

PENDEKATAN BERBASIS GENOMIK DALAM MENGATASI PERMASALAHAN ABNORMALITAS KLON KELAPA SAWIT

Syarul Nugroho*, Hernawan Yuli Rahmadi, Retno Diah Setiowati, dan Heri Adriwan Siregar

Abstrak - Peningkatan permintaan minyak sawit dunia sejalan dengan jumlah populasi global yang terus bertambah. Kebutuhan minyak tetap dapat terpenuhi tanpa perlu melakukan perluasan lahan dengan meningkatkan produktivitas kelapa sawit. Perbanyakkan klon kelapa sawit secara *in vitro* diperkirakan menghasilkan minyak 30% lebih banyak dibandingkan kelapa sawit DxP-nya. Klon kelapa sawit memiliki permasalahan yaitu abnormalitas yang menghasilkan buah mantel dengan hasil minyak rendah serta tidak menghasilkan biji. Metilasi pada situs *Karma* menjadi penyebab abnormalitas pada klon kelapa sawit. Pendekatan berbasis genomik menjadi solusi untuk mengatasi fenomena abnormalitas klon. Pendekatan genomik yang ditawarkan antara lain pencarian marka molekuler dan pengaplikasian CRISPR/dCas9. Marka molekuler yang diperoleh dapat digunakan dalam deteksi dini abnormalitas klon kelapa sawit. CRISPR/dCas9 dapat dikembangkan untuk memicu metilasi spesifik di situs *Karma* untuk mendapatkan klon kelapa sawit normal. Terlepas dari tantangannya, kemajuan teknologi genomik menawarkan potensi keberhasilan dalam mengatasi permasalahan abnormalitas klon kelapa sawit.

Kata kunci: CRISPR/dCas9, *Karma*, mantel, marka molekuler

PENDAHULUAN

Minyak sawit merupakan salah satu minyak yang paling banyak dikonsumsi dan diproduksi di dunia. Minyak sawit memiliki banyak kegunaan dalam industri pangan, kosmetik, dan biofuel yang membuat permintaan minyak sawit semakin meningkat. Meningkatnya permintaan minyak sawit dunia sejalan dengan jumlah populasi global yang terus bertambah. Minyak sawit pada puncak pandemi Covid-19 tahun 2020, bahkan masih menjadi produk yang nilainya tumbuh sebesar 13,6% dari tahun 2019 (Indriyadi, 2022). Tercatat kontribusi devisa industri kelapa sawit pada tahun 2021 mencapai US\$ 35,79 miliar atau Rp 500 triliun (BPDPKS, 2022). Permintaan minyak sawit yang terus naik perlu dijaga ketersediaannya dengan meningkatkan jumlah produksi kelapa sawit.

Jumlah produksi kelapa sawit dapat ditingkatkan melalui perluasan lahan, namun hal ini tidak

disarankan karena memiliki beberapa dampak negatif terhadap lingkungan. Perubahan ekosistem hutan akibat deforestasi berdampak pada hilangnya keanekaragaman hayati dan perubahan iklim yang menjadi isu politik dalam menghalangi peningkatan perluasan lahan (Wicke et al., 2011). Produktivitas kelapa sawit perlu ditingkatkan agar kebutuhan minyak sawit dapat terus terpenuhi tanpa melakukan perluasan lahan.

Salah satu aspek yang dapat meningkatkan produksi kelapa sawit adalah pemilihan bibit. Penggunaan benih berkualitas rendah dapat berdampak negatif terhadap produktivitasnya, sehingga perlu digunakan benih yang bersertifikat dari varietas unggul kelapa sawit. Menurut Solikin (2018), perbanyakkan vegetatif seperti okulasi juga memiliki keunggulan dalam menghasilkan bahan tanaman dengan produktivitas lebih tinggi. Permasalahannya kelapa sawit tidak memiliki metode perbanyakkan vegetatif konvensional seperti tanaman lainnya, karena kelapa sawit hanya memiliki satu meristem apikal tanpa cabang dasar (John Martin et al., 2022). Berdasarkan Mgbeze dan Iserhienrhien (2014), perbanyakkan klon kelapa sawit secara *in vitro* menjadi solusi yang tepat dan layak untuk perbanyakkan kelapa sawit dengan produktivitas tinggi.

Penulis yang tidak disertai dengan catatan kaki instansi adalah peneliti pada Pusat Penelitian Kelapa Sawit

Syarul Nugroho* (✉)
Pusat Penelitian Kelapa Sawit
Jl. Brigjen Katamso No. 51 Medan 20158, Indonesia
Email: synugroho@outlook.com

Upaya perbanyakkan kelapa sawit melalui kultur jaringan dimulai pada tahun 1960-an, dan pada pertengahan tahun 1970-an klon pertama kelapa sawit berhasil diperoleh. Produksi minyak dari klon diperkirakan setidaknya 30% minyaknya lebih banyak dibandingkan populasi ortet tersebut dipilih (Hardon et al., 1987). Hal ini dikarenakan ortet yang digunakan sebagai eksplan klon merupakan ortet dari tanaman individu elit kelapa sawit terpilih yang mempunyai produktivitas tinggi. Produktivitas dari perbanyakkan klonal akan sama dengan individu tanaman asal yang diambil ortetnya. Populasi tanaman yang dihasilkan juga akan lebih homogen karena berasal dari sumber ortet yang sama.

Perbanyakkan kelapa sawit melalui klon ternyata mengalami kendala permasalahan abnormalitas yang dapat menurunkan hasil dan kandungan minyak.

Berdasarkan Ong-Abdullah et al. (2015) buah kelapa sawit abnormal atau buah mantel merupakan varian somaklonal yang muncul dari kultur jaringan yang menurunkan hasil secara drastis. Kejadian abnormalitas klon pertama kali dilaporkan pada tahun 1986 yang mengakibatkan kerugian besar bagi industri dan pemusnahan ratusan hektar perkebunan klon kelapa sawit di seluruh dunia (Mgbeze dan Iserhienhien, 2014). Meskipun tidak terdapat data yang dipublikasikan mengenai hasil minyak, petani melaporkan bahwa buah mantel memiliki hasil minyak yang rendah serta tidak ada biji yang dihasilkan (Shearman et al., 2013). Perbedaan fenotipik antara buah mantel dan buah normal dapat diperkirakan hasil minyak yang akan dihasilkan. Perbedaan fenotipe antara buah klon kelapa sawit normal dengan abnormal dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Buah normal (a), mantel fertil (b), dan mantel partenokarpi (c). Buah ditampilkan sebagai buah utuh (atas), potongan membujur (tengah) dan potongan melintang (bawah). Panah hitam menunjukkan pseudokarpel; panah putih menunjukkan kernel (Ong-Abdullah et al., 2015).

