

**PENGEMBANGAN TEKNIK PENYELAMATAN  
EMBRIO KELAPA KOPYOR (*Cocos nucifera* L.)  
SECARA *IN-VITRO***



Disusun oleh:

*Hari Prasetyo dan Adi Rachmat*

**LABORATORIUM BIOTEKNOLOGI  
JURUSAN AGRONOMI FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS PEMBANGUNAN NASIONAL "VETERAN" JAWA TIMUR  
2003**

# **Pengembangan Teknik Penyelamatan Embrio Kelapa Kopyor (*Cocos nucifera* L.) Secara *in-vitro***

*Hari Prasetyo dan Adi Rachmat*

Laboratorium Bioteknologi, Jurusan Agronomi, Fakultas Pertanian  
UPN “Veteran” Jawa Timur

## **Abstrak**

Buah kelapa kopyor di lapang sangat sulit ditemukan. Buah ini hanya ditemukan pada pohon kelapa biasa yang mengandung gen kopyor. Umumnya hanya 1-2 buah per pohon. Secara alami kelapa kopyor tidak bisa diperbanyak karena cadangan makanan (daging buah) rusak (kopyor) sehingga embrio tidak dapat memanfaatkan sumber makanan untuk berkecambah. Satu-satunya cara untuk menyelamatkan embrio agar dapat berkecambah adalah dengan teknik kultur embrio dengan kondisi yang aseptik. Ada 2 set eksperimen yang dilaksanakan, yaitu (1) pengujian berbagai protokol media untuk mencari rangkaian kegiatan sub kultur media yang cocok untuk embrio kelapa kopyor, dan (2) pengujian berbagai bahan aditif ke dalam media kultur untuk mencari bahan suplemen yang baik guna meningkatkan pertumbuhan plantlet kelapa kopyor. Secara umum embrio kelapa kopyor dapat ditumbuhkan pada media yang diuji, dengan daya kecambah berkisar antara 70-90%. Pertumbuhan embrio yang paling baik ditunjukkan oleh protokol media dengan komposisi  $Y_3$  padat: $Y_3$  padat: $Y_3$  padat (serangkaian media Eeuwens padat pada tahap inisiasi, tahap subkultur I dan subkultur II). Sebaliknya embrio kelapa kopyor sangat lambat berkecambah pada serangkaian media Eeuwens cair (protokol media  $Y_3$  cair: $Y_3$  cair: $Y_3$  cair). Bahan aditif yang cocok untuk ditambahkan dalam media kultur adalah air kelapa. Pertumbuhan embrio kelapa kopyor mengalami stagnasi pada media dengan bahan aditif ekstrak kacang hijau.

Kata kunci: kelapa kopyor, kultur embrio, protokol media, bahan aditif

## **PENDAHULUAN**

Kelapa kopyor masih merupakan buah yang eksklusif, mahal, langka dan tidak selalu tersedia di pasaran, sehingga harganya menjadi 10-15 kali lebih mahal dari kelapa biasa. Buah kelapa kopyor ditandai dengan tekstur daging buah yang lunak, berbutir dan mudah lepas dari tempurungnya. Karakter daging buah yang demikian menyebabkan buah kelapa kopyor gagal untuk berkecambah, karena daging buah (endosperm) yang merupakan sumber bahan makanan embrio kelapa cepat membusuk jika ditanam dengan cara konvensional.

Cara untuk menyelamatkan dan menumbuhkan embrio kelapa kopyor tersebut adalah dengan menggunakan teknik kultur embrio yaitu menanam embrio kelapa kopyor di dalam media buatan yang mengandung bahan organik, anorganik, vitamin, gula dan hormon dalam kondisi *in-vitro*. Dengan teknik penyelamatan ini dapat diperoleh buah kelapa kopyor lebih kurang 92%. Keberhasilan teknik penyelamatan embrio kelapa kopyor banyak ditentukan oleh susunan dan komposisi media kulturnya. Saat ini terdapat beberapa macam media kultur baku untuk tanaman kelapa yang dikembangkan oleh Filipina, India dan Perancis.

Faktor lain yang mempengaruhi keberhasilan kultur embrio kelapa kopyor adalah penambahan bahan aditif sebagai sumber hormon, vitamin, protein, karbohidrat dan mineral ke dalam media kultur yaitu media  $Y_3$  (Eeuwens).

Penggunaan bahan aditif diharapkan dapat melengkapi dan meningkatkan ketersediaan nutrisi yang terkandung dalam media Eeuwens sehingga dapat meningkatkan dan memperbaiki pertumbuhan embrio kelapa kopyor selama dalam masa kultur serta juga diharapkan untuk mencari alternatif pengganti zat pengatur tumbuh sintetik yang kini harganya sulit untuk dijangkau.

