

Optimasi sistem kultur dan media untuk peningkatan tinggi tunas *in vitro* kelapa sawit

Optimization of culture system and media for the in vitro shoot growth of oil palm

Masna Maya SINTA^{*)}, Rizka Tamania SAPTARI, Imron RIYADI & SUMARYONO

Pusat Penelitian Kelapa Sawit Unit Bogor, Jl. Taman Kencana No.1, Bogor 16128, Indonesia

Diterima tgl 5 Okt 2022 / Perbaikan tgl 1 Nov 2022 / Disetujui tgl 16 Jan 2023

Abstract

Optimization of in vitro shoot growth is necessary to shorten the culture time and produce vigorous oil palm plantlets. This research was conducted to determine the best media and culture techniques to accelerate in vitro shoot growth of oil palm. Shoots of oil palm derived from somatic embryogenesis were grown on DF media with two culture systems (solid medium and double-layer) combined with hormone treatments (0.5-1 mg L⁻¹ gibberellin/GA₃ and 0.5 mg L⁻¹ Benzyl amino purine/BAP or thidiazuron/TDZ). Further optimization was conducted using different bottle closures (polypropylene screw caps and plastic wraps) and macronutrients (standard or double concentrations). This research was conducted using a completely randomized design (CRD), with each treatment consisting of 5 bottle replications and each bottle consisting of 5 shoots. The results showed that media with double-layer system combined with GA₃ (0.5-1 mg L⁻¹) and TDZ (0.5 mg L⁻¹) gave the highest shoot height increment. The use of double-strength macronutrient media combined with screw bottle caps increased shoot height (136-167 %) and decreased shoot tip necrosis (0-24 %). Plastic wrap bottle caps increased shoot tip necrosis (STN), while doubling macronutrients reduced STN. The growth of oil palm shoots began to slow down after 5 weeks of culture. In conclusion, the optimal conditions for in vitro shoot growth of oil palm were at usage of double-layer media added with GA₃ 0.5-1 mg L⁻¹, TDZ 0.5 mg L⁻¹, and double macronutrients on bottle jars with polypropylene screw caps.

[Keywords: double-layer, GA₃, macronutrients, bottle cap, thidiazuron]

Abstrak

Optimasi pembesaran tunas *in vitro* perlu dilakukan untuk mempersingkat waktu kultur dan menghasilkan planlet kelapa sawit yang vigor. Penelitian ini dilakukan untuk menetapkan media dan sistem kultur terbaik untuk mempercepat pertumbuhan tinggi tunas *in vitro* kelapa sawit. Tunas kelapa sawit yang berasal dari embriogenesis somatik dikultur pada media DF menggunakan dua sistem kultur (medium padat dan *double-layer*) yang dikombinasikan dengan perlakuan hormon (GA₃ 0,5 - 1 mg L⁻¹ dan BAP atau thidiazuron 0,5 mg L⁻¹). Optimasi lebih lanjut dilakukan dengan penggunaan penutup botol yang berbeda (tutup ulir polipropilen dan *plastic wrap*) dikombinasikan dengan perlakuan hara makro (1 atau 2 kali konsentrasi). Penelitian ini dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan masing-masing perlakuan terdiri dari 5 ulangan botol dan tiap botol berisi 5 tunas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa media dengan sistem *double-layer* dan kombinasi media GA₃ (0,5-1 mg L⁻¹) dan TDZ (0,5 mg L⁻¹) memberikan penambahan tinggi tunas terbesar. Penggunaan media dengan dua kali konsentrasi hara makro pada botol kultur dengan penutup ulir meningkatkan penambahan tinggi tunas (136-167%) dan menurunkan kejadian nekrosis ujung tunas (0-24%). Penggunaan tutup botol plastik wrap menyebabkan peningkatan terjadinya nekrosis ujung daun, sedangkan penambahan hara makro menurunkan persentase nekrosis ujung daun. Pertumbuhan tunas kelapa sawit mulai melambat pada minggu ke-5 setelah kultur. Sebagai kesimpulan, kondisi optimum untuk pertumbuhan tunas *in vitro* kelapa sawit adalah penggunaan media *double-layer* ditambah GA₃ 0,5-1 mg L⁻¹, TDZ 0,5 mg L⁻¹, dan dilanjutkan dengan pengkulturan menggunakan media dengan dua kali konsentrasi hara makro pada botol jar dengan penutup ulir.

[Kata kunci: *double-layer*, GA₃, hara makro, penutup botol, thidiazuron]

^{*)} Korespondensi penulis: mayasinta77@gmail.com

Pendahuluan

Kelapa sawit merupakan salah satu tanaman penting bagi industri perkebunan di Indonesia. Peningkatan luas areal serta kegiatan *replanting* kebun kelapa sawit menyebabkan peningkatan permintaan bibit kelapa sawit. Tanaman kelapa sawit komersial merupakan hasil persilangan dari pohon induk betina (Dura) dan jantan (Pisifera) yang dikenal dengan nama Tenera. Pemenuhan kebutuhan bibit kelapa sawit umumnya dilakukan melalui persilangan konvensional (benih hibrida / Tenera) atau dengan perbanyakan *in vitro* tanaman Teneranya (Setiawan, 2017).

Keunggulan perbanyakan *in vitro* kelapa sawit yaitu dapat dihasilkannya kelapa sawit klonal (*true to type*), massal, tidak tergantung waktu, dan bebas penyakit (Karim, 2021). Kultur *in vitro* kelapa sawit dilakukan melalui teknik *somatic embryogenesis* (SE), pada media padat ataupun melalui sistem perendaman sesaat (Jyanthi et al., 2015; Gomes et al., 2016). Teknik SE dilakukan dengan menanam bagian somatik eksplan dan meregenerasikannya menjadi planlet, dimana pada proses ini diawali dengan pembentukan embrio, baik langsung maupun tidak langsung. Keuntungan lain dari SE adalah dapat dimanfaatkan untuk pemuliaan tanaman modern melalui *genome editing* (Budiani et al., 2018; Yarra et al., 2020; Wan-Chin et al., 2021; Martin et al., 2022) dan untuk penyimpanan plasma nutfah (da Silva et al., 2017; Palanyandy et al., 2020).

