

Embriogenesis somatik dari pucuk tunas tanaman kurma (*Phoenix dactylifera* L.)

Somatic embryogenesis from shoot tip of date palm (Phoenix dactylifera L.)

Rizka Tamania SAPTARI* & SUMARYONO

¹Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, Jl. Taman Kencana No.1 Bogor 16128, Indonesia

Diterima tgl 21 Juni 2018/ disetujui tgl 14 September 2018

Abstract

Date palm (Phoenix dactylifera L.) is the most important crop in the dry areas of the Middle East and North Africa. This palm has been introduced to many countries but has not been grown commercially in Indonesia. Date palm propagation by seeds is easy but its progenies are varied and a half of them are male trees that will not produce fruits. Meanwhile, the propagation by offshoots is impractical and technically difficult. Tissue culture makes it possible to massproduce of genetically identical superior date palms. This research aimed to develop somatic embryogenesis (SE) of date palm using shoot tip and young leaves of date palm seedling as explants. Steps on somatic embryogenesis are explant sterilization, callus initiation and proliferation, somatic embryos induction and maturation, and plantlets maturation and rooting. Calli emerged from shoot tip explants after 9 weeks of culture in a modified MS medium supplemented with 10 mg/L 2,4-D, 1 mg/L or 3 mg/L 2-iP, and 1.5 g/L active charcoal. The callus was able to bear somatic embryo in the modified MS medium without hormones. Somatic embryos then developed into plantlets, and roots of plantlets were effectively initiated in the medium supplemented with 0.5 mg/L NAA and 1 mg/L IBA.

[Keywords: *sterilization, callogenesis, somatic embryo induction, plantlet rooting, clonal propagation*]

Abstrak

Tanaman kurma (*Phoenix dactylifera* L.) merupakan tanaman terpenting di wilayah kering Timur Tengah dan Afrika Utara. Palma ini telah menyebar ke banyak negara, namun belum ditanam secara komersial di Indonesia. Perbanyak kurma dengan biji sangat mudah tetapi turunannya sangat beragam dan setengahnya merupakan tanaman jantan yang tidak berbuah. Perbanyak dengan anakan (*offshoots*) secara komersial tidak praktis dan relatif sulit. Melalui Kultur jaringan bibit tanaman kurma varietas unggul memungkinkan untuk

diproduksi secara massal dan seragam. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan embriogenesis somatik menggunakan eksplan pucuk tunas dan daun muda dari bibit tanaman kurma. Pengembangan embriogenesis somatik terdiri dari tahap sterilisasi eksplan, inisiasi dan proliferasi kalus, induksi dan maturasi embrio somatik, serta pembesaran dan pembentukan akar planlet. Kalus terbentuk dari eksplan pucuk tunas setelah 9 minggu dikultur pada medium MS modifikasi yang ditambahkan 2,4-D 10 mg/L, 2-iP 1 mg/L atau 3 mg/L, dan arang aktif 1,5 g/L. Kalus berhasil diinduksi menghasilkan embrio somatik pada medium MS modifikasi tanpa penggunaan hormon. Embrio somatik kemudian berkembang hingga menjadi planlet, dan akar planlet secara efektif terinisiasi pada medium yang ditambahkan NAA 0,5 mg/L dan IBA 1 mg/L.

[Kata kunci : sterilisasi, kalogenesis, induksi embrio somatik, pengakaran planlet, propagasi klonal]

Pendahuluan

Tanaman kurma (*Phoenix dactylifera* L.), tanaman palma tahunan, sejak lama telah menjadi tanaman paling penting di wilayah kering dan panas Timur Tengah dan Afrika Utara (Zehdi-Azouzi *et al.*, 2015). Diperkirakan populasi tanaman kurma di seluruh dunia sebanyak 100 juta pohon, dan akan terus meningkat setiap tahun. Tanaman kurma menyebar dari Mauritania Afrika hingga Pakistan dan India (Pintaud *et al.*, 2013). Kultivasi tanaman kurma diperkirakan berasal dari daerah Teluk Arab, Lembah Sungai Indus, *Fertile Crescent* di Timur Tengah (Tenberg, 2012; Gross-Balthazard *et al.*, 2016), dan Afrika (Larson *et al.*, 2014). Oleh karena itu terdapat perbedaan genetik yang besar antara tanaman kurma Afrika Utara dengan tanaman kurma Timur Tengah/Asia Selatan karena adaptasi geografi (Arabnezhad *et al.*, 2012; Hazzouri *et al.*, 2015).

Sejak sepuluh tahun terakhir, tanaman kurma berhasil dibudidayakan di wilayah tropis Thailand. Thailand telah mengembangkan

tanaman kurma tropis berupa hibrida KL1 dari persilangan varietas Barhee dan Deglet Noor (Intha & Chairprasart, 2018). Hibrida tersebut mampu berbuah dengan baik di Thailand, namun karena bahan tanam yang digunakan adalah biji maka hanya setengah dari populasi berupa pohon betina dan buahnya beragam (Intha & Chairprasart, 2018). Di Indonesia, kurma hanya ditanam dari biji secara sporadis. Beberapa tanaman kurma dilaporkan dapat berbuah, namun belum ada perkebunan kurma komersial yang sudah berproduksi. Sejak beberapa tahun terakhir ini, pekebun di Indonesia mulai gencar menanam kurma secara komersial dengan bibit asal biji dan kultur jaringan dari luar negeri.

Perbanyakan konvensional tanaman kurma adalah menggunakan anakan (*offshoots*), namun hanya dihasilkan 5-10 anakan per pohon selama 15 tahun. Anakan dipisah dari pohon induk dan dipelihara di pembibitan selama 1 tahun sebelum ditanam di lapang. Bobot anakan yang baik sekitar 12-15 kg (El-Kosary *et al.*, 2009) sehingga menyulitkan dalam pengiriman. Karena hal ini, penyediaan bahan tanam dari anakan tidak efisien dalam pengembangan tanaman kurma skala luas. Perbanyakan kurma yang mudah adalah dengan biji, namun melalui cara ini akan dihasilkan keturunan berupa tanaman betina dan tanaman jantan dengan perbandingan 50 : 50 (Elmeer & Mattat, 2012). Tanaman jantan kurang menguntungkan dalam budidaya kurma karena tidak menghasilkan buah, yang disebabkan karena tanaman kurma merupakan tanaman berumah dua (*dioecious*) (Hamza *et al.*, 2016). Disamping itu perbanyakan kurma dengan biji akan menghasilkan tanaman dengan sifat beragam, dan baru mulai berbuah setelah 4-7 tahun. Oleh karena itu, penggunaan bahan tanam asal kultur jaringan merupakan alternatif yang menjanjikan (Mohammadi *et al.*, 2017).

