

Pengaruh Kinetin dan BAP terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Embrio Somatik Tanaman Sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.)

Imron Riyadi

Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Jl. Taman Kencana No. 1, Bogor 16151
Telp. (0251) 8324048, 8633080, Faks. (0251) 8327449; E-mail: imron_riyadi@yahoo.co.id

Diajukan: 10 Mei 2010; Diterima: 2 September 2010

ABSTRACT

Effect of Kinetin and BAP to Growth and Development of Somatic Embryos of Sago Palm (*Metroxylon sagu* Rottb.).

Imron Riyadi. Somatic embryos induction in sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) have successfully developed. Kinds and concentration of plant growth regulators (PGR's) influence to growth and development of somatic embryos. The research was conducted to determine the optimal concentration of BAP and kinetin for proliferation, maturation and germination of sago palm somatic embryos. Cotyledon-stage of somatic embryo derived from shoot tip cultures cultured on Modified Murashige-Skoog (MMS) with half-strength macro-salts and added with 30 g/l sucrose, 2 g/l gelrite, 1 g/l activated charcoal. pH of media was adjusted at 5.6 before sterilized. The media were supplemented with 0.1-2.0 mg/l BAP and 0.1-2.0 mg/l kinetin in combination with 0.01 mg/l ABA each for supporting growth and development. The cultures was incubated at $26 \pm 1^\circ\text{C}$ under a 12-h photoperiod with lighting providing an intensity 20 $\mu\text{moles photons/m}^2/\text{second}$ for 11 weeks with replication 10 times. The results showed that the highest of somatic embryo proliferation was achieved in a culture medium with BAP at 0.5 mg/l + 0.01 mg/l ABA with an expression rate of 94%, the best maturation at 1.0 mg/l kinetin + 0.01 mg/l ABA with an expression rate of 93.5% and the most germination at 2.0 mg/l kinetin + 0.01 mg/l ABA with an expression rate of 100%. Transfer of these germinants to gelled media without PGR's led to the development of normal plantlets.

Keywords: BAP, kinetin, germination sago palm, somatic embryogenesis, maturation, *Metroxylon sagu* Rottb.

ABSTRAK

Pengaruh Kinetin dan BAP terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Embrio Somatik Tanaman Sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.). Imron Riyadi. Induksi embrio somatik tanaman sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.) telah berhasil dikembangkan. Jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi BAP dan kinetin yang optimal untuk penggandaan, pendewasaan, dan perkecambahan embrio

somatik tanaman sagu. Embrio somatik fase kotiledon yang berasal dari kultur pucuk tunas dikulturkan pada media Murashige-Skoog Modifikasi (MMS) dengan setengah konsentrasi garam makro dan ditambahkan sukrosa 30 g/l, gelrite 2 g/l, dan arang aktif 1 g/l. Nilai pH media diatur pada 5,6 sebelum disterilisasi. Media tersebut ditambahkan BAP 0,1-2,0 dan kinetin 0,1-2,0 yang masing-masing dikombinasikan dengan ABA 0,01 mg/l untuk mendorong pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik sagu. Kultur diinkubasi di bawah cahaya lampu TL dengan intensitas cahaya 20 $\mu\text{mol foton/m}^2/\text{detik}$ dengan periode penyinaran 12 jam pada suhu $26 \pm 1^\circ\text{C}$ selama 11 minggu menggunakan ulangan 10 kali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggandaan embrio somatik sagu tertinggi sebesar 94% yang dicapai pada media kultur dengan penambahan BAP 0,5 mg/l + ABA 0,01 mg/l, pendewasaan embrio somatik terbaik diperoleh pada media dengan pemberian kinetin 1,0 mg/l + ABA 0,01 mg/l yang mencapai 93,5% dan perkecambahan embrio somatik terbanyak diperoleh pada media dengan penambahan kinetin 2,0 mg/l + ABA 0,01 mg/l yang mencapai 100%. Pemindahan kultur kecambah asal embrio somatik tersebut pada media padat tanpa ZPT telah mengalami perkembangan menjadi planlet normal.

Kata kunci: BAP, kinetin, perkecambahan sagu, embriogenesis somatik, pendewasaan, *Metroxylon sagu* Rottb.

