

## Efektivitas Transformasi Genetik pada Kedelai (*Glycine max* L. Merrill) Menggunakan Particle Bombardment

### Effectiveness of Genetic Transformation in Soybean (*Glycine max* L. Merrill) by Particle Bombardment

M. Rafli Yudi<sup>1\*)</sup>, Takahiro Gondo<sup>2)</sup>, Ryo Akashi<sup>2)</sup>, Respatijarti<sup>1)</sup> dan Arifin Noor Sugiharto<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Brawijaya University  
 Jl. Veteran No. 65145 Malang, Jawa Timur, Indonesia

<sup>2)</sup> Frontier Science Research Center, University of Miyazaki  
 Miyazaki, Japan

<sup>\*)</sup>E-mail: mrafliyudi@gmail.com

#### ABSTRAK

Kedelai merupakan salah satu komoditas penting pertanian. Kebutuhan komoditas kedelai dalam negeri saat ini, rata-rata sebanyak 2.3 juta ton biji kering/tahun (BPS, 2018). Perakitan kultivar unggul kedelai dapat dilakukan melalui transformasi genetik. Beberapa faktor penting dari keberhasilan transformasi genetik *particle bombardment* yaitu faktor fisik misalnya ukuran partikel emas, posisi dan letak eksplan, faktor biologi misalnya *embryo tip* dan mengetahui seberapa stabil gen yang telah ditransformasi (Kikkert *et al.*, 2004). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui posisi peletakan embrio (*inside* dan *outside*), ukuran partikel emas dan stabilitas ekspresi gen pada embrio yang optimum. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioresource Universitas Miyazaki, Jepang pada bulan April hingga Juli 2018. Bahan yang digunakan sebagai eksplan dalam penelitian ini ialah *embryo tip* biji kedelai kultivar Williams 82 dengan jumlah 9 embrio per ulangan. Pengamatan yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi, efektivitas posisi dan letak eksplan, efektivitas ukuran partikel emas dan stabilitas ekspresi gen yang ditampilkan dalam bentuk persentase. Hasil yang dari penelitian ini ialah terdapat ekspresi gen GUS yang berbeda pada posisi peletakan embrio secara *inside* dan *outside*. Metode peletakan *inside* memiliki ekspresi gen GUS yang terbaik. Kemudian terdapat perbedaan ekspresi gen GUS pada masing-masing

ukuran partikel emas yang ditembakkan pada saat transformasi genetik. Pada ukuran partikel emas 0.6  $\mu\text{m}$  memiliki persentase ekspresi gen GUS terbaik dan metode peletakan *inside* dan hasil penelitian ini memiliki peluang sebagai metode yang dapat dipilih pada transformasi embrio kedelai menggunakan *particle bombardment*. Hal ini dibuktikan pada 14 hari setelah transformasi masih terdapat ekspresi gen GUS setinggi 34.1%.

Kata kunci: *Embryo tip* Kedelai, GUS, Partikel Emas, Posisi Embryo, Stabilitas Gen, Transformasi Genetik.

#### ABSTRACT

Soybean is an important commodity for vegetable based protein fulfillment. Soybean demand for local food industries reached 2.3 million dry beans/year (BPS, 2018). Developing superior cultivars to increase production can be done by genetic transformation. Important factors to success of genetic transformation by particle bombardment are physical factor such as gold particle size, position and location of explant, biological factor such as embryo tip and knowing how stable the transformed gene is (Kikkert *et al.*, 2004). This research aims to determine optimum embryo location (*inside* and *outside*), gold particle size and gene expression stability on embryo in genetic transformation by particle bombardment. Research was conducted at Bioresource Laboratory of Miyazaki

University Gakuen kibanadai nishi-1-1, Miyazaki, Japan from April to July 2018. Explants in this research are embryo tips of Williams 82 cultivar soybeans with 9 embryos per repetition. Observation includes effectiveness of position and location of explant, effectiveness of gold particle size and gene expression stability showed in percentage. Results showed difference of GUS gene expression between inside and outside embryo location. Inside method has best GUS gene expression. There is also difference of GUS gene expression in different sizes of gold particle shot in genetic transformation. Gold particle size of 0.6  $\mu\text{m}$  showed the best result between sizes. Combination of inside embryo location and 0.6  $\mu\text{m}$  gold particle size has potential to be chosen for soybean embryo transformation by particle bombardment. This conclusion was proven 14 days after transformation the GUS gene expression value was as high as 34.1%.