Kultur jaringan kurma pada dasarnya dilakukan untuk menyediakan bibit tanaman betina kurma dari kultivar unggul yang seragam dan sehat secara massal. Kultur jaringan kurma dapat dilakukan melalui organogenesis dan embriogenesis somatik (*somatic embryogenesis*, SE) (Bekheet, 2013). Laju multiplikasi SE lebih tinggi dan memungkinkan untuk ditingkatkan skala produksinya (*scale up*) dalam kultur cair (Fki *et al.*, 2003; Othmani *et al.*, 2009a), sehingga proses produksinya lebih efisien. Metode SE juga bermanfaat dalam transformasi genetik untuk pemuliaan tanaman dan dalam konservasi *in vitro* plasma nutfah (Fki *et al.*, 2011a). Sebagian besar prosedur kultur jaringan kurma menggunakan sumber eksplan pucuk tunas dari anakan (Badawy *et al.*, 2005; Alkhateeb, 2006; Al-Khayri, 2007;

Othmani *et al.*, 2009b; Aslam *et al.*, 2011; Boufis *et al.*, 2014). Selain itu bagian bunga (*inflorescences*) (Abul-Soad & Mahdi, 2010) dan daun muda (Fki *et al.*, 2003; Fki *et al.*, 2011b; Abd El Bar & El Dawayati, 2014; Mazri *et al.*, 2017) juga dapat digunakan sebagai sumber eksplan.

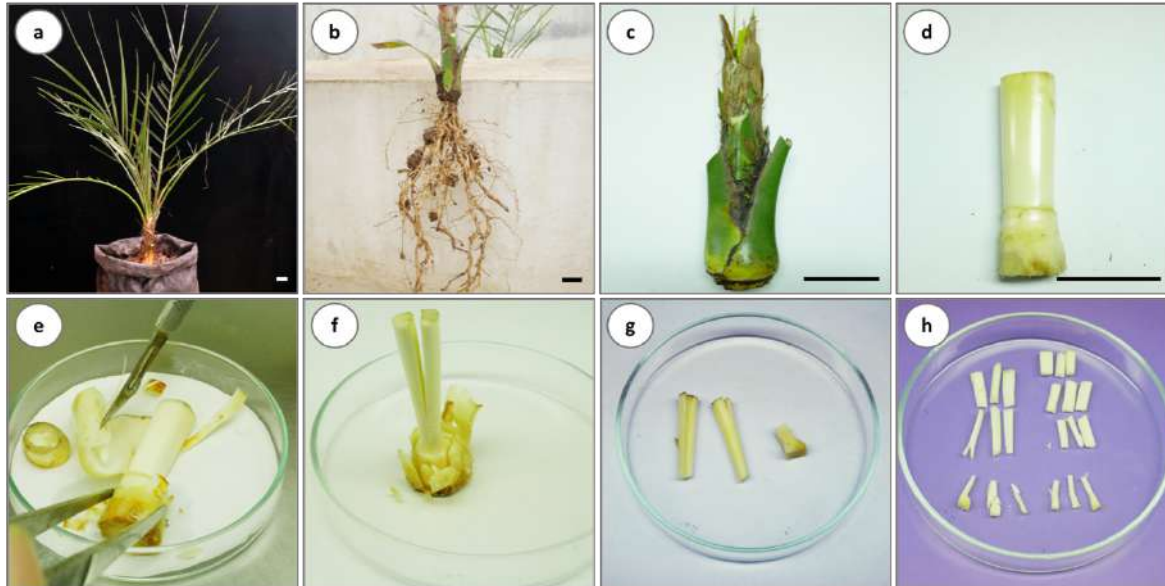
Hasil penelitian kultur jaringan tanaman kurma di Indonesia belum pernah dilaporkan. Mengingat mulai terariknya pekebun Indonesia untuk membudidayakan tanaman kurma, maka penelitian kultur jaringan kurma perlu segera dilakukan guna menyediakan bibit kurma kultivar unggul dan teradaptasi dengan agroklimat tropis Indonesia, bebas-penyakit, dan secara genetik seragam. Tujuan dari penelitian ini adalah mengembangkan prosedur awal kultur jaringan kurma melalui embriogenesis somatik menggunakan eksplan pucuk tunas dan daun muda dari bibit tanaman kurma, yang kemudian dapat diimplementasikan untuk perbanyakan bibit kurma yang terbukti mampu beradaptasi dan berbuah di Indonesia.

Bahan dan Metode

Sumber dan sterilisasi eksplan

Sumber eksplan berupa tanaman kurma cv. Ajwa asal biji berumur 1,5 tahun yang ditanam di dalam rumah kaca. Bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan yaitu daun muda dan jaringan pucuk tunas (*shoot-tip*). Daun muda yang digunakan yaitu daun yang masih berwarna putih, dipotong dari bagian pangkal daunnya. Kemudian untuk pengambilan eksplan pucuk tunas, daun-daun tua dipangkas, bagian perakaran dipotong, dan lapisan pelepah terluar dikupas hingga tersisa beberapa lapisan pucuk tunas (diameter 3 cm) yang terdiri dari lapisan primordia daun dan apeks (Gambar 1a-1d). Eksplan dicuci dengan air mengalir, kemudian disterilisasi di dalam *Laminar Air Flow Cabinet* dengan dua metode sebagai berikut:

1. Eksplan direndam dalam larutan deterjen yang ditambah satu tetes Tween selama 5 menit. Setelah itu, larutan deterjen dibuang, dan eksplan dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali. Selanjutnya eksplan direndam dalam larutan benomyl 0,4 % selama 30 menit, kemudian dalam alkohol 70% selama 2 menit, dan larutan Clorox 20% selama 20 menit. Kemudian, sterilan dibuang, dan eksplan dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali. Larutan Clorox 20% dibuat dengan mengencerkan 5x larutan 100% Clorox teknis yang memiliki kadar natrium hipoklorida 5, 25 %.



Gambar 1. Isolasi eksplan jaringan pucuk tunas dari kecambah tanaman kurma cv. Ajwa umur 1,5 tahun (a-d), dan pemotongan eksplan (e-h). Skala garis = 5 cm

Figure 1. Shoot tip explant isolation from 1,5 years old date palm cv. Ajwa seedling (a-d), and explant dissection (e-h). Bar = 5 cm

- Eksplan direndam dalam larutan deterjen yang ditambah satu tetes Tween selama 5 menit. Setelah itu, larutan deterjen dibuang, dan eksplan dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali. Selanjutnya eksplan direndam dalam larutan benomyl 0,4% selama 30 menit, kemudian dalam larutan Clorox 30% selama 20 menit. Sterilan dibuang, dan eksplan dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali.

