

Perkembangan kalus embriogenik sago (*Metroxylon sago* Rottb.) pada tiga sistem kultur *in vitro*

*Development of embryogenic callus of sago (Metroxylon sago Rottb.)
on three systems of in vitro culture*

Pauline D. KASI & SUMARYONO

Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

Summary

Embryogenic callus of sago (Metroxylon sago Rottb.) has been grown on three systems of in vitro culture i.e. agar-solidified medium, liquid medium, and temporary immersion system (TIS) medium to observe and compare the development of embryogenic callus over one passage of six weeks. A-half gram of embryogenic callus was cultured on a modified MS medium containing 10 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L kinetin. For histological studies, embryogenic callus was fixed in FAA and embedded in paraplast wax. Serial sections were stained with safranin 1% and observed microscopically. By the end of culture period, the development of embryogenic callus in TIS medium was relatively better than those of the other two media. Fresh weight of callus in liquid medium and TIS increased by 6.5-fold, while on agar-solidified medium increased by 5.4-fold in six weeks. About 40% of callus in liquid medium and TIS and 20% of callus on agar solidified medium have changed into somatic embryos at globular stage. Histology structure of embryogenic callus of the three systems of in vitro culture shows different pattern. On agar-solidified medium, secondary callus and friable embryogenic callus that consist of meristematic cells were formed. In contrast, more embryogenic cells were formed in liquid medium and TIS to support maturation process to somatic embryos. Therefore, temporary immersion system and liquid medium are recommended for maturation of embryogenic callus, whereas

agar-solidified medium is for proliferation of embryogenic callus of sago.

[*Key words: Sago palm, Metroxylon sago, embryogenic callus, agar-solidified medium, liquid medium, temporary - immersion system*]

Ringkasan

Kalus embriogenik sago (*Metroxylon sago* Rottb.) telah ditumbuhkan pada tiga sistem kultur *in vitro* yaitu medium padat, medium cair, dan medium dengan sistem perendaman sesaat (SPS) untuk mempelajari dan membandingkan perkembangan dari kalus embriogenik selama periode enam minggu. Setengah gram kalus embriogenik dikulturkan pada medium MS modifikasi yang mengandung 2,4-D 10 mg/L dan kinetin 0,1 mg/L. Untuk studi histologi, kalus embriogenik difiksasi dengan FAA dan *embedding* menggunakan lilin paraplast. Irisan diwarnai dengan safranin 1% dan diamati menggunakan mikroskop. Pada akhir periode kultur, pertumbuhan kalus pada medium dengan SPS lebih baik dibandingkan dengan medium cair dan padat. Bobot basah kalus pada medium cair dan SPS meningkat 6,5 kali sedangkan pada medium padat meningkat 5,4 kali dalam waktu enam minggu. Sebanyak 40% kalus pada medium cair dan SPS serta 20% kalus pada medium padat berubah menjadi embrio somatik fase globuler. Struktur histologi kalus embriogenik pada ketiga jenis sistem kultur *in vitro*

menunjukkan pola yang berbeda. Pada medium padat terjadi pembentukan kalus sekunder dan kalus embriogenik remah yang terdiri atas sel-sel meristematik. Sebaliknya pada medium cair dan SPS pembentukan sel embriogenik lebih banyak yang menunjang proses pendewasaan menjadi embrio somatik. Oleh karena itu, medium cair dan SPS direkomendasikan untuk pendewasaan kalus embriogenik, sedangkan medium padat untuk proliferasi kalus embriogenik sagu.