PENDAHULUAN

Pemanfaatan tanaman sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.) di Indonesia belum optimal, sebagian besar masih digunakan sebagai sumber bahan makanan pokok terutama Indonesia bagian Timur (Maluku dan Papua) dan sumber bahan makanan olahan lainnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanaman sagu mempunyai potensi besar sebagai sumber bahan industri, yaitu seperti bahan kimia industri (penghasil alkohol/bioetanol), lem atau perekat, kosmetik, farmasi/bahan obat-obatan, makanan ternak, tekstil, kertas dan makanan olahan (Flach, 1997).

Pembukaan areal perkebunan baru atau peremajaan perkebunan tanaman sagu memerlukan ketersediaan bibit sagu yang unggul, seragam, dalam jumlah besar, dan dalam waktu relatif singkat. Sampai seka-

rang, perbanyak tanaman sagu masih dilakukan secara konvensional dengan tunas anakan (*sucker*). Sistem perbanyak konvensional memiliki beberapa kelemahan, antara lain proses seleksi memerlukan waktu lama dengan tingkat kerumitan yang relatif tinggi dan penanaman bibit memerlukan waktu dan biaya besar (Tahardi *et al.*, 2002). Teknologi *in vitro* menawarkan alternatif untuk mengatasi masalah perbanyak konvensional. Teknologi ini, khususnya teknik embriogenesis somatik, mampu menghasilkan bibit tanaman secara masal, tingkat keseragaman tinggi, bersifat klonal (sama dengan induknya), dan juvenil (jagur) seperti dari biji (Pedroso dan Pais, 1995; Tahardi, 1999).

Jenis dan komposisi zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan dalam media sangat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan tanaman dalam kultur *in vitro*. Dua golongan ZPT yang sering digunakan adalah golongan auksin dan sitokinin. Kedua ZPT tersebut sering dikombinasikan dengan berbagai konsentrasi tergantung tujuan kultur (Suryowinoto, 1989). Kandungan auksin seperti 2,4-D, NAA, IBA, dan IAA yang tinggi lebih banyak berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus atau akar, sedangkan kandungan sitokinin, seperti BAP dan kinetin yang tinggi lebih banyak berpengaruh terhadap tunas saja (Neuenschwander dan Baumann, 1992; Castillo dan Smith, 1997; Aberlenc-Bertossi *et al.*, 1999). Perbandingan konsentrasi kedua golongan ZPT yang hampir berimbang, pada umumnya berpengaruh terhadap pertumbuhan tunas dan akar (Suryowinoto, 1990; Arnold *et al.*, 2002).

Penelitian embriogenesis somatik pada sagu telah berhasil dilakukan. Tahardi *et al.* (2002), melaporkan hasil penelitiannya tentang induksi kalus embriogenik pada sagu yang menggunakan eksplan berupa meristem pucuk dari tunas anakan pada media MS modifikasi dengan penambahan 2,4-D 20-200 mg/l dikombinasikan dengan kinetin 0,1-1,0 mg/l. Inisiasi kalus embriogenik sagu yang dihasilkan berkisar 12-28%. Induksi embriogenesis somatik sagu dapat mencapai 100% pada media sama dengan penambahan 2,4-D 5-10 mg/l dikombinasikan dengan kinetin 0,1 mg/l (Riyadi *et al.*, 2005). Teknologi perakitan bibit sagu dengan teknik embriogenesis somatik telah dipatenkan dengan No. S-00200200187 (LRPI, 2009).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan kinetin dan BAP terhadap penggandaan, pendewasaan, dan perkecambahan embrio somatik tanaman sagu secara *in vitro* pada media padat.