Key words: Embryo Position, Genetic Transformation, Gold Particle, GUS, Soybean Embryo tip, Stability of Gene.

## PENDAHULUAN

Kedelai merupakan salah satu komoditas pertanian yang penting sebagai bahan pemenuhan protein nabati. Kebutuhan komoditas kedelai dalam negeri saat ini, rata-rata sebanyak 2.3 juta ton biji kering per tahun (BPS, 2018). Perakitan kultivar unggul kedelai dapat dilakukan dengan pemuliaan secara konvensional dan inkonvensional. Namun pemuliaan konvensional melalui penyerbukan memiliki kelemahan yaitu kawin silang hanya terjadi pada spesies yang sama, sehingga dapat membatasi sumber-sumber genetik yang akan digunakan (Manuhara, 2006).

Teknik pemuliaan secara inkonvensional dapat dilakukan dengan rekayasa genetika, yaitu dengan menyisipkan gen asing kedalam genom tanaman yang diisolasi dari tanaman, virus, bakteri atau hewan atau yang sering disebut proses transformasi genetik. Gen asing yang disisipkan tidak hanya terbatas dalam satu spesies melainkan dari taksonomi,

seperti ordo dan spesies lain (Webb dan Morris, 1992). Transformasi genetik pada tanaman kedelai pertama kali berhasil menggunakan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* oleh (Hinchee *et al.*, 1988), tetapi efisiensinya masih rendah dan metodenya sulit untuk diperbanyak (Jackson *et al.*, 2003). Kikkert *et al.* (2004) menyatakan bahwa transformasi menggunakan *particle bombardment* mampu memindahkan partikel yang telah dilapisi gen secara handal dibandingkan *Agrobacterium* dikarenakan lebih sederhana, cepat, dan memberikan frekuensi hasil transformasi yang lebih tinggi. Hal tersebut disebabkan karena gen gun dapat digunakan pada jangkauan yang lebih luas dan ditembakkan langsung ke jaringan tanaman.

Penentuan kesuksesan dan optimisasi transformasi dapat diketahui dengan menggunakan *selectable marker* dan *reporter genes* yang dapat memberikan informasi yang baik mengenai jejak transformasi (Farias dan Ana, 2008). Sekuen yang mengkode gen-gen penghasil enzim dan mudah dapat dianalisis, salah satu gen ini ialah bentuk dasar dari reporter gen, yang umum digunakan adalah *B-glucuronidase* (GUS). Jefferson (1987) menyatakan bahwa ada beberapa keuntungan dari GUS ialah mudah untuk divisualisasikan, enzim tidak mudah terdenaturasi dan endapan stabil. Namun kelemahan dari sistem GUS adalah bersifat destruktif, yaitu eksplan tidak dapat dipulihkan. Menurut Drosteet *et al.* (2000); Siregar (2002) bahwa dengan adanya enzim GUS, X-gluc yang dipakai sebagai substrat analisis histokimia, akan memberikan reaksi warna biru yang dengan mudah dapat dilihat di bawah mikroskop.

Kikkert *et al.* (2004) juga berpendapat bahwa faktor penting dari keberhasilan transformasi genetik melalui *particle bombardment* yaitu faktor fisik (ukuran partikel emas, posisi dan letak eksplan) dan faktor biologi (jenis eksplan). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui posisi peletakan embrio (*inside* dan *outside*) yang efektif, ukuran partikel emas yang efektif dan stabilitas ekspresi gen GUS pada

embrio terhadap transformasi genetik menggunakan *particle bombardment*.

#### BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioresource Universitas Miyazaki, Gakuen kibana dai nishi-1-1, Miyazaki, Jepang pada bulan April sampai Juli 2018. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *embryo tip* dari kedelai kultivar Williams 82; HCl, clorox 60%, media SIM, partikel emas berukuran 0.6  $\mu\text{m}$ , 1.0  $\mu\text{m}$ , 1.6  $\mu\text{m}$ ; etanol 70%, SDW, plasmid pSLG2, NaOAC, etanol 70% dingin, etanol 99% dingin, pBS, methanol  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ,  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ , Triton X-100 dan X-Gluc. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah petri dish, pinset, gelas beaker, gelas ukur, *safety cabinet*, *Eppendorf tube*, *desiccator*, inkubator, oven, *freezer*, *autoclave*, *sonication*, *centrifuge*, *vortex*, tank helium, *bombardment device*, mikroskop Leica DVM6, kertas *whatman*, timbangan analitik dan pH meter.