Pendahuluan

Tanaman sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.) merupakan tanaman palma yang tumbuh di sekitar rawa dan lahan tergenang air di daerah tropis. Sebagai salah satu tanaman penghasil pati paling produktif (15-25 ton pati kering/hektar/tahun), sagu dapat dimanfaatkan dalam bidang industri antara lain untuk bioetanol, sirup berkadar fruktosa tinggi, plastik terurai-hayati, dan bahan perekat (Flach, 1997). Perbanyakkan tanaman sagu umumnya dilakukan secara vegetatif, dengan anakan (*sucker*) yang tumbuh di sekitar batang utama (induk). Perbanyakkan dengan anakan menghasilkan tanaman yang relatif seragam, tetapi jumlah anakan yang dihasilkan sangat terbatas. Hal ini merupakan salah satu hambatan utama dalam pengembangan budidaya tanaman sagu secara komersial (Jong, 1995).

Kultur jaringan tanaman sagu dilakukan melalui induksi embrio zigotik (Hisajima *et al.*, 1991) maupun embrio somatik (Tahardi *et al.*, 2002). Embriogenesis somatik merupakan salah satu aplikasi penting dalam propagasi tanaman secara vegetatif dalam skala besar (van Arnold *et al.*, 2002). Tahardi *et al.* (2002) telah berhasil menginduksi embrio somatik tanaman sagu dengan menggunakan eksplan berupa jaringan muda dari

tunas apikal anakan. Embriogenesis somatik sagu serupa dengan embriogenesis somatik tanaman palma lainnya yang diawali dengan pembentukan kalus embriogenik, yang kemudian pada fase selanjutnya membentuk embrio somatik globuler. Tahapan selanjutnya adalah perubahan menjadi fase bentuk hati, torpedo, kotiledon, dan kecambah. Kecambah berkembang membentuk planlet yang selanjutnya akan menjadi bibit.

Kultur jaringan tanaman sagu umumnya dilakukan pada medium padat untuk semua fase perkembangan dimulai dari induksi kalus hingga ke proses maturasi embrio. Pada beberapa jenis tanaman palma lainnya seperti kelapa sawit, penggunaan medium padat dalam prosedur propagasi *in vitro* mempunyai beberapa kekurangan diantaranya pertumbuhan embrio yang tidak seragam dan multiplikasi kalus yang rendah. Hal ini dapat menjadi hambatan untuk produksi skala besar, di samping biaya produksi yang mahal (Duval *et al.*, 1993). Alternatif lainnya adalah penggunaan medium cair sebagai medium tumbuh. Kultur cair telah berhasil dilakukan pada beberapa tanaman perkebunan, diantaranya kelapa sawit (Sumaryono *et al.*, 1994). Sistem ini memberikan hasil yang menjanjikan karena dapat memproduksi embrio somatik dalam skala besar dengan menggunakan bioreaktor. Akan tetapi pada medium cair, eksplan cenderung mengalami kekurangan oksigen sehingga dapat menghambat pertumbuhan (Sumaryono *et al.*, 1994).

Selain prosedur konvensional seperti kultur pada medium padat dan cair, terdapat prosedur kultur lainnya yaitu sistem perendaman sesaat (*temporary immersion system*). Sistem ini memungkinkan terjadinya perendaman periodik dalam jangka waktu pendek, dan

selebihnya kalus atau embrio terpapar ke udara. Kondisi ini, menurut Teisson *et al* (1999) memungkinkan terjadinya transfer oksigen yang cukup, pencampuran antara propagul dan medium memadai, pergantian medium berurutan dan otomatis, kontaminasi berkurang, serta biaya relatif rendah. Sistem perendaman sesaat (SPS) telah diaplikasikan untuk perbanyakkan *in vitro* secara masal pada berbagai jenis tanaman, antara lain pada karet (Etienne *et al.*, 1997), kopi (Berthouly *et al.*, 1995), teh (Tahardi *et al.*, 2003), dan kelapa sawit (Tahardi, 1998).

Dalam rangka produksi bibit tanaman sagu melalui kultur jaringan, perlu dilakukan perbanyakkan kalus embriogenik sebagai sumber bahan pembentuk embrio somatik. Perkembangan kalus embriogenik sagu yang baik dan cepat merupakan tahap awal untuk mendapatkan embrio somatik yang seragam dalam skala besar. Melalui penelitian ini, dipelajari dan dibandingkan perkembangan kalus embriogenik sagu pada tiga sistem kultur *in vitro*, yaitu medium padat, cair, dan SPS.