Teknik kultur embrio kelapa kopyor di Indonesia telah dikembangkan sejak tahun 1980 oleh berbagai lembaga penelitian. Hasil dari berbagai penelitian hanya melaporkan tentang media yang cocok untuk digunakan dalam kultur embrio kelapa kopyor namun masih belum ada penelitian tentang protokol media baku atau penambahan bahan aditif yang sesuai dengan pertumbuhan embrio kelapa kopyor di Indonesia khususnya di Jawa Timur. Hasil penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian UPN “Veteran” Jawa Timur dengan menggunakan protokol UPLB Filipina tanpa menggunakan bahan aditif menunjukkan pertumbuhan embrio yang lambat dan sulit membentuk akar.

Tampaknya jenis kelapa kopyor di Jawa Timur memerlukan rangkaian media yang berbeda dengan kelapa kopyor yang ada di Filipina. Penelitian yang dilakukan ini sangat penting untuk mencari protokol media dan bahan aditif yang sesuai bagi pertumbuhan embrio kelapa kopyor yang ada di Jawa Timur.

## TINJAUAN PUSTAKA

### Buah Kelapa Kopyor

Buah kelapa kopyor diperoleh dari pohon kelapa yang memiliki sifat kopyor (gen kopyor) sehingga sebagian buahnya normal dan sebagian buahnya tidak normal (kopyor). Sifat kopyor dibawa oleh pasangan gen resesif (kk) yang merupakan gabungan dari dua gen kopyor yang berasal dari pohon yang sama ataupun berbeda. Sifat tersebut tidak akan muncul apabila gen kopyor yang resesif (k) berpasangan dengan gen kelapa biasa (K) yang dominan. Jadi, buah kelapa kopyor hanya terbentuk apabila terjadi persilangan antar buah yang memiliki sifat kopyor (Zuniga, 1953 dalam Tahardi, 1997).

Secara alami kelapa kopyor sulit untuk diperbanyak karena daging buah sebagai cadangan makanan untuk embrio mengalami kerusakan sehingga embrio tidak dapat berkecambah (Tahardi, 1997).

### Protokol Media Kultur Embrio Kelapa Kopyor

Protokol media adalah rangkaian baku kegiatan penggantian media kultur selama tahapan kultur. Menurut Sukanto (2001), terdapat beberapa media kultur yang digunakan dalam kultur embrio kelapa kopyor yaitu media MS (Murashige dan Skoog), media White modifikasi De Guzman, media Gamborg dan media Eeuwens. Del Rosario (1997) dalam Batugal dan Engelmann, (1998) menjelaskan bahwa media Eeuwens dan MS lebih sering digunakan untuk kultur embrio kelapa kopyor karena terbukti memberikan pertumbuhan yang lebih baik dibandingkan dengan penggunaan media kultur yang lain. Sementara itu bentuk media yang dapat digunakan adalah dalam bentuk padat atau cair pada fase *in-vitro* atau kombinasi antara media padat dan cair (Engelmann, 1997 dalam Batugal dan Engelmann, 1998).

Beberapa protokol media yang telah dibakukan adalah protokol media UPLB Filipina yang menggunakan media Y<sub>3</sub> yang dimodifikasi serta menggunakan kombinasi bentuk padat dan bentuk cair selama dalam tahapan kultur. Pada tahap inisiasi menggunakan media Y<sub>3</sub> cair, kemudian saat tahap sub kultur I menggunakan media Y<sub>3</sub> padat dan pada saat sub kultur II menggunakan media Y<sub>3</sub> cair. Protokol media PCA Filipina menggunakan media Y<sub>3</sub> yang telah dimodifikasi. Selama tahapan pengkulturan, mulai dari tahap inisiasi sampai tahap sub kultur II, protokol ini menggunakan bentuk media cair. Protokol media CPCRI India juga menggunakan media Y<sub>3</sub> yang telah dimodifikasi dan menggunakan kombinasi bentuk padat dan bentuk cair selama dalam tahapan kultur. Pada tahap inisiasi dan sub kultur I menggunakan media Y<sub>3</sub> padat, kemudian saat tahap sub kultur II menggunakan media Y<sub>3</sub> cair. Sedangkan protokol media ORSTOM/CIRAD Perancis menggunakan media MS yang telah dimodifikasi. Selama tahap pengkulturan, protokol media ini menggunakan media dalam bentuk cair.

### Bahan Aditif

Komposisi media kultur jaringan disamping terdiri dari unsur-unsur hara makro, mikro dan vitamin juga ditambahkan

persenyawaan kompleks seperti air kelapa, casein hydrolysate, ekstrak ragi, ekstrak tomat, ekstrak kentang, ekstrak pisang dan ekstrak lainnya (Gunawan, 1997). Bahan-bahan organik tersebut ditambahkan ke dalam media untuk mendukung pertumbuhan embrio yang optimal.