Pada eksplan pucuk tunas, setelah sterilisasi, pelepah luar dikupas kembali hingga tersisa lapisan terdalam pucuk tunas (diameter 1 cm), yang berturut-turut mulai dari yang terdalam terdiri dari apeks dan tiga lapisan primordia daun. Lapisan pucuk tunas terdalam tersebut yang digunakan dalam inisiasi kalus, dan diberi nomor lapisan. Apeks disebut sebagai lapisan 1, dan tiga lapisan primordia daun disebut sebagai lapisan 2, 3, dan 4 berturut-turut mulai dari yang terdalam. Eksplan dipotong-potong dengan ukuran 1,5 cm x 0,5 cm dan dikulturkan pada media inisiasi kalus (Gambar 1e-1h). Pada eksplan daun muda, setelah sterilisasi, daun dikeringkan di atas kertas tisu, kemudian dipotong – potong dengan ukuran 1 cm x 0,5 cm, dan dikulturkan pada media inisiasi kalus.

Inisiasi dan proliferasi kalus

Inisiasi kalus dilakukan menggunakan media Murashige & Skoog (MS) modifikasi (Al-Khayri *et al.*, 2007) dengan penambahan 2,4-asam diklorofenoksiasetat (2,4-D) pada konsentrasi 10, 50, atau 100 mg/L, 2-isopenteniladenin (2-iP) pada konsentrasi 1 atau 3 mg/L, sukrosa 40 g/L, arang aktif (1,5 g/L), dan pematid gelzan. Tingkat

pH media diatur sebesar 5,7 sebelum disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 1 kg/cm² selama 20 menit. Setiap perlakuan memiliki 5 ulangan untuk eksplan pucuk tunas dan 20 ulangan untuk daun muda. Kultur diinkubasi dalam ruang kultur gelap dengan suhu 25°C selama 9 minggu.

Kalus primer yang terbentuk kemudian diproliferasi pada media MS modifikasi yang ditambah 2-iP 30 mg/L, asam naftalenasetat (NAA) 10 mg/L, sukrosa 40 g/L, arang aktif 1,5 g/L, dan gelzan. Setelah 3 minggu inkubasi dalam ruang kultur gelap, kalus dipindahkan ke media dengan konsentrasi 2-iP yang diturunkan menjadi 6 mg/L. Kultur diinkubasi dalam ruang gelap selama 9 minggu untuk menginduksi pembentukan kalus embriogenik. Kalus embriogenik diseleksi dan dipelihara pada media yang menggunakan konsentrasi 2-iP 1,5 mg/L dengan atau tanpa arang aktif untuk memperoleh lini murni kalus embriogenik. Pengamatan dan seleksi kalus embriogenik dilakukan di bawah mikroskop.

Induksi dan maturasi embrio somatik

Pada tahap induksi embrio somatik, kalus embriogenik disubkultur ke media MS modifikasi tanpa penggunaan hormon, dan diinkubasi selama 12 minggu pada ruang kultur terang dengan intensitas cahaya sekitar 30 μmol foton/cm²/detik dengan fotoperiode 12 jam dan suhu 25 °C. Subkultur dilakukan setiap 4 minggu. Maturasi dan perkecambahan embrio somatik menggunakan media dengan komposisi yang sama, dengan periode subkultur setiap 4 minggu hingga terbentuk planlet.

Pembesaran dan pembentukan akar planlet

Bahan tanaman yang digunakan adalah planlet dengan tinggi tunas minimal 2 cm. Sebanyak 3 planlet masing-masing dikulturkan pada media pembesaran dan pembentukan akar dengan komposisi sebagai berikut: (1) MS modifikasi, sukrosa 40 g/L, (2) MS modifikasi, sukrosa 40 g/L, NAA 0,2 mg/L, (3) MS modifikasi, sukrosa 40 g/L, NAA 0,5 mg/L, indol-3-asam butirat (IBA) 1 mg/L, (4) MS modifikasi, sukrosa 40 g/L, NAA 1 mg/L, IBA 0,5 mg/L, (5) ½ MS modifikasi, sukrosa 40 g/L, NAA 0,5 mg/L, IBA 1 mg/L.

Rancangan percobaan dan analisis data

Penelitian dilaksanakan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Data hasil pengamatan kemudian dianalisis menggunakan analisis sidik ragam yang dilanjutkan dengan uji Jarak Berganda Duncan (DMRT) pada taraf kepercayaan $\alpha \leq 0,05$.

Hasil dan Pembahasan

Sterilisasi eksplan

Kontaminasi pada eksplan diamati setelah 4 minggu inkubasi pada ruang gelap. Pada metode sterilisasi pertama, tingkat kontaminasi sebesar 14%, sedangkan pada metode sterilisasi kedua, tingkat kontaminasi sebesar 18%. Kedua metode sterilisasi memiliki tingkat kontaminasi yang cukup rendah yaitu di bawah 20%. Badawy *et al.* (2005) melaporkan hasil sterilisasi eksplan menggunakan etanol dan berbagai konsentrasi sodium hipoklorit pun mendapatkan persentase kontaminasi eksplan di bawah 20%, yaitu 12,5 – 17,5%.

Metode sterilisasi pertama menggunakan perendaman pada alkohol 70% selama 2 menit diikuti dengan perendaman dengan larutan Clorox 20% ternyata lebih efektif menghambat kontaminasi dibandingkan metode kedua yang hanya menggunakan perendaman dengan Clorox 30% saja. Kontaminan dapat berasal dari mikroba yang menempel pada eksplan maupun mikroba endofit yang terdapat di dalam sel eksplan (Cassells, 2012). Metode sterilisasi menggunakan alkohol dan larutan Clorox efektif menghilangkan mikroba dari eksplan daun dan pucuk tunas tanaman kurma.