Bahan dan Metode

Bahan tanaman

Penelitian dilakukan di laboratorium Biak Sel dan Mikropropagasi Tanaman, Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor. Dalam penelitian ini, digunakan kalus embriogenik sagu yang merupakan kalus embriogenik sekunder yang berasal dari kultur embrio somatik pada medium padat. Kalus embriogenik diinduksi dari eksplan jaringan pucuk meristem anakan sagu asal Kalimantan Selatan dengan menggunakan medium padat modifikasi MS (medium MMS)

seperti yang dilaporkan oleh Tahardi *et al.* (2002).

Medium dan kondisi kultur

Sebanyak 0,5 g kalus embriogenik dikulturkan pada tiga jenis medium tumbuh yang berbeda, yaitu medium padat di cawan Petri, cair di labu Erlenmeyer dan medium cair dengan sistem perendaman sesaat (SPS). Komposisi dasar ketiga media adalah MMS dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D 10 mg/L; kinetin 0,1 mg/L; sukrosa 30 g/L; dan arang aktif 1 g/L. Khusus untuk medium padat ditambahkan gelrite 2 g/L. Sebanyak 50 mL medium masing-masing ditempatkan pada cawan Petri berdiameter 10 cm untuk medium padat dan pada labu Erlenmeyer 250 mL untuk medium cair. Untuk kultur cair, dilakukan penggoyangan dengan meletakkan labu Erlenmeyer pada *shaker* dengan kecepatan 100 rpm.

Pada kultur SPS, kalus dikulturkan pada bejana yang terdiri dari dua wadah dengan propagul (kalus atau embrio somatik) terletak di bagian atas dan medium di bagian bawah (Gambar 1). Sebanyak 50 mL medium cair dapat naik menggenangi propagul selama jangka waktu dan interval yang telah diatur sesuai program dengan alat *autonic double timer*. Dalam penelitian ini jangka waktu perendaman selama tiga menit dengan interval setiap enam jam.

Untuk ketiga jenis medium, pH medium disesuaikan pada skala 5,7 sebelum medium diautoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 kg/cm² selama 20 menit. Kultur ditempatkan di ruang kultur pada suhu 26°C dengan intensitas cahaya 30 µmol foton/m²/detik dan periode pencahayaan 14 jam.



Gambar 1. Kultur kalus embriogenik sagu pada medium cair dengan sistem perendaman sesaat (SPS).

Figure 1. Culture of embryogenic calli of sago in a liquid medium using temporary immersion system (TIS).

Pengamatan kalus embriogenik

Pertumbuhan kalus embriogenik diamati selama enam minggu, menggunakan metode destruktif dengan memanen lima cawan Petri (medium padat) dan lima labu Erlenmeyer (medium cair) yang dipilih secara acak setiap minggu. Khusus untuk medium SPS, dipanen tiga bejana yang dipilih secara acak. Pertumbuhan diamati dengan menimbang bobot basah kalus. Dari data bobot basah tersebut dibuat kurva pertumbuhan kalus embriogenik sagu. Pada akhir periode kultur (minggu keenam) diamati pula komposisi kalus embriogenik dan embrio somatik berdasarkan bobot basah pada masing-masing medium tumbuh.