Upaya untuk mengatasi permasalahan abnormalitas klon perlu dilakukan. Upaya yang dilakukan saat ini yaitu dengan memilih jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh (ZPT) yang tepat serta memangkas siklus kultur dan waktu pemaparan ZPT (Azahra dan Ernayunita, 2023). Terlepas dari upaya teknis kultur jaringan yang dilakukan dalam mengatasi permasalahan tersebut, pendekatan genomik dapat dijadikan sebagai upaya lain dalam mengatasi permasalahan abnormalitas klon kelapa sawit. Pendekatan genomik yang ditawarkan antara lain pengembangan marka molekuler untuk deteksi dini abnormalitas klon kelapa sawit di pembibitan

dan pengaplikasian CRISPR/dCas9 untuk perakitan klon kelapa sawit normal. Ulasan ini bertujuan mencari solusi dalam upaya mengatasi permasalahan abnormalitas klon pada kelapa sawit khususnya dengan pendekatan berbasis genomik.

METILASI KARMA PENYEBAB ABNORMALITAS KLON KELAPA SAWIT

Kultur jaringan merupakan salah satu metode perbanyakkan kelapa sawit yang digunakan oleh industri. Kultur jaringan adalah teknik yang digunakan

untuk memperbanyak tanaman secara *in vitro* (dalam tabung reaksi) dalam kondisi steril (Soh et al., 2017). Selama proses kultur jaringan, zat pengatur tumbuh (ZPT) digunakan dengan konsentrasi tinggi yang mungkin menjadi penyebab klon kelapa sawit dapat mengalami variasi somaklonal mantel (Garcia et al., 2019). Teknis kultur jaringan lain seperti sterilisasi eksplan dan perlukaan eksisi dapat menyebabkan stres oksidatif, yang juga diduga menjadi penyebab variasi somaklonal mantel (Weckx et al., 2019). Variasi somaklonal terjadi karena perubahan genotipe atau fenotipe suatu tanaman, akibat mutasi yang terjadi selama proses kultur jaringan (Krishna et al., 2016). Peristiwa ini tidak terbatas pada satu tanaman, tetapi sangat umum terjadi pada tanaman hasil regenerasi kalus melalui kultur jaringan seperti kelapa sawit.

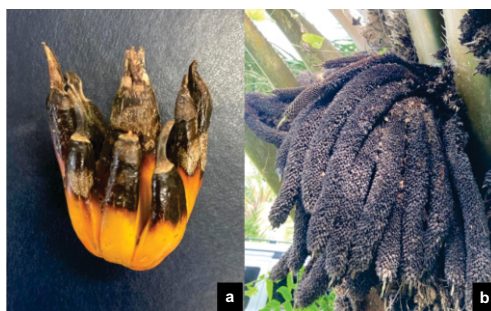
Variasi somaklonal dapat disebabkan oleh variabilitas epigenetik yang terjadi karena metilasi DNA, amplifikasi DNA, modifikasi histon, dan aktivasi transposon yang mempengaruhi ekspresi gen (Smulders dan de Klerk, 2011). Akibat modifikasi epigenetik yang terjadi, perubahan pola ekspresi sejumlah gen yang terlibat dalam pembungaan dan perkembangan buah mengakibatkan klon kelapa sawit menjadi abnormal dengan fenotipe buah mantel (Shearman et al., 2013). Tipe epigenetik penyebab abnormalitas klon kelapa sawit berdasarkan Ong-Abdullah et al. (2015) disebabkan oleh metilasi DNA. Berdasarkan Jin et al. (2011) metilasi DNA merupakan peristiwa yang melibatkan transfer gugus metil kovalen ke posisi C-5 cincin sitosin DNA oleh DNA metiltransferase (DNMT). Pada tanaman, sitosin dimetilasi baik secara simetris (CG atau CHG) atau asimetris (CHH), di mana C singkatan dari Sitosin, G untuk Guanin dan H untuk Adenin, Sitosin, atau Timin. Hal ini mencegah gen tertentu untuk diekspresikan.

Kemungkinan penyebab epigenetik lainnya karena

adanya modifikasi histon. Histon menyediakan mekanisme yang diwariskan untuk mengatur ekspresi gen. Ekor histon mengalami berbagai modifikasi kovalen yang mempengaruhi proses seluler utama seperti transkripsi gen, replikasi DNA, dan perbaikan DNA. Modifikasi histon mengakibatkan perubahan struktur fisik DNA sehingga mempengaruhi pembacaan translasi protein dari gen (Jin et al., 2011). Perubahan epigenetik juga dapat terjadi karena aktivasi elemen transposabel atau dikenal sebagai "gen pelompat" yang merupakan sekuens DNA yang ketika aktif dapat berpindah dari satu lokasi dalam genom ke lokasi lain (Miguel dan Marum, 2011). Perubahan sekuens DNA akibat elemen transposabel juga akan mempengaruhi pembacaan protein. Perbedaan jenis protein yang dihasilkan akan berpengaruh pada perbedaan fenotipe pada tanaman.

Terdapat perbedaan karakteristik utama antara perubahan genetik dan epigenetik. Pada perubahan genetik, modifikasi gen terjadi secara acak (Huang et al. 2016). Sementara perubahan epigenetik dalam populasi tanaman yang dihasilkan, modifikasi gen dapat terjadi pada region yang sama dengan frekuensi tinggi dan dapat direproduksi kembali ketika kondisi yang sama diterapkan pada produksi populasi lain (Smulders dan de Klerk, 2011). Perubahan gen akibat epigenetik menghasilkan fenotipe berbeda dengan tipe liarnya yang dapat membawa sifat menguntungkan atau bahkan merugikan.

Metilasi DNA penyebab abnormalitas klon kelapa sawit menghasilkan klon yang ditanam tidak berbunga secara normal, melainkan memiliki bunga dengan karakter mantel yang tinggi. Pada bunga betina benang sari rudimenter primordial berkembang menjadi karpel tambahan, sedangkan bunga jantan mengalami feminisasi sehingga menghasilkan ekor tupai (Gambar 2).



