

Pengaruh interval dan lama perendaman terhadap pertumbuhan dan pendewasaan embrio somatik tanaman sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.)

Effect of immersion interval and duration on the growth and maturation of somatic embryos of sago palm (Metroxylon sagu Rottb.)

Imron RIYADI & SUMARYONO

Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor 16151, Indonesia

Summary

Liquid culture via temporary immersion system (TIS) has a potency for enhancing maturity and uniformity of plant somatic embryos (SE). An experiment was conducted to determine the effect of medium immersion interval and duration on the growth and maturation of sago SE in TIS. A clump of SE at globular stage derived from sucker's tip meristem culture was used as material source. The SE were cultured on a modified Murashige and Skoog medium added with 0.01 mg/L ABA, 1.0 mg/L kinetin and 0.1 mg/L GA₃. The treatments used were TIS with immersion interval of 3, 6 and 12 hours with duration of 1 and 3 minutes. Solid medium was used as a control. The results show that TIS with immersion interval 12 hours for three minutes produced the highest SE biomass (14.6 g/flask) which had increased by 9.8-fold within six weeks. The longer of immersion interval (less frequent) and the longer of immersion duration (three minutes) increased significantly biomass fresh weight of sago SE. SE biomass of sago on solid medium was significantly lower than those of in liquid media of TIS. The highest number of advanced stage embryos (torpedo, cotyledonary and early germinant) of 643 or 48.2% from the total number of SE was achieved in TIS with 12 hours interval for three minutes. During the maturation of sago SE, the color of embryos has changed from mostly yellowish to greenish and reddish.

[Key words: Embryo somatic - maturation, sago palm, somatic embryogenesis, temporary immersion- system].

Ringkasan

Kultur cair dengan sistem perendaman sesaat (SPS) berpotensi untuk meningkatkan pendewasaan dan keseragaman embrio somatik (ES) tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pengaruh interval dan lama perendaman terhadap proses pendewasaan ES sagu dalam SPS. Bahan yang digunakan berupa ES fase globuler asal kultur pucuk tunas anakan sagu. ES sagu dikulturkan dalam medium Murashige dan Skoog yang dimodifikasi ditambah ABA 0,01 mg/L; kinetin 1 mg/L dan GA₃ 0,1 mg/L. Perlakuan yang digunakan adalah kultur SPS dengan interval perendaman 3, 6 dan 12 jam dengan lama perendaman 1 dan 3 menit serta kultur padat sebagai pembanding. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan SPS dengan interval perendaman 12 jam selama tiga menit menghasilkan bobot biomassa ES tertinggi yaitu 14,6 g/bejana yang meningkat 9,8 kali dalam waktu enam minggu. Interval perendaman lebih lama (lebih jarang) dan lama perendaman lebih panjang (tiga menit) meningkatkan secara nyata bobot segar biomassa ES sagu. Biomassa ES sagu pada medium padat secara nyata lebih rendah dibandingkan dengan kultur cair SPS. Jumlah ES fase dewasa (torpedo,

kotiledon dan kecambah dini) tertinggi yaitu 643 atau 48,2% dari jumlah total ES diperoleh pada perlakuan SPS interval 12 jam dengan lama tiga menit. Seiring dengan pendewasaan ES sagu, terjadi perubahan warna dari sebagian besar kuning menjadi hijau dan merah.

Pendahuluan

Tanaman sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.) merupakan tanaman penghasil karbohidrat yang potensial untuk ketahanan pangan nasional karena keberadaannya cukup melimpah terutama di Indonesia bagian timur (Tarigans, 2001; Bintoro *et al.*, 2007). Luas areal sagu dunia diperkirakan sekitar 2,47 juta ha, lebih dari setengahnya berada di Indonesia (Flach, 1997). Sejak dahulu tanaman sagu digunakan sebagai makanan pokok sebagian besar penduduk Indonesia bagian timur terutama Maluku dan Papua. Dalam perkembangannya, pati sagu tidak hanya digunakan sebagai bahan makanan tapi juga sebagai bahan baku industri seperti untuk mie, roti, biskuit, kue, sirup fruktosa, farmasi, bio-plastik, bahan perekat, bio-etanol dan produk turunan lainnya (Flach, 1997).

