

Keragaman morfologi selama perkembangan embrio somatik sago (*Metroxylon sago* Rottb.)

Morphological variations during the development of somatic embryos of sago (Metroxylon sago Rottb.)

Pauline Destinugrainy KASI & SUMMARYONO

Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

Summary

In vitro culture of sago (Metroxylon sago Rottb.) on an agar-solidified medium consists of somatic embryos of different sizes, colors, and developmental stages. One gram of mostly globular somatic embryos were cultured on a solid medium to observe their morphological variations with respect to embryo size, color, and developmental stage over one passage of six weeks culture. The medium was a modified-MS medium with half-strength of macronutrients containing 0.01 mg/L ABA and 2 mg/L kinetin. At the end of culture passage, fresh weight of embryo increased by 2.3 folds. The embryo numbers increased by more than two times indicating the formation of secondary embryos. The average size of sago somatic embryos did not change significantly over the culture period; however, the embryo size was already highly varied at the start and increased gradually as the embryo developed. At the initial of culture, 33.7 % of the embryos were yellowish, 64.1 % were greenish, and 2.2% were reddish. By the end of the culture the composition of yellowish embryos increased to 51.2 %, greenish embryo decreased to 42.5 % and red embryos increased to 6.3 %. At the initial culture, 61 % of the embryos were at the globular, 9 % at heart-shape and 30 % at torpedo stage. Generally globular embryos developed into later-stage embryos as the culture progressed, although almost 56% of the embryos remained at the globular stage after the sixth week.

[Kata kunci : Embriogenesis somatik, *Metroxylon sago*, perkembangan embrio, sago, warna embrio]

Ringkasan

Kultur *in vitro* sago (*Metroxylon sago* Rottb.) pada medium padat terdiri dari embrio somatik dalam berbagai ukuran, warna, dan fase perkembangan. Satu gram embrio somatik yang sebagian besar dalam fase globuler dikulturkan pada medium padat untuk mengamati keragaman morfologi embrio dalam hal ukuran, warna dan fase perkembangan dalam satu periode kultur enam minggu. Medium kultur adalah MS modifikasi dengan setengah hara makro serta penambahan zat pengatur tumbuh ABA 0,01 mg/L dan kinetin 2 mg/L. Pada akhir masa kultur bobot embrio segar meningkat 2,3 kali dibandingkan awal masa kultur. Jumlah embrio juga mengalami peningkatan sebesar lebih dari dua kali yang menunjukkan adanya pembentukan embrio somatik sekunder. Ukuran rata-rata embrio tidak berubah secara signifikan selama masa kultur akan tetapi ukuran embrio telah sangat beragam pada awal kultur dan terus meningkat hingga akhir kultur. Warna embrio mengalami perubahan selama periode kultur. Pada awal kultur dijumpai 33,7 % embrio berwarna kuning, 64,1 % embrio hijau, dan 2,2 % embrio merah. Pada akhir kultur presentase embrio kuning meningkat menjadi 51,2 %, embrio hijau menjadi 42,5 %, dan embrio merah

6,3 %. Pada awal kultur, dijumpai 61 % embrio pada fase globuler, 9 % fase bentuk-hati dan 30 % fase torpedo. Umumnya embrio globuler berkembang menjadi embrio fase lanjut selama kultur berlangsung, namun 56 % embrio masih tetap dalam fase globuler pada minggu keenam.

Pendahuluan

Tanaman sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.) merupakan jenis tanaman palma yang tumbuh di sekitar rawa dan lahan tergenang air di daerah tropis. Tanaman ini mempunyai nilai penting karena merupakan tanaman pangan penghasil pati paling produktif (15-25 ton pati kering/hektar/tahun) dan penggunaan pati sagu dalam bidang industri yang sangat beragam (Flach, 1997). Kandungan pati terdapat di dalam batang tanaman dewasa. Selain dijadikan sebagai bahan makanan, pati sagu juga dimanfaatkan dalam bidang industri seperti bioetanol, sirup berkadar fruktosa tinggi, plastik terurai-hayati, dan bahan perekat (Flach, 1997).