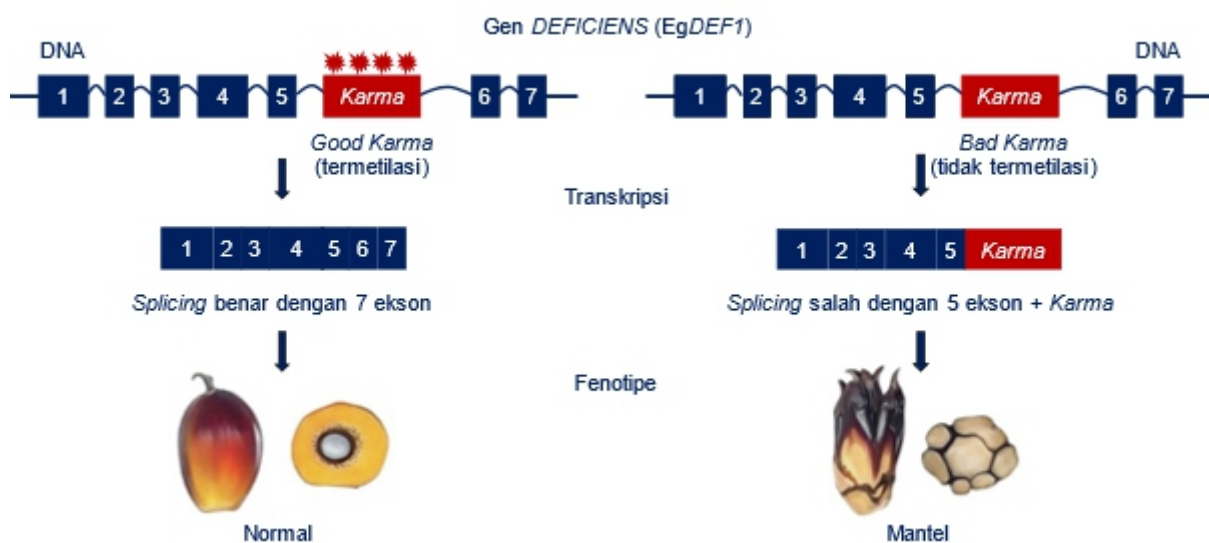
Gambar 2. Bunga betina abnormal menjadi karpel tambahan (a), dan bunga jantan abnormal menyerupai ekor tupai (*gynandromorph*).

Kelainan abnormalitas disertai dengan pembentukan buah nokarpik (tanpa biji) dan kegagalan tandan yang parah (Soh et al., 2017). Diperkirakan sekitar 5% tanaman kelapa sawit yang berasal dari embrio somatik menunjukkan kelainan pada perkembangan bunganya (Corley dan Tinker, 2016).

Ong-Abdullah et al. (2015) melakukan pencarian *genome-wide* untuk mengetahui perubahan metilasi DNA yang berkaitan erat dengan epigenetik dan sifat fenotipe mantel. Hal ini mengarah pada terdeteksinya perubahan metilasi yang terkait dengan fenotipe mantel pada fragmen gen yang sebelumnya diabaikan. Hasil penelitiannya menunjukkan fragmen yang dimetilasi secara berbeda merupakan elemen transposabel yang sekarang disebut “*Karma*”, yang memiliki homolog dengan rice *Karma LINE elements*. Region *Karma* terletak pada intron kelas B gen homeotik kelapa sawit (*EgDEF1*) yang menentukan identitas putik atau benang sari. Transkrip isoform dari gen *EgDEF*, *kDEF1* yang terdeteksi pada organogenesis di pembungaan mantel mengarah

pada protein yang mungkin dapat terpotong.

Hipometilasi DNA dari *Karma* di intron gen homeotik DEFICIENS umum terjadi pada semua klon bermantel dan dikaitkan dengan *alternative splicing* dan *premature termination*. Metilasi yang terjadi menyebabkan penghentian prematur pembacaan *open reading frame* (ORF) yang justru berimplikasi pada fenotipe buah kelapa sawit abnormal. Berdasarkan Ong-Abdullah et al. (2015) metilasi padat (hipermetilasi) di dekat situs *Karma* memprediksi pembentukan buah normal atau disebut *Good Karma*. Sedangkan hipometilasi memprediksi transformasi homeotik, partenokarpi, dan kehilangan hasil yang nyata atau disebut *Bad Karma* (Gambar 3). Transposon mantel juga mengkodekan situs *splice acceptor*, sekuens yang mengarahkan *splicing* dalam transkrip RNA. Hal ini mungkin disebabkan karena selama proses kultur jaringan situs *splicing Karma* menjadi aktif. Ketika *splicing* terjadi, metilasi dapat berkurang sehingga menyebabkan fenotipe buah mantel.



Gambar 3. Mekanisme pembentukan buah mantel. Kehilangan metilasi *Karma* dapat menyebabkan fenotipe buah mantel. Adaptasi dari Ong-Abdullah et al. (2015).

Paszkowski (2015) menjelaskan bahwa pada bunga kelapa sawit mantel ekspresi *EgDEF1* menurun karena berkurangnya metilasi DNA. Berdasarkan hasil penelitian Ong-Abdullah et al. (2015) menunjukkan pada klon kelapa sawit abnormal, metilasi CHG berkurang secara nyata sementara metilasi CHH

sedikit berkurang. Peristiwa ini diperkuat oleh Sarpan et al. (2020), region *kDEF1* yang terdiri dari lima ekson pertama *EgDEF1* dan sebagian wilayah elemen *Karma*, juga mengalami hipometilasi dalam klon bermantel, dengan penurunan kadar metilasi CG, metilasi CHG, dan metilasi CHH.

MARKA MOLEKULER DALAM DETEKSI ABNORMALITAS KELAPA SAWIT

Marka molekuler telah digunakan dalam seleksi berbantuan marka (MAS) untuk program perbaikan tanaman selama puluhan tahun (Desta dan Ortiz, 2014). Penemuan marka merupakan salah satu kegiatan terpenting dalam genomik tanaman atau pemuliaan molekuler. Berdasarkan Pazhamala et al. (2021) pemahaman yang tepat tentang marka molekuler atau gen target yang bertanggung jawab atas regulasi gen dapat dimanfaatkan dalam mengendalikan sifat-sifat yang diinginkan pada tanaman. Kemajuan di bidang bioteknologi, sekuensing keseluruhan genom (WGS) kelapa sawit telah dipublikasikan oleh Singh et al. (2013). Genom kelapa sawit yang telah dianotasi menyediakan sumber daya penting yang mendorong penerapan fungsional genomik dalam pengembangan marka.