Perbanyakan tanaman sagu pada umumnya dilakukan secara vegetatif melalui anakan (*suckers*). Perbanyakan secara generatif dengan biji jarang dilakukan karena persentase perkecambahan biji sagu sangat rendah. Di samping itu, untuk memanen pati sagu dari batang, tanaman ditebang menjelang berbunga. Jong (1995) menyatakan bahwa untuk pembukaan perkebunan sagu skala besar, ketersediaan bibit unggul menjadi kendala utama. Rostiwati *et al.* (1998) menambahkan bahwa berat tunas anakan yang baik untuk dijadikan bibit berkisar 2–5 kg, sehingga

menyulitkan dalam pengiriman bibit ke areal penanaman baru terutama pada skala besar.

Teknik kultur *in vitro* tanaman sagu telah berhasil dikembangkan oleh Hisajima *et al.* (1991) melalui kultur embrio zigotik dan multiplikasi tunas, serta oleh Tahardi *et al.* (2002) melalui embriogenesis somatik menggunakan eksplan jaringan meristem pucuk dari anakan sagu pada medium padat. Lebih lanjut Riyadi *et al.* (2005) melaporkan mengenai pendewasaan embrio somatik tanaman sagu pada medium padat yang menghasilkan rata-rata sembilan kecambah dan 192 embrio somatik fase kotiledon dari awal kultur rata-rata 80 embrio somatik fase globular selama empat minggu. Untuk tujuan produksi komersial, frekuensi pendewasaan embrio somatik ini masih dianggap terlalu rendah.

Teknik kultur jaringan melalui embriogenesis somatik menggunakan kultur cair mulai banyak dikembangkan. Penerapan kultur cair ditujukan untuk otomatisasi dan *scale-up* serta meningkatkan pertumbuhan dan keseragaman kultur (Etienne & Berthouly, 2002; Hvoslef-Eide *et al.*, 2003). Salah satu teknik kultur cair adalah perendaman periodik yang dikenal dengan sistem perendaman sesaat (SPS) atau *temporary immersion system (TIS)*. Pada sistem ini perendaman berlangsung tidak terus menerus sehingga transfer oksigen cukup, pencampuran memadai, kontaminasi rendah, dan biaya relatif murah (Teisson *et al.*, 1999). Hasil penelitian pada kelapa sawit menggunakan metode SPS menunjukkan bahwa produksi embrio somatik dari kalus noduler cukup tinggi dan embrio somatik yang dihasilkan lebih seragam (Tahardi, 1998).

Kultur cair SPS yang terbukti meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan

embrio somatik pada kelapa sawit (Tahardi, 1998; Sumaryono *et al.*, 2007) dan tanaman lain (Etienne & Berthouly, 2002) akan digunakan untuk memperbaiki pertumbuhan dan pendewasaan embrio somatik tanaman sagu yang sampai saat ini masih relatif rendah. Pada tanaman kelapa sawit, lama perendaman yang digunakan adalah tiga menit dengan interval waktu setiap enam jam (Tahardi, 1998) yang didasarkan pada hasil penelitian pada tanaman tahunan lainnya (Etienne & Berthouly, 2002). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan interval (selang waktu) dan lama perendaman terbaik pada kultur cair SPS untuk pertumbuhan dan pendewasaan embrio somatik tanaman sagu.