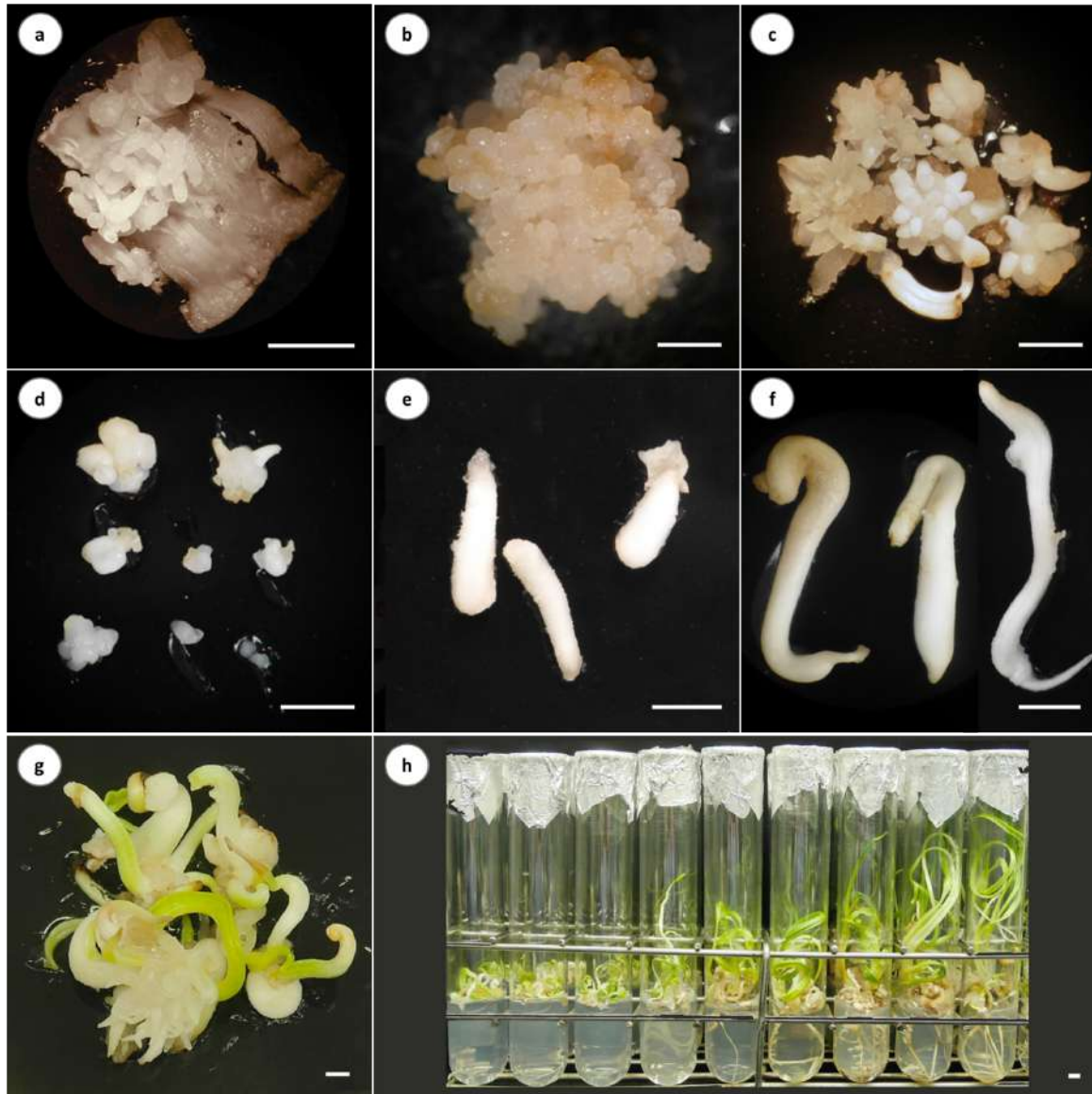
Perendaman dengan larutan natrium hipoklorida (Clorox) dapat mematikan mikroba sehingga mampu menekan kontaminasi pada kultur (Pais *et al.*, 2016), sedangkan perendaman eksplan pada alkohol dapat mematikan bakteri dan fungi dengan cepat dengan melisis dan menginaktivasi protein membran (Yano *et al.*, 2016). Al-Khayri (2007) pun melaporkan bahwa perendaman eksplan kurma dalam etanol 70% selama 1 menit dapat menekan kontaminasi. Dari

dua metode sterilisasi yang digunakan, penggunaan alkohol dan larutan Clorox mampu secara efektif mengurangi kontaminasi pada kultur *in vitro* daun dan pucuk tunas dari tanaman kurma.

Inisiasi kalus

Inisiasi kalus pada eksplan daun muda tidak menghasilkan respons sama sekali hingga minggu ke-12 (Tabel 1), eksplan kemudian menjadi coklat dan mati. Pada eksplan pucuk tunas, terjadi pembengkakan pada minggu kedua inkubasi. Kemudian pada minggu ke-9 mulai terjadi pembentukan kalus dari eksplan pucuk tunas tersebut. Struktur kalus noduler menempel pada bagian tepi eksplan dan pada bagian eksplan yang membengkak (Gambar 2a). Hanya lapisan 3 dan 4 pucuk tunas yang menunjukkan respons pembentukan kalus (Tabel 1). Pucuk tunas pada kecambah tanaman kurma yang digunakan sebagai eksplan memiliki struktur yang berlapis-lapis sangat banyak. Pada 3 minggu pertama inkubasi, ketika terjadi respons pembengkakan eksplan, satu eksplan yang diinokulasi terlihat masih terdiri dari 3-4 lapisan dan dapat dipisahkan menjadi lapisan-lapisan yang lebih tipis. Pada pucuk tunas lapisan 3 dan 4 diperoleh 20 potong eksplan yang lebih tipis, sedangkan eksplan pucuk tunas lapisan 1 dan lapisan 2 berukuran lebih kecil dan sulit dipisahkan lapisan-lapisannya ketika terjadi respons pembengkakan eksplan. Oleh karena itu, lapisan 1 dan lapisan 2 menjadi sangat tebal dan sulit sekali membentuk kalus (Tabel 1). Ketika dilakukan pengirisan atau pencacahan menggunakan skalpel, terjadi pencoklatan pada eksplan tersebut dan tidak dapat membentuk kalus.

Keberhasilan inisiasi kalus dipengaruhi jenis eksplan sebagai faktor internal dan penggunaan hormon sebagai faktor eksternal. Pada penelitian ini, persentase pembentukan kalus tertinggi dari eksplan pucuk tunas terdapat pada perlakuan 2,4-D 10 mg/L dengan konsentrasi 2-iP 3 mg/L dan 1 mg/L yakni sebesar 75-85% (Tabel 1). Embriogenesis somatik yang dilaporkan pada beberapa kultivar kurma seperti cv. Sewei (Badawy *et al.*, 2005), cv. Sukary (Alkhateeb, 2006), cv. Khasab dan cv. Nabout Saif (Al-Khayri, 2010) menggunakan konsentrasi 2,4-D 100 mg/L untuk menginduksi kalus. Namun, pada penelitian ini, 2,4-D konsentrasi rendah lebih efektif menginduksi kalus pada eksplan jaringan meristem pucuk dibandingkan 2,4-D konsentrasi tinggi. Penelitian ini menggunakan eksplan dari kecambah yang lebih juvenil dibandingkan *offshoot* seperti yang digunakan oleh Badawi *et al.* (2005), Alkhateeb (2006), dan Al-Khayri (2010), sehingga 2,4-D pada konsentrasi rendah telah mampu menginduksi dediferensiasi sel eksplan tersebut dan membentuk kalus.