BAHAN DAN METODE

Bahan kultur berupa embrio somatik stadium kotiledon yang berasal dari perkembangan embrio globuler hasil induksi dari kalus noduler. Kalus noduler tersebut diperoleh dari induksi kalus embriogenik pada eksplan tunas pucuk anakan sagu lokal yang diambil dari kebun sagu rakyat di Parung, Bogor, Jawa Barat. Media yang digunakan untuk induksi kalus embriogenik sagu adalah media MS modifikasi yang mengandung sukrosa 3%, arang aktif 0,1%, dan gelrite 0,2% menurut Tahardi *et al.* (2002) dengan penambahan 2,4-D 20-200 mg/l dikombinasikan dengan kinetin 0,1 mg/l. Modifikasi media MS dilakukan untuk memperoleh inisiasi kalus embriogenik yang efektif dan efisien dengan mengubah konsentrasi beberapa garam makro (telah dipatenkan) dari konsentrasi media MS standar.

Embrio somatik sagu stadium kotiledon hasil perkembangan embrio somatik fase globuler yang berasal dari embriogenesis kalus noduler sagu dikulturkan dalam media MS modifikasi menurut Tahardi *et al.* (2002) yang mengandung sukrosa 3%, gelrite 0,2%, dan arang aktif 0,1% serta ditambahkan BAP 0,1-2,0 mg/l atau kinetin 0,1-2,0 mg/l yang masing-masing dikombinasikan dengan ABA 0,01 mg/l. Nilai pH media diatur 5,7 sebelum disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 20 menit. Embrio somatik tersebut dikulturkan dalam botol jam diameter 6 cm dan tinggi 9,5 cm dengan jumlah 5 embrio somatik per botol yang diulang 10 kali. Kultur tersebut selanjutnya diinkubasikan di ruang terang di bawah lampu TL dengan intensitas cahaya 30 μmol foton/m²/detik dengan periode penyinaran 14 jam pada suhu 26°C selama 11 minggu.

Pengamatan terhadap pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik tanaman sagu dilakukan setiap minggu, yang meliputi tiga parameter, yaitu (1) jumlah dan persentase penggandaan embrio somatik, (2) jumlah dan persentase pendewasaan embrio somatik, dan (3) perkecambahan embrio somatik menjadi planlet dari awal sampai akhir kultur (panen). Data yang diperoleh dari hasil pengamatan pada parameter penggandaan dan pendewasaan embrio somatik diuji statistik dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Nilai rata-rata antar perlakuan dilakukan uji jarak dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf nyata 5% setelah dilakukan transformasi archsin terhadap data yang diperoleh.

HASIL DAN PEMBAHASAN

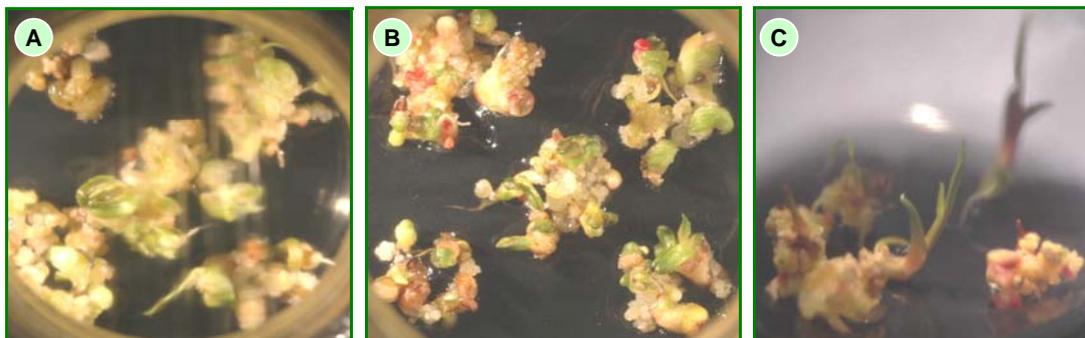
Hasil pengamatan yang dilakukan pada semua perlakuan memperlihatkan adanya pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik tanaman sagu sampai membentuk germinasi atau kecambah. Embrio stadium kotiledon yang dikulturkan, di samping berkembang ke arah germinasi ternyata juga membentuk embrio sekunder, sehingga terjadi penggandaan jumlah embrio somatik. Namun, tingkat penggandaan tersebut berbeda-beda antar perlakuan. Perbedaan ini diduga akibat pengaruh jenis dan konsentrasi sitokinin (BAP dan kinetin) yang terdapat dalam media. Sitokinin mempengaruhi perkembangan embrio somatik, namun tingkat pertumbuhan dan perkembangannya dipengaruhi oleh jenis sitokinin dan konsentrasi yang digunakan (Suryowinoto, 1990; Arnold *et al.*, 2002). Perbedaan hasil kultur antar perlakuan dapat dilihat pada Gambar 1.