Bahan dan Metode

Bahan tanaman dan kondisi kultur

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biak Sel & Mikropropagasi, Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia. Kalus noduler diinisiasi dari jaringan meristem pucuk anakan sagu asal Kalimantan Selatan. Eksplan dikulturkan pada medium padat MS (Murashige & Skoog, 1962) yang dimodifikasi (MMS) seperti dilaporkan oleh Tahardi *et al.* (2002). Kalus yang dihasilkan kemudian dikulturkan pada medium MMS dengan 2,4-D 5 atau 10 mg/L dan kinetin 0,1 mg/L untuk menginduksi embrio somatik. Tingkat pH medium diatur 5,7 sebelum disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 kg/cm² selama 20 menit. Kultur untuk induksi dan pendewasaan embrio somatik diletakkan dalam ruang terang di bawah lampu TL dengan intensitas cahaya 30 μmol

foton/m²/detik dan lama penyinaran 14 jam dengan suhu ruangan 26 ± 1 °C.

Pendewasaan embrio somatik

Embrio somatik sagu fase globuler sebanyak 1,5 g (Gambar 1a) dikulturkan dalam medium MMS dengan garam makro setengah konsentrasi yang mengandung sukrosa 30 g/L, arang aktif 1 g/L, ABA 0,01 mg/L; kinetin 1,0 mg/L dan GA₃ 0,1 mg/L serta ditambahkan rifampisin dan tetrasiklin untuk mencegah kontaminasi oleh bakteri. Embrio somatik dikulturkan dalam bejana dengan teknik sistem perendaman sesaat (SPS) yang dihubungkan dengan alat pengatur waktu digital untuk mengatur interval dan lama perendaman secara otomatis. Perlakuan yang diuji adalah kombinasi perlakuan interval perendaman yaitu 3, 6 dan 12 jam masing-masing dengan lama perendaman 1 dan 3 menit. Medium padat digunakan sebagai pembanding. Setelah enam minggu, embrio somatik dipanen untuk diukur bobot basah biomassa dan jumlah embrio somatik berdasarkan fase perkembangan (globuler, hati, torpedo, kotiledon) dan warna (kuning, hijau, merah).

Analisis statistik

Data bobot basah biomassa dan jumlah embrio somatik diuji statistik menggunakan analisis keragaman (ANOVA). Penelitian ini menggunakan metode faktorial dengan rancangan acak lengkap. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak empat kali. Perbedaan antar-perlakuan ditentukan dengan uji jarak berganda Duncan pada taraf uji $\alpha = 0,05$.

Hasil dan Pembahasan

Bobot basah biomassa embrio somatik

Setelah dikulturkan selama enam minggu pada medium pendewasaan, bobot basah biomassa embrio somatik sagu meningkat dengan tajam (Tabel 1). Bobot basah biomassa tertinggi diperoleh dari perlakuan SPS dengan interval perendaman setiap 12 jam dengan lama perendaman tiga menit yaitu 14,6 g dari bobot awal 1,5 g. Hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa perlakuan interval perendaman dan lama perendaman masing-masing berpengaruh nyata terhadap bobot basah embrio somatik sagu. Semakin panjang interval perendaman, semakin tinggi bobot embrio somatik dan lama perendaman tiga menit lebih baik dari pada satu menit. Di samping

itu, terdapat interaksi yang nyata antara interval perendaman dan lama perendaman terhadap bobot basah embrio somatik sagu.

Bobot basah biomassa embrio somatik sagu dalam medium cair SPS pada semua interval dan lama perendaman secara nyata lebih tinggi dibandingkan dengan medium padat (Tabel 1). Kultur SPS dengan interval perendaman 12 jam selama tiga menit lebih baik dibandingkan dengan interval perendaman dan lama perendaman yang lain. Hasil yang diperoleh ini berbeda dengan interval perendaman yang digunakan untuk kelapa sawit yakni setiap enam jam dengan lama perendaman tiga menit (Tahardi, 1998).

Pertumbuhan biomassa meningkat seiring dengan lamanya interval perendaman. Hal ini kemungkinan disebabkan adanya pembatasan waktu paparan medium

Tabel 1. Pengaruh interval dan lama perendaman terhadap bobot basah biomassa embrio somatik tanaman sagu.

Table 1. Effect of immersion interval and duration on fresh weight of somatic embryo biomass of sago palm.