Gambar 2. Perkembangan kalus dan embrio somatik kurma: kalus awal muncul dari eksplan pucuk tunas (a); lini murni kalus embriogenik (b); embrio somatik (c) embrio somatik fase globuler (d), embrio somatik *elongated* (e), embrio somatik skutelar (f); kecambah (g); dan planlet awal hingga planlet berakar (h). Skala garis = 0,5 cm

Figure 2. Callus and somatic embryo development of date palm: initial callus from shoot tip explant (a); embryogenic callus line (b); somatic embryos (c), globular phase (d), elongated (e), scutellar (f); germinants (g); and early to rooted plantlets (h). Bar = 0,5 cm

Tabel 1. Respons pembentukan kalus kurma pada berbagai media inisiasi kalus

Table 1. Callus initiation responses in some different callus initiation media

Perlakuan Treatments		Pembentukan kalus (%) Callus formation (%)				
2,4-D (mg/L)	2-iP (mg/L)	Daun muda Young leaves	Pucuk tunas lapisan 1 Shoot tip layer 1	Pucuk tunas lapisan 2 Shoot tip layer 2	Pucuk tunas lapisan 3 Shoot tip layer 3	Pucuk tunas lapisan 4 Shoot tip layer 4
10	1	0	0	0	80	75
50	1	0	0	0	25	30
100	1	0	0	0	35	20
10	3	0	0	0	85	75
50	3	0	0	0	15	15
100	3	0	0	0	10	5

Konsentrasi 2,4-D 10 mg/L juga digunakan untuk menginduksi kalus pada kurma cv. Deglet Noor (Fki *et al.*, 2003). Penggunaan 2,4-D dalam kultur *in vitro* merupakan salah satu penyebab terjadinya abnormalitas pada tanaman hasil propagasi, termasuk kurma (Abass *et al.*, 2017). Meskipun demikian, 2,4-D diperlukan untuk menginduksi dediferensiasi sel eksplan agar membentuk kalus (Sane *et al.*, 2006). Oleh karena itu, keberhasilan kalogenesis pada penggunaan 2,4-D konsentrasi rendah ini lebih menguntungkan karena dapat mengurangi risiko terjadinya abnormalitas. Menurut penelitian yang dilaporkan oleh Abass *et al.*, (2017), variasi genetik terjadi pada kalus kurma yang diinisiasi menggunakan 2,4-D konsentrasi 100 mg/L, dibandingkan dengan kontrol (indukan), sedangkan kalus yang diinisiasi menggunakan 2,4-D konsentrasi rendah (50 mg/L) memiliki profil DNA dan protein yang sama dengan kontrol.

Jenis eksplan mempengaruhi keberhasilan inisiasi kalus dalam kultur *in vitro*. Semakin meristematik sel atau jaringan yang digunakan, semakin mudah dediferensiasi sel menghasilkan kalogenesis yang diinduksi menggunakan zat pengatur tumbuh. Pada penelitian ini, eksplan daun muda tidak menghasilkan respons bahkan dengan penggunaan 2,4-D 100 mg/L dan 2-iP karena sifat jaringannya lebih keras dibandingkan dengan eksplan pucuk tunas. Meskipun demikian, penggunaan eksplan daun dilaporkan berhasil membentuk kalus pada beberapa kultivar kurma lainnya, seperti Deglet Noor (Fki *et al.*, 2003) dan Nadja (Mazri *et al.*, 2017). Pada penelitian ini, yang menggunakan kultivar Ajwa, kemungkinan kalus tidak terinduksi dari eksplan daun muda karena konsentrasi hormon yang kurang tinggi atau memerlukan waktu inkubasi yang lebih lama. Waktu inkubasi dalam penelitian ini paling lama 3 bulan untuk menginisiasi kalus, sedangkan pada kultivar Nadja yang dilaporkan berhasil terbentuk kalus dari eksplan daun muda memerlukan waktu inkubasi 4 – 6 bulan (Mazri *et al.*, 2017). Namun hal tersebut kurang menguntungkan karena risiko terjadinya abnormalitas akan meningkat akibat semakin banyak paparan hormon terhadap eksplan.

Perkembangan kalus dan embrio somatik

Proliferasi kalus primer dilakukan menggunakan media yang tidak mengandung 2,4-D. Perkembangan kalus hingga terbentuk embrio somatik dan berkecambah dideskripsikan pada Tabel 2. Kalus primer tumbuh semakin banyak pada media proliferasi awal, namun belum dapat dipisahkan dari eksplannya. Laju proliferasi kalus primer adalah sebesar 1,5 kali dalam waktu 3 minggu. Setelah konsentrasi 2-iP pada media proliferasi diturunkan menjadi 6 mg/L, terbentuk kalus-kalus sekunder berwarna putih dengan ukuran yang lebih kecil dibandingkan dengan

kalus primer. Struktur kalus sekunder yang terbentuk telah mendekati kalus embriogenik yang memiliki ciri berupa nodul-nodul berukuran kecil dengan kerapatan sel yang padat berwarna putih (Fki *et al.*, 2003), mulai terjadi akumulasi protein dan polisakarida pada sitoplasmanya (Sane *et al.*, 2006; Aslam *et al.*, 2011) sehingga warna kalus menjadi lebih pekat (Gambar 2b), dibandingkan kalus awal yang cenderung berwarna bening.