Salah satu bahan aditif yang umumnya dipakai dalam kegiatan kultur jaringan adalah air kelapa yang mengandung mio-inositol, leuko-antosianin dan sitokinin yang mempunyai aktivitas pembelahan sel. Pemberian air kelapa dimaksudkan untuk mendorong induksi tunas adventif, karena penambahan air kelapa dapat meningkatkan pembelahan sel (Steward, 1958 cit.; Pierik, 1987 dalam Priyono & Danimihardja, 1991) dan mendorong pembentukan organ (Bjohwani dan Razdom, 1983 dalam Priyono & Danimihardja, 1991) yang dapat meningkatkan peranan phytohormon dalam proses embriogenesis somatik maupun organogenesis.

Bahan aditif lain yang dapat ditambahkan adalah taoge yang mengandung vitamin, protein, lemak dan karbohidrat yang berperan dalam pertumbuhan embrio (Marzuki dan Soeprapto, 2001). Buah tomat juga dapat ditambahkan sebagai bahan untuk sumber vitamin, gula, asam amino dan mineral (Tugiyono, 1999). Gunawan (1997) menambahkan bahwa sari buah tomat ditambahkan dalam media kultur sebanyak 200 gr/l.

Akhir-akhir ini banyak digunakan ragi sebagai bahan aditif dimana ragi yang telah diekstrak dapat menguraikan gula menjadi alkohol dan berbagai zat organik lain. Ragi termasuk bersel tunggal, tidak berklorofil dan hidupnya heterotrof (Dwijoseputro, 1981). Sel-sel ragi mengandung karbohidrat, vitamin, nitrogen dan mineral. Ragi yang ditambahkan dalam media kultur berkisar antara 0,5 gr/l sampai 2 gr/l (Frazier dan Westhoff, 1967).

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Bioteknologi Jurusan Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Pembangunan Nasional "Veteran" Jawa Timur, Surabaya. Pelaksanaan penelitian dimulai bulan April 2002 sampai dengan bulan Oktober 2002.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Laminar Air Flow yang berfungsi sebagai tempat penabur eksplan. Autoclave digunakan untuk mensterilkan alat-alat gelas, dissecting kit dan media kultur sebelum digunakan. Timbangan analitik berfungsi untuk menimbang bahan media sampai satuan yang kecil (miligram). Magnetic Hot-Stirer digunakan untuk mengaduk, melarutkan dan memanaskan bahan kimia sehingga bahan kimia dapat larut dengan baik. pH meter digunakan untuk mengukur derajat keasaman media. Alat-alat lain yang digunakan selama pelaksanaan kultur embrio adalah tabung reaksi, erlenmeyer, gelas ukur, gelas piala, petridish, pipet, pengaduk, pinset, skalpel/pisau, lampu bunsen/spiritus, botol alkohol, sprayer, kompor gas, corong, kamera, kertas saring, aluminium foil, blender dan water destilator.

Bahan-bahan yang digunakan selama penelitian adalah embrio kelapa kopyor (dari buah kelapa kopyor

umur 11-12 bulan), bahan-bahan kimia untuk media MS dan media Eeuwens, sari buah tomat, sari taoge kacang hijau, ekstrak ragi Fermipan, air kelapa, bubuk agar, alkohol 70% dan 96%, spiritus, klorox, dan aquadest.

Teknik penyelamatan embrio kelapa kopyor dilakukan dengan melaksanakan 2 rangkaian percobaan laboratorium, yaitu:

#### A. Pengujian Berbagai Protokol Media

Penelitian ini merupakan percobaan yang disusun berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) 1 faktor dengan 6 perlakuan yang diulang sebanyak 20 kali. Tabel 1 adalah bentuk perlakuan yang akan dilakukan.:

**Tabel 1. Macam Perlakuan dan Media yang Digunakan Selama Masa Kultur**

Protokol Media	Media yang Digunakan		
	Inisiasi	Sub Kultur I	Sub Kultur II
P <sub>0</sub> UPLB/kontrol	Y <sub>3</sub> Cair	Y <sub>3</sub> Padat	Y <sub>3</sub> Cair
P <sub>1</sub> Protokol Media I	Y <sub>3</sub> Cair	Y <sub>3</sub> Cair	Y <sub>3</sub> Cair
P <sub>2</sub> Protokol Media II	Y <sub>3</sub> Padat	Y <sub>3</sub> Padat	Y <sub>3</sub> Padat
P <sub>3</sub> Protokol Media III	MS Padat	MS Padat	MS Padat
P <sub>4</sub> Protokol Media IV	Y <sub>3</sub> Cair	MS Padat	Y <sub>3</sub> Cair
P <sub>5</sub> Protokol Media V	MS Cair	Y <sub>3</sub> Padat	Y <sub>3</sub> Cair

Parameter yang diamati selama penelitian berlangsung dan sebagai evaluasi keberhasilan protokol media antara lain (1) Keberhasilan pembentukan plantlet yang sempurna, (2) Pertumbuhan plantlet, yang meliputi, jumlah daun, lebar daun, panjang plantlet, panjang akar primer dan jumlah akar lateral, dan (3) Vigor plantlet yang ditunjukkan dengan gambar atau foto.