Histologi

Preparat histologi dibuat dari kalus embriogenik remah dan noduler yang diperoleh dari masing-masing perlakuan. Material (kalus remah dan kalus noduler)

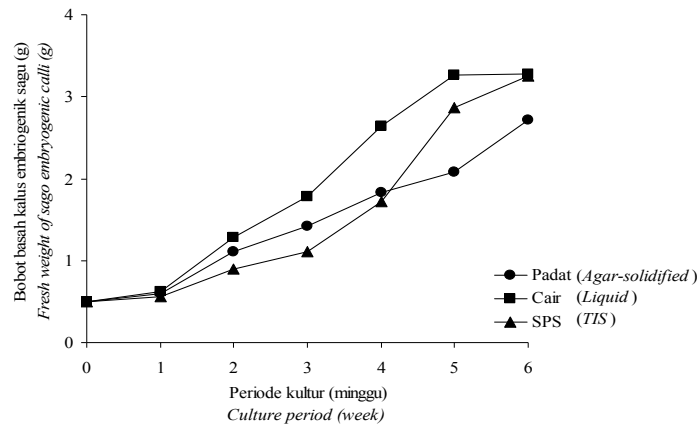
difiksasi dengan FAA (Formalin Acetic acid Alcohol) dengan komposisi 70% etil alkohol (80 mL), asam asetat glasial (10 ml), dan 10 mL formalin (37,5% formaldehid). Material yang akan dibuat preparat dimasukkan ke dalam botol flakon yang berisi larutan FAA selama 18 jam. Kemudian dilakukan proses dehidrasi menggunakan seri larutan butanol (40%, 55%, 70%, 85%, dan 100%) masing-masing selama satu jam. Selanjutnya cairan dehidran diganti dengan larutan butanol:paraplast (1:1) sebelum memasuki proses *embedding*. Spesimen di-*embedding* dengan menggunakan lilin Paraplast (Sigma). Cetakan hasil *embedding* yang berisi material tadi disimpan pada suhu ruangan. Pengirisan dilakukan dengan alat mikrotom putar dengan ketebalan irisan 10 μm dan pewarnaan menggunakan safranin 1% dalam akuades. Preparat histologi diamati di bawah mikroskop cahaya dan dipotret menggunakan kamera Nikon.

Hasil dan Pembahasan

Pertumbuhan kalus embriogenik

Hasil penelitian menunjukkan bahwa bobot basah total kultur kalus embriogenik sagu pada tiga sistem kultur *in vitro* meningkat terus hingga akhir masa kultur (minggu keenam). Pada akhir masa kultur, bobot basah total kalus embriogenik sagu pada medium padat sekitar 5,4 kali, pada medium cair dan medium SPS sekitar 6,5 kali lipat dari bobot basah kalus di awal kultur. Peningkatan terbesar terjadi pada kultur kalus embriogenik di medium cair, namun pada akhir periode kultur bobot basah kalus embriogenik pada medium cair sama dengan pada medium SPS (Gambar 2).

Perkembangan kalus embriogenik sagu...



Gambar 2. Kurva pertumbuhan kalus embriogenik sagu pada tiga sistem kultur *in vitro* selama enam minggu.

Figure 2. Growth curve of sago embryogenic calli on three different systems of *in vitro* culture over a six-week period.

Peningkatan bobot kalus embriogenik sagu pada medium cair lebih baik dibandingkan dengan medium padat. Pada kultur kalus embriogenik kelapa sawit juga menunjukkan hal yang serupa, dimana pertumbuhan kalus pada medium cair lebih baik dibandingkan pada medium padat (Sumaryono *et al.*, 1994). Pada medium padat, hanya sebagian dari kalus embriogenik yang bersinggungan dengan permukaan medium, sementara pada medium cair dan SPS seluruh kalus embriogenik terpapar pada medium. Hal ini berpengaruh terhadap penyerapan medium oleh kalus yang digunakan untuk tumbuh.

Pemaparan kalus embriogenik terhadap medium secara terus-menerus dapat menyebabkan kalus mengalami kekurangan oksigen yang juga menghalangi pertumbuhan kalus. Pada medium SPS, dengan perendaman medium secara berkala, seluruh permukaan kalus dapat berhubungan (kontak) langsung dengan medium pada saat medium menggenangi

kalus, sehingga penyerapan nutrisi terjadi di seluruh bagian kalus, tidak hanya di bagian bawah saja seperti pada medium padat. Dibandingkan dengan medium cair, pada medium SPS terjadi transfer oksigen yang cukup. Oleh karena itu, pertumbuhan kalus menjadi lebih baik karena nutrisi dapat diserap secara bersamaan dalam proporsi seimbang.