Ketiga parameter yang diamati pada delapan perlakuan yang diuji memberikan hasil yang berbeda. Perlakuan BAP cenderung berpengaruh terhadap tingkat penggandaan embrio somatik yang ditandai de-

ngan pembentukan embrio somatik sekunder lebih banyak. Perlakuan kinetin cenderung berpengaruh terhadap tingkat pendewasaan dan perkecambahan embrio somatik yang ditandai dengan terbentuknya embrio fase dewasa (kotiledon) dan kecambah yang lebih banyak dalam waktu lebih singkat.

Penggandaan Embrio Somatik

Pembentukan embrio somatik sekunder tanaman sagu mulai terlihat pada umur 3-4 minggu setelah kultur, terutama pada perlakuan konsentrasi BAP. Embrio sekunder ini tampak bergerombol berwarna keputihan dengan fase perkembangan globular. Karena pertumbuhan embrio sekunder sangat pesat, maka penggandaan yang dihasilkan lebih tinggi bahkan biomasanya jauh lebih besar dibandingkan dengan eksplan (embrio kotiledon). Dari hasil analisis statistik dengan uji DMRT pada taraf nyata 5%, tingkat penggandaan embrio somatik dari perlakuan yang diuji memperlihatkan hasil yang berbeda nyata (Tabel 1). Perlakuan terbaik untuk penggandaan embrio somatik diperoleh pada konsentrasi BAP 0,5 mg/l yang mencapai 94%. Hal ini berarti konsentrasi BAP 0,5 mg/l



Gambar 1. Pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik tanaman sagu sampai menjadi planlet. A = penggandaan embrio somatik lebih mendominasi (BAP 0,5 mg/l), B = pendewasaan lebih mendominasi (kinetin 1,0 mg/l), C = perkecambahan lebih mendominasi (kinetin 2,0 mg/l).

Tabel 1. Persentase embrio somatik sagu yang mengalami penggandaan pada media MS modifikasi dengan penambahan BAP atau kinetin selama 11 minggu.

| Konsentrasi (mg/l) | | Penggandaan embrio somatik (%) |
|--------------------|---------|--------------------------------|
| BAP | Kinetin | |
| 0 | 0 | 29 f |
| 0,1 | 0 | 72 c |
| 0,5 | 0 | 94 a |
| 1,0 | 0 | 82 b |
| 2,0 | 0 | 66 cd |
| 0 | 0,1 | 46 e |
| 0 | 0,5 | 54 de |
| 0 | 1,0 | 62 cde |
| 0 | 2,0 | 56 de |

Angka-angka pada satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji DMRT.

yang dikombinasikan ABA 0,01 mg/l merupakan perlakuan yang paling cocok untuk penggandaan embrio somatik sagu, sehingga tingkat penggandaan embrio somatik paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan lain.

Meskipun tingkat penggandaan embrio somatik sagu berjalan lebih pesat, namun perlakuan BAP tersebut juga dapat berkembang membentuk kecambah seperti pada perlakuan dengan kinetin, tetapi jumlahnya rendah. Fenomena ini mirip dengan hasil penelitian yang dilakukan Aberlenc-Bertossi *et al.* (1999) yang menggunakan BAP dalam perkecambahan embrio somatik kelapa sawit asal kultur suspensi.

Pendewasaan Embrio Somatik

Pendewasaan embrio somatik berlangsung terutama setelah kecepatan penggandaan embrio somatik mulai menurun yang terlihat mulai umur 7-8 minggu setelah kultur. Tingkat pendewasaan embrio somatik sagu pada perlakuan kinetin tampak lebih cepat dan lebih banyak dibandingkan pada perlakuan dengan BAP. Embrio somatik yang mengalami pendewasaan ini berasal embrio sekunder yang tumbuh pada embrio kotiledon. Embrio sekunder tersebut pada mulanya masih stadium globular kemudian berkembang ke arah embrio dewasa dari fase perkembangan hati (*heart*), torpedo sampai kotiledon.