#### B. Pengujian Berbagai Bahan Aditif

Penelitian ini merupakan percobaan yang disusun berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) 1 faktor dengan 5 perlakuan yang diulang sebanyak 30 kali. Berikut adalah bentuk perlakuan yang akan dilakukan :

- A = tanpa bahan aditif
- B = air kelapa
- C = sari buah tomat
- D = sari taoge kacang hijau
- E = ekstrak ragi

Parameter yang diamati selama tahap inisiasi antara lain: (1) Pencoklatan atau browning, (2) Persentase daya kecambah, dan (3) Kecepatan perkecambahan. Parameter yang diamati selama tahap sub kultur I dan II antara lain: (1) Pertumbuhan plantlet yang meliputi, panjang plantlet, jumlah daun, lebar daun, panjang akar primer dan jumlah akar lateral serta persentase plantlet yang terbentuk selama masa pengkulturan.

## HASIL PENELITIAN

### A. Pengujian Berbagai Protokol Media

#### Keberhasilan Pembentukan Plantlet

Keberhasilan pembentukan plantlet pada masing-masing protokol media sangat bervariasi (Tabel 2). Protokol media II memiliki persentase pembentukan plantlet yang paling tinggi daripada protokol media kontrol. Keberhasilan pembentukan plantlet yang sempurna ditunjang oleh faktor keberhasilan embrio dalam membentuk tunas dan akar. Berdasarkan data yang ada, protokol media II memiliki efektifitas dalam pembentukan plantlet karena hampir keseluruhan embrio berhasil membentuk plantlet yang sempurna, sedangkan embrio pada protokol media kontrol hanya sedikit membentuk plantlet dan lebih banyak membentuk tunas. Protokol media III dan V memiliki pembentukan plantlet yang sama namun pada protokol media III terdapat embrio yang hanya dapat membentuk tunas saja atau akar saja sehingga sejalan dengan berjalannya waktu masih memiliki harapan untuk membentuk plantlet yang sempurna.

**Tabel 2. Persentase Keberhasilan Pembentukan Plantlet pada Masing-Masing Protokol Media**

Protokol Media	Keberhasilan Pembentukan Plantlet (%)			Jumlah Plantlet Terbentuk (buah)
	Membentuk Plantlet Sempurna	Hanya Membentuk Tunas	Hanya Membentuk Akar	
P <sub>0</sub>	5	25	5	35
P <sub>1</sub>	-	-	-	-
P <sub>2</sub>	25	10	0	35
P <sub>3</sub>	10	15	10	35
P <sub>4</sub>	-	-	-	-
P <sub>5</sub>	10	0	0	10

Keterangan: - = tidak ada pertumbuhan setelah perkecambahan

0 = belum membentuk tunas dan akar

#### Pertumbuhan Plantlet

Hasil analisis statistik dari perlakuan protokol media terhadap pertumbuhan plantlet yang berupa rata-rata panjang plantlet, lebar daun, jumlah daun, panjang akar primer dan jumlah akar lateral pada akhir sub kultur II menunjukkan pertumbuhan yang beragam (Tabel 3).

Berdasarkan Tabel 3, embrio yang ditanam di dalam protokol media I tidak ada yang berkecambah meskipun telah dilakukan sub kultur I sehingga tidak ada yang berhasil mencapai tahap sub kultur II. Pada protokol media IV, embrio mengalami stagnasi pada saat sub kultur I sehingga tidak dapat membentuk tunas dan akar.

**Tabel 3. Pertumbuhan Plantlet pada Masing-Masing Protokol Media**

Protokol Media	$\bar{X} - SD$				
	Panjang Plantlet (cm)	Lebar Daun (cm)	Jumlah Daun (helai)	Panjang Akar Primer (cm)	Jumlah Akar Lateral (buah)
P <sub>0</sub>	2,750 ± 0,354	0	0	1,400 ± 1,980	0
P <sub>1</sub>	-	-	-	-	-
P <sub>2</sub>	8,750 ± 3,370	0,675 ± 0,483	2,000 ± 0,535	2,600 ± 2,014	4,000 ± 5,682
P <sub>3</sub>	3,700 ± 1,587	0,233 ± 0,404	2,000 ± 0	1,667 ± 1,756	0
P <sub>4</sub>	-	-	-	-	-
P <sub>5</sub>	10,250 ± 3,889	1,450 ± 0,495	2,500 ± 0,707	8,250 ± 0,354	12,000 ± 4,243

Keterangan: - = tidak terbentuk tunas dan akar primer  
0 = belum membentuk daun sempurna dan/atau akar lateral

Pertumbuhan plantlet yang paling pesat dicapai oleh protokol media V, selanjutnya dicapai oleh protokol media II dan protokol media III. Pertumbuhan plantlet ketiga protokol media tersebut (protokol media V, II dan III) masih lebih baik dibandingkan dengan protokol media kontrol yang belum membentuk daun sempurna dan akar lateral

#### Vigor Plantlet

Vigor plantlet masing-masing protokol media dapat ditunjukkan dengan persentase plantlet yang normal dan sehat serta abnormal yang terbentuk, semakin tinggi persentase plantlet normal yang terbentuk berarti semakin banyak plantlet sehat yang siap atau layak untuk diaklimatisasi. Vigor plantlet masing-masing protokol media disajikan pada Tabel 4.