Perbanyakan tanaman sagu umumnya dilakukan secara vegetatif, yaitu dengan anakan (*sucker*) yang tumbuh di sekitar batang utama (induk). Selain itu perbanyakan tanaman sagu dapat juga dilakukan secara generatif dengan biji. Namun, perbanyakan dengan biji jarang terjadi karena pada umumnya tanaman sagu dipanen sebelum mencapai fase reproduktif. Perbanyakan dengan anakan menghasilkan tanaman yang lebih seragam dibandingkan dengan biji, akan tetapi jumlah anakan yang dapat disediakan sangat terbatas. Hal ini merupakan salah satu hambatan utama dalam upaya pengembangan budidaya tanaman sagu secara komersial skala besar (Jong, 1995).

Kultur jaringan sagu telah berhasil dilakukan, walaupun publikasinya sangat terbatas (Hisajima *et al.*, 1991; Tahardi *et al.*, 2002; Riyadi *et al.*, 2005). Pada tanaman sagu, regenerasi planlet secara *in vitro* dapat melalui induksi embrio zigotik maupun embrio somatik (Tahardi *et al.*, 2002). Embriogenesis somatik merupakan salah satu aplikasi penting dalam propagasi tanaman secara vegetatif dalam skala besar (Arnold *et al.*, 2002). Tahardi *et al.* (2002) telah berhasil menginduksi kalus embriogenik tanaman sagu dengan menggunakan eksplan berupa jaringan muda dari tunas apikal anakan. Embriogenesis somatik sagu diawali dengan pembentukan kalus embriogenik, yang kemudian pada fase selanjutnya membentuk embrio somatik globuler. Perkembangan embrio somatik pada tanaman sagu menyerupai fase perkembangan embrio zigotik yang meliputi fase globuler, bentuk-hati, torpedo dan kotiledon.

Selanjutnya Riyadi *et al.* (2005) meneliti komposisi medium untuk induksi embrio somatik, pendewasaan embrio dan pembentukan planlet. Dalam fase perkembangan embrio somatik tanaman sagu Riyadi *et al.* (2005) melaporkan adanya keragaman morfologi meliputi ukuran, bentuk dan warna. Keragaman morfologi pada embrio somatik juga dijumpai pada kultur *in vitro* tanaman teh (Akula & Dodd, 1998; Sumaryono *et al.*, 2001). Keragaman morfologi yang tinggi pada embrio somatik dapat menghambat peningkatan propagasi tanaman secara *in vitro* untuk skala besar (Tautorius & Dunstan, 1995) dan merupakan kendala dalam pengembangan teknologi benih sintetik (Attree & Fowke, 1993; Onishi *et al.*, 1994). Penelitian ini merupakan studi lanjut mengenai keragaman morfo-

Keragaman morfologi selama perkembangan embrio...

logi yang dijumpai selama perkembangan embrio somatik tanaman sagu. Pemahaman mengenai keragaman morfologi pada embrio somatik sagu diharapkan dapat membantu dalam pengembangan prosedur dan kondisi kultur dari embriogenesis somatik sagu sebagai upaya untuk mendapatkan bibit sagu yang seragam dalam skala besar.

Bahan dan Metode

Bahan tanaman

Dalam penelitian ini digunakan embrio somatik globuler sagu yang berasal dari kultur pucuk tunas anakan muda sagu pada medium padat MS yang telah dimodifikasi (MMS), mengacu pada penelitian yang telah dilakukan oleh Riyadi *et al.* (2005). Subkultur dilakukan secara berkala setiap 4-5 minggu pada medium germinasi, yaitu medium MMS dengan setengah jumlah hara makro dan penambahan zat pengatur tumbuh ABA dan kinetin.