Terdapat tiga kegiatan utama dalam penelitian ini yang terhubung yaitu transformasi untuk mengetahui efektifitas ekspresi gen GUS, pada metode peletakan embrio yakni dengan cara posisi eksplan *embryo tip* diletakkan ke arah dalam (*inside*) dan posisi eksplan *embryo tip* diletakkan ke arah luar (*outside*), setelah didapatkan hasil dari kegiatan penelitian tersebut berupa ekspresi gen GUS dan dilakukan evaluasi. Kemudian dilanjutkan dengan kegiatan penelitian transformasi untuk mengetahui ukuran partikel emas yang tepat terhadap transformasi pada embrio kedelai William 82 dengan ukuran emas 0.6  $\mu\text{m}$ , 1.0  $\mu\text{m}$  dan 1.6  $\mu\text{m}$ ), setelah didapatkan hasil dari kegiatan penelitian tersebut berupa ekspresi gen GUS dan dilakukan evaluasi, kemudian dilanjutkan dengan meregenerasi eksplan yang telah ditransformasi yang dilakukan untuk mengetahui seberapa stabil gen yang telah disisipkan ke *embryo tip* kedelai dengan melakukan pengamatan 1, 3, 7 dan 14 hari setelah transformasi. Dari hasil tiga kegiatan utama dalam penelitian ini dilakukan pengujian histokimia GUS yang bersifat destruktif untuk mengetahui jumlah warna/spot biru

(ekspresi gen GUS) pada embrio dan Gen GUS yang stabil pada *embryo tip*. Penelitian ini dilakukan dengan empat kali ulangan pada setiap ulangan terdapat 9 embrio kedelai Williams 82.

Pengamatan yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi, efektifitas posisi dan letak eksplan, efektifitas ukuran partikel emas dan stabilitas ekspresi gen yang ditampilkan dalam bentuk persentase. Data hasil transformasi genetik menggunakan *particle bombardment* diperoleh dari perhitungan jumlah spot warna biru dari gen GUS pada embrio kedelai. Data yang diperoleh dari hasil pengamatan efektifitas posisi dan letak eksplan di analisis dengan uji-t tidak berpasangan (t-student unpaired) dengan taraf 5% (dianalisis dengan menggunakan perangkat lunak SPSS versi 16).

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

Faktor keberhasilan transformasi genetik melalui *particle bombardment* di pengaruhi banyak faktor, salah satunya oleh faktor biologi (sel atau jaringan target) atau eksplan yang digunakan untuk transformasi dan faktor fisik (alat penembak). Faktor fisik di antaranya adalah jarak tembak, jumlah tembakan dan ukuran partikel emas, jumlah DNA per tembakan, tekanan gas He dan temperatur ruang biolistik mempengaruhi keberhasilan proses transfer gen (Kikkert *et al.*, 2004). Pada penelitian ini, jarak tembak, jumlah tembakan, jumlah DNA per tembakan dan tekanan gas He temperatur ruang biolistik yang digunakan adalah sama atau homogen untuk semua perlakuan.

Pendapat Hiei, Ohta, Komari dan Kumashiro (1994) bahwa pemilihan eksplan sebagai jaringan target dalam transformasi merupakan salah satu faktor penting, karena akan berpengaruh terhadap keberhasilan proses transformasi. Sedangkan Christou dan McCabe (1992) bahwa eksplan yang dibutuhkan sebagai target transformasi melalui *particle bombardment* sebaiknya yang bersifat embriogenik, karena aktifitas pembelahan selnya sangat tinggi/aktif sehingga diharapkan sel tersebut dapat bertahan hidup setelah mengalami tekanan selama

proses penembakan. Song *et al.*, (2013) juga menjelaskan kemampuan regenerasi eksplan setelah transformasi merupakan salah satu faktor penting dalam evaluasi efisiensi efektifitas transformasi. Pada penelitian ini menggunakan eksplan yang berasal dari embrio kedelai.