Perbanyakan kelapa sawit melalui SE diawali dengan induksi kalus, proliferasi kalus, induksi kalus embriogenik, maturasi embrio, perkecambahan, pembesaran tunas, dan induksi akar. Tanaman kelapa sawit merupakan tanaman rekalsitran, sehingga perbanyakan *in vitro* kelapa sawit lebih sulit dibandingkan tanaman lain (Karim, 2021). Penelitian optimasi kultur *in vitro* telah banyak dilakukan mulai dari tahap induksi kalus, proliferasi, induksi embrio, hingga induksi akar (Yusnita & Hapsoro, 2011; Marbun et al., 2014; Jyanthi et al., 2015; Gomes et al., 2016; Padua et al., 2017; Karyanti et al., 2021; Sulaksono et al., 2021). Pembesaran tunas merupakan tahapan persiapan tunas sebelum masuk fase induksi akar dan aklimatisasi. Kecepatan pertumbuhan tunas merupakan hal penting terutama dalam produksi bibit komersial. Tinggi tunas merupakan salah satu parameter kesiapan planlet untuk masuk ke tahap aklimatisasi. Sumaryono & Riyadi (2011) mengemukakan bahwa kondisi terbaik planlet siap aklimatisasi adalah memiliki tinggi 9,5 cm dengan 2-3 daun. Namun penelitian mengenai optimasi percepatan penambahan tinggi tunas *in vitro* kelapa sawit secara terpadu mencakup aspek media dan lingkungan mikro masih jarang dilakukan.

Optimasi media kultur *in vitro* umumnya dilakukan dengan mengatur penggunaan zat pengatur tumbuh tanaman (ZPT) (Mahmad et al., 2014; Correa et al., 2016; Ahmad et al., 2022), keseimbangan nutrisi (Weckx et al., 2019; da Silva et al., 2020), dan sistem kultur yang digunakan (padat, cair, atau sistem perendaman sesaat) (Sumaryono et al., 2007; Tarmizi et al., 2008; Marbun et al., 2014; Gomes et al., 2016; Monteiro et al., 2018). Sedangkan optimasi lingkungan mikro dapat dilakukan dengan pengaturan suhu, penggunaan penutup botol, serta pengaturan penyinaran (Sinta et al., 2011; Manoh et al., 2021).

Jenis dan konsentrasi ZPT pada kultur *in vitro* bergantung pada jenis tanaman serta tahapan pertumbuhan tanaman. Beberapa ZPT yang umum digunakan pada kultur *in vitro* seperti auksin, sitokinin, giberelin (GA_3), dan asam absisat (ABA) baik diaplikasikan secara tunggal maupun kombinasi. Sitokinin merupakan ZPT yang berperan dalam pembelahan dan diferensiasi sel (Feng et al., 2017). Beberapa jenis sitokinin yang umum digunakan pada kultur *in vitro* adalah kinetin, *benzylaminopurine* (BAP), dan thidiazuron (TDZ). BAP dan TDZ umum digunakan dalam pembesaran tunas *in vitro* (Azwin et al., 2006; Jafari et al., 2011; Lavakumaran & Seran, 2014; Singh & Dwivedi, 2014; Hutchinson et al., 2015), namun pengaruhnya bergantung pada jenis tanaman dan konsentrasi yang digunakan. Selain sitokinin, GA_3 dilaporkan juga berperan dalam pertumbuhan tunas *in vitro* (Sudrajad et al., 2016; Padròn et al., 2020). Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini adalah mencari komposisi media dan sistem kultur terbaik secara terpadu yaitu media dan lingkungan mikro untuk mempercepat pertumbuhan tinggi tunas *in vitro* kelapa sawit.

Bahan dan Metode

Bahan

Bahan tanam yang digunakan adalah tunas *in vitro* kelapa sawit Tenera asal perbanyakan *in vitro* melalui teknik SE dari Laboratorium Biak Sel dan Mikropropagasi PPKS Unit Bogor. Penelitian ini dibagi menjadi 2 tahap, perlakuan terbaik dari tahap satu selanjutnya digunakan sebagai dasar untuk penelitian tahap 2. Pada percobaan 1 dilakukan optimasi pertumbuhan tunas dengan perlakuan sistem kultur (media padat dan *double layer*) dikombinasikan dengan penggunaan ZPT yaitu GA_3 , BAP, dan TDZ. Pada percobaan 2 dilakukan optimasi pembesaran tunas dengan penggunaan makromineral (1 dan 2 kali konsentrasi) serta penutup botol yang berbeda (tutup ulir berbahan polipropilena dan plastik wrap berbahan polietilen). Bahan tanam yang digunakan pada kedua percobaan berasal dari sumber yang sama.

Percobaan 1: sistem kultur dan ZPT

Tunas aksenik kelapa sawit (tinggi $\pm 1,8$ cm) ditanam pada media dasar DF (de Fossard, 1974), sukrosa 3%, arang aktif $0,5 \text{ g L}^{-1}$, gelzan $3,5 \text{ g L}^{-1}$ dengan perlakuan: sistem kultur (padat dan *double-layer*), ZPT GA_3 ($0,5$ dan 1 mg L^{-1}) dikombinasikan dengan hormon sitokinin yaitu BAP dan TDZ (masing-masing $0,5 \text{ mg L}^{-1}$) dalam botol jar (masing-masing 5 tunas per botol jar). Perlakuan pembesaran tunas (percobaan 1) ini tersaji pada Tabel 1 (G1-G8), dimana G1 digunakan sebagai media kontrol (Sinta et al., 2011). Masing-masing perlakuan terdiri dari 5 ulangan, sehingga pada penelitian ini digunakan 200 tunas. Media *double-layer* dibuat dengan menambahkan media cair dengan komposisi yang sama di atas media padat (sebanyak 5 mL) setelah tunas ditanam pada media. Volume media padat 30 mL per botol jar. Media sebelumnya telah disterilisasi dengan diautoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 kg cm^{-2} selama 20 menit. Pertambahan tinggi tunas diamati pada minggu ke 6 setelah kultur. Tinggi tunas dihitung pada awal kultur dan minggu keenam setelah kultur dengan mengukur panjang tunas dari pangkal tunas hingga daun tertinggi. Selisih tinggi tunas pada minggu keenam dan tinggi tunas awal tanam merupakan penambahan tinggi tunas. Sistem kultur dan media terbaik yang diperoleh pada penelitian ini digunakan sebagai media dasar untuk optimasi pembesaran tunas pada percobaan 2.

Percobaan 2: Penggunaan jenis penutup botol dan hara makro

Media terbaik dari penelitian sebelumnya digunakan sebagai media dasar untuk optimasi pembesaran tunas kelapa sawit tahap 2. Pada

perlakuan ini dilakukan optimasi dengan penggunaan penutup botol (tutup ulir dan *plastic wrap*) dikombinasikan dengan 1 dan 2 kali konsentrasi hara makro. Tutup ulir berbahan plastik polipropilen berwarna putih, memiliki ketebalan $\pm 1,2$ mm sedangkan *plastic wrap* berbahan plastik polietilen bening, dengan ketebalan $\pm 17 \mu\text{m}$. Perlakuan optimasi pembesaran tunas (U1, U2, W1, dan W2) disajikan pada Tabel 2, dengan perlakuan U1 sebagai kontrol.