Medium dan kondisi kultur

Embrio somatik yang sebagian besar pada tahap globuler ditimbang sebanyak 1 g, kemudian dikulturkan pada 35 mL medium germinasi dalam botol kultur dengan diameter 6,7 cm dan tinggi 9,3 cm. Medium germinasi yang digunakan adalah MMS dengan penggunaan setengah hara makro ditambah ABA 0,01 mg/L, kinetin 2 mg/L, sukrosa 20 g/L, arang aktif 0,5 g/L, dan gelrite 2 g/L. Tingkat pH medium disesuaikan pada skala 5,7 sebelum medium diotoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 20 menit. Kultur ditempatkan di ruang kultur pada suhu 25 °C dengan intensitas cahaya 30 µmol foton/m²/detik dan periode pencahayaan 14 jam.

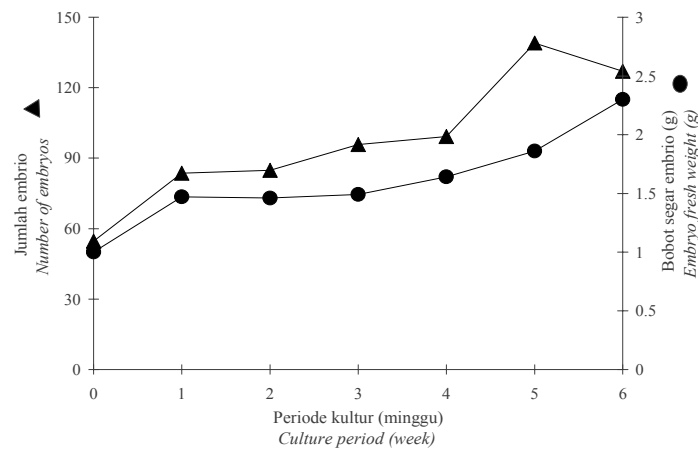
Pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik diamati selama enam minggu menggunakan metode destruktif dengan memanen lima botol yang dipilih secara acak setiap minggu. Pertumbuhan dan perkembangan diamati dengan mengukur panjang embrio serta menghitung jumlah dan bobot segar embrio. Pengamatan juga dilakukan terhadap warna dan fase perkembangan embrio somatik. Keragaman embrio ditentukan oleh ukuran embrio dan koefisien keragamannya. Koefisien keragaman didefinisikan sebagai hasil perhitungan standar deviasi dari sampel dibagi dengan angka rata-rata dan dinyatakan dalam bentuk persentase (Steel & Torrie, 1980).

Hasil dan Pembahasan

Pertumbuhan embrio

Bobot segar embrio somatik sagu mengalami peningkatan hingga akhir masa kultur (minggu keenam) (Gambar 1). Pada akhir masa kultur bobot segar embrio somatik sagu sekitar 2,3 kali dari bobot segar embrio somatik sagu di awal kultur. Hingga akhir masa kultur, jumlah embrio somatik pada umumnya mengalami peningkatan sekitar dua kali dari awal masa kultur. Pada minggu keenam terdapat 127 embrio somatik memenuhi permukaan medium pada botol yang berasal dari 55 embrio somatik pada awal masa kultur (Gambar 1). Penambahan jumlah embrio ini menunjukkan adanya pembentukan embrio somatik baru yang dinamakan embrio somatik sekunder, seperti yang dilaporkan sebelumnya (Riyadi *et al.*, 2005).

Laju pertumbuhan embrio sagu (dicerminkan oleh pertambahan jumlah dan bobot segar) sekitar 2,0-2,6 kali dalam



Gambar 1. Bobot segar dan jumlah total embrio somatik sagu per botol kultur pada medium padat setelah enam minggu dikulturkan.