#### Efektifitas Posisi Eksplan

Posisi peletakan eksplan embrio merupakan salah satu faktor penting dalam transformasi menggunakan *particle bombardment*, ditunjukkan pada hasil analisis uji-t yang menunjukkan terjadi perbedaan nyata antara metode peletakan posisi *embryo tip* ke arah dalam (*inside*) dengan metode peletakan posisi *embryo tip* ke arah luar (*outside*) dengan nilai uji-t nya ialah 3.138. Sedangkan data persentase GUS positif pada efektifitas posisi eksplan embrio kultivar Williams 82 hasil transformasi ditampilkan dalam tabel 1.

Hasil ekspresi gen GUS menunjukkan bahwa total (ekspresi gen GUS pada bagian *embryo tip* dan selain *embryo tip* (*other*)) ekspresi gen GUS pada metode peletakan posisi *outside* memiliki rerata jumlah ekspresi gen GUS lebih tinggi yaitu 62.89, sedangkan dengan metode peletakan *inside*

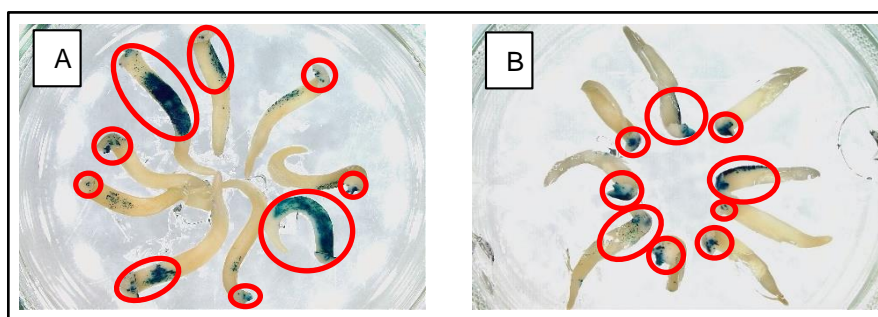
hanya terdapat 52.11 ekspresi gen GUS. Namun ekspresi gen GUS pada *embryo tip* saja dengan metode peletakan *inside* memiliki rerata ekspresi lebih tinggi yakni 26.58 dengan standar deviasi 7.01, dibandingkan *outside* yakni 17.61 dengan standar deviasi 4.79. Dilihat dari persentase intensitas ekspresi gen GUS pada *embryo tip*, peletakan secara *inside* memiliki persentase ekspresi gen GUS sejumlah 51% sedangkan dengan peletakan *outside* memiliki persentase lebih rendah yaitu 28%.

Eksplan dengan posisi *inside* lebih berpotensi dan cepat terkena gen GUS yang di tembakkan, karena luas diameter posisi *embryo tip* lebih kecil dan dimungkinkan lebih banyak kontak langsung dengan *spray gun*. Penembakan pada daerah *embryo tip* kedelai lebih diutamakan dari pada daerah diluar dari *embryo tip*. Menurut Liu *et al.* (2004) bahwa *embryo tip* dari *mature seeds* kedelai memiliki banyak keuntungan dalam penggunaannya pada transformasi. Termasuk frekuensi regenerasi yang lebih tinggi, pembentukan tunas adventif yang lebih cepat, pengiriman T-DNA yang efisien %.

**Tabel 1** Persentase Intensitas Ekspresi Gen GUS Berdasarkan Efektifitas Posisi Peletakan Embryo Tip

Peletakan Embrio	Jumlah Eksplan	Rerata (ET + Other)	Rerata ET	Persentase (%)
<i>Inside</i>	9	52.11	26.58 ± 7.01	51
<i>Outside</i>	9	62.89	17.61 ± 4.79	28

Keterangan: ET= *Embryo tip*; Other = ekspresi gen GUS di bagian selain *embryo tip*.



**Gambar 1** Ekspresi gen GUS berdasarkan Posisi Peletakan Eksplan Embrio

Keterangan: A) Posisi peletakan *embryo tip* ke arah keluar (*outside*) yang mengekspresikan gen GUS (lingkaran merah) (perbesaran 31x), B) Posisi peletakan *embryo tip* ke arah dalam (*inside*) yang mengekspresikan gen GUS (lingkaran merah) (perbesaran 31x).

ke sel-sel dalam meristem embrionik ujung (*embryo tip*), dengan menggunakan *embryo tip* efisiensi produksi tanaman transgenik meningkat hingga lebih dari 10. Sedangkan perbedaan ekspresi gen GUS pada kedua metode peletakan posisi embrio adalah karena tipe penembakan *bombardment device* seperti *spray*. Menurut Akashi *et al.* (2002) menyatakan alat *bombardment device* yang sederhana mempunyai cara kerja seperti *spray gun* yakni menembakan emas yang telah dilapisi DNA melalui *holder filter* yang terletak pada solenoid bagian tengah atas *bombardment device* dengan menembakan partikel seperti *spray* pada eksplan target yang terletak di bagian tengah plat akrilik.