Semakin berkembangnya teknologi sekuensing seperti *next generation sequencing* (NGS) mampu memberikan gambaran mendalam mengenai gen–gen yang diekspresikan pada perkembangan bunga dan buah pada kelapa sawit. Low et al. (2014) melakukan sekuensing dari region yang kaya akan gen hipometilasi dari genom *Elaeis guineensis* dan *Elaeis oleifera* dan diperoleh masing–masing 294.115 dan 150.744 sekuens yang disusun menjadi contig. Sebanyak 33.752 mikrosatelit dan 40.820 marka *single nucleotide polymorphism* (SNP) berkualitas tinggi telah diidentifikasi. Model gen yang diprediksi dari kumpulan contig teridentifikasi faktor transkripsi yang terkait dengan perkembangan bunga dan kultur jaringan, seperti protein homeodomain, MADS, *Squamosa*, dan *Apetala2*. Sekuens hipometilasi *E. guineensis* dan *E. oleifera* menyediakan sumber daya penting untuk memahami mekanisme molekuler yang terkait dengan abnormalitas dan sifat agronomi penting lainnya pada kelapa sawit sehingga dapat dieksploitasi lebih lanjut.

Pencarian marka molekuler untuk abnormalitas klon telah dilakukan namun belum berhasil menemukan pita DNA spesifik yang dapat membedakan antara klon normal dengan abnormal secara universal (Anischan et al., 2014). Perbedaan sekuens DNA yang terjadi akibat hilangnya metilasi transposon *Karma* pada klon kelapa sawit abnormal dapat dikembangkan sebagai kandidat marka. Orion

Biosains, anak perusahaan Orion Genomics, mengembangkan tes deteksi abnormalitas klon kelapa sawit dari region *Karma*. Tes tersebut diberi nama SureSawit™ KARMA yang memungkinkan deteksi dini abnormalitas di pembibitan. SureSawit™ KARMA menggunakan sampel daun untuk diekstraksi DNA-nya dan diolah dengan bisulfit. Bisulfit mengubah sitosin menjadi urasil dengan membiarkan 5-metilsitosin (bentuk metilasi sitosin) tetap utuh, sehingga status metilasi *Karma* dapat dengan mudah dideteksi dengan PCR (Ong-Abdullah et al., 2016). Seiring berjalannya waktu, hasil tes SureSawit™ KARMA masih mengalami permasalahan *false negative* yang muncul. Sejalan dengan Jaligot et al. (2011) hal ini dikarenakan kelapa sawit memiliki variasi *genotype dependent* yang tinggi pada setiap individu.

Penelitian Zhang et al. (2022), juga menggunakan marka DNA dari gen *kDEF1* (homolog *EgDEF1*) untuk mendeteksi sampel mantel pada tingkat kalus. Primer *kDEF1* didesain dari sekuens *kDEF1* KR347486.1 (GenBank). Hasil penelitiannya menunjukkan pita DNA hanya terdeteksi pada sampel mantel dan tidak ditemukan pada sampel normal. Hal ini dapat dikaitkan dengan penelitian Sarpan et al. (2020), bahwa hipometilasi elemen *Karma* mengakibatkan ekspresi *kDEF1* pada klon kelapa sawit abnormal yang mengarah pada fenotipe buah mantel sehingga *kDEF1* tidak terekspresi pada klon kelapa sawit normal. Namun ketika metode ini diujikan pada klon kelapa sawit di PPKS, hasil masih menunjukkan *false positive*.

Pengembangan marka untuk deteksi abnormalitas klon kelapa sawit juga dapat menggunakan marka SSR (*short sequence repeat*) dan SNP (*single nucleotide polymorphism*). Marka SSR juga dikenal sebagai mikrosatelit, adalah sekuens pendek DNA berulang yang tersebar di seluruh genom, sedangkan marka SNP adalah perubahan pasangan basa tunggal yang terjadi di lokasi tertentu dalam genom (Tsykun et al., 2017). Keberadaan marka SSR kurang melimpah dalam genom dan memiliki keterbatasan dalam penerapan secara cepat dan presisi tinggi dibandingkan marka SNP (Singh et al., 2013). Marka SNP dicirikan sebagai variasi genom tanaman yang paling melimpah, menjadikannya sangat berguna dalam *high-resolution genotyping*. Marka SNP telah

menjadi marka DNA paling populer di abad ke-21 karena berkembangnya teknik *genotyping by sequencing* (GBS) (Thomson, 2014).

Marka SNP dapat ditemukan dengan dua metode yaitu dengan menggunakan sekuensing seperti *High Throughput-Next generation sequencing* (NGS) dan menggunakan PCR (Dwiningsih et al., 2020). Pendekatan sekuensing dapat mengurangi kompleksitas dan menurunkan biaya dalam penemuan marka SNP. Beberapa tahun terakhir, teknologi NGS telah menghasilkan penemuan ribuan, bahkan jutaan SNP. Banyak tools bioinformatika juga telah ditemukan untuk membantu menganalisis SNP seperti BioEdit, DNASTAR Lasergene Genomics Suite, SAMtools, SOAPsnp, Stacks, Ddocent, Py RAD, dan GATK (Dwiningsih et al., 2020). Marka SNP biasanya bersifat bialelik sehingga mudah untuk diuji. Penemuan marka SNP akan lebih efektif apabila banyak genotipe berbeda digunakan secara bersamaan, sehingga menciptakan dasar yang diperlukan untuk memperoleh variabilitas genetik suatu spesies.

Penemuan marka SNP melalui *Genome by Sequencing* pada kelapa sawit telah dilakukan oleh Babu et al. (2020) dalam pencarian kandidat marka gen untuk sifat-sifat yang berkaitan dengan hasil dan minyak pada kelapa sawit. Dalam penelitiannya, SNP yang diperoleh dipadukan dengan metode studi asosiasi lintas genom (GWAS) sehingga dapat menemukan lokus yang berperan dalam mengekspresikan sifat tertentu. Pendekatan ini memungkinkan untuk diterapkan dalam pencarian marka terkait sifat lain dalam kelapa sawit. Berdasarkan Asif et al. (2021), metode GWAS secara sistematis menganalisis polimorfisme SNP di seluruh genom untuk dikaitkan dengan satu fenotipe yang diminati seperti diagnosis. Pada GWAS akan terdapat garis ambang batas (*threshold*) yang menunjukkan SNP mana saja yang signifikan. Selanjutnya SNP signifikan akan dianalisis untuk menentukan *linkage disequilibrium* (LD) untuk melihat sifat-sifat yang terpaut dengan lokusnya. Berdasarkan Grossi et al. (2017), jika suatu marka berada dalam *linkage disequilibrium* yang cukup dengan mutasi kausal yang mempengaruhi suatu sifat tertentu, maka marka tersebut akan menangkap sebagian besar varian genetik untuk sifat tersebut.

