

Pertumbuhan dan perkembangan kalus embriogenik dan embrio somatik kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) pada sistem perendaman sesaat

Growth and differentiation of embryogenic callus and somatic embryos of oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) in a temporary immersion system

SUMARYONO¹⁾, Imron RIYADI¹⁾, Pauline D. KASI¹⁾ & Gale GINTING²⁾

¹⁾Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

²⁾Pusat Penelitian Kelapa Sawit, Medan 20158, Indonesia

Summary

In temporary immersion system (TIS), plant materials are exposed to the medium for a short time, therefore they are more exposed to the air and a lack of oxygen frequently experienced by a liquid culture can be avoided. This experiment was conducted to determine the procedure for callus proliferation up to somatic embryo germination of oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) in TIS culture. Embryogenic calli of oil palm clone MK 638 from Marihat Research Institute were cultured on solid medium in the dark culture room and then used as materials for TIS. Immersion time for all cultures was three minutes every six hours. Callus proliferation was conducted in DF liquid culture with 5 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L kinetin with transfer interval of 4, 6 and 8 weeks. The treatments for somatic embryo maturation were kinetin and ABA, whereas for somatic embryo germination was IBA, kinetin and GA₃. The results show that the best transfer interval for callus proliferation was four weeks. In this treatment the relative growth rate of callus was 0.38 g/g/week. Somatic embryo initiation from the callus was done in DF medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L kinetin. The percentage of somatic embryo was 80% based on biomass fresh weight after the fourth subculture. The addition of 0.5 mg/L kinetin and 0.05 mg/L ABA improved somatic embryo maturation of oil palm; the average

number of somatic embryos at advanced stages (torpedo and cotyledonary) was 16.3 embryos per flask. The addition of 2 mg/L IBA and 0.5 mg/L kinetin in DF medium with half-strength macro-salt enhanced significantly the germination of somatic embryos. GA₃ at 0.1 mg/L increased the total number of germinants.

[Key words: *In vitro* culture, oil palm, somatic embryogenesis, temporary immersion-system]

Ringkasan

Pada sistem perendaman sesaat (SPS), bahan tanam hanya terpapar sebentar dalam medium sehingga paparan dengan udara lebih lama dan kekurangan oksigen yang sering terjadi pada kultur cair dapat diatasi. Penelitian ini bertujuan menetapkan prosedur untuk memperbanyak kalus embriogenik sampai dengan perkecambahan embrio somatik kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) dalam kultur SPS. Kalus embriogenik kelapa sawit klon MK 638 yang diperoleh dari Balai Penelitian Marihat diperbanyak pada medium padat di ruang gelap yang kemudian digunakan sebagai bahan untuk kultur cair SPS. Lama perendaman semua kultur di SPS diatur tiga menit dengan frekuensi setiap enam jam. Perbanyak kalus dalam medium cair DF dengan 2,4-D 5 mg/L dan kinetin 0,1 mg/L dilaksanakan dengan interval subkultur 4, 6 dan 8 minggu.

Perlakuan pematangan embrio somatik adalah kinetin dan ABA sedangkan perlakuan untuk perkecambahan embrio somatik adalah IBA, kinetin dan GA₃. Hasil penelitian menunjukkan bahwa untuk proliferasi kalus embriogenik kelapa sawit, interval subkultur terbaik adalah empat minggu. Pada perlakuan ini laju tumbuh relatif kalus mencapai 0,38 g/g/minggu. Inisiasi embrio somatik dari kalus dilakukan pada medium DF ditambah 2,4-D 1 mg/L dan kinetin 0,1 mg/L. Persentase embrio somatik mencapai 80% dari total bobot basah biomassa setelah subkultur keempat. Penambahan kinetin 0,5 mg/L dan ABA 0,05 mg/L meningkatkan pematangan embrio somatik kelapa sawit; rata-rata jumlah embrio somatik fase lanjut (torpedo dan kotiledon) adalah 16,3 embrio per bejana. Penambahan IBA 2 mg/L dan kinetin 0,5 mg/L pada medium DF dengan setengah garam makro meningkatkan perkecambahan embrio somatik secara nyata. GA₃ 0,1 mg/L meningkatkan jumlah kecambah yang terbentuk.