Pada medium SPS dan medium padat, hingga akhir masa kultur (minggu keenam) pertumbuhan kalus embriogenik sagu tetap menunjukkan peningkatan, sehingga periode kultur kalus embriogenik sagu pada kedua jenis medium tersebut mungkin dapat diperpanjang. Sementara pada medium cair, pertumbuhan menunjukkan peningkatan hingga minggu kelima dan relatif sama hingga minggu keenam (*levelling off*). Oleh karena itu periode kultur kalus embriogenik sagu pada medium cair sebaiknya dilakukan selama lima minggu. Setelah lima minggu medium harus diperbaharui dengan melakukan subkultur dan interval transfer

kalus embriogenik sagu setiap 5-6 minggu. Interval ini lebih lama jika dibandingkan dengan tanaman kelapa sawit, dimana proliferasi kalus embriogenik paling optimal diperoleh dengan interval transfer setiap empat minggu di medium SPS (Sumaryono *et al.*, 2007).

Perkembangan kalus dan embrio somatik

Pada akhir masa kultur, dilakukan pengamatan terhadap perkembangan kalus embriogenik di tiga jenis medium tumbuh. Pada awal kultur, semua kalus berupa embriogenik yang remah (Gambar 3A). Hasil pengamatan menunjukkan sebagian kalus mengalami diferensiasi menjadi embrio somatik fase perkembangan awal yaitu fase globuler. Berdasarkan bobot basah sebanyak 19,7 % kalus berubah menjadi embrio somatik pada medium padat, 40,5 % pada medium cair dan 38,4 % pada medium SPS (Tabel 1). Perubahan ini dapat mempengaruhi pertambahan bobot total kalus embriogenik pada tiga sistem kultur *in vitro* (Gambar 2).

Pembentukan embrio somatik pada medium proliferasi kalus embriogenik

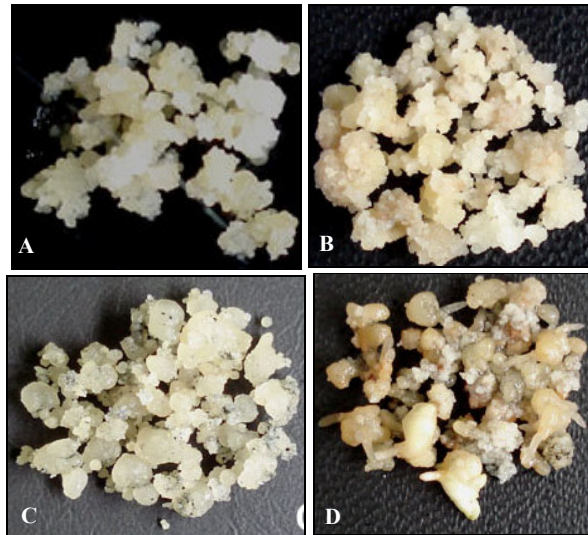
dapat disebabkan oleh zat pengatur tumbuh 2,4-D yang terdapat di dalam medium. Zat pengatur tumbuh jenis auksin dalam konsentrasi rendah digunakan untuk menginisiasi pembentukan embrio somatik pada tanaman kelapa (Chan *et al.*, 1999; Fernando & Gamage, 2000) dan kurma (Huong *et al.*, 1999). Pada penelitian sebelumnya Riyadi *et al.* (2005) menemukan bahwa penggunaan 2,4-D sebesar 10 mg/L yang dikombinasikan dengan kinetin 0,1 mg/L pada medium padat dapat menginisiasi pembentukan embrio somatik sagu sebesar 45%. Sehingga dengan menggunakan medium proliferasi, dapat dilakukan dua tahapan sekaligus yaitu proliferasi dan diferensiasi kalus embriogenik menjadi embrio somatik.