#### Efektifitas Ukuran Partikel Emas

Setelah didapatkan hasil dari kegiatan penelitian efektifitas peletakan posisi eksplan embrio berupa ekspresi gen GUS dan dilakukan evaluasi. Kemudian dilanjutkan dengan transformasi untuk mengetahui ukuran partikel emas yang efektif pada embrio kedelai Williams 82. Ukuran partikel emas menjadi salah satu faktor fisik dalam transformasi menggunakan *particle bombardment*. Ukuran emas yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 0.6  $\mu\text{m}$ , 1.0  $\mu\text{m}$  dan 1.6  $\mu\text{m}$ .

Persentase GUS positif pada eksplan embrio kultivar Williams 82 hasil transformasi melalui *particle bombardment* dengan plasmid pSLG2 yang mengandung gen GUS ditampilkan dalam tabel 2. Pada ukuran partikel emas 0.6  $\mu\text{m}$  memiliki hasil rerata intensitas gen GUS yang tinggi pada *embryo tip* yaitu 16.86 dengan standar deviasi 2.38, rerata *embryo tip* pada transformasi menggunakan ukuran partikel emas 1.0  $\mu\text{m}$  yaitu 9.75 dengan standar deviasi 2.07 dan kemudian rerata intensitas gen GUS paling rendah terhadap

penembakan partikel emas pada *embryo tip* ialah transformasi dengan menggunakan partikel emas 1.6  $\mu\text{m}$  dengan rerata 5.67 dengan standar deviasi 1.51. Sedangkan hasil persentase intensitas ekspresi gen GUS pada *embryo tip* memiliki perbedaan, dengan ukuran partikel emas 0.6  $\mu\text{m}$  memiliki persentase yang tinggi yaitu 25.14%, kemudian ukuran partikel emas 1.6  $\mu\text{m}$  memiliki persentase 22.87%, sedangkan untuk ukuran partikel emas 1.0  $\mu\text{m}$  memiliki persentase intensitas ekspresi gen GUS paling rendah yaitu 20.01%.

Menurut Pardal *et al.* (2005) bahwa semakin besar ukuran partikel tentunya akan memperbesar kerusakan pada dinding sel-sel target yang ditembus. Namun sebaliknya, apabila ukuran partikel semakin kecil juga akan memperkecil kemampuan untuk menembus dinding sel dan semakin mudah menyebar (berdispersi), sehingga efisiensi mengenai target semakin kecil. Namun pada penelitian ini ekspresi gen GUS dengan transformasi menggunakan tungsten partikel emas berukuran 0.6  $\mu\text{m}$  lebih tinggi dibandingkan perlakuan 1.6  $\mu\text{m}$  dan 1.0  $\mu\text{m}$ . Hal ini selaras dengan penelitian Khalafalla *et al.* (2005) menyatakan interaksi yang signifikan antara tiga ukuran partikel emas (0.6  $\mu\text{m}$ , 1.0  $\mu\text{m}$  dan 1.6  $\mu\text{m}$ ) dan jarak sasaran penembakan diamati pada *embryonic* kedelai, kombinasi ukuran partikel kecil (0.6  $\mu\text{m}$ ) dengan jarak target pendek (6 cm) menghasilkan ekspresi transien sGFP tertinggi. Sedangkan pada penelitian ini, jarak tembakan, jumlah tembakan, jumlah DNA per tembakan, tekanan gas He dan temperatur ruang biolistik yang digunakan adalah sama atau homogen untuk semua perlakuan.

