel dan tipe perkembangan globular.

(C). Perlakuan V_2Z_3 menghasilkan kalus berwarna putih kekuningan dengan teksur semi friabel dan tipe perkembangan globular + akar

(D). Perlakuan V_3Z_1 menghasilkan kalus berwarna kekuningan cerah dengan teksur friabel dan tipe perkembangan globular + akar

(E). Perlakuan V_3Z_2 menghasilkan kalus berwarna kekuningan cerah dengan teksur friabel dan tipe perkembangan globular + akar

(F). Perlakuan V_3Z_3 menghasilkan kalus berwarna kekuningan dengan teksur friabel dan tipe perkembangan globular

Bobot Kalus

Bobor segar kalus diperoleh dengan menimbang kalus menggunakan timbangan analitik. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Bobot segar kalus Varietas Gepak Kuning dan Baluran dengan kombinasi ZPT yang berbeda pada umur 6 MST

Varietas	Media Tanam			Rataan
	Z_1	Z_2	Z_3	
	.....g.....			
V_1	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00a
V_2	2,60 a	4,13 a	3,10 a	3,28b
V_3	0,00 b	0,00 b	3,33 a	1,11c
Rataan	0,87a	1,38ab	2,14a	1,46

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada baris dan kolom yang sama menunjukkan pengaruh nyata pada uji DMRT pada taraf kepercayaan 5%

Berdasarkan Tabel 1 data pengamatan bobot segar kalus dan hasil sidik ragam menunjukkan perlakuan varietas, beberapa kombinasi zat pengatur tumbuh pada media tanam dan interaksi keduanya berpengaruh nyata pada 6 MST. Bobot segar kalus tertinggi pada interaksi diperoleh pada kombinasi varietas Gepak Kuning dan media 10 mg/l 2,4-D + 1,5 mg/l BAP (V_2Z_2).

Pengamatan terhadap peubah amatan bobot kalus menunjukkan bahwa genotipe dan media berpengaruh terhadap besarnya bobot kalus. Interaksi media dan varietas terbaik terdapat pada varietas Gepak Kuning dengan media kombinasi zat pengatur tumbuh 10 mg/l 2,4-D + 1,5 mg/l BAP. Zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin berperan dalam pembelahan dan pemanjangan sel sehingga aktivitas keduanya menyebabkan pertumbuhan sel kalus secara terus menerus. Semakin baik pertumbuhan kalus maka bobot yang dihasilkan semakin tinggi, kalus yang semakin besar ditandai dengan gumpalan massa kalus yang semakin banyak. Indrianto (2003) yang menyatakan bahwa pemberian sitokinin dan auksin pada medium kultur dapat memacu pembelahan sel dan morfogenesis. Berdasarkan penelitian Khumaida dan Handayani (2010) diketahui bahwa induksi kalus eksplan kotiledon muda tanaman kedelai terbaik pada perlakuan 10 mg/l 2,4-D + 10 mg/l NAA dan didukung penelitian Manurung (2007) pada kultur invitro buah makassar menyatakan bahwa BAP 1,5 mg/l merupakan konsentrasi yang optimum dalam pertumbuhan biji buah makasar dalam kultur jaringan secara *in vitro*.

Konsentrasi Protein

Tabel 2 menunjukkan bahwa terjadi penurunan dan kenaikan konsentrasi protein. Berdasarkan hasil dari Tabel 2 diketahui bahwa perlakuan penggenangan memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata terhadap kenaikan ataupun penurunan konsentrasi protein.

Pada hasil rataan analisis terhadap konsetrasi protein diketahui bahwa varietas Gepak Kuning (V_2) dan varietas Grobogan (V_3) pada media 15 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP (Z_3) mengalami peningkatan konsentrasi protein sedangkan dua perlakuan lainnya mengalami penurunan konsentrasi protein. Varietas Gepak Kuning dan Grobogan menunjukkan menunjukkan respon metabolik protein pada kondisi hipoksia. Respon terhadap kondisi tergenang menyebabkan adanya perubahan proses menuju terbentuknya protein. Penggunaan sitokinin meningkatkan laju sintesis protein sehingga proses pembelahan sel semakin cepat. Dalam kultur jaringan nitrogen merupakan penyusun asam-asam nukleat, protein, dan senyawa lain yang mengandung N. Dennis *et al* (2000) menyatakan bahwa dalam kondisi hipoksia dan anoksia jaringan padi mensintesis lebih banyak solubel protein. Pada tahap kedua (4-24 jam) tahapan proses respon tanaman terhadap kondisi defisit oksigen merupakan proses adaptasi metabolik. Pada tahap ini berlangsung induksi glikolisis dan gen fermentasi yang penting untuk menjaga keberlangsungan prosuksi energi. Respon metabolik pada tahap ini lebih kompleks dari yang diduga karena melibatkan perubahan dalam metabolisme nitrogen.