Pendahuluan

Kultur *in vitro* melalui embriogenesis somatik pada medium padat merupakan teknik yang paling umum digunakan saat ini untuk perbanyakan klonal kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). Penggunaan medium padat dianggap tidak efisien dalam hal tingkat produksi planlet dan dalam penggunaan tenaga kerja serta ruang (Soh *et al.*, 2006). Di samping itu, kemungkinan untuk otomatisasi dari kultur padat lebih terbatas sehingga menghambat peningkatan skala produksi secara massal.

Kelemahan medium padat tersebut dapat diatasi dengan penggunaan medium cair. Medium cair sangat ideal dalam mikropropagasi untuk menurunkan biaya produksi dan untuk otomatisasi (Aitken-Christie, 1991). Sistem kultur cair menyediakan kondisi kultur yang lebih seragam, penggantian medium lebih

mudah dan dapat digunakan wadah yang lebih besar daripada kultur padat. Penggunaan medium cair mulai banyak dikembangkan untuk kultur *in vitro* kelapa sawit dengan tujuan meningkatkan laju pertumbuhan dan keseragaman kalus serta embrio somatik (de Touchet *et al.*, 1991; Duval *et al.*, 1993; Sumaryono *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 1995; Ginting & Fatmawati, 1997; Tahardi, 1998).

Namun, kultur *in vitro* dalam medium cair juga memiliki kelemahan antara lain adanya masalah teknis seperti vitrifikasi, kerusakan sel-sel oleh putaran baling-baling dan kekurangan oksigen. Untuk menghindari masalah tersebut telah dikembangkan berbagai prosedur seperti penggunaan blok/sponge penyangga, sistem rakit untuk mendukung eksplan, penambahan medium cair pada kultur agar dan penggunaan bioreaktor kabut. Sistem perendaman sesaat (SPS) dikembangkan untuk mikropropagasi tanaman berdasarkan prinsip serupa dengan bioreaktor kabut yakni kontak antara eksplan dan medium hanya secara periodik, tidak terus menerus. Lama dan frekuensi perendaman dapat diatur secara otomatis dengan pengatur waktu. Pada sistem ini eksplan tidak kekurangan oksigen, terjadi pencampuran (*mixing*) yang cukup merata, dan biaya relatif lebih rendah (Teisson *et al.*, 1999).

Sistem perendaman sesaat (SPS) telah diaplikasikan untuk perbanyakan *in vitro* secara massal pada berbagai jenis tanaman (Etienne & Berthouly, 2002). Hasil penelitian pada kelapa sawit (Tahardi, 1998) menunjukkan bahwa frekuensi produksi embrio somatik dari kalus nodular di SPS lebih tinggi daripada di medium padat, di samping itu keseragaman perkembangan embrio juga lebih baik sehingga diperoleh embrio somatik yang lebih seragam. Namun, bahan yang digunakan adalah

kalus nodular yang dipilih seragam dan disubkultur berulang kali sampai membentuk kecambah. Dalam penelitian ini digunakan kumpulan (*clump*) kalus dan embrio somatik beragam seperti dilakukan dalam kegiatan produksi rutin sehari-hari. Penelitian ini bertujuan menetapkan prosedur kultur cair untuk memperbanyak kalus embriogenik sampai dengan perkecambahan embrio somatik kelapa sawit pada sistem perendaman sesaat

Bahan dan Metode

Bahan kalus dan kondisi kultur

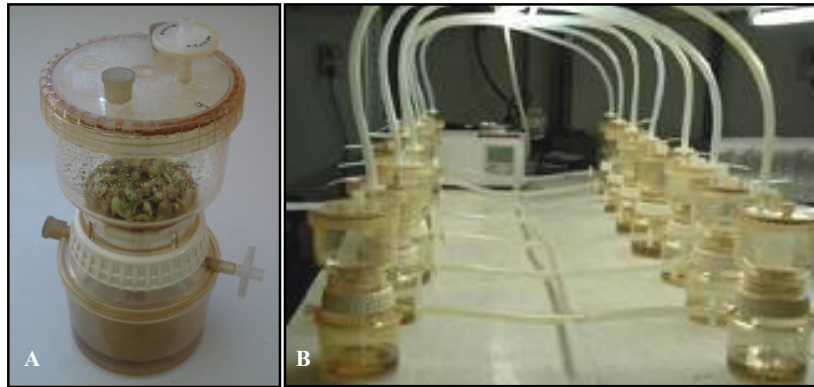
Kalus yang diinduksi dari daun pupus kelapa sawit klon MK 638 berasal dari Balai Penelitian Marihat, Pusat Penelitian Kelapa Sawit, Medan. Kalus tersebut kemudian dikulturkan dalam tabung kultur yang berisi medium MS (Murashige & Skoog, 1962) padat dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D 1mg/L; kinetin 0,1 mg/L; air kelapa 10%; sukrosa 30 g/L; arang aktif 2 g/L, kasein hidrolisat 100 mg/L; dan gelrite 2 g/L. pH medium disesuaikan pada skala 5,2 sebelum diautoklaf pada suhu 121^oC dengan tekanan 1 atm selama 20 menit. Kultur disimpan di ruang gelap pada suhu 25^oC. Kalus disubkultur pada medium yang sama sebanyak dua kali sehingga diperoleh kalus yang bersifat embriogenik. Kalus embriogenik digunakan untuk kultur SPS.