Perlakuan (<i>Treatment</i>)		Bobot basah biomassa embrio somatik
Interval perendaman (jam) <i>Immersion interval (hour)</i>	Lama perendaman (menit) <i>Immersion duration (minute)</i>	<i>Fresh weight of somatic embryo biomass (g)</i>
12	1	11,9 b*
	3	14,6 a
6	1	7,9 cd
	3	9,6 c
3	1	7,6 d
	3	6,8 d
Medium padat (<i>Solid medium</i>)		3,6 e

*) Angka dalam kolom diikuti oleh huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada $\alpha = 0,05$.

*) *Means in the column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$.*

terhadap embrio somatik yang berpengaruh terhadap tingkat efisiensi penyerapan nutrisi dan oksigen oleh embrio somatik. Pada medium padat, embrio somatik terpapar medium secara terus-menerus namun hanya pada bagian bawah saja sehingga tingkat pertumbuhan embrio somatik lebih lambat. Demikian juga, pertumbuhan embrio somatik pada SPS interval tiga jam (sering) lebih lambat dibandingkan pada interval enam jam (sedang) dan interval 12 jam (jarang).

Bobot basah embrio somatik sagu lebih tinggi pada lama perendaman tiga menit dari pada lama perendaman satu menit pada interval 12 jam dan enam jam, namun tidak berbeda nyata pada interval tiga jam. Hal ini memperlihatkan bahwa perendaman selama satu menit belum memungkinkan medium cair terserap embrio somatik secara penuh, kecuali pada interval perendaman yang sering yaitu setiap tiga jam. Interaksi faktor interval dan lama perendaman berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan biomassa embrio somatik.

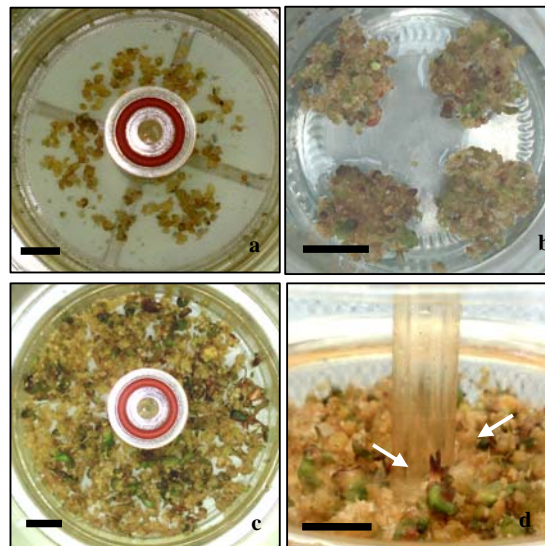
Komposisi embrio somatik

Perkembangan embrio somatik sagu tertinggi dicapai pada perlakuan SPS dengan interval perendaman 12 jam selama tiga menit (Gambar 1c) yang secara visual terlihat sangat berbeda dengan kultur medium padat (Gambar 1b) maupun perlakuan SPS lainnya. Hasil uji analisis statistik menunjukkan bahwa pada parameter jumlah embrio fase perkembangan muda (*early stage*) yang terdiri atas stadium globuler dan hati terdapat perbedaan nyata pada beberapa perlakuan. Demikian juga pada fase lanjut (*advanced stage*) yang terdiri atas stadium torpedo, kotiledon dan

kecambah dini menunjukkan perbedaan yang nyata (Tabel 2). Pada SPS interval 12 jam selama tiga menit, jumlah rata-rata embrio somatik fase lanjut per bejana sebanyak 643,3 embrio atau 48,2% dan 690,5 embrio atau 51,8% pada fase muda. Jumlah embrio somatik fase lanjut terendah pada SPS diperoleh pada interval tiga jam dengan lama perendaman tiga menit yakni sebanyak 368,5 embrio atau 38,8% (Tabel 2). Kultur pada medium padat menghasilkan jumlah dan pendewasaan embrio somatik yang paling rendah dibandingkan dengan kultur SPS.