Pencarian marka SNP melalui metode berbasis

PCR, caranya dengan melakukan analisis sekuens spesifik menggunakan primer yang cocok dengan nukleotida tersubstitusi atau menggunakan oligonukleotida untuk memblokir atau menjepit templat yang tidak ditargetkan (Matsuda, 2017). Metode ini memiliki kendala, terkadang gen target spesies yang digunakan belum ada dalam database genbank (NCBI). Penyelarasan gen berkerabat dari beberapa spesies untuk mendesain *degenerate primer* perlu dilakukan sehingga dapat mengamplifikasi gen target dari spesies yang diinginkan.

Hasil penyelarasan sekuens dari beberapa spesies, akan diperoleh daerah dengan basa nukleotida yang *conserved* (basa nukleotida sama) maupun tidak. Degenerate primer digunakan untuk mengatasi perbedaan basa nukleotida yang terjadi. Berdasarkan Linhart dan Shamir (2005), *degenerate primer* memiliki sekuens basa unik yang dapat mengamplifikasi beberapa kemungkinan basa dalam sampel saat melakukan PCR. Price et al. (2002) menggunakan *degenerate primer* untuk mengkarakterisasi gen *copla*-like retrotransposons pada kelapa sawit. Metode ini sangat memungkinkan untuk mengkarakterisasi gen-gen lain pada kelapa sawit.

Penggunaan marka SNP dinilai lebih efisien karena gen yang berasosiasi dengan sifat-sifat penting dapat diidentifikasi secara cepat dan presisi dibandingkan dengan marka molekuler lainnya (Dwiningsih et al., 2020). Marka SNP merupakan marka yang dapat dikembangkan untuk menentukan variasi fenotipe buah kelapa sawit mantel dengan melihat perbedaan sekuens metilasi DNA pada region *Karma* antara klon kelapa sawit normal dengan klon kelapa sawit abnormal. Perbedaan SNP yang teridentifikasi dapat digunakan sebagai kandidat marka molekuler dalam mendeteksi abnormalitas pada klon kelapa sawit.

Marka abnormalitas klon yang diperoleh dapat digunakan untuk seleksi pada tahap sangat awal pada beberapa fase kultur jaringan seperti fase kalus dan embrio somatik di laboratorium hingga fase aklimatisasi di pembibitan. Metode ini menjamin klon kelapa sawit abnormal dapat terdeteksi sebelum ditanam di lapangan, sehingga kerugian akibat abnormalitas

klon dapat dihindari. Pendekatan ini diharapkan dapat mengurangi atau bahkan menghilangkan jumlah kelapa sawit dewasa abnormal di perkebunan komersial.

CRISPR/dCas9 MEMEDIASI PENGEDITAN GENOM PADA SITUS SPESIFIK METILASI KLON KELAPA SAWIT

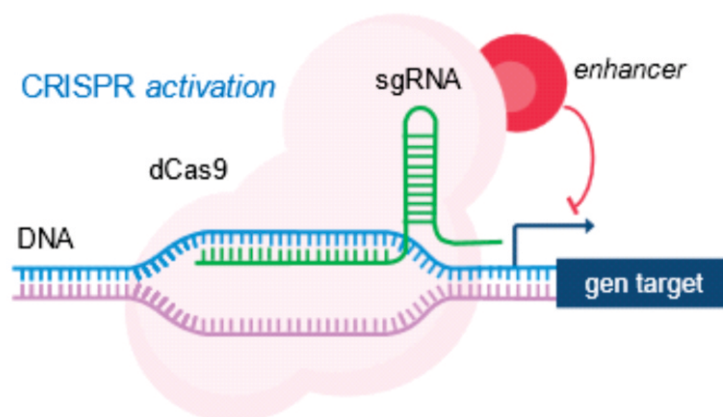
CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) dan protein terkait enzim Cas (Cas9) merupakan teknik pengeditan genom tertarget spesifik yang banyak digunakan dalam memodifikasi gen (El-Mounadi dkk., 2020). CRISPR/Cas9 diadopsi dari mekanisme imun adaptif prokariota terhadap virus. CRISPR sendiri adalah larik urutan berulang pendek yang dipisahkan oleh spacer dalam urutan yang unik. Sedangkan protein Cas9 adalah endonuklease yang berfungsi memotong sekuens DNA (Le Rhun et al., 2019). Protein Cas9 dapat dipandu oleh sgRNA (*single guide RNA*) untuk menuju dan menentukan daerah sekuens DNA target spesifik yang akan dimodifikasi. CRISPR/Cas9 kemudian melakukan pemotongan sekuens DNA yang dapat menyebabkan kerusakan untai ganda DNA (DSB). Kerusakan yang terjadi dapat diperbaiki dengan mekanisme penggabungan ujung non homolog (NHEJ) atau perbaikan yang diarahkan pada homologi (HDR) (Doudna dan Charpentier, 2014). Mekanisme CRISPR dan perbaikannya selanjutnya dimanfaatkan dalam pengeditan gen target spesifik.

Sekuens DNA target yang telah terpotong oleh CRISPR/Cas9 pada kebanyakan kasus akan diperbaiki dengan mekanisme NHEJ. Perbaikan yang

terjadi akan menyebabkan insersi atau delesi (indel) secara acak, yang dapat mengakibatkan mutasi karena pergeseran pembacaan *open reading frame* (orf) pada wilayah pengkodean gen. Indel yang terjadi secara efektif menciptakan gen *knock out* yang mengakibatkan gen menjadi tidak terekspresi atau memiliki ekspresi lain dibanding tipe liarnya (Bortesi dan Fischer, 2015). Berbeda dengan perbaikan kerusakan DSB yang menggunakan mekanisme HDR, ketika templat homolog tersedia di wilayah sekitar DSB, mekanisme ini tidak menghasilkan indel sehingga dapat dimanfaatkan untuk penyisipan gen dengan sifat baru (gen *knock in*) (Peterka et al., 2022).

CRISPR/Cas9 tidak hanya dapat digunakan untuk *knock out* atau *knock in* gen, tetapi juga CRISPR/Cas9 dapat dimanfaatkan untuk memodifikasi elemen regulator seperti faktor transkripsi. Faktor transkripsi dan promotor diperlukan oleh sel eukariota untuk mengekspresikan suatu gen (Phillips, 2008). Mekanisme pengeditan elemen regulator dapat dilakukan dengan memodifikasi CRISPR/Cas9 dengan mematikan fungsi pemotongan dari Cas9 atau disebut *dead Cas9* (dCas9). Berdasarkan Moradpour dan Abdullah (2020), sistem Cas9 yang tidak aktif secara katalitik atau mati (dCas9) menyediakan alat manipulasi genetik yang kuat, yang sangat penting untuk perubahan fenotipik.