Untuk proliferasi kalus embriogenik, kultur ditempatkan dalam ruang dengan intensitas cahaya rendah sekitar 10 $\mu\text{mol foton/m}^2/\text{s}$ dan periode pencahayaan selama 12 jam. Untuk inisiasi, pematangan, dan perkecambahan embrio somatik, kultur ditempatkan dalam ruang dengan intensitas cahaya 30 $\mu\text{mol foton/m}^2/\text{s}$ dan periode pencahayaan selama 12 jam. Suhu ruang diatur sekitar 25 ^oC.

Pada kultur SPS, bejana terdiri dari dua wadah yang terpisah. Propagula ditempatkan dalam wadah atas sedangkan medium berada dalam wadah bawah (Gambar 1A). Pada penelitian ini volume medium cair yang digunakan adalah 75-100 mL per bejana. Untuk mencegah kontaminasi ditambahkan rifampicin 15 mg/L dan tetracycline 15 mg/L ke dalam medium. Medium cair naik ke wadah atas menggenangi kultur tanaman dengan lama dan interval perendaman tertentu yang diatur oleh alat *Autonic double timer* (Gambar 1B). Perendaman kalus embriogenik atau embrio somatik diatur selama tiga menit dengan interval waktu enam jam, sehingga dalam sehari (24 jam) terjadi empat kali perendaman.

Proliferasi kalus embriogenik

Sebanyak 0,5 g kalus embriogenik ditempatkan dalam setiap bejana SPS. Medium yang digunakan untuk proliferasi kalus embriogenik adalah medium DF (de Fossard *et. al.*, 1974) cair dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D 5 mg/L, kinetin 0,1 mg/L, dan sukrosa 30 g/L. pH medium disesuaikan pada skala 5,7 sebelum diautoklaf pada suhu 121 ^oC dengan tekanan 1 atm selama 20 menit. Perlakuan yang digunakan adalah interval subkultur (lama periode kultur) yaitu 4, 6 dan 8 minggu. Penelitian dilaksanakan sampai dengan 24 minggu sehingga ketiga perlakuan berakhir pada saat yang sama. Setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Pertumbuhan kalus embriogenik diamati dengan menimbang bobot basah kalus embriogenik setiap kali dilakukan subkultur. Dari bobot basah tersebut dibuat kurva pertumbuhan kalus embriogenik pada tiga interval subkultur tersebut.



Gambar 1. Kultur *in vitro* kelapa sawit pada sistem perendaman sesaat (A) Bejana terdiri dari wadah atas tempat bahan kultur dan wadah bawah tempat medium, (B) Bejana dihubungkan dengan *Autonic double timer*.

Figure 1. *In vitro* culture of oil palm in temporary immersion system (A) Flask consisted of upper containment for culture the materials and lower containment for the media, (B) Flasks are connected with an *Autonic double timer*.

Inisiasi embrio somatik

Sebagian kalus embriogenik yang telah diperbanyak dalam tahap proliferasi dalam medium cair SPS diinisiasi menjadi embrio somatik. Sebanyak 0,5 g kalus embriogenik dimasukkan ke dalam setiap bejana. Medium yang digunakan adalah medium cair DF dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D 1 mg/L, kinetin 0,1 mg/L dan sukrosa 30 g/L. Pembentukan embrio somatik diamati selama 24 minggu. Setiap enam minggu kalus embriogenik disubkultur pada medium yang sama. Setiap kali disubkultur, embrio somatik yang terbentuk dipisahkan dari kalus embriogenik dan bobot basahnya ditimbang dari setiap bejana.