Figure 1. Fresh wight and total number of sago somatic embryo per culture jar on a solid medium over a six-week culture period.

waktu enam minggu. Laju pertumbuhan ini serupa dengan yang diperoleh Riyadi *et al.* (2005), namun lebih rendah dibandingkan dengan laju pertumbuhan embrio somatik tanaman lain seperti pada tanaman teh sebesar 2,4-2,6 kali dalam waktu empat minggu (Tahardi *et al.*, 2000; Sumaryono *et al.*, 2001) dan 4-8 kali dalam waktu enam minggu (Akula & Dodd, 1998). Oleh karena itu perbaikan prosedur embriogenesis somatik sagu masih diperlukan untuk meningkatkan laju pertumbuhan embrio.

Ukuran embrio

Ukuran rata-rata embrio somatik sagu pada awal kultur adalah 3,56 mm (Tabel 1). Ukuran embrio sedikit menurun hingga minggu ketiga (3,46 mm) kemudian meningkat hingga akhir masa kultur (3,93 mm).

Penurunan ukuran ini dapat dimungkinkan karena adanya pertumbuhan embrio somatik sekunder yang ditandai munculnya embrio globuler berukuran kecil pada embrio somatik primer. Walaupun bobot segar embrio meningkat hingga akhir masa kultur menjadi lebih dari dua kali dibandingkan awal kultur (Gambar 1), tetapi ukuran rata-rata embrio somatik tidak berubah secara signifikan (Tabel 1).

Keragaman ukuran embrio somatik sagu yang dinyatakan oleh nilai koefisien keragaman (CV) menunjukkan keragaman yang sudah tinggi pada awal kultur (40,9%). Nilai CV lebih besar dari 30% menunjukkan adanya keragaman yang tinggi. CV dari ukuran embrio somatik sagu mengalami peningkatan hingga minggu keenam yang mencapai 63% (Tabel 1). Pada akhir masa kultur, sebagian embrio telah mencapai fase

Keragaman morfologi selama perkembangan embrio...

Tabel 1. Ukuran embrio somatik sagu dan koefisien keragamannya (CV) dalam satu periode kultur.

Table 1. Size of sago somatic embryo and its coefficient of variance (CV) on one passage of culture.

| Periode kultur (minggu) <i>Culture period (week)</i> | Ukuran embrio (mm) <i>Embryo size (mm)</i> | CV dari ukuran embrio (%) <i>CV of embryo size (%)</i> |
|---|---|---|
| 0 | 3,56 | 40,9 |
| 1 | 3,18 | 41,5 |
| 2 | 3,51 | 40,1 |
| 3 | 3,46 | 56,5 |
| 4 | 3,66 | 44,0 |
| 5 | 3,68 | 63,9 |
| 6 | 3,93 | 63,8 |

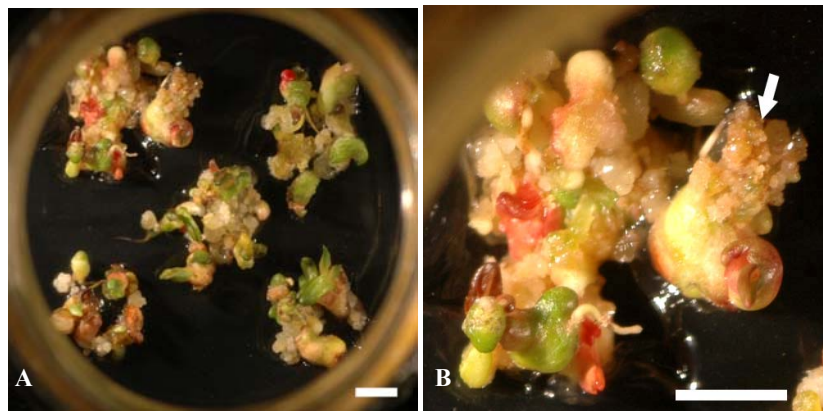
kotiledon dan kecambah dengan ukuran lebih dari 5 mm, walaupun masih banyak embrio pada fase globuler dan torpedo yang berukuran kurang dari 3 mm (Tabel 3). Beberapa fase perkembangan embrio dapat ditemukan pada saat yang sama, termasuk adanya pembentukan embrio somatik sekunder (Gambar 2). Pertumbuhan embrio somatik sekunder juga dijumpai pada kultur embriogenesis somatik tanaman teh (Akula & Dodd, 1998; Sumaryono *et al.*, 2001).