CRISPR/dCas9 kemudian harus difusikan dengan faktor transkripsi seperti *enhancer* atau *repressor* (Gambar 4). Sejalan dengan Xu et al. (2019), level ekspresi gen dapat diubah melalui fusi dCas9 ke regulator transkripsional.



Gambar 4. Mekanisme CRISPR/dCas9 dalam meningkatkan level ekspresi

Kompleks CRISPR juga terdapat sgRNA yang memandu menuju sekuens target spesifik. Metode untuk aktivasi atau represi ekspresi suatu gen yang ditargetkan akan lebih sederhana dan efisien. CRISPR/dCas9 yang difusikan dengan *enhancer* akan meningkatkan level ekspresi gen atau disebut CRISPR *activation*, sedangkan CRISPR/dCas9 yang difusikan dengan *repressor* akan menurunkan level ekspresi gen atau disebut dengan CRISPR *interference* (Karlsen et al., 2021).

Mekanisme CRISPR/dCas9 dapat digunakan sebagai pendekatan untuk mengatasi permasalahan abnormalitas pada klon kelapa sawit. Diketahui sebelumnya, berdasarkan penelitian Ong-Abdullah et al. (2015), hipometilasi yang terjadi pada buah mantel klon kelapa sawit abnormal mengindikasikan bahwa gen yang seharusnya diekspresikan tidak terekspresi. Klon kelapa sawit normal mengalami hipermetilasi atau *Good Karma* yang mempunyai metilasi CHG padat. Sebaliknya klon kelapa sawit abnormal mengalami hipometilasi atau *Bad Karma* dimana telah terjadi hilangnya seluruh metilasi CHG yang menyebabkan fenotipe buah mantel. CRISPR/dCas9 sangat memungkinkan difusikan dengan *enhancer* untuk meningkatkan tingkat metilasi pada klon kelapa sawit guna menginduksi ekspresi buah normal.

Beberapa gen yang terkait dengan mekanisme metilasi pada tanaman juga telah diidentifikasi, sehingga dapat dikombinasikan dengan CRISPR/dCas9 untuk menginduksi metilasi. Berdasarkan Ghoshal et al. (2021), metilasi DNA dipertahankan melalui tiga mekanisme utama, bergantung pada lokasi genom dan konteks sekuens: metilasi CG dipertahankan oleh DNA *METHYLTRANSFERASE 1 (MET1)*, metilasi non-CG pada transposon kecil dan elemen berulang dalam kromatin terbuka dipertahankan oleh RNA-*directed DNA methylation (RdDM)*, dan metilasi non-CG dalam heterokromatin padat dipertahankan oleh *CHROMOMETHYLASE 2 (CMT2)* dan *CHROMOMETHYLASE 3 (CMT3)*. Berdasarkan Du et al. (2015), *DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2 (DRM2)* diperlukan untuk pembentukan metilasi DNA secara *de novo*. Hasil penelitian Lei et al. (2017) menunjukkan metiltransferase bakteri spesifik CG, *MQ1 (Sssl)* dari bakteri *Mollicutes spiroplasma* difusikan dengan dCas9 dapat memicu metilasi DNA *de novo* dalam konteks CG pada lokus target spesifik dalam sel.

Teridentifikasinya kandidat gen terkait metilasi, CRISPR/dCas9 akan lebih mudah diterapkan dalam mengatasi permasalahan abnormalitas pada klon kelapa sawit.

Karakter dari tanaman hasil pengeditan genom dengan CRISPR dapat diwariskan secara stabil pada generasi berikutnya (Song et al., 2022). Artinya apabila kalus yang digunakan sebagai eksplan dalam pengeditan genom CRISPR/dCas9 berhasil mengaktivasi metilasi situs *Karma* dan beregenerasi menjadi tanaman kelapa sawit dewasa, maka keturunan (biji) yang dihasilkan akan membawa karakter yang sama dengan tetap mengikuti konsep segregasi. Klon kelapa sawit dewasa hasil pengeditan genom, dapat juga diambil ortetnya untuk memperbanyak secara *in vitro* tanpa perlu menjalani pengeditan genom kembali menggunakan CRISPR/dCas9. Hal ini bisa terjadi, karena setiap sel hasil pengeditan yang membelah akan tetap membawa kompleks CRISPR/dCas9 untuk terus diekspresikan dalam aktivasi metilasi *Karma*.

KESIMPULAN

Pemahaman penyebab dan mekanisme abnormalitas pada klon kelapa sawit, dapat dikembangkan lebih lanjut untuk metode pendekatan yang tepat dalam mengatasinya. Pendekatan genomik mempunyai peluang keberhasilan tinggi dalam mengatasi permasalahan abnormalitas klon. Kandidat marka molekuler terkait abnormalitas klon dapat digunakan untuk deteksi dini antara klon kelapa sawit normal dengan abnormal. CRISPR/dCas9 dapat memicu metilasi spesifik pada situs *Karma* untuk perakitan klon kelapa sawit normal. Pendekatan berbasis genomik memberikan gambaran dalam mengatasi permasalahan abnormalitas klon kelapa sawit.

DAFTAR PUSTAKA

Asif, H., Alliey-Rodriguez, N., Keedy, S., Tamminga, C. A., Sweeney, J. A., Pearlson, G., Clementz, B. A., Keshavan, M. S., Buckley, P., Liu, C., Neale, B., and Gershon, E. S. (2021). GWAS significance thresholds for deep phenotyping studies can depend upon minor allele frequencies and sample size,