Pematangan dan perkecambahan embrio somatik

Embrio somatik yang digunakan sebagian besar masih dalam fase perkem-

bangun awal (globuler dan bentuk-hati). Sebanyak 4 g embrio somatik pada fase tersebut dikulturkan dalam bejana. Medium dasar yang digunakan adalah DF cair dengan penambahan 2,4-D 0,01 mg/L dan sukrosa 30 g/L. Perlakuan yang digunakan untuk pematangan embrio somatik adalah peningkatan konsentrasi kinetin (0,1 mg/L dan 0,5 mg/L), serta kombinasi kinetin 0,5 mg/L dengan ABA 0,05 mg/L. Masing-masing perlakuan diulang empat kali. Jumlah embrio somatik fase lanjut (torpedo dan kotiledon) diamati enam minggu kemudian. Pada perkecambahan embrio somatik digunakan medium dasar DF cair (setengah garam makro) dengan penambahan sukrosa 20 g/L dan PVP 20 mg/L. Perlakuan untuk perkecambahan adalah IBA 3 mg/L, IBA 2 mg/L + kinetin 0,5 mg/L, dan IBA 2 mg/L + kinetin 0,1 mg/L + GA₃ 0,1 mg/L. Masing-masing perlakuan diulang empat kali. Jumlah kecambah diamati enam minggu kemudian.

Analisis data

Data hasil pengamatan dianalisis dengan sidik ragam (*analysis of variance*). Apabila ada perbedaan yang nyata maka perbedaan antar perlakuan ditentukan menurut uji jarak berganda Duncan pada $P = 0,05$ (Duncan, 1955).

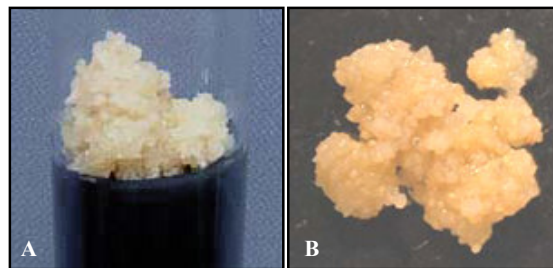
Hasil dan Pembahasan

Proliferasi kalus embriogenik

Kalus embriogenik pada medium padat yang digunakan berstruktur noduler dan berwarna putih kecoklatan (Gambar 2A). Kultur di SPS menyebabkan kalus menjadi lebih lunak dan berwarna kekuningan (Gambar 2B). Setelah empat minggu dalam kultur SPS, bobot basah kalus meningkat lebih dari dua kali lipat (Gambar 3). Bobot basah biomassa kalus bertambah terus sampai enam minggu, selanjutnya menurun pada delapan minggu. Hal ini menunjukkan bahwa setelah enam minggu terjadi penurunan laju tumbuh kalus mendekati tanpa pertumbuhan (*levelling-off*). Penggantian medium dengan medium baru terlihat memacu kembali kalus untuk tumbuh.

Setelah 16-18 minggu, bobot biomassa meningkat dengan tajam, terutama pada perlakuan interval empat minggu (Gambar 3).

Bobot basah biomassa kalus terus meningkat pada kultur berulang sampai dengan umur 24 minggu (Gambar 3). Interval transfer berpengaruh nyata terhadap proliferasi kalus embriogenik. Bobot kalus paling tinggi diperoleh pada interval transfer empat minggu (5,02 g), disusul interval transfer enam minggu (3,70 g) dan delapan minggu (3,02 g) (Tabel 1). Laju tumbuh relatif masing-masing perlakuan selama 24 minggu memperlihatkan bahwa pada interval transfer empat minggu penambahan rata-rata biomassa mencapai 0,38 g per gram biomassa awal per minggu. Ini menunjukkan peningkatan lebih dari sepertiga biomassa setiap minggu. Laju tumbuh relatif pada interval transfer 6 dan 8 minggu berturut-turut adalah 0,27 dan 0,21 g/g/minggu (Tabel 1). Peningkatan bobot biomassa kalus terbaik sekitar 2,2 kali dalam waktu empat minggu pertama. Laju tumbuh kalus kelapa sawit ini lebih rendah dari yang diperoleh de Touchet *et al.* (1991) sebesar empat kali dan Soh *et al.* (2006) sebesar



Gambar 2. Kalus kelapa sawit (A) pada medium padat, (B) setelah ditransfer ke medium cair pada sistem perendaman sesaat.

