

PROTOKOL KULTUR EMBRIO SIGOTIK KELAPA KOPYOR

Sukendah¹, Ira N. Djajanegara², Makhzhiah¹

¹Lab. Bioteknologi Agronomi, Fakultas Pertanian, UPN "Veteran" Jatim, Surabaya

²P3T Bioindustri BPPT, Jakarta

Abstract

In effort to get the true-to-type "Kopyor" coconut (matured coconut with broken meat particles due to abnormal formation of endosperm), the only way is inoculate the embryo in synthetic media under in vitro condition. A protocol of coconut embryo culture was established for "Kopyor" coconut grown in East Java through testing a number of media protocols and adding auxin IBA for rooting. The media protocols tested consisted of Y3 (Eeuwens) and MS (Murashige & Skoog) basal media, i.e. Protocol I (UPLB/Philippines) as a control, Protocol II with a series of solid media Y3 (solid Y3 in germinating phase; solid Y3 in subculture I,II,III and solid Y3 in subculture IV), Protocol III with a series of solid media Y3 in germinating phase; solid Y3 in subculture I,II,III ; and liquid Y3 in subculture IV, Protocol IV with a series of solid media MS (solid MS in germinating phase; solid MS in subculture I,II,III; solid MS in subculture IV), and Protocol V with a series of liquid media MS in germinating phase; solid Y3 in subculture I,II,III; liquid Y3 in subculture IV. The growth of Kopyor coconut embryo was very fast in media Protocol II (a series of solid media Y3) and forming perfect plantlet higher than others. The alternative protocol that could give a positive result was Protocol III, this protocol showed a plantlet good rooting. Growth regulator IBA could induce primary root of kelapa kopyor plantlets. The effective concentration to stimuli lateral root of kelapa kopyor plantlet was 2 ppm IBA.

Kata Kunci : Protokol Media, IBA, Kultur Embrio, Kelapa Kopyor.

1. PENDAHULUAN

Buah kelapa kopyor masih cukup langka sampai sekarang. Hal ini disebabkan belum ditemukannya pohon kelapa kopyor yang *true-to-type* di habitat alam. Kelapa kopyor hanya dapat dihasilkan oleh pohon kelapa yang memiliki sifat kopyor yang dibawa oleh pasangan gen resesif (**kk**). Sifat tersebut tidak akan muncul apabila gen resesif (**k**) berpasangan dengan gen kepala biasa yang dominan (**K**) (Tahardi, 1997). Tidak adanya pohon kelapa kopyor *true-to-type* disebabkan oleh ketidakmampuan embrio untuk berkecambah yang disebabkan oleh rusaknya daging buah (kopyor) sebagai sumber cadangan makanan bagi embrio.

Satu-satunya cara untuk mengecambahkan buah kelapa kopyor tersebut adalah dengan menumbuhkan di media buatan yang mengandung unsur hara makro, mikro, vitamin, sukrosa dan hormon dalam kondisi *in vitro* (Catibog, 2001). Hasil yang telah diperoleh menunjukkan bahwa buah kopyor dari kultur embrio dapat mencapai 92% (Tahardi, 1997). Kelemahannya adalah banyak kendala yang

ditemui dalam proses pengkulturan embrio kelapa kopyor sehingga persentase keberhasilan planlet jadi relatif rendah yaitu kurang dari 50% (Sukendah, 2003). Hal tersebut tidak lepas dari serangkaian cara atau prosedur (protokol) yang dipakai dalam proses pengkulturan embrio kelapa kopyor tersebut.

Saat ini terdapat beberapa macam protokol media kultur untuk tanaman kelapa yang dikembangkan oleh PCA (Philippine Coconut Authority), CPCRI (Central Plantation Crops Research Institute) India, UPLB (University of Philippines at Los Banos) dan ORSTOM/CIRAD Perancis. Protokol-protokol media tersebut umumnya menggunakan media padat dan media cair selama tahap pengkulturan embrio. Media kultur yang digunakan adalah media Y₃ (Eeuwens) dan MS (Murashige dan Skoog) (Engelmann, 1997 *dalam* Batugal dan Engelmann, 1998).