Hara makro media DF terdiri dari: KNO_3 (1.020 mg L^{-1}), NH_4NO_3 (800 mg L^{-1}), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (138 mg L^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (369 mg L^{-1}), dan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (294 mg L^{-1}) (de Fossard, 1974), sehingga untuk perlakuan 2 kali hara makro maka konsentrasinya digandakan. Tunas sebanyak 5 buah ditanam pada media dalam botol jar. Masing-masing perlakuan terdiri dari 5 ulangan, sehingga pada penelitian ini digunakan 100 tunas. Pertumbuhan tunas diamati dengan mengukur tinggi tunas (dari pangkal batang hingga ujung daun tertinggi) setiap minggu hingga minggu ke-6. Persentase daya hidup dan kejadian nekrosis ujung tunas diamati pada minggu keenam. Tunas kelapa sawit aksenik pada kedua percobaan diinkubasi pada ruang kultur terang dengan pencahayaan lampu TL 20 watt selama 12 jam per hari dan suhu ruangan diatur pada $\pm 26^\circ\text{C}$.

Analisis data

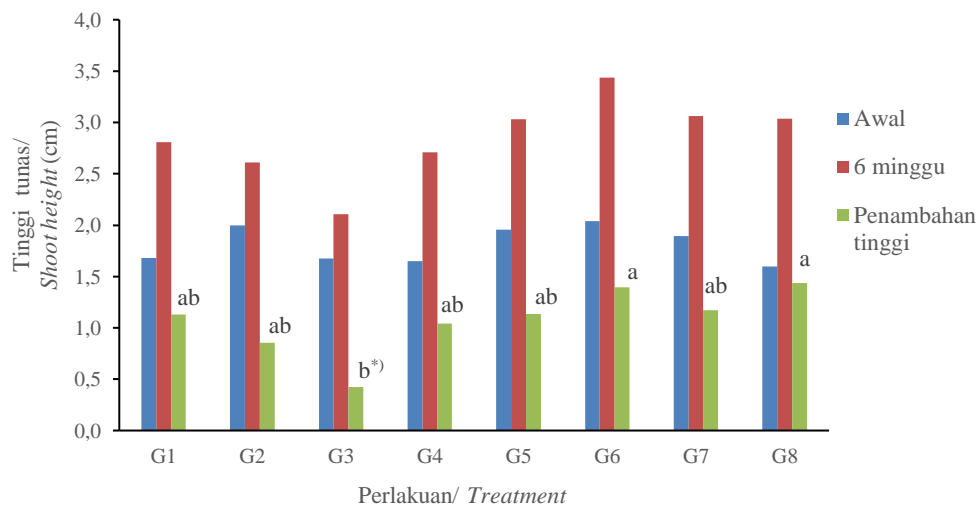
Penelitian ini dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Analisis data dilakukan dengan analisis ragam (*analysis of variance*), perbedaan antar perlakuan diuji lanjut dengan uji jarak berganda *Duncan Multiple Range Test* pada $\alpha = 5\%$.

Tabel 1. Perlakuan pembesaran tunas 1: sistem kultur dan hormon
Table 1. Shoot growth treatment 1: culture system and hormone

Kode media <i>Media code</i>	Sistem kultur <i>Culture system</i>	GA_3 (mg L^{-1})	Sitokinin / <i>Cytokinin</i>	
			BAP (mg L^{-1})	TDZ (mg L^{-1})
G1	Padat / <i>Solid</i>	0,5	0,5	-
G2	Padat / <i>Solid</i>	0,5	-	0,5
G3	Padat / <i>Solid</i>	1	0,5	-
G4	Padat / <i>Solid</i>	1	-	0,5
G5	<i>Double-layer</i>	0,5	0,5	-
G6	<i>Double-layer</i>	0,5	-	0,5
G7	<i>Double-layer</i>	1	0,5	-
G8	<i>Double-layer</i>	1	-	0,5

Tabel 2. Perlakuan pembesaran tunas 2: jenis tutup botol jar dan konsentrasi hara makro
 Table 2. Shoot growth treatment 2: bottle jar closure and macronutrient

Kode Code	Jenis tutup botol jar Bottle jar closure type	Konsentrasi hara makro Macronutrient concentration
U1	Ulir / Screw cap	1 kali (standard)
U2	Ulir / Screw cap	2 kali (double)
W1	Plastic wrap	1 kali (standard)
W2	Plastic wrap	2 kali (double)



Gambar 1. Pengaruh sistem kultur dan hormon terhadap tinggi tunas *in vitro* kelapa sawit setelah 6 minggu
 Figure 1. *In vitro* culture system and hormone effect on *in vitro* shoot height of oil palm after 6 weeks

*Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada $\alpha = 0,05$
 *)The same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$

Hasil dan Pembahasan

Pengaruh sistem kultur dan ZPT terhadap tinggi tunas

Penambahan tinggi tunas terbesar pada penelitian ini didapatkan pada perlakuan G6 dan G8 dimana setelah diinkubasi selama 6 minggu terdapat penambahan tinggi tunas sebesar 1,40-1,44 cm. Penambahan tinggi tunas paling rendah didapatkan pada media G3 (0,43 cm) (Gambar 1). Media G6 dan G8 merupakan media dengan sistem *double-layer* dan TDZ (0,5 mg L⁻¹). Sistem *double-layer* mampu menambah tinggi tunas rerata 0,27 cm lebih tinggi dari media padat, sedangkan tunas dengan penambahan TDZ rerata 0,22 cm lebih tinggi dari media dengan penambahan BAP setelah 6 minggu. Penggunaan sistem kultur *double-layer* telah digunakan baik untuk meningkatkan vigor planlet seperti pada stevia dan anthurium (Saptari & Sumaryono, 2016; Saptari et al., 2017), maupun untuk

menumbuhkan tanaman akuatik (Mahmad et al., 2014). Sistem ini meningkatkan ketersediaan hara yang mampu diserap oleh tanaman.