Protokol media II dan IV memiliki jumlah plantlet normal dan sehat yang paling tinggi dibandingkan dengan protokol media lainnya termasuk protokol media kontrol. Protokol media V memiliki plantlet abnormal yang lebih rendah dibandingkan dengan protokol media II, namun protokol media II mampu menghasilkan lebih banyak plantlet sehingga memiliki peluang lebih besar untuk membentuk plantlet normal dibanding protokol media lainnya sehingga dapat disimpulkan bahwa

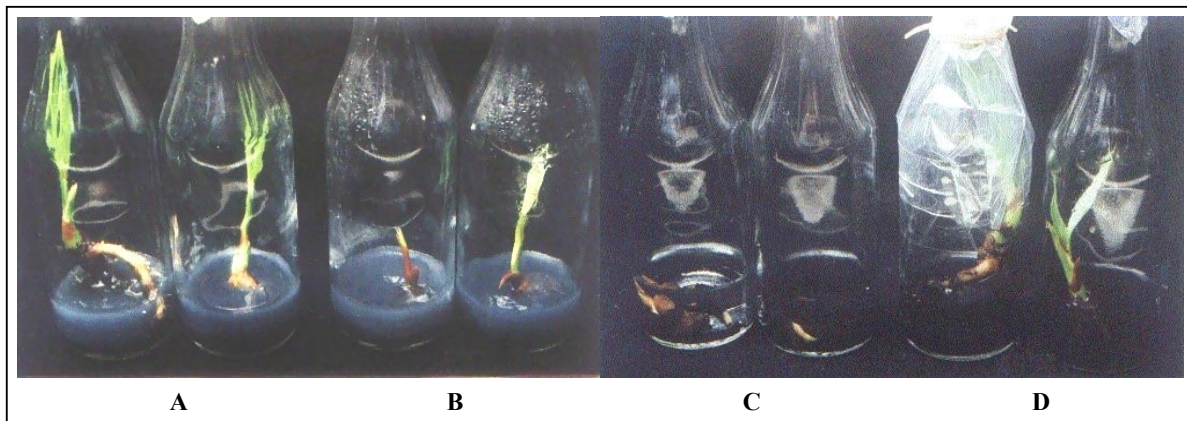
**Tabel 4. Vigor Plantlet pada Masing-Masing Protokol Media**

Protokol Media	Persentase Plantlet Normal dan Sehat	Persentase Plantlet Abnormal
P <sub>0</sub>	0	55,56
P <sub>1</sub>	-	66,67
P <sub>2</sub>	16,67	38,89
P <sub>3</sub>	0	61,11
P <sub>4</sub>	-	16,67
P <sub>5</sub>	11,11	22,22

Keterangan : - = tidak terbentuk plantlet  
0 = belum membentuk plantlet normal dan sehat

protokol media II memiliki vigor plantlet yang lebih baik daripada protokol media V.

Protokol media I, III dan IV tidak menunjukkan adanya plantlet yang normal karena sebagian besar plantlet mengalami keabnormalan namun protokol media III masih memiliki peluang untuk menumbuhkan plantlet yang normal dan sehat daripada protokol media I dan IV. Guna melihat vigor plantlet yang sebenarnya dapat disajikan dalam Gambar 1.



**Gambar 1.** Vigor Plantlet pada Protokol Media II (A) , Vigor Plantlet pada Protokol Media III (B), Vigor Plantlet pada Protokol Media Kontrol/UPLB (C) dan Vigor Plantlet pada Protokol Media V (D).

Gambar 1 menunjukkan vigor plantlet pada protokol media II lebih baik dibandingkan dengan vigor plantlet protokol media III yang ditunjukkan dengan kenormalan kondisi plantlet yaitu telah memiliki 2-3 daun sempurna dan akar primer serta beberapa akar lateral, kondisi plantlet pada protokol media II lebih siap atau layak untuk dilakukan aklimatisasi daripada plantlet pada protokol media III. Kemudian, vigor plantlet pada protokol media kontrol lebih buruk dibandingkan vigor plantlet pada protokol media V karena plantlet pada protokol media kontrol masih berbentuk tunas dan akar primer yang pendek sehingga belum membentuk daun sempurna dan akar lateral. Tampak pada Gambar 2 bahwa plantlet pada protokol media kontrol tenggelam yang dikarenakan pendeknya akar primer. Pada protokol media V nampak vigor plantlet yang lebih baik daripada protokol media kontrol, plantlet telah membentuk 2-3 helai daun dengan akar primer dan akar lateral. Sempurnanya pembentukan daun dan akar tersebut menjadikan plantlet pada protokol media V siap atau layak diaklimatisasi di lapang.