Kondisi medium tumbuh, khususnya luas dan lama kontak antara kalus dengan medium, mempengaruhi perubahan kalus embriogenik. Hal ini menyebabkan pada medium padat sebagian besar kalus tetap remah (Gambar 3B), sedangkan pada medium cair kalus mengalami pertumbuhan yang lebih baik, dan memungkinkan sebagian berubah menjadi embrio somatik (Gambar 3C).

Tabel 1. Perubahan komposisi kalus embriogenik sagu pada tiga sistem kultur *in vitro* setelah enam minggu dikulturkan, berdasarkan bobot basah total kalus.

Table 1. Composition changes of sago embryogenic calli on three different systems of in vitro culture over a six-week culture period, based on total fresh weight of calli.

Sistem kultur <i>Culture system</i>	Persentase komposisi kultur (%) <i>Percentage of culture composition (%)</i>	
	Kalus embriogenik <i>Embryogenic calli</i>	Embrio somatik <i>Somatic embryo</i>
Medium padat <i>Agar-solidified medium</i>	80,3	19,7
Medium cair <i>Liquid medium</i>	59,5	40,5
SPS <i>TIS</i>	61,6	38,4



Gambar 3. Kalus embriogenik sagu: kalus awal (A) setelah enam minggu dikulturkan pada medium padat (B), pada medium cair (C), dan pada sistem perendaman sesaat (D).

Figure 3. Embryogenic calli of sagu: initial calli (A) after six-weeks cultured on agar-solidified medium (B), in liquid medium (C), and in temporary immersion system (D).

Pada medium cair, seluruh permukaan kalus berhubungan langsung dengan medium, sementara pada medium padat hanya sebagian yang mengalami kontak dengan medium. Demikian pula dengan penggunaan medium SPS dapat menghasilkan embrio somatik lebih tinggi (Gambar 3D) dibandingkan medium padat. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian pada kelapa sawit (Tahardi, 1998) yang menunjukkan bahwa frekuensi pembentukan embrio somatik dari kalus nodular pada medium SPS sangat tinggi. Penggunaan medium SPS dapat meningkatkan keseragaman embrio smatik dan meningkatkan skala produksi.

Pada penelitian ini lama perendaman diatur tiga menit setiap enam jam. Pengaturan ini didasarkan pada penelitian tanaman kelapa sawit (Sumaryono *et al.*,

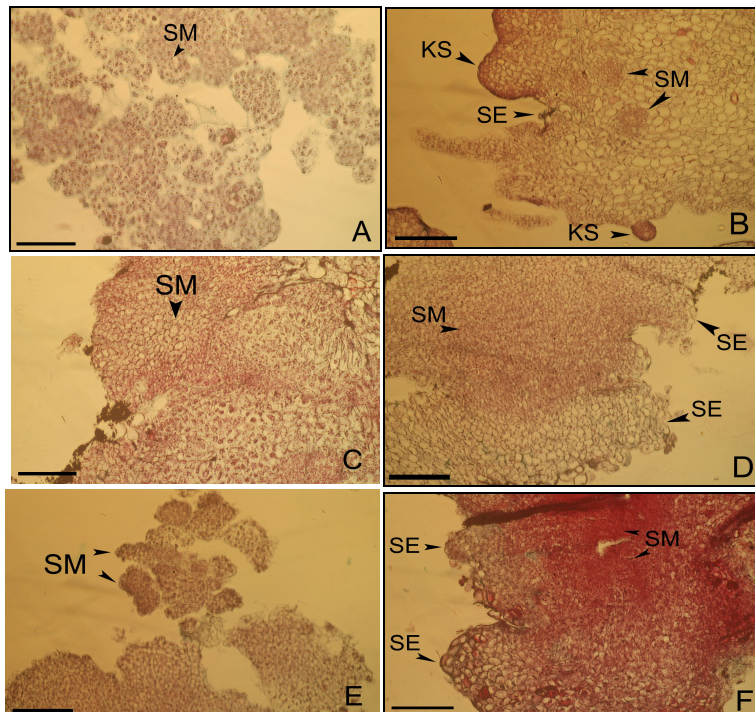
2007). Pada tanaman tahunan, rentang lama perendaman 1 sampai 15 menit dengan frekuensi perendaman 2 sampai 12 jam (Etienne & Berthouly, 2002). Untuk mendapatkan hasil yang lebih baik maka perlu dilakukan penelitian tentang lama dan frekuensi perendaman pada fase pertumbuhan kalus dan embrio somatik sagu.