Thidiazuron merupakan salah satu hormon sitokinin turunan urea tanpa cincin purin, dimana cincin ini umumnya dijumpai pada sitokinin jenis lain seperti BAP (Lu, 1993). TDZ meningkatkan pertumbuhan tunas dengan meningkatkan aktivitas ribonukleotida, sintesis sitokinin, atau melalui penghambatan degradasi sitokinin endogen (Capelle et al., 1983; Thomas & Katterman, 1986). Analisis metabolomik menunjukkan hipotesis pengaruh TDZ dalam meningkatkan penyerapan gula dari media, meningkatkan metabolisme primer, pengalihan metabolisme terpen, dan mediasi metabolisme stress (Erland et al., 2020). TDZ dilaporkan berperan dalam pertumbuhan kultur *in vitro* mulai dari embriogenesis somatik, organogenesis, morfogenesis, hingga regenerasi tunas (Gosh et al., 2018; Mose et al., 2017; Dinani et al., 2018; Ahmad & Shahzad, 2018; Ahmad et al., 2022).

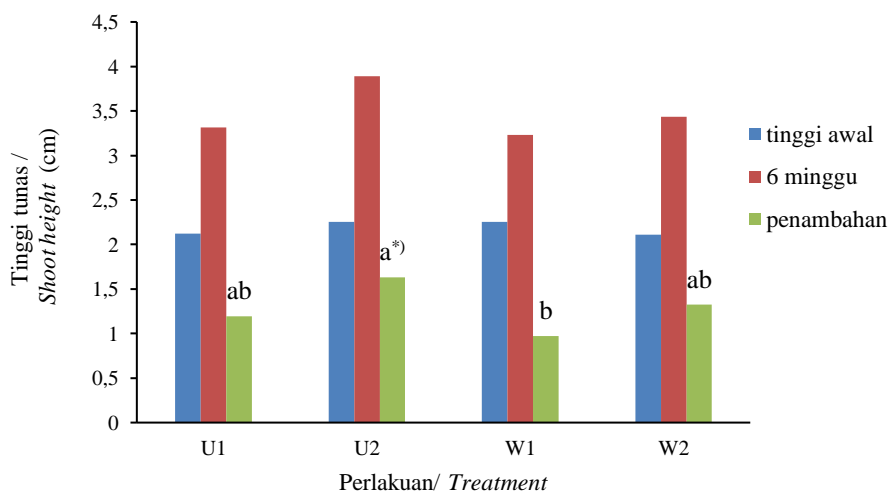
Pada penelitian ini, penggunaan sitokinin TDZ lebih baik dalam memacu pertumbuhan tunas dibandingkan BAP. Performa TDZ yang lebih baik dibandingkan BAP dalam berbagai fungsi di kultur *in vitro*, terutama morfogenesis tunas *in vitro* juga dilaporkan antara lain pada *Aloe vera* (Lavakumaran & Seran, 2014), *Stevia rebaudiana* (Singh & Dwivedi, 2014), dan *Alstroemeria aurantiaca* (Hutchinson et al., 2015). Berdasarkan beberapa pustaka tersebut, pada umumnya penggunaan TDZ hanya memerlukan konsentrasi yang sangat rendah dibandingkan BAP untuk memiliki efek pemacuan pertumbuhan yang sama atau lebih baik, atau pada BAP masih perlu dikombinasikan dengan hormon lain untuk mengimbangi respons perlakuan TDZ.

Pengaruh penggunaan penutup botol dan hara makro

Penambahan tinggi tunas tertinggi didapatkan pada perlakuan U2 yaitu penutup botol ulir dan media dengan 2 kali konsentrasi hara makro (Gambar 2). Penambahan terendah didapatkan pada perlakuan penutup *plastic wrap* dan media dengan hara makro standar. Penambahan hara makro pada penelitian ini menunjukkan efek positif terhadap penambahan tinggi tunas. Sedangkan penambahan tinggi tunas pada perlakuan U1 (tutup ulir, 1 kali makro) dan W2 (*plastic wrap*, 2 kali makro) memiliki nilai yang tidak berbeda nyata. Hal ini diduga karena tunas pada perlakuan tutup botol ulir dengan hara makro standar mampu memanfaatkan media untuk pertumbuhan tunasnya meski hanya dengan satu kali konsentrasi

hara makro, sedangkan pada perlakuan W2, meskipun hara makro ditambahkan, namun dengan adanya penguapan yang tinggi selama proses kultur menyebabkan media sulit diserap oleh tunas. Hal ini sesuai dengan penelitian Sinta et al. (2011) bahwa penggunaan plastik wrap sebagai penutup botol jar menunjukkan pertumbuhan tunas kelapa sawit paling lambat dibandingkan menggunakan tutup berbahan polipropilen, aluminium foil, atau plastik tahan autoklaf pada konsentrasi makromineral standar. Penelitian Lekamge et al. (2021) juga menunjukkan bahwa penambahan beberapa makromineral seperti CaCl₂, MgSO₄, dan KH₂PO₄ meningkatkan vigor planlet kentang yang ditandai dengan peningkatan pertumbuhan tinggi tanaman dan daun yang besar berwarna gelap.

Graham & Thurtell (1989) melaporkan bahwa kenaikan transpirasi tanaman pada tingkat tertentu mengakibatkan penurunan laju fotosintesis yang mengindikasikan kemungkinan stress air atau kelembaban rendah menyebabkan perubahan konduksi stomata yang memengaruhi pertumbuhan. Selain itu, tutup *plastic wrap* memiliki pori besar yang mampu melewatkan uap air dan menyebabkan media tersisa menjadi lebih pekat (Sinta et al., 2011). Penelitian Sinta et al. (2011) membuktikan bahwa bobot basah media tersisa pada perlakuan tutup plastik wrap secara signifikan paling rendah dibandingkan dengan perlakuan penutup lain (ulir, aluminium foil, dan plastik tahan autoklaf). Media yang lebih pekat mengakibatkan nutrisi pada media lebih sulit terserap oleh sel tanaman. Dari segi hormonal tanaman,



Gambar 2. Pertumbuhan tunas kelapa sawit setelah kultur 6 minggu. Perlakuan: U (tutup botol ulir), W (tutup botol *plastic wrap*), 1 (hara makro standar), 2 (hara makro dua kali konsentrasi)

Figure 2. Shoot growth of oil palm after 6 weeks of culture. Treatments: U (screw cap), W (*plastic wrap*), 1 (standard macronutrients), 2 (double macronutrients)