Berdasarkan Tabel 4 dan Gambar 1, vigor plantlet pada protokol media II lebih baik dibandingkan dengan vigor plantlet pada protokol media V, selain ditinjau dari segi kenormalan plantlet juga ditinjau dari kuantitas plantlet normal yang dapat dihasilkan oleh protokol media II yaitu lebih banyak daripada plantlet yang dihasilkan oleh protokol media III. Vigor plantlet pada protokol media III masih lebih baik daripada vigor plantlet pada protokol media kontrol yang nampak pucat dan tenggelam di dalam media

## B. Pengujian Berbagai Bahan Aditif

### Kondisi Embrio Selama Tahap Inisiasi

Kondisi embrio selama tahap inisiasi diamati dari beberapa pengamatan sebagaimana yang tercantum pada Tabel 5 antara lain pencoklatan (browning), persentase daya kecambah dan kecepatan perkecambahan.

Pencoklatan banyak terjadi pada tahap inisiasi, terutama pada media bahan aditif. Tabel 5 menunjukkan embrio yang mengalami pencoklatan selama tahap inisiasi. Pada media tanpa bahan aditif, embrio hampir tidak ada yang mengalami pencoklatan (browning). Embrio yang diinisiasikan pada media dengan bahan aditif sari taoge kacang hijau menunjukkan pencoklatan yang paling tinggi, disusul oleh media dengan bahan aditif ekstrak ragi. Embrio yang dikulturkan pada media dengan bahan aditif sari tomat dan air kelapa menunjukkan pencoklatan paling rendah.

Tabel 5 menunjukkan persentase daya kecambah embrio pada media tanpa bahan aditif dan dengan menggunakan bahan aditif adalah kurang dari 60 %. Persentase daya kecambah yang paling tinggi terdapat dalam media dengan bahan aditif air kelapa dan ekstrak ragi. Peningkatan daya kecambah pada kedua media tersebut sebesar 16 % dibandingkan dengan media tanpa bahan aditif. Bahan aditif lainnya, seperti sari buah tomat, atau sari taoge kacang hijau memperlihatkan daya kecambah lebih rendah bila dibandingkan dengan tanpa bahan aditif.

Embrio pada media yang ditambah dengan bahan aditif rata-rata membutuhkan waktu yang lebih lama untuk berkecambah jika dibandingkan dengan media tanpa bahan aditif untuk berkecambah. Embrio yang dikulturkan pada media dengan bahan aditif sari taoge kacang hijau atau sari buah tomat membutuhkan waktu sekitar 2-3 bulan untuk berkecambah, sedangkan bahan aditif air kelapa membutuhkan waktu sekitar 2 bulan untuk berkecambah.

### Kondisi Plantlet pada Tahap Sub Kultur I dan II

Tabel 6 menunjukkan bahwa pertumbuhan tunas yang meliputi panjang plantlet, jumlah daun dan lebar daun terbaik pada media dengan bahan aditif air kelapa. Sedangkan bahan aditif lainnya seperti sari buah tomat, sari taoge kacang hijau dan ekstrak ragi, pertumbuhan plantletnya masih dibawah pertumbuhan plantlet di

**Tabel 5. Kondisi Embrio pada Masing-Masing Perlakuan Selama Tahap Inisiasi**

Perlakuan	Pencoklatan Browning (buah)	Persentase Daya Kecambah (%)	Kecepatan Perkecambahan (hari)
A (Tanpa Bahan Aditif)	1	37	52
B (Air Kelapa)	6	53	52
C (Sari Buah Tomat)	5	23	88
D (Sari Taoge Kacang Hijau)	25	20	113
E (Ekstrak Ragi)	10	53	80

**Tabel 6. Kondisi Plantlet pada Masing-Masing Perlakuan Selama Tahap Sub Kultur II**

Perlakuan	$\bar{X}$ – SD					Plantlet Terbentuk (%)
	Panjang Plantlet (cm)	Lebar Daun (cm)	Jumlah Daun (helai)	Panjang Akar Primer (cm)	Jumlah Akar Lateral (buah)	
A	12,30 – 10,84	0,50 – 0,70	1,40 – 1,94	1,60 – 1,29	9,00 – 11,57	41,60
B	12,80 – 8,85	1,90 – 0,96	2,00 – 1,22	2,90 – 1,94	3,80 – 4,72	50,00
C	1,10 – 2,24	0,30 – 0,61	0,20 – 0,40	2,00 – 1,75	-	8,30
D	-	-	-	-	-	-
E	3,50 – 2,42	0,20 – 0,27	0,80 – 1,09	1,50 – 1,50	2,40 – 2,30	22,20

Keterangan: - = Tidak tumbuh tunas dan akar

media tanpa bahan aditif.