Figure 2. Callus of oil palm (A) on a solid media, (B) after being transferred into a liquid medium of temporary immersion system.

Tabel 1. Pengaruh interval transfer terhadap laju tumbuh relatif dan bobot basah biomassa kalus embriogenik setelah 24 minggu pada media cair SPS.

Table 1. Effect of transfer interval on relative growth rate and biomass fresh weight of embryogenic callus at 24th week on a liquid media of TIS.

Interval transfer (minggu) <i>Transfer interval (week)</i>	Laju tumbuh relatif (g/g/minggu) <i>Relative growth rate (g/g/week)</i>	Bobot basah kalus (g) <i>Callus fresh weight (g)</i>
4	0,38 a*	5,02 a
6	0,27 ab	3,70 b
8	0,21 b	3,02 b

* Angka rata-rata pada kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada P=0,05.

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

enam kali dalam medium cair, walaupun laju ini tergantung pada bobot kalus awal yang digunakan. Oleh karena itu perlu penelitian lebih lanjut menyangkut komposisi medium serta lama dan frekuensi perendaman untuk meningkatkan laju pertumbuhan kalus kelapa sawit dengan SPS.

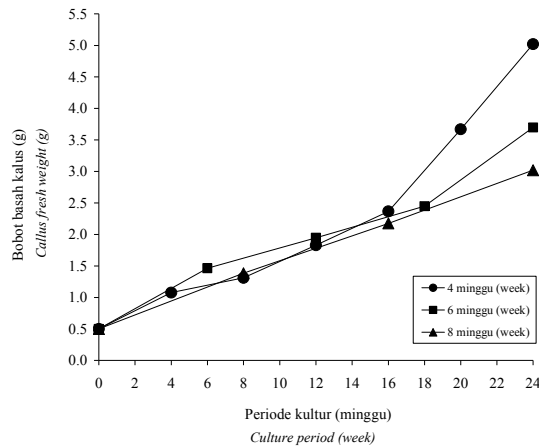
Laju pertumbuhan yang lebih baik pada perlakuan interval subkultur empat minggu menunjukkan bahwa ketersediaan nutrisi bagi pertumbuhan kalus masih memadai sampai dengan empat minggu. Pada perlakuan interval enam dan delapan minggu, tingkat ketersediaan nutrisi sudah mulai terbatas yang berakibat laju pertumbuhan mulai menurun. Namun perlu diperhatikan bahwa interval subkultur kalus setiap empat minggu mempunyai kecenderungan meningkatkan abnormalitas pembungaan kelapa sawit dibandingkan dengan interval delapan minggu (Eeuwens *et al.*, 2002). SPS memang tidak banyak digunakan untuk proliferasi kalus, tetapi

lebih sering ditujukan untuk meningkatkan pematangan dan kualitas embrio somatik (Duval *et al.*, 1993; Tahardi, 1998), setek mikro (Berthouly *et al.*, 1995), serta umbi mikro (Teisson & Alvard, 1999).

Inisiasi embrio somatik

Pada tahap inisiasi embrio somatik, selama 24 minggu (empat periode kultur) pada SPS terjadi peningkatan persentase embrio somatik dan penurunan persentase kalus secara bertahap. Hal ini memperlihatkan berlangsungnya diferensiasi kalus menjadi embrio somatik. Persentase embrio somatik mencapai 80% pada periode kultur keempat (Gambar 4). Embrio somatik berukuran lebih besar dibanding ukuran kalus dengan bentuk globuler yang tersusun dalam agregat. Sebagian besar embrio somatik berwarna kuning-kehijauan yang permukaannya tampak halus dan lebih kompak (Gambar 5A).

Pertumbuhan dan perkembangan kalus embriogenik dan embrio somatik...



Gambar 3. Laju pertumbuhan kalus embriogenik kelapa sawit dalam SPS pada tiga interval subkultur yang berbeda.