^{*)}Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada $\alpha = 0,05$

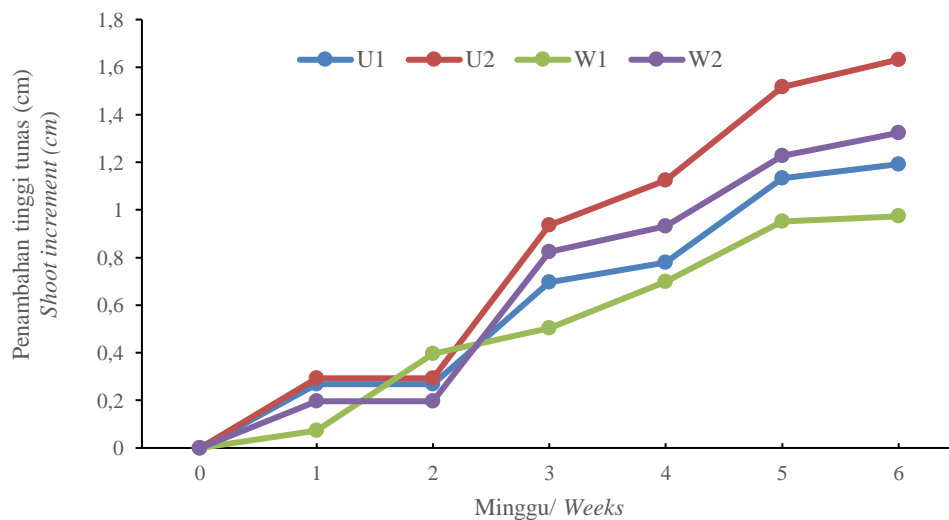
^{*)}The same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$

dalam keadaan potensial air pada media yang rendah, konsentrasi asam absisat (ABA) endogen tanaman menjadi tinggi (Sharp et al., 1994). ABA banyak ditranspor dari akar ke daun untuk menjalankan fungsi penghambatan pertumbuhan daun dan tunas, dalam rangka regulasi pertumbuhan menghadapi cekaman (Sharp et al., 1994).

Penambahan tinggi tunas naik secara tajam pada minggu ke-2 hingga ke-3 (naik 0,5-0,6 cm selama seminggu), kecuali pada perlakuan W1 dimana penambahan tunas tertinggi terjadi pada minggu pertama hingga ke-2 (naik 0,3 cm pada minggu ke 1-2, namun hanya naik 0,11 cm pada minggu ke 2-3) (Gambar 3). Pada minggu selanjutnya, penambahan tinggi tunas mulai melambat. Pada minggu ke-5 hingga 6, perlakuan W1 sudah tidak terjadi penambahan tinggi tunas (0 cm), sedangkan pada perlakuan U1 masih terjadi sedikit penambahan tinggi tunas (0,06 cm). Pada perlakuan W2 masih terdapat penambahan tinggi tunas sebesar 0,10 cm dan penambahan tunas masih tinggi pada perlakuan U2 (0,12 cm). Penggunaan hara makro 2 kali konsentrasi pada penelitian ini menunjukkan efek positif terhadap penambahan tinggi tunas, hal ini diduga karena masih tersedianya nutrisi untuk pertumbuhan tunas. Sebaliknya pada perlakuan media dengan satu kali hara makro (W1 dan U1), diduga karena nutrisi sudah mulai habis yang menyebabkan tidak ada lagi

kenaikan tinggi tunas, sehingga pada perlakuan ini harus dilakukan subkultur pada minggu ke-5.

Daya hidup tunas pada penelitian ini tinggi (96-100%), namun beberapa tunas mengalami nekrosis pada bagian ujung (*shoot tip necrosis*) (Tabel 3). Penguningan ujung daun tertinggi terjadi pada perlakuan W1 (28%) disusul perlakuan W2 (16%), dimana keduanya menggunakan penutup botol *plastic wrap*. Meskipun demikian, penggunaan media dengan hara makro 2 kali konsentrasi mampu menurunkan nekrosis ujung daun tunas *in vitro* kelapa sawit pada kultur dengan penutup *plastic wrap*. Penggunaan penutup botol ulir mampu mencegah terjadinya nekrosis ujung daun. Nekrosis ujung daun merupakan kondisi fisiologis yang menyebabkan kematian pucuk tunas, kondisi ini dapat menyebar ke bagian bawah planlet hingga pangkal dan menyebabkan kematian tunas (da Silva et al., 2020). Kondisi ini terjadi umumnya akibat defisiensi hara atau ketidakseimbangan nutrisi pada media (da Silva et al., 2020). Penelitian yang dilakukan Ernayunita et al. (2019) menunjukkan bahwa apabila pada tunas *in vitro* kelapa sawit memiliki ciri ujung daun yang mengering (nekrosis), akan terjadi penurunan daya hidup setelah planlet diaklimatisasi hingga 77,8%, kemudian menurun menjadi 33,3% pada fase ramet, dan tersisa 12,5% saja pada fase *prenursery*.



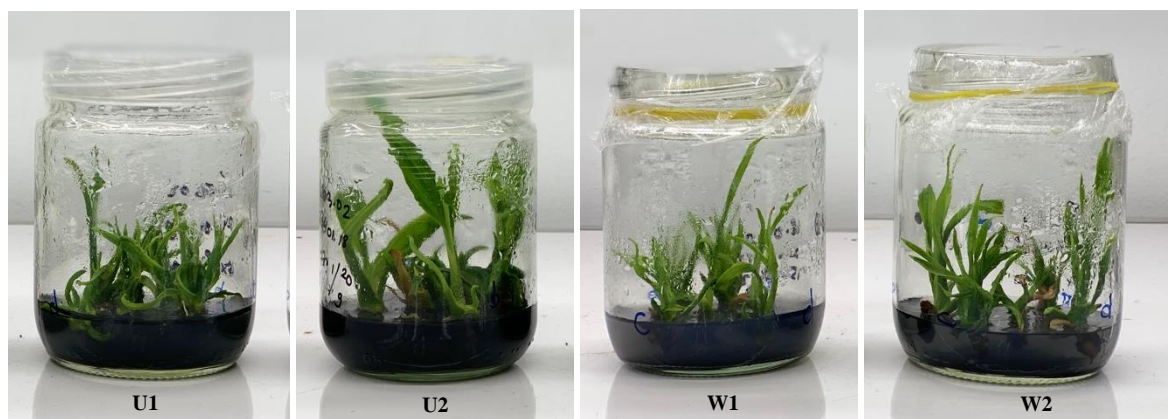
Gambar 3. Penambahan tinggi tunas *in vitro* kelapa sawit selama 6 minggu. Perlakuan: U (tutup botol ulir), W (tutup botol *plastic wrap*), 1 (hara makro standar), dan 2 (hara makro 2 kali konsentrasi)

Figure 3. *In vitro* oil palm shoot height increment in 6 weeks period. Treatments: U (screw cap), W (*plastic wrap*), 1 (standard macronutrients), and 2 (double macronutrients)