Secara umum, perlakuan kinetin dapat memberikan tingkat pendewasaan lebih cepat dan lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan BAP. Hasil uji DMRT pada taraf nyata 5%, menunjukkan bahwa hasil pendewasaan dari perlakuan yang diujikan memperlihatkan hasil yang berbeda nyata. Penentuan pendewasaan embrio somatik berdasarkan jumlah atau persentase embrio somatik yang sudah dewasa, yaitu stadium torpedo dan kotiledon. Semakin besar jumlah embrio dewasa tersebut, tingkat pendewasaannya semakin tinggi.

Tabel 2 menunjukkan bahwa maturasi atau pendewasaan embrio somatik sagu tertinggi dicapai pada perlakuan konsentrasi kinetin 1,0 mg/l + ABA 0,01 mg/l, yaitu sebesar 93,5%. Hal ini berarti konsentrasi kinetin 1,0 mg/l yang dikombinasikan dengan ABA 0,01 mg/l merupakan perlakuan paling cocok dalam maturasi embrio somatik tanaman sagu. Castillo dan Smith (1997) telah berhasil menginduksi tanaman *Begonia gracilis* sampai maturasi embrio somatik menggunakan kinetin dengan konsentrasi 0,5 mg/l ditambah air kelapa 2%. Kandungan dan konsentrasi kinetin dalam media sangat berpengaruh terhadap maturasi embrio somatik (Arnold *et al.*, 2002; Riyadi dan Tirtoboma, 2004).

Tabel 2. Persentase embrio somatik sagu yang mengalami pendewasaan pada media MS modifikasi dengan penambahan BAP atau kinetin selama 11 minggu.

| Konsentrasi (mg/l) | | Pendewasaan embrio somatik (%) |
|--------------------|---------|--------------------------------|
| BAP | Kinetin | |
| 0 | 0 | 34,0 f |
| 0,1 | 0 | 47,4 e |
| 0,5 | 0 | 49,5 e |
| 1,0 | 0 | 62,1 d |
| 2,0 | 0 | 65,9 cd |
| 0 | 0,1 | 71,3 bcd |
| 0 | 0,5 | 74,5 bc |
| 0 | 1,0 | 93,5 a |
| 0 | 2,0 | 76,0 bc |

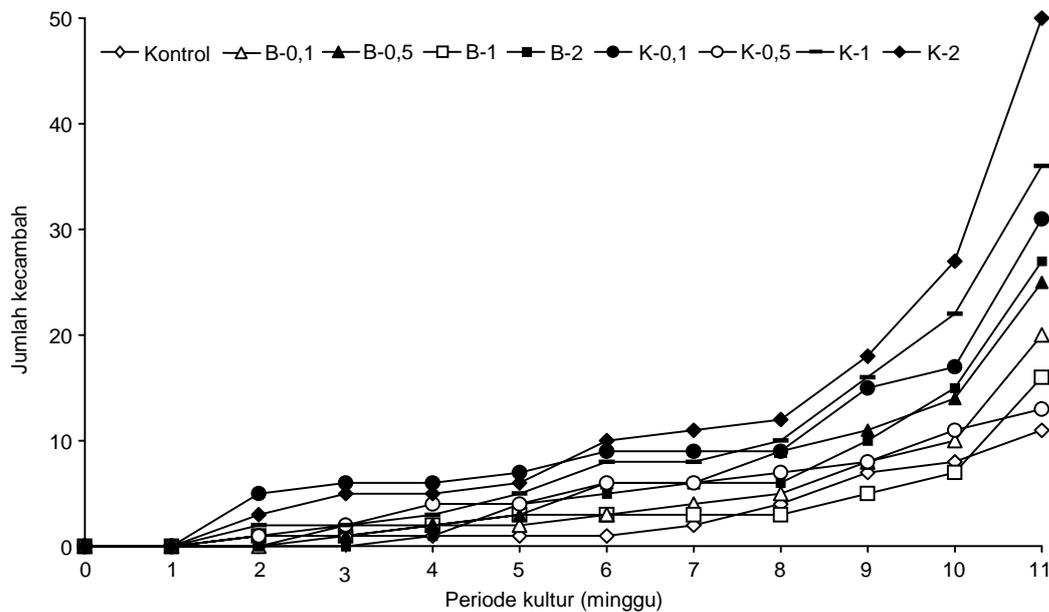
Angka-angka pada satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji DMRT.