Histologi

Pengamatan anatomi dari kalus embriogenik sagu menunjukkan bahwa kalus embriogenik remah terdiri atas sel-sel yang bersifat meristematik (yang ditandai dengan ruang antar sel lebih rapat, mempunyai inti yang jelas, menyerap warna kuat, sitoplasma padat dan aktivitas pembelahan sel yang tinggi).

Pada kalus embriogenik remah di medium padat dan SPS sel-sel meristem tersebut membentuk kluster-kluster yang dilindungi lapisan polisakarida (Gambar 4A dan 4E), dimana setiap kluster tersebut nantinya akan menjadi satu individu kalus yang terpisah. Sementara pada medium

cair sel-sel meristem membentuk daerah meristematik di bagian tepi (Gambar 4C). Hal serupa juga dijumpai pada kalus embriogenik tanaman kurma (Sané *et al.*, 2006). Pada ketiga jenis medium, kalus embriogenik noduler terdiri atas sel-sel meristematik dan sel-sel embriogenik (Gambar 4B, 4D, dan 4F).



Gambar 4. Penampang lintang kalus embriogenik remah dan noduler pada tiga sistem kultur yang berbeda. Kalus embriogenik remah pada medium padat (A). Kalus embriogenik noduler pada medium padat (B). Kalus embriogenik remah di medium cair (C). Kalus embriogenik noduler di medium cair (D). Kalus embriogenik remah di SPS (E). Kalus embriogenik noduler di SPS (F). SM= sel meristem, SE= sel embriogenik, KS= kalus sekunder. Bar = 125 μ m.

Figure 4. Transversal section of friable and nodular embryogenic calli on different systems of culture. Friable embryogenic calli on solid medium (A). Nodular embryogenic calli on solid medium (B). Friable embryogenic calli in liquid medium (C). Nodular embryogenic calli in liquid medium (D). Friable embryogenic calli in temporary immersion system (E). Nodular embryogenic calli in temporary immersion system (F). SM = meristematic cell, SE = embryogenic cell, KS = secondary callus. Bar = 125 μ m.

Sel meristematik pada umumnya terdapat di bagian tengah sedangkan sel embriogenik terdapat di bagian tepi. Sel embriogenik mempunyai ruang antar sel yang tidak dijumpai pada sel meristem, sehingga sel-sel meristem lebih rapat. Di antara kedua jaringan tersebut terdapat sekelompok sel yang mempunyai vakuola yang besar dan bersifat paren-kimatis (yang nantinya akan membentuk jaringan parenkim). Pada kalus embriogenik noduler di medium padat terdapat bentukan kalus sekunder pada bagian tepi yang juga terdiri atas sel-sel meristem (Gambar 4B). Struktur histologi kalus embriogenik pada ketiga jenis kultur *in vitro* menunjukkan pola yang berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan jenis medium akan mempengaruhi tipe kalus embriogenik yang terbentuk.

Medium padat dapat digunakan untuk proliferasi kalus karena mempercepat pembentukan kalus sekunder dan pembentukan kalus embriogenik remah yang lebih banyak. Sementara pada SPS dan medium cair, pembentukan kalus embriogenik remah relatif sedikit, sehingga terbentuk lebih banyak sel embriogenik yang menunjang proses pendewasaan menjadi embrio somatik. Oleh karena itu, penggunaan medium cair dan medium SPS dapat direkomendasikan sebagai medium tumbuh untuk pendewasaan kalus embriogenik menjadi embrio somatik. Sedangkan untuk proliferasi kalus embriogenik sagu sebaiknya tetap menggunakan medium padat.