Tabel 3. Daya hidup dan nekrosis ujung daun tunas *in vitro* kelapa sawit setelah 6 minggu
 Table 3. Survival rate and shoot tip necrosis on *in vitro* shoot of oil palm after 6 weeks

Perlakuan <i>Treatment</i>	Daya hidup (%) <i>Survival rate (%)</i>	Nekrosis ujung daun (%) <i>Shoot tip necrosis (%)</i>
U1	96 ^{a*)}	4 ^b
U2	100 ^a	4 ^b
W1	96 ^a	28 ^a
W2	100 ^a	16 ^{ab}

^{*)} Angka dalam kolom yang sama diikuti oleh huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada $\alpha = 0,05$
^{*)} Means in the same column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$



Gambar 4. Tunas *in vitro* kelapa sawit umur 6 minggu, U1= tutup ulir + 1 kali hara makro, U2= tutup ulir + 2 kali hara makro, W1= tutup *plastic wrap* + 1 kali hara makro, W2= tutup *plastic wrap* + 2 kali hara makro

Figure 4. Oil palm *in vitro* shoot after 6 weeks of culture, U1 = screw cap + standard macronutrients, U2 = screw cap + double macronutrients, W1 = plastic wrap + standard macronutrients, W2 = plastic wrap + double macronutrients

Pada penelitian ini, pengaruh fisik diduga menjadi penyebab tidak langsung terjadinya nekrosis ujung daun yaitu akibat penguapan yang tinggi pada kultur dengan penutup botol *plastic wrap*, yang akhirnya menyebabkan defisiensi atau ketidak-seimbangan nutrisi. Pada perlakuan W2, kematian ujung daun lebih rendah dibandingkan W1 karena adanya penambahan hara makro. Nekrosis ujung tunas dilaporkan juga diakibatkan karena defisiensi Ca (Srivastava & Joshi, 2013; Machado et al., 2014; Nezami et al., 2015; Ahmed & Palta, 2017; Kurup et al., 2018) atau rendahnya hara makro lain seperti K, Mg, N (Reed et al., 2013; Kovalchuk et al. 2017; 2018). Penggunaan penutup botol berventilasi juga dilaporkan menyebabkan kematian ujung tunas (Offord & Tyler, 2009). Pada penelitian ini, pori plastik wrap yang lebih besar diduga mirip dengan sistem penutup botol berventilasi. Tunas *in vitro* kelapa sawit pada penelitian ini tumbuh dengan baik terutama pada perlakuan U2 (Gambar 4).

Perbanyakkan *in vitro* tanaman kelapa sawit melalui teknik *somatic embryogenesis* (SE)

merupakan proses yang panjang dan membutuhkan waktu yang lama. Berbagai optimasi sering dilakukan untuk percepatan penyediaan bibit unggul klonal secara massal, mulai dari induksi kalus hingga pembesaran planlet, pengakaran, dan aklimatisasi (Alves et al., 2011; Correa et al., 2016; Lin et al., 2017; Kingsley et al., 2018; Sparjanbabu et al., 2020). Berdasarkan data penambahan tinggi tunas dapat diprediksi jumlah subkultur yang diperlukan hingga planlet siap untuk masuk fase berikutnya (yakni induksi akar) sebelum dilakukan aklimatisasi ke lingkungan luar. Pada penelitian ini, penambahan tinggi planlet dengan rerata 1,6 cm (setiap enam minggu) dengan tinggi awal tunas 2 cm, sehingga diprediksi dibutuhkan 28 minggu kultur hingga planlet siap diaklimatisasi atau 25 minggu apabila subkultur dilakukan setiap 5 minggu (dengan target tinggi planlet siap aklimatisasi setinggi 9,5 cm). Namun penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk melihat konsistensi pola penambahan tinggi planlet hingga siap diaklimatisasi.

Kesimpulan

Peningkatan tinggi tunas kelapa sawit dipengaruhi oleh sistem kultur, kombinasi hormon dan hara makro yang digunakan. Media dengan sistem *double-layer* dan kombinasi media GA₃ (0,5-1 mg L⁻¹) dan 0,5-1 mg L⁻¹ (TDZ atau BAP) memberikan pengaruh terhadap penambahan tinggi tunas. Penggunaan 2 kali konsentrasi hara makro pada media dikombinasikan dengan penggunaan tutup botol ulir meningkatkan penambahan tinggi tunas dan menurunkan kejadian nekrosis ujung tunas.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdr M Amir AM dan Sdr Aliyah atas bantuan teknis pelaksanaan kultur.

Daftar Pustaka

- Ahmad, A. & Shahzad, A. (2018). Thidiazuron influenced morphogenesis in some medicinal plants. In: N. Ahmad, M. Faisal (Eds.), *Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator*. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3_1
- Ahmad, N., Faisal, M., Ahmad, A., Alatar, A. A., Qahtan, A. A., & Alok, A. (2022). Thidiazuron induced in vitro clonal propagation of *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers., an important avenue tree. *Horticulturae* 8, 359. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050359>
- Ahmed ZFR & JP Palta (2017). Significant variations in mineral composition among agar sources: implications in nutrition and abiotic stress studies that use in vitro culture. *Acta Horticulturae* 1187, 115–122. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1187.14>
- Alves, S. A. O., De Lemos, O. F., Filho, B. G. S., & Da Silva, A. L. P. (2011). *In vitro* protocol optimization for development of interspecific hybrids of oil palm (*Elaeis oleifera* (H.B.K) Cortés x *Elaeis guineensis* Jacq.). *Journal of Biotechnology and Biodiversity* 2(3), 1-6.
- Azwin, Siregar, I. Z., & Supriyanto (2006). Penggunaan BAP dan TDZ untuk perbanyak tanaman gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.). *Media Konservasi* 11(3), 98-104.
- Budiani, A., Putranto, R. A., Riyadi, I. Sumaryono, Minarsih, H., & Faizah, R. (2018). Transformation of oil palm calli using CRISPR/Cas9 System: toward genome editing of oil palm. *IOP Conference Series Earth Environmental Science*. 183 (012003). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/183/1/012003>
- Capelle, S. C., Mok, D. W. S., Kirchner, S. C., & Mok, M. C. (1983). Effects of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N6. (A2-isopentenyl)[8-¹⁴C] adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L. *Plant Physiology* 73, 796–802.
- Corrêa, T. R., Motoike, S. Y., Andrade, A. P. S., Coser, S. M., Queiroz, V., Granja, M. M. C., Caetano, D. D. N., Peña, C. N. M., & Picoli, E. A. T. (2016). Accelerated in vitro propagation of elite oil palm genotypes (*Elaeis guineensis* Jacq.) by substituting cytokinin with putrescine. *African Journal of Biotechnology* 15(50), 2767–2775.
- Da Silva, J. A., Nezami-Alanagh, E., Barreal, M. E., Kher, M. M., Wicaksono, A., Gulyás, A., Hidvégi, N., Magyar-Tábori, K., Mendler-Drienyovszki, N., Márton, L., Landín, M., Gallego, P. P., Driver, J. A., & Dobránszki, J. (2020). Shoot tip necrosis of in vitro plant cultures: a reappraisal of possible causes and solutions. *Planta* 252, 47 <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03449-4>
- Da Silva, T. J. A., & Engelmann, F. (2017). Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Cryobiology* 77, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.04.007>
- De Fossard, R. A., Myint, A., & Lee, E. C. M. (1974). A broad spectrum tissue culture experiment with tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) pith tissue callus. *Physiology Plant* 30, 125–130.
- Dinani, E. T., Shukla, M. R., Turi C. E., Sullivan, J. A., & Saxena, P. K. (2018). Thidiazuron: Modulator in vitro. In: N Ahmad & M Faisal (eds.), *Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator*, Springer plus, Singapura. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3_1
- Erland, L. A. E., Giebelhaus, R. T., Victor J. M. R., Murch, S. J., & Saxena, P. K. (2020). The morphoregulatory role of thidiazuron: metabolomics-guided hypothesis generation for mechanisms of activity. *Biomolecules* 10, 1253. <https://doi.org/10.3390/biom10091253>
- Ernayunita, Rahmadi, H., Yenni Y., Setiowati, R. D., & Harahap, I. Y. (2019). Vegetative characterization to identify oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) planlet abnormalities. *AIP Conference Proceedings* 2099, 020004. <https://doi.org/10.1063/1.5098409>
- Feng, J., Shi, Y., Yang, S., & Zuo, J. (2017). Cytokinins. In: J li, C Li & S Smit (Eds.), *Hormone metabolism and signaling in plants*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811562-6.00003->