Perkecambahan Embrio Somatik

Pada umur dua minggu setelah inkubasi, sebagian embrio fase perkembangan kotiledon tampak mulai tumbuh *plumula* (bakal tunas) dan *radicula* (bakal akar), terutama pada perlakuan konsentrasi kinetin. Namun dengan adanya pertumbuhan embrio somatik sekunder berpengaruh terhadap berkurangnya kecepatan perkecambahan embrio somatik. Hal ini menyebabkan waktu yang diperlukan untuk perkecambahan lebih lama. Embrio kotiledon yang tidak mengalami pembentukan embrio somatik sekunder, memperlihatkan kecepatan perkecambahan embrio somatik lebih cepat. Embrio somatik fase kotiledon tanaman sagu berkecambah menjadi planlet sempurna selama 4 minggu dengan membentuk tunas dan akar (Riyadi *et al.*, 2005), terutama terjadi pada perlakuan kinetin.

Tingkat perkecambahan pada semua perlakuan yang diuji memberikan hasil yang bervariasi (Gambar 2). Jumlah kecambah terendah diperoleh pada kontrol yang hanya mencapai 11 kecambah atau 22%. Jumlah kecambah terbanyak diperoleh pada perlakuan kinetin 2,0 mg/l yang mencapai 50 kecambah atau 100% dan disusul oleh perlakuan kinetin 1,0 mg/l dikombinasikan dengan ABA 0,01 mg/l dengan jumlah 36 kecambah atau 72%. Perlakuan BAP terbaik menghasilkan sebanyak 27 kecambah atau 54% yang diperoleh pada perlakuan BAP 2,0 mg/l dikombinasikan dengan ABA 0,01 mg/l dan pada konsentrasi BAP lebih rendah hasilnya semakin rendah di bawah 50%. Dengan demikian dapat ditarik kesimpulan bahwa perlakuan kinetin lebih efektif dan efisien untuk perkecambahan embrio somatik sagu dibandingkan dengan BAP.

Perkecambahan embrio somatik sagu pada awal kultur sampai umur 8 minggu terlihat masih lambat yang berkisar 10 atau 20% pada perlakuan terbaik. Kultur embrio kotiledon pada umur dua sampai de-



Gambar 2. Perkembangan perkecambahan embrio somatik tanaman sagu.

ngan 8 minggu memperlihatkan pertumbuhan embrio somatik sekunder yang cukup pesat dan mulai turun setelah umur 8 minggu. Umur 9 minggu, perkecambahan embrio somatik mengalami peningkatan yang cukup pesat terutama pada perlakuan kinetin 2,0 mg/l yang dikombinasikan dengan ABA 0,01 mg/l (Gambar 2). Hal ini diperkirakan karena menurunnya tingkat penggandaan embrio somatik sekunder yang mulai terlihat pada umur 8 minggu setelah tanam. Menurunnya tingkat penggandaan embrio somatik sekunder berpengaruh terhadap perkembangan embrio somatik kotiledon untuk membentuk kecambah sehingga proses perkecambahan berlangsung lebih pesat. Proses perkecambahan embrio somatik berlangsung semakin cepat setelah proses pertumbuhan embrio sekunder berhenti, karena energi yang digunakan untuk pembentukan kecambah sampai planlet lebih optimal dan efisien (Arnold *et al.*, 2002).

Perlakuan kinetin dapat menghasilkan kecambah sagu lebih tinggi daripada perlakuan BAP. Perlakuan terbaik didapat pada perlakuan konsentrasi kinetin 2,0 mg/l + ABA 0,01 mg/l yang dapat menghasilkan kecambah sampai 100% artinya semua embrio kotiledon yang dikulturkan berkecambah membentuk planlet. Hal ini berarti konsentrasi kinetin 2,0 mg/l yang dikombinasikan dengan ABA 0,01 mg/l merupakan perlakuan yang paling tepat untuk perkecambahan embrio somatik sagu. Konsentrasi sitokinin yang tepat berpengaruh dalam tingkat perkecambahan embrio menjadi planlet (Debergh dan Read, 1991; Litz dan Gray, 1995).