Perbedaan masing-masing protokol media adalah pada jenis dan komposisi media yang digunakan serta pergantian media kultur yang digunakan selama masa kultur. Masing-masing protokol media tersebut memiliki keunggulan dan kekurangan terhadap pertumbuhan embrio kelapa.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dari keempat protokol tersebut yang menunjukkan hasil terbaik adalah protokol UPLB dengan persentase embrio yang berhasil mencapai tahap aklimatisasi di *screen house* yaitu dibawah 50 %. Selanjutnya dari planlet-planlet yang berhasil dan bertahan hidup adalah dari protokol UPLB yaitu dibawah 30% (Mashud, 1999).

Hasil penelitian yang telah dilakukan penulis dengan protokol UPLB untuk kelapa kopyor di Jawa Timur (genotipe di Sumenep) menunjukkan pertumbuhan planlet yang sangat lambat dan persentase planlet jadi sekitar 30%. Kemudian penulis mengembangkan protokol media untuk genotipe Sumenep dengan berbagai modifikasi rangkaian bentuk media dengan protokol UPLB sebagai kontrol. Makalah ini menyajikan hasil dari embrio kultur kelapa kopyor setelah melalui beberapa tahap pengujian dan perlakuan ZPT auksin pra-aklimatisasi untuk planlet-planlet yang belum berakar.

1.2. Bahan Penelitian

Bahan atau sumber eksplan yang digunakan selama penelitian adalah buah kelapa kopyor berumur 11 bulan yang diperoleh dari kebun sentra petani kopyor di Sumenep Jawa Timur. Media dasar yang digunakan adalah media Murashige & Skoog (1962) dan Eeuwens (1976). Untuk memadatkan media dipakai agar kultur jaringan (Invitrolab), sedangkan sumber sukrosa digunakan gula pasir. Untuk merangsang akar dipakai auksin IBA (Sigma). Untuk mengatasi *browning* dipakai arang aktif (Phytotech). Sterilisasi menggunakan etil alkohol dan klorox, Bahan-bahan lainnya adalah akuades, aluminium foil, spiritus, dan tissue.

1.3. Metode Penelitian

1.3.1. Pengujian Protokol Media

Ada 5 protokol media yang diuji (Tabel 1). Protokol media terdiri dari 3 fase pergantian media yaitu fase perkecambahan, fase pendewasaan planlet (subkultur I-III), dan fase penyempurnaan planlet sebelum aklimatisasi (subkultur IV). Percobaan disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang diulang 3 kali. Setiap perlakuan diambil 10 sampel. Keberhasilan protokol media diukur dari pertumbuhan tunas dan akar planlet serta presentase planlet yang dihasilkan.

2. BAHAN DAN METODE

2.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Pembangunan Nasional "Veteran" Jawa Timur, Surabaya. Pengujian Protokol Media dilaksanakan bulan Mei 2004 sampai dengan Oktober 2006. Perlakuan penguatan akar dilaksanakan mulai bulan Nopember 2006 sampai Juli 2007.

2.3.2. Penguatan Perakaran Pra-aklimatisasi

Planlet hasil kultur embrio yang belum keluar akarnya diberi perlakuan auksin IBA dengan konsentrasi 1, 2, dan 3 mg/l untuk merangsang keluarnya akar primer. Percobaan disusun dengan RAL yang diulang 3 kali. Setiap perlakuan diambil 5 sampel planlet. Variabel yang diamati adalah pertumbuhan tunas dan akar planlet serta keberhasilan dalam membentuk planlet sempurna (akar+ tunas).