Setelah 9 minggu inkubasi, kalus telah dapat dipisahkan dari eksplannya untuk diseleksi menjadi lini murni kalus embriogenik. Diperoleh lini kalus murni embriogenik setelah 3-4 kali subkultur pada media seleksi. Struktur kalus noduler kecil berwarna putih. Pada media seleksi tanpa arang aktif, kalus lebih cepat berwarna kecoklatan, namun lebih cepat menghasilkan lini murni kalus embriogenik. Pada inkubasi 3 minggu pertama telah diperoleh 25% lini murni kalus embriogenik. Sedangkan Pada media yang ditambahkan arang aktif, kalus tetap berwarna putih, namun hanya diperoleh 14% lini murni kalus embriogenik setelah inkubasi 3 minggu pertama. Arang aktif umum digunakan untuk pencegahan pencoklatan baik pada eksplan maupun pada media kultur jaringan. Arang aktif mampu menjerap senyawa fenolik dan metabolit toksik lainnya yang berasal dari eksplan kultur jaringan (Manchanda & Gosal, 2012) yang menyebabkan pencoklatan. Meskipun demikian, adanya arang aktif juga dapat menjerap hara, vitamin, atau hormon tertentu pada komponen media (Thomas, 2008) sehingga sedikit mengurangi efektivitas media dalam menginduksi kalus embriogenik. Seperti yang dilaporkan oleh Chutipajit & Sutjaritvorakul (2018) bahwa penggunaan arang aktif pada media kultur *in vitro Oryza sativa* menghambat induksi dan menurunkan biomassa kalus.

Setelah 3-4 kali subkultur diperoleh sebanyak 90% lini murni kalus embriogenik yang memiliki laju proliferasi sebesar 3 kali setiap periode 3 minggu. Kalus embriogenik mampu menghasilkan embrio somatik (Gambar 2c-f) setelah diinkubasi pada medium tanpa hormon selama 8-12 minggu. Persentase pembentukan embrio somatik tanaman kurma adalah 100%. Seluruh *clump* kalus embriogenik menghasilkan embrio somatik dengan berbagai fase perkembangan. Embrio globuler (Gambar 2d) memiliki diameter 0,5 – 2,5 mm, embrio *elongated* (Gambar 2e) memiliki diameter 1,2 – 3 mm dengan rerata panjang 8,8 mm, sedangkan embrio skutelar (Gambar 2f) memiliki diameter 2 – 7 mm dengan rerata panjang 25,1 mm. Ukuran embrio somatik yang diperoleh normal dan serupa dengan yang dilaporkan Fki *et al.* (2003) pada embrio somatik kurma cv. Deglet Noor, yaitu ukuran embrio globuler 0,5 – 4 mm, *elongated* 10 mm, dan skutelar 20 – 25 mm. Embrio skutelar tumbuh secara bipolar menghasilkan plumula

(bakal tunas) dan radikula (bakal akar) (Gambar 2f). Setelah 8 minggu diinkubasi pada media perkecambahan, plumula tumbuh memanjang membentuk tunas-tunas hijau (Gambar 2g), sedangkan radikula membentuk akar tunggang pertama. Pada tahap perkecambahan, juga tumbuh banyak embrio somatik sekunder dari pangkal atau tepi embrio somatik primer dan kecambah. Pembentukan embrio sekunder ini merupakan sumber dari proliferasi embrio somatik ke tahap perkembangan embrio lebih lanjut. Kecambah tumbuh semakin panjang membentuk daun planlet yang sebagian besar memiliki struktur menggulung. Planlet yang memiliki daun dengan panjang minimal 2 cm kemudian diinduksi perakarannya.

Pembentukan akar planlet

Perakaran pada planlet kurma tumbuh cukup lambat. Pada minggu ke-4 inkubasi, hanya akar tunggang pertama yang tumbuh pada sebagian planlet. Akar-akar selanjutnya mulai tumbuh setelah minggu ke-8 inkubasi, dan pada minggu ke-12 tumbuh akar lateral pada beberapa planlet. Pembentukan akar planlet yang cukup lambat ini serupa dengan yang dilaporkan oleh Al-Khayri (2007) bahwa akar planlet kurma terbentuk minimal setelah 9 minggu inkubasi.

Berdasarkan hasil pada Tabel 3, penggunaan NAA 0,2 mg/L pada media MS dan kombinasi NAA 0,5 mg/L dan IBA 1 mg/L pada media ½ MS menghasilkan persentase planlet berakar tertinggi, yaitu 100% (Tabel 3). Penggunaan NAA 0,2 mg/L pada media MS pun menginduksi akar primer paling banyak, yaitu dengan rata-rata 4,6 akar primer per planlet. Pembentukan akar primer terbanyak, yaitu 4,6 akar primer per planlet, juga terjadi pada media MS dengan penambahan kombinasi NAA 0,5 mg/L dan IBA 1 mg/L. Pada media yang menggunakan ½ konsentrasi MS modifikasi, pembentukan akar primer berkurang. Hasil serupa dilaporkan oleh Badawy *et al.* (2005), bahwa media MS konsen-

trasi penuh menginduksi jumlah akar primer per planlet kurma cv. Sewei lebih banyak dibandingkan dengan penggunaan MS ½ konsentrasi. Hal ini karena media MS konsentrasi penuh tentunya mengandung mineral dan vitamin dengan konsentrasi yang memenuhi untuk menunjang pembentukan akar planlet dibandingkan dengan hanya menggunakan ½ konsentrasi (Badawy *et al.*, 2005).

Selain kuantitas pembentukan akar, pada penelitian ini juga diamati struktur atau kualitas akar yang terbentuk. Pada media MS yang menggunakan NAA 0,5 mg/L dan IBA 1 mg/L terbentuk paling banyak akar lateral dibandingkan dengan yang hanya menggunakan NAA 0,2 mg/L meskipun rerata jumlah akar primer sama, sehingga struktur perakarannya lebih lebat (Tabel 3). Menurut Ibrahim *et al.* (2009), penggunaan NAA dalam inisiasi perakaran planlet kurma lebih memacu ke arah pemanjangan akar, sedangkan penggunaan IBA lebih memacu pembentukan akar lateral. Oleh karena itu, pada penelitian ini pembentukan akar lateral paling sedikit terjadi pada media yang hanya menggunakan NAA. Akar lateral mampu mendukung keberhasilan ketika planlet kelapa sawit diaklimatisasi ke lingkungan *ex vitro* (Riyadi & Sumaryono, 2010). Oleh karena itu, berdasarkan hasil penelitian ini, komposisi media MS dengan penambahan NAA 0,5 mg/L dan IBA 1 mg/L paling baik digunakan dalam menginduksi pembentukan akar planlet kurma cv. Ajwa dari eksplan pucuk tunas, baik secara kuantitas maupun kualitas perakaran yang terbentuk.

Berbagai komposisi media pembesaran dan pembentukan akar tidak signifikan mempengaruhi panjang tunas planlet. Planlet kurma memiliki struktur tunas atau daun yang menggulung-gulung (Gambar 2h), dengan panjang berkisar antara 5,4 – 7,5 cm. Planlet yang telah memiliki daun dan sistem perakaran yang baik siap untuk diaklimatisasi ke lingkungan *ex vitro*.