Sementara itu pertumbuhan akar yang meliputi panjang akar primer dan jumlah akar lateral pada berbagai media sangat beragam. Plantlet pada media air kelapa meskipun mempunyai panjang akar primer yang terpanjang, tetapi jumlah akar lateralnya jauh dibawah plantlet yang di media tanpa bahan aditif. Pertumbuhan embrio pada media sari taoge kacang hijau terhenti setelah fase perkecambahan sehingga tidak bisa membentuk tunas dan akar.

Persentase plantlet yang terbentuk tertinggi pada media air kelapa. Dengan penambahan air kelapa di dalam media, persentase plantlet yang terbentuk meningkat sekitar 10%.

## PEMBAHASAN

### A. Pengujian Berbagai Protokol Media

Embrio yang ditanam pada protokol media I menunjukkan respon yang kontras dibandingkan dengan protokol media kontrol yaitu sebagian besar embrio mengalami stagnasi pada tahap sub kultur I. Saat tahap inisiasi embrio tumbuh dengan normal di dalam media  $Y_3$  cair dan berkecambah sebanyak 35%.

Setelah embrio dipindahkan atau disubkulturkan ke media baru yaitu media  $Y_3$  cair, embrio tidak mengalami pertumbuhan yang berarti sehingga tidak ada embrio yang berhasil membentuk plantlet hingga penelitian berakhir. Hal tersebut disebabkan karena tidak ada pergantian bentuk fisik media yaitu bentuk cair terus-menerus mulai tahap inisiasi sampai tahap sub kultur I sehingga embrio terlalu lama di dalam media cair meskipun telah dilakukan pergantian media dengan media yang sama sesuai dengan protokol media.

Menurut Wattimena (1992), umumnya eksplan (bagian/potongan jaringan tanaman) di dalam kultur *in-vitro* akan cepat tumbuh bila dikulturkan pada media cair karena seluruh permukaan eksplan dapat menyerap semua nutrisi dalam media cair, tetapi hal tersebut berlawanan dengan fenomena yang terjadi pada protokol media I yaitu embrio yang dikulturkan di dalam media cair tidak mengalami pertumbuhan yang berarti.

Kemungkinan secara fisiologis, penyerapan nutrisi untuk pertumbuhan embrio berbeda dengan penyerapan nutrisi yang dilakukan eksplan (bagian/potongan tanaman) yang dikulturkan dalam media cair. Hal yang sama telah dilaporkan oleh Mkumbo, Tembo dan Marealle (1997) dalam Batugal dan Engelmann (1998) bahwa embrio yang terlalu lama di dalam media cair dapat menurunkan persentase perkecambahan, bahkan umumnya tidak berkecambah sama sekali dan apabila berkecambah, embrio tumbuh dengan lambat dan klorofil mengalami defisiensi.

Embrio yang ditanam di protokol media II saat tahap inisiasi dengan menggunakan media  $Y_3$  padat memiliki persentase perkecambahan yang sama dengan protokol media kontrol yaitu sebesar 70%. Selama tahap inisiasi terjadi pemanjangan embrio seperti yang ditunjukkan oleh embrio yang ditanam pada media cair namun pemanjangan embrio tersebut tidak secepat pemanjangan embrio pada media cair. Selama tahap sub kultur II, plantlet yang berhasil membentuk

akar dan tunas dengan rata-rata panjang akar primer sebesar 2,6 cm; rata-rata jumlah akar lateral adalah 4 akar; panjang plantlet 8,75 cm; rata-rata lebar daun adalah 0,675 cm dan rata-rata jumlah daun adalah 2 helai daun.

Pertumbuhan dan vigor plantlet pada protokol media II lebih baik dibandingkan dengan protokol media kontrol yang juga tersusun atas media yang sama yaitu media  $Y_3$ . Hal tersebut diduga karena bentuk media yang berbeda pada masing-masing tahapan pengkulturan yang dapat mempengaruhi pertumbuhan plantlet. Tampaknya media padat yang digunakan terus menerus pada semua tahapan pengkulturan memberikan pertumbuhan yang lebih baik.