- Gomes, H. T., Bartos, P. M. C., Balzon, T. A., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2016). Regeneration of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis*) using temporary immersion bioreactors. *Industrial Crops and Products* 89, 244–249.
- Graham, M. E. D., & Thurtell, G. W. (1989). The effect of increased transpiration on photosynthesis of corn part II. Comparisons between hydroponically and soil-grown plants. *Agricultural and Forest Meteorology* 44(3–4), 317–326.
- Hutchinson, M. J., Onamu, R., Kipkosgei, L., & Obukosia, S. D. (2015). Effect of Thidiazuron, NAA and BAP on in vitro propagation of *Alstroemeria aurantiaca* CV. 'Rosita' from shoot tip explants. *Journal of Agricultural Science and Technology* 16(2), 58–72.
- Jafari, N., Othman, R. Y., & Khalid, N. (2011). Effect of benzylaminopurine (BAP) pulsing on in vitro shoot multiplication of *Musa acuminata* (banana) cv. Barangan. *African Journal of Biotechnology* 10(13), 2446–2450.
- Jayanthi, M., Susanthi, B., Mohan, M., & Mandal, P. K. (2015). In vitro somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult dura and tenera palms of *Elaeis guineensis* (Jacq.). *SpringerPlus* 4, 256. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1025-4>
- Karim, S. K. A. (2021). An overview of oil palm cultivation via tissue culture technique. In: Kamyab, H (Ed). *Elaeis guineensis* [Internet]. London: IntechOpen; 2021 [cited 2022 Sep 21]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/77859>. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99198>
- Karyanti, Khairiyah, H., Sukarnih, T., Hanifah, N. F., Rudyana, Y., Wahid, A., & Mira, F. R. (2021). In vitro induction of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) shoot roots and their acclimatization in mycorrhiza-enriched media. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 759, 012014. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/759/1/012014>
- Kingsley TM, NN Godswill, TL Brice, NEG Frank & E Youmbi (2018). Optimization of rhizogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) vitro plantlets derived from direct organogenesis of mature zygotic embryos (MZE). *Advances in Plants Agriculture Research* 8(3), 233–235.
- Kovalchuk., I. Y., Mukhitdinova, Z., Turdiyev, T., Madiyeva, G., Akin, M., Eydurán, E., & Reed, B. M. (2017). Modeling some mineral nutrient requirements for micropropagated wild apricot shoot cultures. *Plant Cell Tissue Organic Culture* 129, 325–335. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1180-0>
- Kovalchuk, I. Y., Mukhitdinova, Z., Turdiyev, T., Madiyeva, G., Akin, M., Eydurán, E., & Reed, B. M. (2018). Nitrogen ions and nitrogen ion proportions impact the growth of apricot (*Prunus armeniaca*) shoot cultures. *Plant Cell Tissue Organic Culture* 133, 263–273. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1379-8>
- Kurup, S. S., Purayil, F. T., Alkhaili, M. M. S., Tawfik, N. H., Cheruth, A. J., Kabshawi, M., & Subramaniam, S. (2018). Thidiazuron (TDZ) induced organogenesis and clonal fidelity studies in *Haloxylon persicum* (Bunge ex Boiss & Buhse): an endangered desert tree species. *Physiology and Molecular Biology Plant* 24, 683–692. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0532-5>
- Lavakumaran, L. & Seran, T. H. (2014). Effect of 6-benzyl-aminopurine and thidiazuron on in vitro shoot organogenesis of *Aloe vera* (L.) Burm. f. *Chilean Journal of Agricultural Research* 74(4), 497–501.
- Lemkage, D., Sasahara, T., Yamamoto, S. I., Hatamoto, M., Yamaguchi, T., & Maki, S. (2021). Effect of enhanced CaCl₂, MgSO₄ and KH₂PO₄ on improved in vitro growth of potato. *Plant Biotechnology* 38, 401–408.
- Lin, Y., Wang, Y., Iqbal, A., Li, J., & Lei, X. (2017). Optimization of culture medium and temperature for the in vitro germination of oil palm pollen. *Science Horticulture* 220, 134–138.
- Lu, C. Y. (1993). The use of thidiazuron on tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 29, 92–96.
- Machado, M. P., Da Silva, A. A. L., Biasi, L. A., Deschamps, C., Filho, J. C. B., & Zanette, F. (2014). Influence of calcium content of tissue on hyperhydricity and shoot-tip necrosis of in vitro regenerated shoots of *Lavandula angustifolia* Mill. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 57, 636–643. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201402165>
- Mahmad N., Taha, R. M., Othman, R., Saleh, A., Hasbullah, N. A., & Elias, H. (2014). Effects of NAA and BAP, double-layered media, and light distance on in vitro regeneration of *Nelumbo nucifera* Gaertn. (Lotus), an aquatic edible plant. *The Scientific World Journal* 745148. <https://doi.org/10.1155/2014/745148>
- Manoh, H. P., Yanti, & Toruan-Mathius, N. (2021). Growth and development of oil palm shoots under different light qualities. *Biotropia* 28(1), 21–28.