Kesimpulan

Pertumbuhan kalus embriogenik sagu pada medium cair dan SPS lebih baik dibandingkan pada medium padat. Akan tetapi pertumbuhan ini diikuti dengan perkembangan kalus embriogenik menjadi

embrio somatik fase globuler. Penggunaan media cair dan SPS untuk tahapan pendewasaan kalus embriogenik menjadi embrio somatik, sedangkan medium padat untuk tahapan proliferasi kalus embriogenik sagu.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai melalui Program Insentif Riset Terapan dengan nomor kontrak 78/RT/Insentif/PPK/1/2007 tanggal 15 Januari 2007, dari Kementerian Negara Riset dan Teknologi, Republik Indonesia.

Daftar Pustaka

- Berthouly, M., M. Dufour, D. Alvard, C. Carasco, L. Alemanno & C. Teisson (1995). *Coffee micropropagation in liquid medium using temporary immersion technique*, ASIC, Kyoto, Vol II, 514-519C.
- Chan, J.L., L. Saenz, C. Talavera, R. Hornung, M. Robert & C. Oropeza (1998). Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.*, **17**, 515-521.
- Duval, Y., F. Aberlenc & B. de Touchet (1993). Use of embryogenic suspensions for oil palm micropropagation. In V. Rao, I.E. Henson & N. Rajanaidu (Eds.) *Recent Development in Oil Palm Tissue Culture and Biotechnology*. Palm Oil Research Institute of Malaysia, p. 38-47.
- Etienne, H., M. Lartaud, N. Michaux-Ferrière, M.P. Carron, M. Berthouly & C. Teisson (1997). Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. using the temporary immersion technique. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **33**, 81-87.

- Etienne, H. & M. Berthouly (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **69**, 215-231.
- Fernanado, S. C. & C. K. A. Gamage (2000). Absisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Sci.*, **151**, 193-198.
- 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. 76p.
- 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 embryo in vitro. *J. Trop. Agric.*, **35**(4), 259-267
- Jong, F. S. (1995). *Research for the Development of Sago Palm (Metroxylon sagu Rottb.) Cultivation in Sarawak, Malaysia*. Malaysia, Sadong Press Sdn. Bhd. 139p.
- Riyadi, I., J. S. Tahardi & Sumaryono (2005). The development of somatic embryos of sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) on solid media. *Menara Perkebunan*, **73**(2), 35-43.
- Sané, D., F. Aberlenc-Bertossi, Y.K. Gassama-Dia, M. Sagna, M. F. Trouslot, Y. Duval & A. Borgel (2006). Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspension of date palm (*Phoenix dactylifera*). *Ann. Bot.*, **98**, 301-308.
- Sumaryono, N. Mardiana & J. S. Tahardi (1994). Embryogenic suspension culture of oil palm. *Menara Perkebunan*, **62**(3), 41-46.
- 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 *Proc. International Oil Palm Conf.* Nusa Dua, Bali, 23-25 September 1998.
- Tahardi, J. S., N. F. Sianipar & I. Riyadi (2002). Somatic embryogenesis in sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.). In K. Kaimuna, M. Okazaki, Y. Toyoda, & J.E. Cecil (Eds.) *New Frontiers of Sago Palm Studies*. Tokyo, Universal Academy Press, p. 75-81.
- Tahardi, J. S., I. Riyadi & W. A. Dodd (2003). Enhancement of somatic embryo development and plant recovery in *Camellia sinensis* by temporary liquid immersion. *Jurnal Biotek. Pertanian*, **8**(1), 1-7.
- 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 International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*, Jerusalem, p. 629-632.
- van Arnold S., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok & L. Filonova (2002). Development pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **69**, 233-249.