Tabel 1.
Macam Perlakuan Protokol Media dan Media yang Digunakan Selama Masa Pengkulturan Embrio Kelapa Kopyor

Protokol Media	Media yang Digunakan		
	Perkecambahan	Sub Kultur I, II, III	Sub Kultur IV
PI (UPLB/Kontrol)	Y ₃ Cair	Y ₃ Padat	Y ₃ Cair
P II (Y3p; Y3p; Y3p)	Y ₃ Padat	Y ₃ Padat	Y ₃ Padat
P III (Y3p; Y3p; Y3c)	Y ₃ Padat	Y ₃ Padat	Y ₃ Cair
P IV (MSp; MSp; MSp)	MS Padat	MS Padat	MS Padat
P V (MSc; Y3p; Y3c)	MS Cair	Y3 Padat	Y ₃ Cair

Isolasi dan Sterilisasi Embrio

Embrio diisolasi berupa silinder endosperm dari buah kelapa kopyor umur 11-12 bulan dengan bantuan alat spatula berukuran 2 cm. Silinder endosperm dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi akuades, siap untuk disterilisasi. Sterilisasi endosperm dilakukan dengan menggunakan klorok 20% selama 10 menit dan dibilas dengan akuades steril. Di dalam *Laminar Air Flow* embrio diekstrak dari silinder endosperm. Sterilisasi embrio menggunakan klorok 10% selama 5 menit yang dilakukan dua kali. Sebelum diinokulasi embrio dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali.

Penanaman dan Perkecambahan Embrio

Embrio yang sudah steril ditanam ke dalam media sesuai dengan perlakuan protokol medianya. Jika embrio sudah berkecambah, embrio dipindah ke serangkaian protokol media yaitu media subkultur I dan planlet disubkultur setiap 3 bulan sekali sampai subkultur yang ke 3. Terakhir, perpindahan planlet kelapa kopyor pada periode berikutnya dilakukan pada media protokol untuk subkultur IV (Tabel 1).

Kultur embrio diletakkan di ruang gelap dengan suhu 20-25°C selama tahap perkecambahan. Setelah berkecambah embrio dipindah ke ruang terang dengan pencahayaan 5000 flux photoperiod 8-9 jam dalam cahaya dari lampu inflorescence.

Pemberian ZPT Auksin IBA

Planlet-planlet hasil kultur embrio sigotik yang belum berakar setelah subkultur IV dipindah ke media Eeuwens yang mengandung IBA 1, 2, dan 3 mg/l. Setelah planlet keluar akar primer dan akar lateral yang cukup, planlet sudah siap untuk proses aklimatisasi yaitu dikeluarkan dari ruang kultur.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembentukan plantlet sempurna kelapa kopyor terjadi pada semua protokol media. Protokol media II dan III, yaitu media Eeuwens padat pada fase perkecambahan dan pendewasaan planlet. Protokol media ini menghasilkan persentase planlet relatif tinggi dibandingkan dengan protokol media lainnya maupun dengan Protokol UPLB (Tabel 2). Planlet sempurna yang diperoleh oleh kedua protokol tersebut sekitar 30%. Protokol II menghasilkan lebih banyak planlet sempurna daripada Protokol media III, namun Protokol III menghasilkan persentase planlet total lebih tinggi daripada Protokol II. Jika planlet-planlet yang tidak sempurna (tanpa akar) pada Protokol media III dapat distimulir perakarannya, maka total planlet sempurna yang dapat diaklimatisasi lebih banyak pada Protokol III.

Pertumbuhan tunas dan akar pada Protokol II dan III lebih sempurna dan proporsional antara pertumbuhan tunas dan akar dibandingkan dengan protokol media lainnya. Seperti Protokol UPLB yang memperlihatkan pertumbuhan daun yang lambat dan akar lateral terhambat (Tabel 3). Begitu juga dengan Protokol IV dan V yang memakai media dasar MS menunjukkan pertumbuhan akar yang terhambat. Antara Protokol II dan III memperlihatkan perbedaan pada pertumbuhan tunas dan akar, Protokol II lebih baik dalam merangsang pertumbuhan tunas dibandingkan Protokol III. Sebaliknya Protokol III pertumbuhan akar planletnya jauh lebih baik daripada Protokol II.