- Molecular Psychiatry*, 26(6), 2048–2055. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0670-3>
- Anischan, M., Suharsono., Mathius, N. T., and Kusnandar, A. S. (2014). Hubungan Metilasi DNA dengan Ekspresi Gen MADS-box pada Buah Mantel Tanaman Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Indonesian Journal of Agronomy*, 42(3). <https://doi.org/10.24831/jai.v42i3.9175>
- Azahra, P. S., and Ernayunita (2023). Upaya Meminimalkan Abnormalitas pada Klon Kelapa Sawit, *WARTA Pusat Penelitian Kelapa Sawit*, 28(1), 55–62. <https://doi.org/10.22302/iopri.war.warta.v28i1.102>
- Babu, B. K., Mathur, R. K., Ravichandran, G., Anita, P., and Venu, M. V. B. (2020). Genome wide association study (GWAS) and identification of candidate genes for yield and oil yield related traits in oil palm (*Elaeis guineensis*) using SNPs by genotyping-based sequencing, *Genomics*, 112(1), 1011–1020. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.06.018>
- Badan Pengelola Dana Perkebunan Kelapa Sawit. (2022). Optimalisasi Industri Sawit Penopang Perekonomian: Produk kelapa sawit dan minyak sawit mentah menjadi andalan penghasil devisa. <https://www.bpdp.or.id>.
- Bortesi, L., and Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 System for Plant Genome Editing and Beyond, *Biotechnology Advances*, 33(1), 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>
- Corley, R.H.V., and Tinker, P.B. (2016). *The Oil Palm*. Wiley - Blackwell, Hoboken. <https://doi.org/10.1002/9781118953297>
- Desta, Z. A., and Ortiz, R. (2014). Genomic selection: genome-wide prediction in plant improvement, *Trends in Plant Science*, 19(9), 592–601. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.05.006>
- Doudna, J. A., and Charpentier, E. (2014). The New Frontier of Genome Engineering with CRISPR-Cas9, *Science*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Du, J., Johnson, L. M., Jacobsen, S. E., and Patel, D. J. (2015). DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(9), 519–532. <https://doi.org/10.1038/nrm4043>
- Dwiningsih, Y., Rahmaningsih, M., and Alkahtani, J. (2020). Development of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Markers in Tropical Crops, *Advance Sustainable Science, Engineering and Technology*, 2(2). <https://doi.org/10.26877/asset.v2i2.6279>
- El-Mounadi, K., Morales-Floriano, M. L., and Garcia-Ruiz, H. (2020). Principles, Applications, and Biosafety of Plant Genome Editing Using CRISPR-Cas9, *Frontiers in Plant Science*, 11, 56. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00056>
- Garcia, C., A. A. F. Almeida, M. Costa, D. Britto, R. Valle, S. Royaert and J. P. Marelli (2019). Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 137 : 193 – 212 . <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01569-8>
- Ghoshal, B., Picard, C. L., Vong, B., Feng, S., and Jacobsen, S. E. (2021). CRISPR-based targeting of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* by a bacterial CG-specific DNA methyltransferase, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(23), e2125016118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2125016118>
- Grossi, D. A., Jafarikia, M., Brito, L. F., Buzanskas, M. E., Sargolzaei, M., and Schenkel, F. S. (2017). Genetic diversity, extent of linkage disequilibrium and persistence of gametic phase in Canadian pigs, *BMC Genetics*, 18(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0473-y>
- Hardon, J.J., Corley, R.H.V., and Lee, C. H. (1987). Breeding and selecting the oil palm. In: A.J. Abbot and R.K. Atkin (Eds.), *Improving vegetatively propagated crops*. Academic Press, London, pp. 63-81
- Huang, W., Lyman, R. F., Lyman, R. A., Carbone, M. A., Harbison, S. T., Magwire, M. M., and Mackay, T. F. (2016). Spontaneous mutations and the origin and maintenance of quantitative genetic variation, *eLife*, 5, e14625. <https://doi.org/10.7554/eLife.14625>
- Indriyadi, W. (2022). Palm Oil Plantation in Indonesia: A Question of Sustainability, *Salus Cultura*:

- Jurnal Pembangunan Manusia Dan Kebudayaan*, 2 (1), 1 – 10 .
<https://doi.org/10.55480/saluscultura.v2i1.40>
- Jaligot, E., Adler, S., Debladis, É., Beulé, T., Richaud, F., Ilbert, P., Finnegan, E. J., and Rival, A. (2011). Epigenetic imbalance and the floral developmental abnormality of the in vitro-regenerated oil palm *Elaeis guineensis*, *Annals of Botany*, 108(8), 1453–1462. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq266>
- Jin, B., Li, Y., and Robertson, K. D. (2011). DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy?, *Genes & Cancer*, 2(6), 607–617. <https://doi.org/10.1177/1947601910393957>
- John Martin, J. J., Yarra, R., Wei, L., and Cao, H. (2022). Oil Palm Breeding in the Modern Era: Challenges and Opportunities, *Plants*, 11(11), 1395. <https://doi.org/10.3390/plants11111395>
- Karlson, C. K. S., Mohd-noor, S. N., Nolte, N., and Tan, B. C. (2021). Crispr/dcas9-based systems: Mechanisms and applications in plant sciences. *Plants*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/plants10102055>
- Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M., and Sadh, R. K. (2016). Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement, *3 Biotech*, 6(1), 54. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0389-7>
- Le Rhun, A., Escalera-Maurer, A., Bratovič, M., and Charpentier, E. (2019). CRISPR-Cas in *Streptococcus pyogenes*, *RNA Biology*, 16(4), 380–389. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1582974>
- Lei, Y., Zhang, X., Su, J., Jeong, M., Gundry, M. C., Huang, Y.-H., Zhou, Y., Li, W., and Goodell, M. A. (2017). Targeted DNA methylation in vivo using an engineered dCas9-MQ1 fusion protein, *Nature Communications*, 8(1), 16026. <https://doi.org/10.1038/ncomms16026>
- Linhart, C., and Shamir, R. (2005). The Degenerate Primer Design Problem: Theory and Applications, *Journal of Computational Biology*, 12(4), 431–456.
<https://doi.org/10.1089/cmb.2005.12.431>
- Low, E.-T. L., Rosli, R., Jayanthi, N., Mohd-Amin, A. H., Azizi, N., Chan, K.-L., Maqbool, N. J., Maclean, P., Brauning, R., McCulloch, A., Moraga, R., Ong-Abdullah, M., and Singh, R. (2014). Analyses of Hypomethylated Oil Palm Gene Space, *PLoS ONE*, 9(1), e86728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086728>
- Matsuda, K. (2017). PCR-Based Detection Methods for Single-Nucleotide Polymorphism or Mutation, 45–72 in *Advances in Clinical Chemistry*, Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2016.11.002>
- Mgbeze, G.C.M., and Iserhienrhien, A. (2014). Somaclonal variation associated with oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clonal propagation: A review, *African Journal of Biotechnology*, 13(9), 989–997. <https://doi.org/10.5897/AJBX12.011>
- Miguel, C., and Marum, L. (2011). An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond, *Journal of Experimental Botany*, 62(11), 3713–3725. <https://doi.org/10.1093/jxb/err155>
- Moradpour, M., and Abdulah, S. N. A. (2020). CRISPR/dCas9 platforms in plants: strategies and applications beyond genome editing. *Plant Biotechnology Journal*, 18(1), 32–44. <https://doi.org/10.1111/pbi.13232>
- Ong-Abdullah, M., Ordway, J. M., Jiang, N., Ooi, S.-E., Kok, S.-Y., Sarpan, N., Azimi, N., Hashim, A. T., Ishak, Z., Rosli, S. K., Malike, F. A., Bakar, N. A. A., Marjuni, M., Abdullah, N., Yaakub, Z., Amiruddin, M. D., Nookiah, R., Singh, R., Low, E.-T. L., Chan, K.-L., Azizi, N., Smith, S. W., Bacher, B., Budiman, M. A., Van Brunt, A., Wischmeyer, C., Beil, M., Hogan, M., Lakey, N., Lim, C.-C., Arulandoo, X., Wong, C.-K., Choo, C.-N., Wong, W.-C., Kwan, Y.-Y., Alwee, S. S. R. S., Sambanthamurthi, R., and Martienssen, R. A. (2015). Loss of Karma transposon methylation underlies the mantled somaclonal variant of oil palm, *Nature*, 525(7570), 533–537. <https://doi.org/10.1038/nature15365>
- Ong-Abdullah, M., Ordway, J. M., Jiang, N., Ooi, S.-E., Mokri, A., and Nookiah, R. (2016) SureSawit TM KARMA-A Diagnostic Assay for Clonal Conformity, MPOB Information Series 156. <https://www.mpob.gov.my>
- Paszkowski, J. (2015). The karma of oil palms, *Nature*, 525(7570), 466–467.