Warna embrio

Embrio somatik sagu yang dikulturkan pada medium padat terdiri atas beberapa warna yang berbeda. Pada awal kultur dijumpai 33,7 % embrio berwarna kuning, 64,1 % embrio berwarna hijau, dan 2,2 % embrio berwarna merah (Tabel 2). Pada minggu ketiga jumlah embrio kuning meningkat, karena embrio sekunder yang mulai terbentuk umumnya berwarna kuning. Hingga akhir masa kultur, jumlah embrio kuning meningkat menjadi sekitar setengah dari total jumlah embrio karena pertumbuhan embrio somatik sekunder yang baru tetap berlanjut. Sementara persentase embrio

hijau mengalami penurunan dari 64,1 % menjadi sekitar 42,5%, karena adanya pertumbuhan embrio lebih lanjut yang disertai perubahan warna menjadi merah. Embrio globuler pada umumnya berwarna kuning dan hijau, sementara kotiledon dan kecambah umumnya berwarna merah (Gambar 2). Hal yang sama juga dijumpai oleh peneliti sebelumnya (Riyadi *et al.*, 2005), dimana pada fase akhir pertumbuhan embrio somatik sagu ditemukan embrio yang berwarna merah. Warna merah pada kecambah sagu merupakan hal yang unik, karena tidak dijumpai pada tanaman perkebunan lainnya.

Warna embrio berhubungan dengan perkembangan embrio somatik, misalnya embrio berwarna putih pada karet berkembang menjadi planlet, sedangkan embrio hijau akan membentuk kalus dan menghasilkan kalus embriogenik lewat embriogenesis sekunder (Veisseire *et al.*, 1994). Warna embrio somatik telah digunakan dalam penilaian mutu benih sintetik wortel (Sakamoto *et al.*, 1992) dan potensi konversi embrio somatik dari ubi jalar (Padmanabhan *et al.*, 1998) dan walnut (Deng & Cornu, 1992).



Gambar 2. (A) Kultur embrio somatik sago pada medium padat MMS dengan berbagai ukuran, warna, dan fase perkembangan embrio yang ditemukan pada waktu yang sama selama dikulturkan; (B). Pembentukan embrio somatik sekunder. Bar = 1 cm.

Figure 2. (A). Somatic embryo cultures of sago on a solid MMS medium where different sizes, colors, and developmental stages of embryos found at any time during the culture; (B) formation of secondary somatic embryos. Bar =1 cm.

Tabel 2. Perubahan warna dari komposisi embrio somatik sago dalam satu periode kultur.
Table 2. Color changes of sago embryo somatic composition over one passage of culture.

| Periode kultur (minggu) <i>Culture period (week)</i> | Persentase warna embrio (%) <i>Percentage of embryo color (%)</i> | | |
|---|--|--------------------------|-------------------------|
| | Kuning <i>Yellowish</i> | Hijau <i>Greenish</i> | Merah <i>Reddish</i> |
| 0 | 33,7 | 64,1 | 2,2 |
| 1 | 53,4 | 45,2 | 1,4 |
| 2 | 45,3 | 44,6 | 10,1 |
| 3 | 60,1 | 32,4 | 7,5 |
| 4 | 33,4 | 41,7 | 2,8 |
| 5 | 56,7 | 37,4 | 6,1 |
| 6 | 51,2 | 42,5 | 6,3 |

Embrio somatik sago yang warnanya berbeda mungkin mempunyai perbedaan kadar cadangan simpan seperti pati dan

triasilgliserol yang diketahui berperan dalam perkecambahan embrio somatik menjadi planlet pada tanaman karet (Cailloux *et al.*, 1996).