- Martin, J. J. J., Yarra, R., Wei, L., & Cao, H. (2022). Oil palm breeding in the modern era: challenges and opportunities. *Plants* 11, 1395. <https://doi.org/10.3390/plants11111395>
- Monteiro, T. R., Freitas, E. O., Nogueira, G. F., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2018). Assessing the influence of subcultures and liquid medium during somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 93(2), 196–203. <https://doi.org/10.1080/14620316.2017.1360156>
- Mose, W., Indrianto, A., Purwantoro, A., & Semiarti, E. (2017). The influence of thidiazuron on direct somatic embryo formation from various types of explant in *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume Orchid. *HAYATI Journal of Biosciences*, 24(4), 201–205. <https://doi.org/10.4308/hjb.24.4.201>
- Nezami, S. R., Yadollahi, A., Hokmabadi, H., & Eftekhari, M. (2015). Control of shoot tip necrosis and plant death during in vitro multiplication of *Pistachio rootstock* UCB1 (*Pistacia integrima* × *P. atlantica*). *Journal of Nuts* 6, 27–35. <https://doi.org/10.22034/jon.2015.515646>
- Offord, C. A. & Tyler, J. L. (2009). In vitro propagation of *Pimelea spicata* R.Br (Thymelaeaceae), an endangered species of the Sydney region. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 98, 19–23. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9534-x>
- Padròn, I. E. S., Meza, P. M. P., Marcela, C., & Díaz, L. (2020). Evaluation of sucrose and GA, in an in vitro shoot culture of *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae). *Ciencia & Tecnologia Agropecuaria* 21(2), e1193. https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num2_art:1193
- Pádua, M. S. S., Santos, R. S., Paiva, L. V., Stein, V. C., & Silva, L. C. (2017). In vitro rooting of tenera hybrid oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plants. *Revista Árvore* 41(4). <https://doi.org/10.1590/1806-9088201700014>
- Palanyandy, S. R., Gantait, S., Subramaniam, S., & Sinniah, U. R. (2020). Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids via encapsulation-desiccation. *Biotechnology* 10(1), 9. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1997-9>
- Reed, B. M., Wada, S., DeNoma, J., & Niedz, R. P. (2013). Mineral nutrition influences physiological responses of pear in vitro. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 49, 699–709. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9556-2>
- Saptari, R. T. & Sumaryono (2016). Modifikasi sistem kultur in vitro untuk meningkatkan vigor planlet stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). *Menara Perkebunan* 84(2), 61–68.
- Saptari, R. T., Sinta, M., & Budiani, A. (2017). In vitro propagation of *Anthurium adreanum* cv. nitta through organogenesis. *AGRIVITA Journal of Agricultural Science* 39(2), 192–200.
- Setiawan, K. (2017). *Pemuliaan Kelapa Sawit*. Plantaxia, Yogyakarta.
- Sharp, R. E., Wu, Y., Voetberg, G. S. Saab, I. N., & LeNoble, M. E. (1994). Confirmation that abscisic acid accumulation is required for maize primary root elongation at low water potentials. *Journal of Experimental Botany* 45, 1743–1751.
- Singh, P. & Dwivedi, P. (2014). Two-stage culture procedure using thidiazuron for efficient micropropagation of *Stevia rebaudiana*, an anti-diabetic medicinal herb. *Biotechnology* 4(4), 431–437. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0172-y>
- Sinta, M. M., Riyadi, I., & Sumaryono (2011). Pengaruh jenis penutup botol kultur terhadap pertumbuhan planlet kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Menara Perkebunan* 79(1), 150–22.
- Sparjanbabu, D. S., Naveenkumar, P., Krisna, M. S. R., Ramajayam, D., Susanthi, B., & Prasana, H. S. (2020). Optimizing the acclimatization process of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in vitro plantlets derived from the mature zygotic embryos. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 21, 128–134.
- Srivastava, A. & Joshi, A. G. (2013). Control of shoot tip necrosis in shoot cultures of *Portulaca grandiflora* Hook. *Notulae Scientia Biologicae* 5, 45–49. <https://doi.org/10.15835/nsb519009>
- Sulaksono, G., Hasmeda1, M., Hanum, L., Wendra, F., Santika, B. & Asmono, D. (2021). The effect of culture media type and plant growth regulators on callus induction of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) Pisifera type. *Biovalentia: Biological Research Journal* 7(2), 55–60.
- Sudrajad, H., Suharto, D. & Widodo, H. (2016). The effect of benzil amino purin (BAP) and gibberellin with in vitro seedling growth of pulesari (*Alyxia reinwardtii* BI). *Health Science Journal of Indonesia* 7(2), 93–96.
- Sumaryono & Riyadi, I. (2011). Ex vitro rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) plantlets derived from tissue culture. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 12(2), 57–62.

- Sumaryono, Riyadi, I., Kasi, P. D., & Ginting, G. (2007). Pertumbuhan dan perkembangan kalus embriogenik dan embrio somatik kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) pada sistem perendaman sesaat. *Menara Perkebunan* 75(1), 32–42.
- Thomas, J. C. & Katterman, F. R. (1986). Cytokinin activity induced by thidiazuron. *Plant Physiology* 81, 681–683.
- Wan-Chin, Y., Khan, N. C. M., Jamalludin, N., Rashdan, M. M., Ross, A. D., & Kulaveerasingam, H. (2021). An efficient clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 mutagenesis system for oil palm (*Elaeis guineensis*). *Frontiers in Plant Science* 12, 773656.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.773656>
- Weckx, S., Inzé, D., & Maene, L. (2019). Tissue culture of oil palm: finding the balance between mass propagation and somaclonal variation. *Frontiers in Plant Science* 10, 722.
- Yarra, Cao, R. H., Jin, L., Mengdi, Y., & Zhou, L. (2020). CRISPR/Cas mediated base editing: a practical approach for genome editing in oil palm. *3 Biotechnology* 10(7), 306.
<https://doi.org/10.1007/s13205-020-02302-5>.
- Yusnita & Hapsoro, D. (2011). *In vitro* callus induction and embryogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from leaf explants. *HAYATI Journal of Bioscience* 18(2), 61–65.
<https://doi.org/10.4308/hjb.18.2.61>.