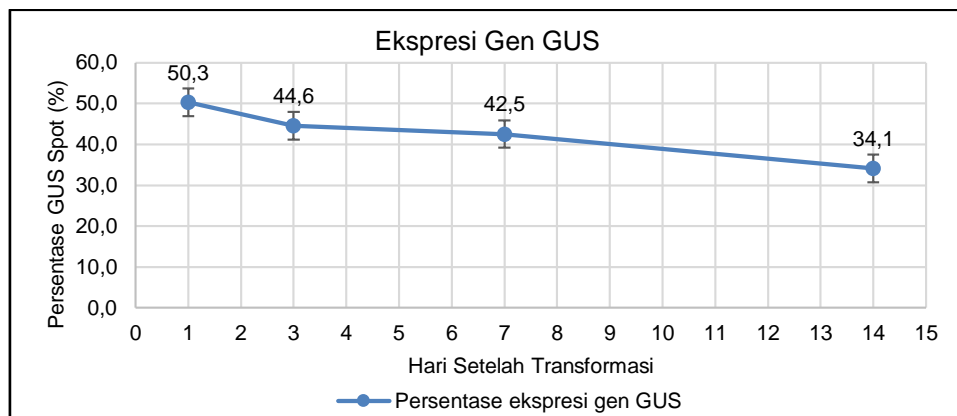
#### Stabilitas Ekspresi Gen

Stabilitas ekspresi gen pada *embryo tip* kedelai dapat diketahui dengan

**Tabel 2** Persentase Efektifitas Ukuran Partikel Emas

Ukuran Partikel Emas	Jumlah Eksplan	Rerata (ET + Other)	Rerata ET	Persentase (%)
0.6	9	67.06 $\pm$ 14.68	16.86 $\pm$ 2.38	25.14
1.0	9	48.72 $\pm$ 5.54	9.75 $\pm$ 2.07	20.01
1.6	9	24.78 $\pm$ 1.90	5.67 $\pm$ 1.51	22.87

Keterangan: ET= *Embryo tip*; Other = ekspresi gen GUS di bagian selain *embryo tip*.



**Gambar 2** Diagram intensitas ekspresi gen GUS hari setelah transformasi.

meregenarasi eksplan yang telah ditransformasi. Kegiatan ekspresi gen dilakukan berdasarkan hasil terbaik efektivitas peletakkan posisi eksplan dan efektifitas ukuran partikel emas. Pengamatan ekspresi gen GUS dilakukan pada 1,3,7 dan 14 hari setelah transformasi. Sehingga diperoleh hasil bahwa terjadi penurunan persentase ekspresi gen GUS.

Persentase intensitas ekspresi gen GUS yang diamati satu hari setelah transformasi sampai 14 hari setelah transformasi menunjukkan persentase intensitas gen GUS pada embrio yang menurun, dapat diketahui bahwa ekspresi intensitas gen GUS pada *embryo tip* pada hari pertama setelah transformasi adalah 50.3%, kemudian pada tiga hari setelah transformasi 44.6%, kemudian pada hari ke tujuh setelah transformasi terdapat ekspresi intensitas gen GUS 42.5% dan pada 14 hari setelah transformasi masih ditemukan gen GUS pada *embryo tip* yakni setinggi 34.1%.

Makful *et al.* (2004) menyatakan pendeteksian secara kualitatif ekspresi GUS dapat dilakukan dengan menggunakan substrat X-gluc yang memproduksi warna biru. Warna ini menandakan hasil reaksi enzimatis GUS pada sel tanaman. Oleh karena itu, ekspresi GUS positif hanya mungkin terjadi bila udah terintegrasi pada sel tanaman. Menurut Kikkert *et al.* (2004) bahwa jika DNA asing mencapai inti sel, maka ekspresi transgen kemungkinan dihasilkan dan transgen dapat stabil di dalam kromosom inang, dan DNA yang

ditembakkan ke sel inang sebagian akan lisis (apabila tidak tersisip di dalam genom inang) karena bersifat transien dan sebagian akan stabil di dalam kromosom inang. Hal ini disebut sebagai ekspresi transien karena sifatnya sementara dan tergantung pada keberhasilan tahapan integrasi transgen ke dalam genom. Jika transgen tidak berhasil terintegrasi maka ekspresi akan menghilang dan sebaliknya, jika berhasil terintegrasi maka ekspresinya menjadi permanen.