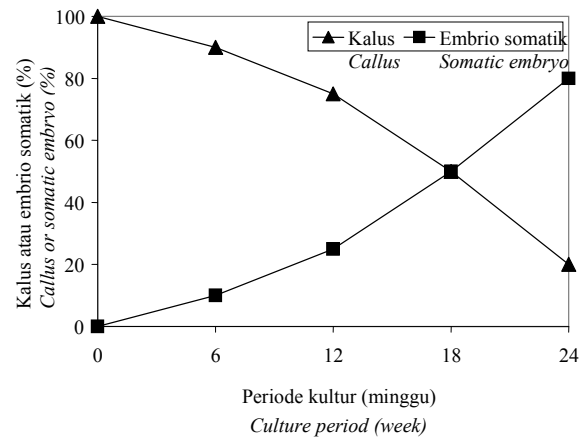
Figure 3. Growth rate of embryogenic callus of oil palm in TIS on three different transfer intervals.

Pematangan dan perkecambahan embrio somatik

Embrio somatik yang sebagian besar dalam fase globuler (Gambar 5A) dikulturkan pada medium pematangan DF dengan 2,4-D 0,01 mg/L dan berbagai konsentrasi kinetin. Hasil pengamatan jumlah embrio somatik fase lanjut (torpedo dan kotiledon) setelah enam minggu menunjukkan bahwa kinetin 0,1 mg/L tidak berbeda dengan 0,5 mg/L terhadap perkembangan embrio somatik kelapa sawit, sedangkan penambahan ABA 0,05 mg/L meningkatkan secara nyata jumlah embrio dewasa (Tabel 2). Jumlah embrio somatik fase lanjut yang dihasilkan berkisar 10-16 per bejana. Hasil ini serupa dengan yang diperoleh Tahardi (1998) bahwa ABA 0,05 mg/L meningkatkan pembentukan embrio dewasa. ABA diketahui dapat membantu perkecambahan yang normal dengan

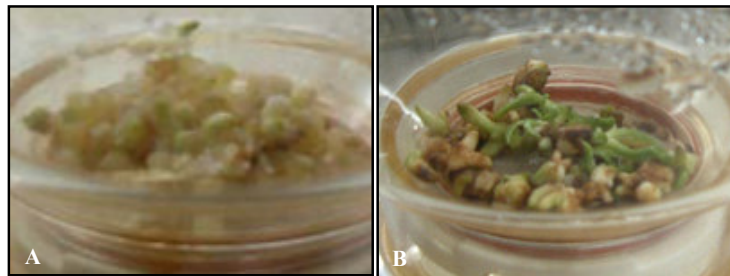
mempengaruhi akumulasi cadangan protein dan asam lemak simpanan (Bonetta & McCourt, 1998) serta pati (Fujii *et al.*, 1992). Pada pematangan embrio somatik teh, ABA 5 mg/L yang diberikan pada fase hati meningkatkan beberapa kali lipat kandungan pati, protein dan total gula terlarut sehingga mampu memperbaiki daya kecambah embrio somatik (Sharma *et al.*, 2004). Sharma *et al.* (2004) menyimpulkan bahwa kekurangan bahan simpanan saat pematangan embrio somatik merupakan penyebab utama daya kecambah yang rendah dan abnormal.

Perkecambahan embrio somatik fase dewasa (torpedo dan kotiledon) menjadi kecambah (Gambar 5B) dilakukan pada medium DF setengah makro dan sukrosa 20 g/L. Zat pengatur tumbuh yang ditambahkan adalah IBA, kinetin dan GA₃. Peningkatan jumlah kecambah yang terbentuk terdapat pada kultur dengan penambahan IBA 2 mg/L dan kinetin



Gambar 4. Perkembangan komposisi kalus dan embrio somatik berdasarkan bobot basahnya dalam medium inisiasi embrio somatik pada SPS selama empat siklus dari kultur enam minggu.

Figure 4. Development of callus and somatic embryo composition based on their fresh weights in somatic embryo initiation medium on TIS for four cycles of six week-culture.



Gambar 5. Embrio somatik kelapa sawit pada sistem perendaman sesaat (A) pada fase perkembangan dini, dan (B) fase kecambah.

Figure 5. Somatic embryos of oil palm in temporary immersion system (A) at early developmental stages, and (B) germinant stage.

Pertumbuhan dan perkembangan kalus embriogenik dan embrio somatik...

Tabel 2. Jumlah embrio somatik fase lanjut per bejana setelah enam minggu dalam SPS pada perlakuan pematangan.