Perlakuan SPS dengan interval perendaman 12 jam selama tiga menit menghasilkan tingkat pendewasaan embrio somatik paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal ini diduga karena meningkatnya paparan embrio ke udara sehingga penangkapan oksigen lebih optimum. Penyerapan medium medium selama satu menit setiap 12 jam sudah memenuhi kebutuhan embrio somatik sagu untuk tumbuh dan berkembang namun perendaman selama tiga menit setiap 12 jam lebih baik lagi. Embrio somatik tanaman teh (Tahardi *et al.*, 2003) dan kelapa sawit (Tahardi, 1998; Sumaryono *et al.*, 2007) yang dikulturkan pada SPS memerlukan interval perendaman yang lebih sering yakni setiap enam jam selama tiga menit.

Meskipun dikulturkan dalam medium pendewasaan, embrio fase globuler dalam perkembangannya menjadi embrio fase yang lebih dewasa tetap membentuk embrio sekunder fase globuler. Hasil pengamatan pada umur enam minggu memperlihatkan jumlah embrio somatik fase muda tetap tinggi meskipun embrio somatik fase lanjut telah terbentuk (Tabel 2). Hal ini berpengaruh terhadap komposisi fase perkem-



Gambar 1. Perkembangan embrio somatik sagu pada: (a) SPS umur lima hari, (b) kultur medium padat umur enam minggu, (c) kultur SPS dengan interval perendaman 12 jam selama tiga menit umur enam minggu, (d), kecambah dini dalam kultur SPS, tanda anak panah menunjukkan bakal tunas. Bar = 1cm.

Figure 1. Development of somatic embryos of sago palm: (a) in TIS at five days, (b) on solid medium at six weeks, (c) in TIS with immersion interval 12 hours and duration for three minutes at six weeks, (d) early germinants in TIS, arrows indicate plumule. Bar = 1 cm.

bangun embrio somatik yakni masih tingginya proporsi embrio fase awal atau bentuk globuler dan hati. Pembentukan embrio somatik sekunder juga dijumpai pada proses embriogenesis somatik tanaman kurma (Huong *et al.*, 1999) dan teh (Akula & Dodd, 1998; Sumaryono *et al.*, 2001).

Warna embrio somatik

Dalam proses perkembangannya, embrio somatik sagu mengalami perubahan warna dari sebagian besar kuning pada fase globuler berkembang menjadi hijau dan merah pada fase kotiledon. Perbedaan

warna embrio somatik fase globuler sampai dengan fase kotiledon dari seluruh perlakuan yang diuji pada umur enam minggu ditunjukkan pada Gambar 2. Persentase warna embrio somatik fase kecambah dini tidak ditampilkan karena jumlah kecambah masih sangat sedikit. Pada umumnya kecambah dini sagu berwarna hijau atau merah.

Pada medium padat, persentase warna kuning dominan pada embrio somatik fase globuler mencapai hampir 70% dan hanya 39% pada fase kotiledon. Persentase warna hijau sebesar 29% pada fase globuler dan 39% pada fase kotiledon. Embrio

Pengaruh interval dan lama perendaman terhadap pertumbuhan....

Tabel 2. Pengaruh interval dan lama perendaman terhadap pendewasaan embrio somatik tanaman sagu.

Table 2. Effect of immersion interval and duration on the maturation of somatic embryos of sago palm.

Perlakuan <i>Treatment</i>		Jumlah dan persentase embrio somatik <i>Number and percentage of somatic embryo</i>				Jumlah embrio somatik <i>Number of somatic embryo</i>
		Fase muda <i>Early stage</i>		Fase lanjut <i>Advanced stage</i>		
Interval perendaman (jam) <i>Immersion interval (hours)</i>	Lama perendaman (menit) <i>Immersion duration (minutes)</i>	Jumlah <i>Number</i>	(%)	Jumlah <i>Number</i>	(%)	
12	1	642,0 abc*	51,4	607,8 ab*	48,6	1249,8
	3	690,5 ab	51,8	643,3 a	48,2	1333,8
6	1	661,0 abc	57,1	496,8 c	42,9	1157,8
	3	710,5 a	55,3	573,3 abc	44,7	1283,8
3	1	647,3 abc	54,9	532,0 c	45,1	1179,3
	3	581,0 c	61,2	368,5 d	38,8	949,5
Medium padat (<i>Solid medium</i>)		382,3 d	61,2	242,3 e	38,8	624,5