## KESIMPULAN

Transformasi genetik yang efektif pada kedelai dengan menggunakan *particle bombardment* yaitu dengan peletakan posisi eksplan secara *inside* dan ukuran partikel emas 0.6  $\mu\text{m}$  dengan persentase stabilitas ekspresi gen GUS setinggi 34.11% pada 14 hari setelah transformasi.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Frontier Science Research Center, University of Miyazaki, Miyazaki, Jepang yang telah berkenan mendanai penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

Akashi, R., C. Yuge, T. Gondo, O. Kawamura dan F. Hoffmann. 2002. Bialaphos-Resistant Cells of Dallisgrass (*Paspalum dilatatum*

- Poir.) Through Particle Bombardment with a Simple Self-Built Inflow Gun. *Journal Grassland Science*. 47(6):588-593.
- Badan Pusat Statistik (BPS). 2018.** Kebutuhan Kedelai Nasional. <https://www.bps.go.id>. Diakses tanggal 4 Desember 2018.
- Christou, P. dan Mc Cabe D. E. 1992.** Prediction Of Germline Transformation Events in Chimeric Ro Transgenic Soybean Plantlets Using Tissue-Specific Expression Patterns. *The Plant Journal*. 2(3):283-290.
- Droste, A., P. Giancarlo dan B. Z. M. Helena. 2000.** Integrated Bombardment and *Agrobacterium* Transformation System: An Alternative Method for Soybean Transformation. *Plant Molecular Biology Reporter*. 18(1):51-59.
- Farias, P. C. M. dan L. S. C. Ana. 2008.** Advances in *Agrobacterium*-mediated Plant Transformation with Enphasys on Soybean. *Journal of Science Agriculture (Piracicaba, Brazil)* 65(1):95-106.
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari dan T. Kumashiro. 1994.** Efficient Transformation of Rice (*Oryza Sativa* L.) Mediated By *Agrobacterium* And Sequence Analysis of Boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*. 6(2):271-282.
- Hinchee, M. A. W., D. V. C. Ward, C. A. Newell, R. E. McDonnell, S. J. Sato, C. S. Gasser, D. A. Fischhoff, D. B. Re, R. T. Fraley dan R. B. Horsch. 1988.** Production of Transgenic Soybean Plants Using *Agrobacterium*-Mediated Gene Transfer. *Journal Nature Biotechnology*. 6(8):915-922.
- Jackson, J. F., H. F. Linskens dan R. B. Inman. 2003.** Molecular Methods of Plant Analysis: Genetic Transformation of Plants. Springer-Verlag Berlin Heidelberg Published.
- Jefferson, R. A. 1987.** Assaying Chimeric Genes in Plants: The GUS Gene Fusion System. *Journal Plant Molecular Biology Reporters*. 5(1):387-405.
- Khalafalla, Mutasim M., S.M. Rahman, H. A. El-Shemy, Y. Nakamoto, K. Wakasa dan M. Ishimoto. 2005.** Optimization of Particle Bombardment Conditions by Monitoring of Transient sGFP (S65T) Expression in Transformed Soybean. *Journal Breeding Science*. 55(3):257-263.
- Kikkert, R., R. V. Jose dan I. R. Bruce. 2004.** Stable Transformation of Plant Cells by Particle Bombardment/Biostolistics. In: Pena, L (Eels). Method in Molecular Biology. *Transgenic Plants*. 286(4): 61-78.
- Liu, H. K., C. Yang dan Z. M. Wei. 2004.** Efficient *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation of Soybeans Using an Embryonic Tip Regeneration System. *Journal Planta* 219(6): 1042-1049.
- Makful, S. Purnomo, Sunyoto, R. Iswanto dan T. I. R. Utami. 2004.** Transformasi cDNA Gen 1-Aminosisiklopropan-1-Asam Karboksilat Oksidase untuk Penundaan Kematangan pada Pepaya Dampit dan Sarirona. *Jurnal Hortikultura*. 14(1):1-7.
- Manuhara, Y. Sri Wulan. 2006.** Pengembangan Metode Transformasi Genetik Tanaman Untuk Meningkatkan Kesejahteraan Hidup Manusia. Makalah Seminar Nasional Biodiversitas. Biologi FMIPA UNAIR. ISBN: 979-98109-1-4.
- Pardal, S. S., G. A. Wattimena, H. Aswidinnoor dan M. Herman. 2005.** Transformasi Genetik Kedelai dengan Gen Proteinase Inhibitor II Menggunakan Teknik Penembakan Partikel. *Jurnal AgroBiogen*. 1(2):53-61.
- Song, Z., J. Tian, W. Fu, L. Li, L. Lu, L. Zhou, Z. shan, G. Tang dan H. Shou. 2013.** Screening Chinese Soybean for *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation Suitability. *Journal of Zhejiang University Science*. 14(4):289-298.