Keragaman morfologi selama perkembangan embrio...

Tabel 3. Jumlah embrio somatik sagu dari berbagai fase perkembangan dalam satu periode kultur.

Table 3. Number of sago somatic embryos at different developmental stages over one passage of culture.

| Periode kultur (minggu) <i>Culture period (week)</i> | Jumlah embrio somatik sagu <i>Number of sago somatic embryos</i> | | | | |
|---|---|----------------------|---------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | Globuler <i>Globular</i> | Hati <i>Heart</i> | Torpedo <i>Torpedo</i> | Kotiledon <i>Cotyledon</i> | Kecambah <i>Germinant</i> |
| 0 | 33 | 5 | 16 | 0 | 0 |
| 1 | 56 | 2 | 20 | 5 | 0 |
| 2 | 44 | 5 | 28 | 5 | 2 |
| 3 | 57 | 1 | 18 | 10 | 10 |
| 4 | 59 | 3 | 22 | 12 | 4 |
| 5 | 83 | 3 | 29 | 19 | 9 |
| 6 | 71 | 0 | 36 | 9 | 9 |

Fase perkembangan embrio

Pada awal masa kultur, terdapat 54 embrio somatik pada berbagai fase perkembangan, 33 embrio (61%) berada pada fase globuler, tiga embrio (9 %) pada fase bentuk-hati, 16 embrio (30 %) pada fase torpedo, dan belum ada embrio fase lanjut (Tabel 3). Hingga minggu ketiga embrio pada fase globuler mengalami perkembangan ke fase selanjutnya, demikian pula embrio bentuk-hati dan torpedo mengalami perkembangan membentuk kotiledon dan kecambah. Pada minggu ketiga hingga minggu kelima jumlah embrio globuler semakin meningkat karena adanya pembentukan embrio somatik sekunder baru yang berbentuk globuler (Gambar 2 dan Tabel 3).

Jumlah embrio somatik sagu bentuk-hati yang terbentuk selama periode kultur cukup rendah. Hal ini sejalan dengan tanaman monokotil pada umumnya memang jarang dijumpai embrio bentuk-hati (Leyser

& Day, 2003). Dalam penelitian ini, pada akhir masa kultur tidak dijumpai adanya embrio yang berada pada fase bentuk-hati (Tabel 3). Untuk itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, dengan mengamati struktur anatomi dari embrio somatik sagu pada tiap fase perkembangan embrio.

Ketidakteragaman perkembangan embrio somatik juga dijumpai pada tanaman berkayu lain (Taurus & Dustan, 1995; Akula & Dodd, 1998; Sumaryono *et al.*, 2001). Keragaman embrio somatik sagu yang tinggi akan menghambat pengembangan produksi klonal secara massal dan produksi benih sintetik. Oleh karena itu perlu dilakukan upaya untuk meningkatkan keseragaman perkembangan embrio somatik sagu dengan memperbaiki medium dan kondisi kultur atau menggunakan kultur cair seperti yang telah dilakukan pada tanaman teh (Tahardi *et al.*, 2000) dan kelapa sawit (Tahardi, 1999).

Kesimpulan

Embrio somatik sagu yang dikulturkan pada medium padat terdiri atas berbagai ukuran, warna dan fase perkembangan selama satu periode kultur. Ukuran rata-rata embrio tidak berubah secara signifikan selama masa kultur, akan tetapi ukuran embrio telah beragam sejak awal kultur dan terus meningkat hingga akhir kultur. Komposisi warna embrio mengalami perubahan selama periode kultur. Persentase embrio kuning meningkat dari 33,7 % menjadi 51,2 %, embrio merah dari 2,2 % menjadi 6,3 % sedangkan embrio hijau menurun menjadi 42,5 %. Sampai akhir kultur, jumlah embrio fase globuler tetap meningkat karena adanya pertumbuhan embrio sekunder, walaupun sebagian berkembang menjadi embrio somatik fase-lanjut. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai perubahan warna embrio tunggal selama masa perkembangan dan upaya untuk meningkatkan keseragaman embrio somatik sagu antara lain dengan menggunakan kultur cair.