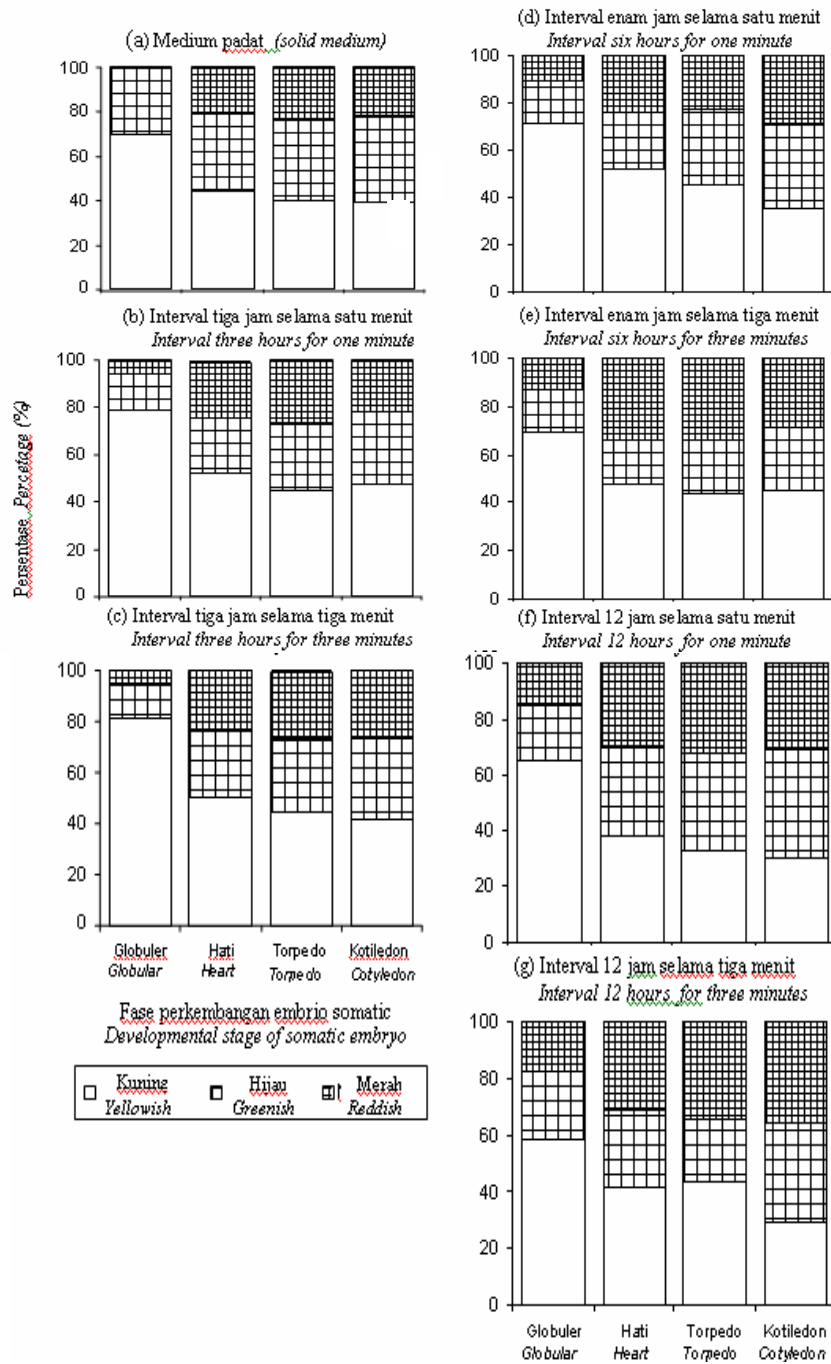
*) Angka dalam kolom yang sama diikuti oleh huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada $\alpha = 0,05$.