Table 2. Number of somatic embryos at advanced stages per flask after six-weeks in TIS at maturation treatments.

Perlakuan <i>Treatment</i>	Jumlah embrio somatik dewasa <i>Number of mature somatic embryos</i>
Kinetin 0,1 mg/L	10,3 b*
Kinetin 0,5 mg/L	10,5 b
Kinetin 0,5 mg/L + ABA 0,05 mg/L	16,3 a

* Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada $P=0,05$.

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

0,5 mg/L (Tabel 3). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan kinetin 0,5 mg/L diperlukan untuk perkecambahan embrio somatik kelapa sawit pada SPS. Penambahan GA_3 0,1 mg/L memberi pengaruh positif terhadap perkecambahan embrio somatik walaupun secara statistik tidak berbeda nyata. GA_3 diketahui membantu sintesis protein yang memacu perkembangan embrio somatik untuk menjadi planlet. Di samping itu, komposisi dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang tepat dapat meningkatkan perkembangan embrio somatik (Gaspar *et al.*, 1996; Tahardi *et al.*, 2003).

Perendaman eksplan dalam medium secara periodik memungkinkan tingkat penyerapan hara oleh eksplan lebih optimal sehingga menstimulasi perkembangannya (Teisson *et al.*, 1999; Tahardi *et al.*, 2000). Pada saat medium menggenangi propagula, seluruh permukaannya terpapar langsung dengan medium sehingga penyerapan hara terjadi di seluruh bagian eksplan, tidak hanya di bagian bawah saja seperti pada medium padat. Oleh karena itu, tingkat pertumbuhan dan perkembangan di seluruh

bagian eksplan menjadi lebih seragam karena hara diserap secara bersamaan dalam proporsi seimbang (Etiene & Berthouly, 2002).

Sebagian besar embriogenesis somatik kelapa sawit dilakukan pada medium padat. Pada medium padat, laju pertumbuhan kalus dan embrio somatik dianggap lebih rendah dibandingkan pada medium cair (de Touchet *et al.*, 1991; Duval *et al.*, 1993; Tahardi, 1998; Tarmizi *et al.*, 2003; Soh *et al.*, 2006). Di samping itu, kultur cair digunakan untuk meningkatkan keseragaman embrio somatik dan meningkatkan skala produksi. Kekhawatiran penggunaan kultur cair dapat meningkatkan persentase abnormalitas pembungaan kelapa sawit sejauh ini tidak terbukti. Rata-rata tingkat abnormalitas pada kultur padat dan cair kurang dari 3% (Soh *et al.*, 2006).

Pada penelitian ini lama perendaman diatur tiga menit dengan frekuensi perendaman setiap enam jam. Pengaturan tersebut didasarkan pada hasil penelitian spesies tanaman lain, terutama tanaman tahunan yang mempunyai rentang lama perendaman 1 sampai 15 menit dengan frekuensi perendaman 2 sampai 12 jam

Tabel 3. Jumlah kecambah per bejana setelah enam minggu dalam medium perkecambahan pada perlakuan zat pengatur tumbuh.

Table 3. Number of germinants per flask after six-weeks in germination media at different treatments of plant growth regulators.

Perlakuan Treatment	Jumlah kecambah Number of germinants
IBA 3 mg/L	18,5 b*
IBA 2mg/L + kinetin 0,5 mg/L	45,5 a
IBA 2mg/L + kinetin 0,1 mg/L + GA ₃ 0,1 mg/L	56,3 a

* Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada P=0,05.

* Means followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at P=0.05.

(Etiene & Berthouly, 2002). Untuk mendapatkan hasil yang lebih baik maka perlu dilakukan penelitian tentang lama dan frekuensi perendaman pada masing-masing fase pertumbuhan kalus dan embrio somatik kelapa sawit.

Kesimpulan

Perbanyakkan kalus embriogenik kelapa sawit dapat dilakukan pada sistem perendaman sesaat (SPS) dengan interval subkultur terbaik empat minggu. Sebagian besar kalus berubah menjadi embrio somatik setelah subkultur keempat pada medium inisiasi embrio somatik. Medium terbaik untuk tahap pematangan embrio somatik adalah medium DF dengan penambahan 2,4-D 0,01 mg/L, kinetin 0,5 mg/L, dan ABA 0,05 mg/L; sedangkan untuk perkecambahan embrio somatik adalah medium DF setengah garam makro dengan penambahan IBA 2 mg/L dan kinetin 0,5 mg/L.