Tabel 2. Deskripsi perkembangan kalus dan embrio somatik tanaman kurma
Table 2. Description of callus and somatic embryo development of date palm

Tahap perkembangan <i>Developmental stage</i>	Zat pengatur tumbuh yang digunakan <i>Plant growth regulator used</i>	Waktu inkubasi <i>Incubation time</i>	Hasil <i>Results</i>
Proliferasi kalus noduler	2-iP 30 mg/L, NAA 10 mg/L, arang aktif 1,5 g/L	3 minggu	Kalus noduler dengan laju proliferasi 1,5 kali (Gambar 2a)
	2-iP 6 mg/L, NAA 10 mg/L, arang aktif 1,5 g/L	9 minggu	Kalus sekunder berukuran lebih kecil dari kalus primer
Induksi dan seleksi kalus embriogenik	2-iP 1,5 mg/L, NAA 10 mg/L, arang aktif 1,5 g/L atau tanpa arang aktif	9-12 minggu	Lini murni kalus embriogenik dengan laju proliferasi 3 kali. (Gambar 2b)
Eksresi embrio somatik	Tanpa ZPT	8-12 minggu	Embrio somatik fase globuler (Gambar 2c-d), <i>elongated</i> (Gambar 2e), dan skutelar (Gambar 2f)
Perkecambahan embrio somatik	Tanpa ZPT	8 minggu	Kecambah dengan struktur tunas menggulung, dan embrio somatik sekunder (Gambar 2g)
Pembesaran planlet	NAA 0,5 mg/L, IBA 1 mg/L	12 minggu	Planlet dengan daun dan akar (Gambar 2h)

Tabel 3. Pembentukan akar planlet kurma pada berbagai konsentrasi NAA dan IBA
Table 3. Rooting of date palm plantlets on various NAA and IBA concentrations

Media dasar Basal media	Zat pengatur tumbuh <i>Plant growth regulator</i>		Persentase planlet berakar <i>Rooting percentage</i>	Jumlah akar primer <i>Number of primary root</i>	Struktur akar <i>Root structure</i>	Panjang tunas <i>Shoot height (cm)</i>
	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)				
MS modifikasi <i>Modified MS</i>	0	0	60,0	2,2 b*)	akar panjang, tidak ada akar lateral <i>long root, no lateral root</i>	5,4 a
MS modifikasi <i>Modified MS</i>	0,2	0	100	4,6 a	akar pendek namun berdiameter besar, akar lateral sedikit <i>shorty root with wide diameter, not many lateral roots</i>	6,5 a
MS modifikasi <i>Modified MS</i>	0,5	1	73,3	4,6 a	akar panjang, akar lateral sangat banyak dan panjang <i>long root, abundant lateral roots</i>	6,9 a
MS modifikasi <i>Modified MS</i>	1	0,5	86,7	1,8 b	akar pendek namun berdiameter besar, akar lateral cukup banyak <i>shorty root with wide diameter, many lateral roots</i>	6,8 a
½ MS modifikasi <i>½ Modified MS</i>	0,5	1	100	4,1 ab	akar panjang, akar lateral cukup banyak <i>long root, many lateral roots</i>	7,5 a

*) Huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nilai rerata tidak signifikan berdasarkan uji jarak berganda Duncan dengan $\alpha \leq 0,05$

*) Same letters in the same coloumn indicate that means are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $\alpha \leq 0,05$

Kesimpulan

Protokol yang efektif untuk mikropropagasi tanaman kurma melalui embriogenesis somatik menggunakan eksplan pucuk tunas telah diperoleh. Kalus terbentuk pada media yang mengandung 2,4-D 10 mg/L dan 2-iP 1 atau 3 mg/L. Kalus embriogenik mampu diinduksi dengan meniadakan 2,4-D dan menurunkan konsentrasi 2-iP pada media. Kalus embriogenik membentuk embrio somatik yang berkembang hingga menjadi planlet pada media tanpa penggunaan hormon. Pada media MS dengan NAA 0,5 mg/L dan IBA 1 mg/L, planlet membentuk akar yang baik dan siap untuk diaklimatisasi. Ketersediaan protokol embriogenesis somatik tanaman kurma ini membuka peluang penyediaan bibit klonal kurma unggul hasil kultur jaringan.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdr. Aliyah dan R. Ridwan dari Laboratorium Biak Sel dan Mikropropagasi, Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia atas bantuan teknisnya.

Daftar Pustaka

- Abass, MH, SD Al-Utbi & EARH Al-Samir (2017). Genotoxicity assessment of high concentrations of 2,4-D, NAA and Dicamba on date palm callus (*Phoenix dactylifera* L.) using protein profile and RAPD markers. *J Genet Eng Biotechnol* 15, 287-295.
- Abd El Bar OH & MM El Dawayati (2014). Histological changes on regeneration *in vitro* culture of date palm (*Phoenix dactylifera*) leaf explants. *Aust J Crop Sci* 8(6), 848-855.