*) Means in the same column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$.

somatik warna merah pada fase globuler belum terbentuk, pada bentuk hati dan selanjutnya sebesar 20–22% (Gambar 2a). Terlihat bahwa warna kuning lebih banyak dijumpai pada embrio somatik fase globuler, sedangkan warna hijau dan merah lebih banyak terdapat pada embrio somatik fase lebih lanjut. Hal ini diduga berkaitan dengan tingkat perkembangan embrio somatik pada medium padat yang lebih lambat dibandingkan pada kultur SPS.

Pada perlakuan SPS dengan interval perendaman tiga jam, persentase warna kuning pada embrio somatik fase globuler sebesar 80%, dan menurun sejalan dengan perkembangan embrio (Gambar 2b & 2c).

Sebaliknya, persentase embrio somatik warna hijau dan merah meningkat seiring dengan perkembangan embrio somatik. Pada perlakuan SPS dengan interval perendaman enam jam dan 12 jam, persentase warna kuning pada embrio somatik fase globuler antara 60–70%. Persentase embrio somatik fase lanjut yang berwarna kuning semakin menurun (Gambar 2d–2g). Persentase warna hijau meningkat seiring dengan perkembangan embrio somatik dari sekitar 20% pada fase globuler menjadi 30–40% pada fase kotiledon. Komposisi warna merah embrio somatik sagu juga meningkat seiring dengan semakin lanjut stadia perkembangannya.



Gambar 2. Komposisi warna embrio somatik sagu pada berbagai fase perkembangan pada umur kultur enam minggu.

Figure 2. Color composition of sago somatic embryo at different developmental stages at six-weeks old of culture.

Sebagian besar embrio somatik sagu fase globuler berwarna kuning. Kondisi ini juga dijumpai pada embriogenesis somatik tanaman lain seperti teh (Sumaryono *et al.*, 2001) dan kelapa sawit (Tahardi, 1998). Semakin dewasa fase perkembangan embrio somatik, semakin banyak dijumpai embrio somatik yang berwarna hijau dan merah. Fenomena ini juga dijumpai pada perkembangan embrio somatik sagu pada medium padat (Kasi & Sumaryono, 2007). Dari hasil penelitian ini juga terlihat bahwa medium tumbuh berpengaruh terhadap perubahan komposisi warna embrio somatik. Pada medium padat dan SPS interval 3 dan 6 jam, 70– 80% embrio fase globuler berwarna kuning, sedangkan pada SPS interval 12 jam hanya sekitar 60%. Pada fase perkembangan lanjut, pada medium padat 22% embrio somatik berwarna merah, 39% hijau dan 39% kuning. Pada SPS, semakin lama interval perendaman maka persentase warna hijau dan merah semakin besar.

Kesimpulan

Pertumbuhan dan pendewasaan embrio somatik sagu terbaik diperoleh pada kultur SPS dengan interval perendaman setiap 12 jam dengan lama perendaman tiga menit. Pada kultur tersebut, bobot basah embrio somatik dan persentase embrio somatik fase lanjut paling tinggi dibandingkan pada kultur medium padat maupun kultur SPS lainnya. Terjadi perubahan warna dari sebagian besar kuning pada embrio somatik fase globuler menjadi hijau dan merah pada embrio somatik fase lanjut.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai melalui Program Insentif Riset Terapan, Kementerian Negara Riset dan Teknologi, dengan kontrak nomor: 78/RT/Insentif/ PPK/I/2007, bekerjasama pula dengan Dinas Perkebunan Kabupaten Banjar, Kalimantan Selatan dalam pengambilan bahan eksplan berupa anakan sagu.