Berdasarkan analisis yang dilakukan diketahui bahwa kalus varietas Grobogan yang diinduksi dari media 15 mg/l 2,4-D +2 mg/l BAP (V_3Z_3) memiliki aktivitas metabolisme yang meningkat setelah penggenangan yaitu pada peubah amatan konsentrasi protein dan aktivitas enzim perosidase (POD) dan enzim Superoksida Dismutase (SOD).

Tabel 2. Rataan Uji-t terhadap konsentrasi protein kalus kedelai varietas Gepak Kuning dan Grobogan pada media kombinasi ZPT berbeda

Perlakuan	Rataan		t-Value
	Sebelum Penggenangan	Sesudah Penggenangan	
V_2Z_1	1,265	1,133	0,070
V_2Z_2	1,217	1,205	0,759
V_2Z_3	0,853	1,228	0,390
V_3Z_3	0,084	0,476	0,408

SIMPULAN

Varietas Gepak kuning dan Grobogan merupakan varietas yang responsif terhadap pertumbuhan kalus embriogenik dengan persentase pertumbuhan 100%. Umumnya kalus yang dihasilkan berwarna putih kekuningan dengan tekstur friabelInteraksi varietas dan media tanam yang terbaik untuk induksi kalus embriogenik berdasarkan penelitian ini yaitu varietas Gepak Kuning pada media 10 mg/l 2,4-D + 1,5 mg/l BAP dengan bobot kalus segar tertinggi yaitu 4,13 g.Pada kondisi hipoksia, konsentrasi protein kalus varietas Gepak Kuning dan Grobogan yang diinduksi dengan media 15 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP meningkat setelah penggenangan.

DAFTAR PUSTAKA

Badan Pusat Statistik. 2015. Produksi Tanaman Pangan. Angka Ramalan I Tahun 2014. http://www.bps.go.id Diakses pada tanggal 30 Maret 2016.

Dennis, E. S., R. Dolferus, M. Ellis, M. Rahman, Y. Wu, F.U. Hoeren, A. Grover, K.P. Ismond, A.G. Good, and W.J. Peacock. 2000. Molecular Strategies for Improving Water-logging Tolerance in Plants. *J. Exp*. Bot. 51:89-97.

Hapsari, R.T. dan M.M. Adie. 2010. Peluang Perakitan dan Pengembangan Kedelai Toleran Genangan. Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian 29(2):50.

Indrianto, A. 2003. Kultur Jaringan Tumbuhan. Fak. Biologi UGM. Yogyakarta. 134 hal.

Khumaida N., T. Handayani. 2010. Induksi dan Proliferasi Kalus Embriogenik pada Beberapa Genotipe Kedelai. J. Agron. Indonesia 38 (1) : 19 – 24.

Lizawati. 2012. Induksi Kalus Embriogenik dari Eksplan Tunas Apikal Tanaman Jarak Pagar (*Jatropa curcas* L.) dengan Penggunaan 2,4-D dan TDZ. Fakultas Pertanian. Universitas Jambi.

Manurung, L, Y, S. 2007. Pengaruh Auksin (2,4-D) dan Sitokinin (BAP) Dalam Kultur Invitro Buah Makasar *Brucea javanica* (L.) Merr.). Departemen Pertanian.

Yelnitis dan Komar, M. 2010. Pembentukan Kalus Remah dari Eksplan Daun Ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq) Kurtz). Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan.

Yunita, R. 2009. Pemanfaatan Variasi Smaklonal dan seleksi In Vitro Dalam Perakitan Tanaman Toleran Cekaman Abiotik. Jurnal Litbang Pertanian. 28(4) : 143-144.

Yusnita. 2003. Kultur Jaringan : Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien. Agromedia Pustaka, Jakarta.

Zulkarnain, H. 2009. Kultur Jaringan. Bumi Aksara. Jakarta.