- Abul-Soad AA & SM Mahdi (2010). Commercial production of tissue culture date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by inflorescence technique. *J Genet Eng Biotechnol* 8(2), 39-44.
- Alkhateeb AA (2006). Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Sukary in response to sucrose and polyethylene glycol. *Biotechnol* 5(4), 466-470.
- Al-Khayri JM (2007). Date palm *Phoenix dactylifera* L. micropropagation, In: SM Jain & H. Häggman (eds.), *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Netherlands, Springer. p. 509-526
- Al-Khayri JM (2010). Somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) improved by coconut water. *Biotechnol* 9, 484.
- Arabnezhad H, M Bahar, HR Mohammadi & M Latifian (2012). Development, characterization and use of microsatellite markers for germplasm analysis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Sci Hort* 134, 150-156.
- Aslam J, SA Khan, AJ Cheruth, A Mujib, MP Sharma & PS Srivastava (2011). Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy, histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Saudi J Biol Sci* 18, 369-380.
- Badawy EM, AMA Habib, A El-Bana & GM Yosry (2005). Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera*) plants by using tissue culture technique. *Arab J Biotechnol* 8, 343-354.
- Bekheet S (2013). Date palm biotechnology in Egypt (review article). *App. Sci. Report* 3(3), 144-152.
- Boufis N, M Khelifi-Slaoui, Z Djillali, D Zaoui, A Morsli, MA Bernards, A Makhzum & L Khelifi (2014). Effects of growth regulators and types of culture media on somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L. cv. Degla Beida). *Sci Hort* 172, 135-142.
- Cassells AC (2012). Pathogen and biological contamination management in plant tissue culture: phytopathogens, vitro pathogens, and vitro pests. In: Loyola-Vargas V & Ochoa-Alejo N (eds.) *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol. 877. Totowa, Humana Press. p. 57-80.
- Chutipajit S & T Sutjaritvorakul (2018). Application of activated charcoal and nanocarbon to callus induction and plant regeneration in aromatic rice (*Oryza sativa* L.). *Chem Spec Bioavailab* 30(1), 1-8.
- Elmeer K & I Mattat (2012). Marker-assisted sex differentiation in date palm using simple sequence repeats. *3 Biotech* 2, 241-247.
- El-Kosary S, MA Shaheen, SAY Rizk & AA Abdel-Hameed (2009). Rooting light weight offshoots of Zagloul date palm using hydroponics technique. *J Hort Sci Ornam Plants* 1(3), 68-78.
- Fki L, R Masmoudi, N Drira & A Rival (2003). An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. *Plant Cell Rep* 21, 517-524.
- Fki L, R Masmoudi, W Kriaâ, A Mahjoub, B Sghaier, R Mzid, A Mliki, A Rival & N Drira (2011a). Date Palm Micropropagation via Somatic Embryogenesis In: SM Jain et al. (eds.), *Date Palm Biotechnology*, Netherlands, Springer. p. 47-68.
- Fki L, N Bouaziz, W Kriaa, R Benjemaa-Masmoudi, R Gargouri-Bouazid, A Rival & N Drira (2011b). Multiple bud cultures of 'Barhee' date palm (*Phoenix dactylifera*) and physiological status of regenerated plants. *J. Plant Physiol* 168, 1694-1700.
- Gross-Balthazard M, C Newton, S Ivorra, M Pierre, J Pintaud & J Terral (2016). The domestication syndrome in *Phoenix dactylifera* seeds: Toward the identification of wild date palm populations. *PLoS One* 11(3), e0152394.
- Hamza H, A Mrabet & A Jimenez-Araujo (2016). Date palm parthenocarpic fruits (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Deglet Nour: chemical characterization, functional properties and antioxidant capacity in comparison with seeded fruits. *Sci Hort* 211, 352-357.
- Hazzouri KM, JM Flowers, HJ Visser, HSM Khierallah, U Rosas, GM Pham, RS Meyer, CK Johansen, ZA Fresquez, K Masmoudi, N Haider, NE Kadri, Y Idaghdour, JA Malek, D Thirkhill, GS Markhand, RR Krueger, A Zaid & MD Purugganan (2015). Whole genome re-sequencing of date palms yields insights into diversification of a fruit tree crop. *Nat Commun* 6, 8824.
- Ibrahim K, KB Alromaihi & KMS Elmer (2009). The combined role of sucrose with IBA and NAA in rooting of date palm somatic embryos cv. Khanaizi. *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 19(2), 127-132.

- Intha N & P Chaiprasart (2018). Sex determination in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by PCR based marker analysis. *Sci Hort* 236, 251-255.
- Larson G, DR Piperno, RG Allaby, MD Purugganan, L Andersson, M Arroyo-Kalin, L Barton, CC Vigueira, T Denham, K Dobney, AN Doust, P Gepts, MTP Gilbert, KJ Gremillion, L Lucas, L Lukens, FB Marshall, KM Olsen, JC Pires, PJ Richerson, RR de Casas, OI Sanjur, MG Thomas & DQ Fuller (2014). Current perspectives and the future of domestication studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 111(17), 6139-6146.
- Manchanda P & SS Gosal (2012). Effect of activated charcoal, carbon sources and gelling agents on direct somatic embryogenesis and regeneration in sugarcane via leaf roll segments. *Sugar Tech* 12(2), 168-173.
- Mazri MA, I Belkoura, R Meziani, B Mokhless & S Nour (2017). Somatic embryogenesis from bud and leaf explants of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Nadja. *3 Biotech* 7, 58.
- Mohammadi N, S Rastgoo & M izadi (2017). The strong effect of pollen source and pollination time on fruit set and the yield of tissue culture-derived date palm (*Phoenix dactylifera* L.) trees cv.Barhee. *Sci Hort* 224, 343-350.
- Othmani A, C. Bayoudh, N Drira & M Trifi (2009a). *In vitro* cloning of date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Bey by using embryogenic suspension and temporary immersion bioreactor (TIB). *Biotechnol Biotechnol Equip.* 23(2), 1181-1188.
- Othmani A, C. Bayoudh, N Drira, M Marrakchi & M Trifi (2009b). Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 97(1), 71-79.
- Pais AK, AP da Silva, JC de Souza, SL Teixeira, JM Ribeiro, AR Peixoto & CD da Paz (2016). Sodium hypochlorite sterilization of culture medium in micropropagation of *Gerbera hybrida* cv. Essandre. *Af. J Biotechnol* 15(36), 1995-1998.
- Pintaud JC, B Ludena, F Aberlenc-Bertossi, S Zehdi & M Gros-Balthazard (2013). Biogeography of the date palm (*Phoenix dactylifera* L., arecaceae): insights on the origin and on the structure of modern diversity. *Acta Hort* 994, 19-38.
- Riyadi I & Sumaryono (2010). Pembentukan akar *in vitro* planlet kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) dalam medium cair dengan penambahan auksin. *Menara Perkebunan* 78(1), 19-24.
- Sane D, F Aberlenc-Bertossi, YK Gassama-Dia, M Sagna, MF Trouslot, Y Duval & A Borgel (2006). Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). *Annals Bot* 98, 301-308.
- Tenberg M (2012). Beginnings and early history of date palm garden cultivation in the Middle East. *J Arid Environ* 86, 139-147.
- Thomas TD (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol Adv* 26, 618-631.
- Yano T, Y Miyahara, N Morii, T Okano & H Kubota (2016). Pentanol and benzyl alcohol attack bacterial surface structures differently. *Appl Environ Microbiol* 42, 402-408.
- Zehdi-Azouzi S, E Cherif, S Moussouni, M Gros-Balthazard, SA Naqvi, B Ludena, K Castillo, N Chabrillange, N Bouguedoura, M Bennaceur, F Si-Dehbi, S Abdoukader, A Daher, J Terral, S Santoni, M Ballardini, A Mercuri, MB Salah, K Kadri, A Othmani, C Littardi, A Salhi-Hannachi, J Pintaud & F Aberlenc-Bertossi (2015). Genetic structure of the date palm (*Phoenix dactylifera*) in the old world reveals a strong differentiation between eastern and western populations. *Annals Bot* 116, 101-112.