Tabel 2.
Persentase Pembentukan Planlet Kultur Embrio Sigotik Kelapa Kopyor
pada Masing-masing Perlakuan Protokol Media

Protokol Media	Keberhasilan Pembentukan Planlet (%)		
	Planlet Tunas	Planlet Sempurna (akar+tunas)	Total Planlet yang Terbentuk
PI (UPLB/Y3c;Y3p;Y3c)	5.00	25.00	30.00
P II (Y3p; Y3p; Y3p)	16.10	32.00	48.10
P III (Y3p; Y3p; Y3c)	14.28	28.60	57.16
P IV (MSp; MSp; MSp)	14.68	17.50	32.14
P V (MSc; Y3p; Y3c)	33.30	21.65	38.20

Keterangan : c = cair; p = padat

Y = media Eeuwens, MS= media Murashige & Skoog

Tabel 3.
Rata-rata Panjang Tunas, Jumlah Daun, Panjang Akar Primer,
dan Jumlah Akar Lateral Planlet Kelapa Kopyor pada Masing-masing Protokol Media

Protokol Media	Panjang Tunas (cm)	Jumlah Daun Sempurna	Panjang Akar Primer (cm)	Jumlah Akar Lateral
PI (UPLB/ Y3c;Y3p;Y3c)	2.75±0.50	0.00	1.40±1.98	0.00
P II (Y3p; Y3p; Y3p)	8.75±3.37	2.00±0.54	2.60±2.01	4.00±5.68
P III (Y3p; Y3p; Y3c)	4.16±2.93	1.30±0.00	6.50±4.77	15.50±4.72
P IV (MSp; MSp; MSp)	3.70±1.59	2.00±0.00	1.67±1.76	0.00
P V (MSc; Y3p; Y3c)	2.50±0.00	2.00±0.00	1.00±0.00	0.00

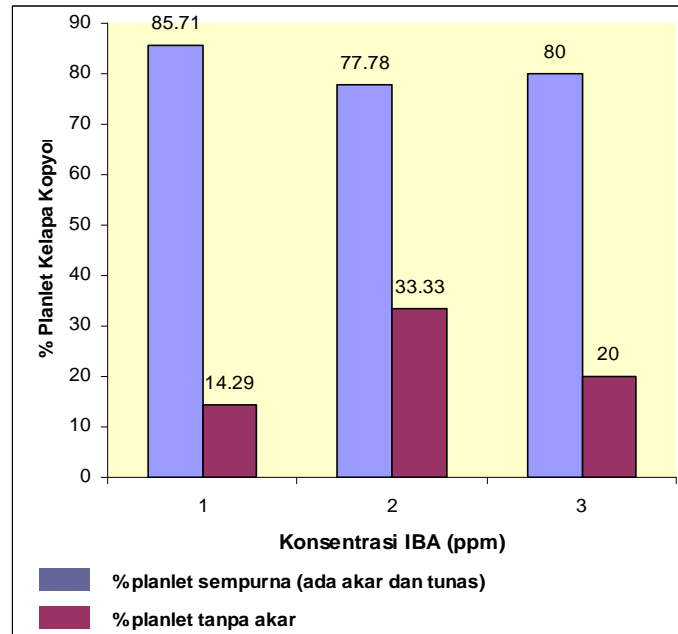
Keterangan : p = padat, c=cair

0 = belum membentuk akar atau daun

Tabel 4.
Pertumbuhan Tunas dan Akar Planlet Kelapa Kopyor Asal Kultur Embrio Sigotik
pada Media Eeuwens dengan Penambahan Berbagai Konsentrasi IBA Sebelum Diaklimatisasi

Perlakuan IBA	Tinggi planlet (cm)	Jumlah Daun	Lebar Daun (cm)	Panjang Akar Primer (cm)	Jumlah Akar Lateral/Sekunder
1 ppm	21.01a	2.60a	1.62a	1.36a	1.5b
2 ppm	16.81a	2.37a	1.62a	1.00a	7.5a
3 ppm	16.79a	2.92a	1.56a	0.83a	4.5ab