Daftar Pustaka

Aitken-Christie, J. (1991). Automation. In P.C. Debergh & R.J. Zimmerman (eds.)

Micropropagation: Technology and Application. Dordrecht, Kluwer Acad. Publ. p. 363-388.

Berthouly, M., M. Dufour, D. Alvard, C. Carasco, L. Alemano & C. Teisson (1995). Coffee micropropagation in a liquid medium using the temporary immersion technique. In: *ASIC Publ. 16th International Sci. Colloq. on Coffee*, Kyoto, Japan. p. 514-519.

Bonetta, D. & P. McCourt (1998). Genetic analysis of ABA signal transduction pathways. *Trend Plant Sci.*, **3**, 231-235.

de Fossard, R.A., A. Myint & E.C.M. Lee (1974). A broad spectrum tissue culture experiment with tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) pith tissue callus. *Physiol. Plant.*, **30**, 125-130.

de Touchet, B., Y. Duval & C. Pannetier (1991). Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell Rep.*, **10**, 529-532.

Duncan, D.B. (1955). Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, **11**(1-4), 1-42.

- Duval, Y., F. Aberlenc & B. de Touchet (1993). Use of embryogenic suspensions for oil palm micropropagation. In: V. Rao *et al.* (eds.) *Recent Dev. in Oil Palm Tissue Cult. & Biotechnol.*, Kuala Lumpur, p. 38-47.
- Eeuwens, C.J., S. Lord, C.R. Donough, V. Rao, G. Vallejo & S. Nelson (2002). Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of "mantled" flowering in clonally propagated oil palm. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **70**, 311-323.
- Etienne, H. & M. Berthouly (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **69**, 215-231.
- Fujii, J.A., D. Slade, J. Aguirre-Rascon & K. Redenbaugh (1992). Field planting of alfalfa artificial seeds. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, **28**, 73-80.
- Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. M. Reid & T.A. Thorpe (1996). Plant Hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.*, **32**, 272-289.
- Ginting, G. & Fatmawati (1997). Suspensi sel pada kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). *J. Pen. Kelapa Sawit*, **5**(3), 153-160.
- Murashige, T. & F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- Sharma, P., S. Pandey, A. Bhattacharya, P.K. Nagar & P.S. Ahuja (2004). ABA associated biochemical changes during somatic embryo development in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *J. Plant Physiol.* **161**, 1269-1276.
- Soh, A.C., G. Wong, C.C. Tan, S.P. Chong, C.N. Chou, A. Nur Azura & Y.W. Ho (2006). Progress and challenges in commercial mass propagation of clonal oil palm. In E.S. Sutarta *et al.* (eds.) *Proc. International Oil Palm Conf.*, Bali, p. 229-240.
- Sumaryono, N. Mardiana & J.S. Tahardi (1994). Embryogenic suspension culture of oil palm. *Menara Perkebunan*, **62**(3), 41-46.
- Tahardi, J.S. (1998). Improvement of oil palm somatic embryogenesis by periodic immersion in liquid medium. In A. Jatmika *et al.* (eds.) *Proc. Internat. Oil Palm Conf.*, Bali, Indonesia, p. 595-601.
- Tahardi, J.S., 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., I. Riyadi & W.A. Dodd (2003). Enhancement of somatic embryo development and plantlet recovery in *Camellia sinensis* by temporary liquid immersion. *J. Biotek. Pert.*, **8**(1), 1-7.
- Tarmizi A., M.A. Norjihan, R.S. Kamal, R. Zaitun & S.C. Soh (2003). Mass propagation of oil palm planting materials using liquid culture and bioreactor technology. In: *Proc. PIPOC 2003 Internat. Palm Oil Congress (Agric.)*, p. 130-143.
- Teisson, C. & D. Alvard (1999). *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. *Potato Res.*, **42**, 499-504.
- Teisson, C., D. Alvard, M. Lartaud, H. Etienne, M. Berthouly, M. Escalona & J.C. Lorenzo (1999). Temporary immersion for plant tissue culture. In: *Proc. IXth Internat. Congress of Plant Tissue and Cell Cult.* Jerusalem, p. 629-632.
- Teixeira, J.B., M.R. Sondahl, T. Nakamura & E.G. Kirby (1995). Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **40**, 105-111.