KESIMPULAN

Kultur embrio somatik fase perkembangan kotiledon tanaman sagu pada media MS Modifikasi dapat tumbuh dan berkembang membentuk kecambah. Selain berkembang membentuk kecambah, embrio somatik fase kotiledon membentuk embrio somatik sekunder baru fase perkembangan globuler yang kemudian berkembang menjadi embrio dewasa (fase perkembangan hati, torpedo, dan kotiledon).

Penggandaan embrio somatik tertinggi sebesar 94% diperoleh pada perlakuan konsentrasi BAP 0,5 mg/l + ABA 0,01 mg/l, sedangkan tingkat pendewasaan tertinggi sebesar 93,5% yang didapat pada perlakuan konsentrasi kinetin 1 mg/l + ABA 0,01 mg/l. Perkecambahan tertinggi dicapai pada perlakuan konsentrasi kinetin 2 mg/l + ABA 0,01 mg/l yang mencapai 100% artinya jumlah kecambah yang diperoleh sebanyak 50 kecambah dari 50 embrio somatik fase kotiledon yang dikulturkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada PT Perkebunan Nusantara V Pekanbaru Provinsi Riau atas kerja sama dan dukungan pendanaan penelitian ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada sdr. Ade Firmansyah dan R. Ridwan atas bantuannya dalam pengambilan eksplan dan pelaksanaan kultur *in vitro* di Laboratorium Biak Sel dan Mikropropagasi Tanaman Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Aberlenc-Bertossi, F., M. Noirot, and Y. Duval. 1999. BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 56:53-57.
- Arnold, S.V., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok, and L. Filonova. 2002. Developmental pathway of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 69:233-249.
- Castillo, B. and M.A.L. Smith. 1997. Direct somatic embryogenesis from *Begonia gracilis* explants. *Plant Cell Rep.* 16:385-388.
- Debergh, P.C. and P.E. Read. 1991. Micropropagation. p. 1-13. In P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (eds.) *Micropropagation: Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Flach, M. 1997. Sago palm. *Metroxylon sagu Rottb.* Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops 13. International Plant Genetic Resources Institute, Rome-Italy. 76 p.
- Lembaga Riset Perkebunan Indonesia. 2009. Buku Pedoman 2009: Tarif Pelayanan dan Harga Lingkup Produk LRPI. Lembaga Riset Perkebunan Indonesia. Bogor. 65 hlm.
- Litz, R.E. and D.J. Gray. 1995. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. *J. Microbiol. Biotech.* 11:416-425.
- Neuenschwander, B. and Thomas W. Baumann. 1992. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep.* 10:608-612.
- Pedroso, M.C. and M.S. Pais. 1995. Plant regeneration from embryogenic suspension culture of *Camellia japonica*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 31:31-35.
- Riyadi, I. dan Tirtoboma. 2004. Pengaruh 2,4-D terhadap induksi embrio somatik kopi Arabika. *Bul. Plasma Nutfah* 10(2):82-89.
- Riyadi, I., J.S. Tahardi, and Sumaryono. 2005. The development of somatic embryos of sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) on solid media. *Menara Perkebunan* 73(2):33-40.
- Suryowinoto, M. 1990. Petunjuk Laboratorium, Pemuliaan Tanaman secara *In Vitro*. PAU Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. hlm. 49-85.
- Tahardi, J.S. 1999. Growth characteristic of embryogenic cells of oil palm in bioreactor cultures. *J. Bioteknologi Pertanian* 4(2):49-55.
- Tahardi, J.S., N.F. Sianipar, and I. Riyadi. 2002. Somatic embryogenesis in sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.): New Frontiers of Sago Palm Studies. p. 75-81. In K. Kaimuna, M. Okazaki, and Y. Toyoda (ed.) *Proc. of the Int. Symp. on SAGO, Tokyo-Japan*. Universal Academic Press, Inc.
-