Daftar Pustaka

- Akula, A. & W.A. Dodd (1998). Direct somatic embryogenesis in a selected tea clone TRI 2025 (*Camellia sinensis* [L.] O. Kuntze) from nodal explants. *Plant Cell Rep.*, **17**, 804-809.
- Bintoro, M. H., M. Mashud & H. Novarianto (2007). Status teknologi sagu. *Dalam* Karmawati, *et al.* (eds.) *Pros. Lokakarya Pengembangan Sagu di Indonesia*. Batam, 25-26 Juli 2007. p. 76-94.
- Etienne, H. & M. Berthouly (2002). Temporary immersion system in plant micro-propagation. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **69**, 215-231.
- Flach, M. (1997). *Sago Palm* Metroxylon Sagu Rottb. *Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops*. 13. Rome, International Plant Genetic Resources Institute, 76 p.
- Hisajima, S., F.S. Jong, Y. Arai & E.S. Sim (1991). Propagation and breeding of sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) plant *in vitro*: 1. Embryo culture and induction of multiple shoots from sago embryos *in vitro*. *Japan J. Trop. Agric.*, **35**(4), 259-267.

Riyadi & Sumaryono

- Huong, L.T.L., M. Baiocco, B.P. Huy, B. Mezzetti, R. Santilocchi & P. Rosati (1999). Somatic embryogenesis in Canary Island date palm. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **56**, 1-7.
- Hvoslef-Eide, A.K., C. Munster, P.H. Heyerdahl, R. Lyngved & O.A.S. Olsen (2003). Liquid culture system for plant propagation. *Acta Hort.*, **625**, 173-185.
- Jong, F.S. (1995). *Research for the Development of Sago Palm (Metroxylon sagu Rottb.) Cultivation in Sarawak, Malaysia*. Sadong Press Sdn. Bhd. 139 pp.
- Kasi, P.D & Sumaryono (2007). Morphological changes during the development of somatic embryos of sago (*Metroxylon sagu* Rottb.). *Indonesian J. Agric. Sci.*, **8**(2), 43-47.
- Murashige, T. & F. Skooge (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-479.
- Riyadi, I., J.S. Tahardi & Sumaryono (2005). The development of somatic embryos of sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) on solid media. *Menara Perkebunan*, **69**(2), 46-57.
- Rostiwati, T., F.S. Jong & M. Natadiwirya (1998). *Penanaman Sagu (Metroxylon sagu Rottb.) Berskala Besar*. Jakarta, Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan dan Perkebunan. 60p.
- Sumaryono, I. Riyadi & J.S. Tahardi (2001). Morphological variations during the development of somatic embryos of tea (*Camellia sinensis* L.) *in vitro*. *Menara Perkebunan* **69**(2), 46-57.
- Sumaryono, I. Riyadi, P.D. Kasi & G. Ginting (2007). Pertumbuhan dan perkembangan kalus embriogenik dan embrio somatik kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) pada sistem perendaman sesaat. *Menara Perkebunan* **75**(1), 32-42.
- Tahardi, J.S. (1998). Improvement of oil palm somatic embryogenesis by periodic immersion in liquid medium. In A. Jatmika et al. (eds.) *Proc. Internat. Oil Palm Conf.*, Bali, Indonesia, p. 595-601.
- Tahardi, J. S., N. F. Sianipar & I. Riyadi (2002). Somatic embryogenesis in sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.). In: K. Kaimuna et al. (eds.) *New Frontiers of Sago Palm Studies*, Tokyo, Universal Academic Press, Inc. p. 75-81.
- Tahardi, J.S., I. Riyadi & W.A. Dodd (2003). Enhancement of somatic embryo development and plantlet recovery in *Camellia sinensis* by temporary liquid immersion. *J. Biotek. Pert.*, **8**(1), 1-7.
- Tarigans, D.D. (2001). Sagu memantapkan swasembada pangan. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian*, **23**(5), 1-3.
- Teisson, C., D. Alvard, M. Lartaud, H. Etienne, M. Berthouly, M. Escalona & J.C. Lorenzo (1999). Temporary immersion for plant tissue culture. In: *Proc. IXth Internat. Congress Plant Tiss. Cell Cult.* Jerusalem, p. 629-632.