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata menurut Uji Duncan Multiple Range Test (DMRT) 5%



Gambar 1. Persentase planlet kelapa kopyor sempurna dan planlet tanpa akar pada masing-masing media Eeuwens yang mengandung IBA 1, 2, dan 3 mg/l

Pada periode pra-aklimatisasi, planlet yang distimulir perakarannya dengan IBA menunjukkan bahwa ZPT auksin IBA mampu merangsang keluarnya akar primer planlet kelapa kopyor asal kultur embrio sigotik. Dengan konsentrasi IBA 1 ppm sudah dapat menghasilkan planlet sempurna sebesar 85% (Gambar 1). Namun untuk merangsang keluarnya akar lateral dibutuhkan konsentrasi IBA lebih dari 1 ppm. Konsentrasi 2 ppm merupakan konsentrasi yang terbaik untuk merangsang keluarnya akar lateral planlet kelapa kopyor (Tabel 4). Konsentrasi IBA lebih dari 2 ppm menghasilkan akar lateral yang tidak berbeda nyata bahkan cenderung menurun.

Komposisi dan rangkaian protokol media disesuaikan dengan kondisi kultur yang akan dikembangkan. Untuk genotipe kelapa kopyor yang ada di Kabupaten Sumenep (Sentra Kelapa Kopyor di Jawa Timur), protokol media yang paling sesuai adalah media dasar Eeweuns (Y3) dengan bentuk media padat (Protokol I dan II) baik pada fase awal (tahap perkecambahan) maupun fase berikutnya (tahap subkultur I, II dan III). Hal yang menarik adalah akar lateral planlet dari kultur embrio sigotik tidak dapat berkembang bila bentuk media pada fase perkecambahan cair, seperti yang terjadi pada Protokol UPLB atau Protokol IV. Tampaknya pertumbuhan kelapa kopyor kurang sesuai pada media cair terutama

pada fase perkecambahan, hal yang sama terjadi juga pada planlet kelapa yang dikulturkan oleh Miftahorachman *et.al.* (1991), kultur kelapa lambat tumbuh dan umur 4 bulan belum membentuk akar pada Protokol UPLB yang dimodifikasi. Sebagian besar peneliti kelapa memakai media dasar Eeuwens untuk mengkulturkan embrio kelapa sigotik (de Guzman, 1971) maupun embrio kelapa somatik (Blake, 1990; Hoher *et.al.*, 1998; Adkins *et.al.*, 2002).

Apapun protokol yang digunakan dalam pengkulturkan embrio sigotik kelapa atau kelapa kopyor selama pertumbuhan planlet, ada sejumlah planlet yang tidak tumbuh normal sebagaimana tanaman yang mempunyai akar dan tunas. Planlet-planlet yang tidak sempurna ini terutama planlet yang belum mempunyai akar umumnya diperlakukan dengan penambahan zat pengatur tumbuh dan dipindah ke media baru. Nurita-Toruan (1978) menambahkan IAA 10 ppm untuk memperbaiki pertumbuhan akar kelapa. Verdeil *et.al.* (1997) menyatakan bahwa pengakaran merupakan problem dalam pengkulturkan kelapa di masa lalu. Perlakuan yang terbaik adalah dengan menambahkan NAA 20 mg/l. Pada penelitian yang dilakukan ini ternyata penambahan IBA 2 ppm sudah cukup merangsang keluarnya akar primer dan akar

lateral pada planlet kelapa kopyor yang belum berakar.

4. KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil dari pengujian berbagai protokol media dan penambahan IBA ke media kultur embrio kelapa kopyor pra-aklimatisasi adalah:

1. Protokol Media II dan III (serangkaian media Y3 padat dan serangkaian media Y3padat-cair) menunjukkan keberhasilan pembentukan plantlet total lebih tinggi dari pada protokol media lainnya dengan persentase mencapai 50%. Selain itu pertumbuhan tunas dan akar pada protokol media tersebut berjalan cukup baik dan stabil.
2. Embrio kelapa kopyor genotipe Sumenep ternyata sulit membentuk akar pada Protokol UPLB dan media MS padat atau cair pada fase perkecambahan.
3. Penambahan auksin IBA cukup efektif merangsang keluarnya akar primer planlet kelapa kopyor asal kultur embrio sigotik dengan persentase keberhasilan sekitar 80%.
4. Konsentrasi IBA 2 ppm merupakan konsentrasi yang cukup efektif untuk memperbaiki perakaran planlet kelapa kopyor asal kultur embrio sigotik.

DAFTAR PUSTAKA

Adkins, S.W., Y.M.S. Samosir, A. Nikmatullah, R. Wilkins, Ogle & S. Heterington. 2002. Towards Clonal Propagation of Coconut. *Acta Horticulture* 575:104-110

Blake, J. 1990. Coconut (*Cocos nucifera* L.): Micropropagation. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* Vol. 10, Legumes and Oilseed Crops I.(ed. By Y.P.S. Bajaj). Springer-Verlag, Berlin. Pp. 539-554.

Catibog, N., 2001. Improved Embryo Culture Protocol for Makapuno Developed. <<http://www.stii.dost.gov.ph/sntpost/NovPostWeb/Feb2kl/pg11b.htm>> Accessed 22 February, 2002).

de Guzman, E.V. 1971. The Growth and Development of Coconut "Macapuno" Embryo *In Vitro* I. The Induction of Rooting. *Phil.Agr.* 53:377-380.

Eeuwens, C.J. 1976. Mineral Requirements of Cultural Coconut Tissue. *Physiol. Plant.* 36:23-24

Engelman, F. 1997. Current State of the Art and Problems with *In Vitro* Culture of Coconut Embryos. *In: Coconut Embryo In Vitro Culture.* Batugal, P.A. and F. Engelman (eds.). Proceedings of the First Workshop on Embryo Culture 27-31 Oktober 1997 Banao, Guinobatan, Albay. Philippines.

Hocher, V.J., F. Verdell, C.Crosdemange, R.Huel, Y. Bourdeix, A. N'Ch, R. Sangare, H.J.Hornung, E. Jacobson, C. Rillo, Gropeza, and S. Hamon. 1998. The Development of *In vitro* Vegetative Propagation in Coconut (*Cocos nucifera* L.). *Agricultures.* No.7, Vol.6. 499.

Mashud, N. 1999. Kultur Embrio Kelapa. Laporan Bulanan Pusat dan Pengembangan Perkebunan Juni 1999. Hal 6-10.

Miftahorachman, S. Donata, Pandin, dan T. Rompas. 1991. Pertumbuhan Embrio Kelapa pada Media Eeuwens yang Dimodifikasi. *Buletin Balika* No.14 Mei 1991 Hal: 114-124

Sukendah. 2003. Potensi dan Pengembangan Kelapa Kopyor Secara *In vitro* di Tiga Kabupaten di Jawa Timur. Laporan Penelitian Mandiri. Fakultas Pertanian. UPN "Veteran" Jawa Timur.

Tahardi, J.S. 1997. Kelapa Kopyor sebagai Komoditi Alternatif Agribisnis. *Warta Puslit Bioteknologi Perkebunan* 1997 Vol III (1), Hal 16 – 21.

Toruan, N. 1978. Pertumbuhan dan Perkembangan Embrio Kelapa (*Cocos nucifera* L.) dalam Kultur Aseptik. *Menara Perkebunan* 1978 Vol. 46 (5), Hal 213 – 216.

Verdeil JL, Hocher V, Triques K, Lyakurwa R, Rival A, Durand-Gasselin T, Engelmann F, Sangare A, and Hamon S. 1997. State of Research on Coconut Embryo Culture and Acclimatization Techniques in the IDEFPR (Cote d'Ivoire) and ORSTOM/CIRAD Laboratories (France). Proceedings of the First Workshop on Embryo Culture, 27-31 October 1997. Albay. Philippines.