Daftar Pustaka

- Akula, A. & W. A. Dodd (1998). Direct somatic embryogenesis in a selected tea clone, 'TRI-2005' (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) from nodal explants. *Plant Cell Rep.*, **17**, 804-809.
- Arnold, S., van, I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok & L. Filonova (2002). Development pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **69**, 233-249.
- Attree, S. M. & L. C. Fowke (1993). Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell, Tiss. & Org. Cult.*, **35**, 1-35.
- Cailloux, F., J. Julien-Guerrier, L. Linossier & A. Coudret (1996). Long-term somatic embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. *Plant Sci.*, **120**, 185-196.
- Deng, M. D. & D. Cornu (1992). Maturation and germination of walnut somatic embryos. *Plant Cell, Tiss. & Org. Cult.*, **28**, 195-202.
- Flach, M. (1997). *Sago Palm. Metroxylon sago Rottb. Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops*. 13. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 76p.
- Hisajima, S., F. S. Jong, Y. Arai & E. S. Sim (1991). Propagation and breeding of sago palm (*Metroxylon sago* 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 sago Rottb.) Cultivation in Sarawak*, Malaysia. Sadong Press Sdn. Bhd. 139p.
- Leyser, O. & S. Day (2003). *Mechanism in Plant Development*. Blackwell Publishing. 231p.
- Onishi, N., Y. Sakamoto & T. Hirose (1994). Synthetic seeds as an application of mass production of somatic embryos. *Plant Cell, Tiss. & Org. Cult.*, **39**, 137-145.
- Padmanabhan, K., D. J. Cantliffe, R. C. Harrel & J. Harrison (1998). Computer vision analysis of somatic embryo of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.) for assessing their ability to convert to plants. *Plant Cell Rep.*, **17**, 681-684.
- Riyadi, I., J. S. Tahardi & Sumaryono (2005). The development of somatic embryos of

Keragaman morfologi selama perkembangan embrio...

- sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) on solid media. *Menara Perkebunan*, **73** (2), 35-43.
- Sakamoto, Y., T. Mashiko, A. Suzuki & H. Kawata (1992). Development of encapsulation technology for synthetic seed. *Acta Hort.*, **319**, 71-76.
- Steel, R. G. D. & J. H. Torrie (1980). *Principles and Procedures of Statistics : A Biometrical Approach*, 2nd ed. New York, McGraw-Hill Inc. 633p.
- 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.
- Tahardi, J.S. (1999). Growth characteristics of embryogenic cells of oil palm in bioreactor cultures. *J. Bioteknol. Pertanian*, **4**(2), 49-55.
- Tahardi, J.S., T. Raisawati, I. Riyadi & W.A. Dodd (2000). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration in tea by temporary liquid immersion. *Menara Perkebunan*, **68**(1), 1-9.
- Tahardi, J.S., N. F. Sianipar & I. Riyadi (2002). Somatic embryogenesis in sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.). In K.Kainuma et al. (eds.). *New Frontiers of Sago Palm Studies*. Tokyo-Japan, Universal Academy Press. p. 75-81.
- Taurus, T. E. & D. J. Dunstan (1995). Scale-up of embryogenic plant suspension cultures in bioreactors. In S. Jain, P. Gupta & R. Newton (eds.) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, Vol. 1, p. 265-292.
- Veisseire, P., L. Linossier & A. Coudret (1994). Effect of abscisic acid and cytokinins on the development of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell. Tiss. & Org. Cult.*, **39**, 219-223.