- <https://doi.org/10.1038/nature15216>
- Pazhamala, L. T., Kudapa, H., Weckwerth, W., Millar, A. H., and Varshney, R. K. (2021). Systems biology for crop improvement, *The Plant Genome*, 14(2). <https://doi.org/10.1002/tpg2.20098>
- Peterka, M., Akrap, N., Li, S., Wimberger, S., Hsieh, P.-P., Degtev, D., Bestas, B., Barr, J., van de Plassche, S., Mendoza-Garcia, P., Šviković, S., Sienski, G., Firth, M., and Maresca, M. (2022). Harnessing DSB Repair to Promote Efficient Homology-Dependent and -Independent Prime Editing. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28771-1>
- Phillips, T. (2008). Regulation of transcription and gene expression in eukaryotes. *Nature Education* 1(1):199
- Price, Z., Dumortier, F., MacDonald, D., and Mayes, S. (2002). Characterisation of copia-like retrotransposons in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), *Theoretical and Applied Genetics*, 104(5), 860–867. <https://doi.org/10.1007/s00122-001-0818-8>
- Sarpan, N., Taranenko, E., Ooi, S.-E., Low, E.-T. L., Espinoza, A., Tatarinova, T. V., and Ong-Abdullah, M. (2020). DNA methylation changes in clonally propagated oil palm, *Plant Cell Reports*, 39(9), 1219–1233. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02561-9>
- Shearman, J. R., Jantasuriyarat, C., Sangsrakru, D., Yoocha, T., Vannavichit, A., Tangphatsornruang, S., and Tragoonrung, S. (2013). Transcriptome Assembly and Expression Data from Normal and Mantled Oil Palm Fruit, *Dataset Papers in Biology*, 2013, 1–7. <https://doi.org/10.7167/2013/670926>
- Singh, R., Ong-Abdullah, M., Low, E.-T. L., Manaf, M. A. A., Rosli, R., Nookiah, R., Ooi, L. C.-L., Ooi, S., Chan, K.-L., Halim, M. A., Azizi, N., Nagappan, J., Bacher, B., Lakey, N., Smith, S. W., He, D., Hogan, M., Budiman, M. A., Lee, E. K., DeSalle, R., Kudrna, D., Goicoechea, J. L., Wing, R. A., Wilson, R. K., Fulton, R. S., Ordway, J. M., Martienssen, R. A., and Sambanthamurthi, R. (2013). Oil palm genome sequence reveals divergence of interfertile species in Old and New worlds, Smulders, M. J. M., and de Klerk, G. J. (2011). Epigenetics in plant tissue culture, *Plant Growth Regulation*, 63(2), 137–146. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9531-4>
- Soh, A.C., Mayes, S., and Roberts, J.A. (Eds.). (2017). *Oil Palm Breeding: Genetics and Genomics* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315119724>
- Song, H., Ahn, J.Y., Yan, F., Ran, Y., Koo, O., and Lee, G.J. (2022). Genetic Dissection of CRISPR-Cas9 Mediated Inheritance of Independently Targeted Alleles in Tobacco α -1,3-Fucosyltransferase 1 and β -1,2-Xylosyltransferase 1 Loci. *Int J Mol Sci*, 23(5):2450. <https://doi.org/10.3390/ijms23052450>
- Solikin, S. (2018). Effect of nodes position on the growth and yield of stem cutting of Sambiloto (*Andrographis paniculata*), *Nusantara Bioscience*, 10(4), 226–231. <https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n100405>
- Thomson, M. J. (2014). High-Throughput SNP Genotyping to Accelerate Crop Improvement, *Plant Breeding and Biotechnology*, 2(3), 195–212. <https://doi.org/10.9787/PBB.2014.2.3.195>
- Tsykun, T., Rellstab, C., Dutech, C., Sipos, G., and Prospero, S. (2017). Comparative assessment of SSR and SNP markers for inferring the population genetic structure of the common fungus *Armillaria cepistipes*, *Heredity*, 119(5), 371–380. <https://doi.org/10.1038/hdy.2017.48>
- Weckx, S., Inzé, D., and Maene, L. (2019). Tissue Culture of Oil Palm: Finding the Balance Between Mass Propagation and Somaclonal Variation, *Frontiers in Plant Science*, 10, 722. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00722>
- Wicke, B., Sikkema, R., Dornburg, V., and Faaij, A. (2011). Exploring land use changes and the role of palm oil production in Indonesia and Malaysia, *Land Use Policy*, 28(1), 193–206. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2010.06.001>
- Xu, J., Yu, Y., Chen, K., and Huang, Y. (2019). Intersex

regulates female external genital and imaginal disc development in the silkworm. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 108, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.02.003>

Zhang, D., Htwe, Y.M., Zhao, Z., Ihase, L.O., Kareem, A., Shil, P., and Wang, Y. (2022).

High Concentration of 2,4-D Treatment May Not Result in Mantled variation during Callus Induction of Oil Palm. *Journal of Animal and Plant Sciences*. 32(4). <http://doi.org/10.36899/JAPS.2022.4.0500>