Embrio yang ditanam di protokol media III saat tahap inisiasi dengan menggunakan media MS padat memiliki persentase perkecambahan lebih kecil dibandingkan dengan protokol media kontrol yaitu sebesar 55%. Selama tahap inisiasi terjadi pemanjangan embrio yang lebih lambat dibandingkan pemanjangan embrio pada media  $Y_3$  padat saat tahap inisiasi. Selanjutnya pada tahap sub kultur I, hanya 10% embrio yang berhasil membentuk plantlet sempurna, kemudian pada tahap sub kultur II, plantlet yang dapat membentuk akar dan tunas dengan rata-rata panjang tunas sebesar 3,7 cm, rata-rata lebar daun sebesar 0,675 cm, rata-rata jumlah daun sebanyak 2 helai daun dan rata-rata panjang akar primer sebesar 1,667 cm. Persentase plantlet yang abnormal sebanyak 61,11% karena adanya plantlet yang mati dan stagnasi selama tahap sub kultur I yang diduga plantlet tersebut tidak viabel atau mati.

Pertumbuhan dan vigor plantlet pada protokol media III masih lebih baik dibandingkan dengan pertumbuhan dan vigor plantlet pada protokol media kontrol. Namun terdapat perbedaan pertumbuhan plantlet antara protokol media III dengan protokol media II yang memiliki bentuk media yang sama di semua tahapan pengkulturan yaitu media padat. Jenis media yang digunakan pada protokol III berbeda dengan jenis media yang digunakan pada protokol media II. Pada protokol media II menggunakan media  $Y_3$ , sedangkan pada protokol media III menggunakan media MS. Diduga perbedaan pertumbuhan plantlet tersebut karena nutrisi yang terkandung pada media  $Y_3$  lebih lengkap dibandingkan pada media MS. Pada media  $Y_3$  terkandung  $NaH_2PO_4$ ,  $NiCl_6H_2O$ , Folic Acid dan Glycine yang tidak terdapat pada media MS. Tampaknya penambahan unsur tersebut dapat memperbaiki pertumbuhan plantlet kelapa kopyor. Menurut Gunawan (1992),  $NaH_2PO_4$  dan  $NiCl_6H_2O$  berguna untuk proses metabolisme sel dan membentuk perakaran. Folic Acid merupakan jenis vitamin yang sering digunakan dalam media kultur jaringan yang berperan untuk memacu pembelahan sel, kemudian Glycine adalah sumber N organik yang berguna untuk pertumbuhan sel.

Embrio yang ditanam di protokol media IV saat tahap inisiasi dengan menggunakan  $Y_3$  (Eeuwens) cair menunjukkan adanya pertumbuhan sebagaimana pertumbuhan embrio di protokol media lain selama tahap inisiasi. Perkecambahan yang terjadi pada protokol media IV selama tahap inisiasi di media  $Y_3$  (Eeuwens) cair lebih kecil dibandingkan dengan protokol media kontrol yakni hanya sebesar 45%. Setelah 4-6 minggu di tahap inisiasi, embrio dipindahkan ke media yang baru yaitu media MS padat (sub kultur I). Setelah beberapa minggu kemudian, tidak ada

embrio yang berhasil membentuk plantlet maupun membentuk akar dan tunas. Kemungkinan embrio mengalami *transplant shock* yang diakibatkan karena perubahan komposisi dan bentuk media yang berbeda yaitu dari media  $Y_3$  cair media MS padat sehingga sulit untuk membentuk akar dan tunas. Sebaliknya, kesulitan dalam pembentukan akar dan tunas tidak terjadi apabila susunan media terbalik, yaitu embrio ditanam pada media MS saat tahap inisiasi dan media  $Y_3$  pada tahap sub kultur I sebagaimana yang terjadi pada embrio yang ditanam pada protokol V (MS Cair:  $Y_3$  padat:  $Y_3$  padat).

Embrio yang ditanam di protokol media V pada saat tahap inisiasi menggunakan media MS cair memiliki persentase perkecambahan sebesar 65%, kemudian setelah dilakukan sub kultur I, didapatkan persentase plantlet yang sempurna sebesar 10%, selanjutnya saat dilakukan sub kultur II persentase plantlet yang normal sebesar 11,11 % dengan rata-rata panjang plantlet sebesar 10,25 cm, rata-rata lebar daun sebesar 1,45 cm, rata-rata jumlah daun sebanyak 2,5 helai daun, rata-rata panjang akar primer sebesar 8,25 cm dan rata-rata jumlah akar lateral sebanyak 12 buah akar.

Pertumbuhan dan vigor plantlet pada protokol media V ini masih menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan protokol media kontrol. Meskipun nutrisi pada media MS tidak selengkap media  $Y_3$ , namun tampaknya media MS masih dapat digunakan pada tahap inisiasi sebagaimana yang terjadi pada protokol media V ini. Nutrisi yang terkandung pada media MS selama tahap inisiasi diduga masih dapat mencukupi kebutuhan nutrisi yang dibutuhkan embrio untuk membentuk bagian-bagian vegetatif seperti daun dan akar. Pada tahap sub kultur I, media  $Y_3$  padat dapat memacu pertumbuhan akar yang berfungsi sebagai penyerap nutrisi pada media. Demikian pula perpindahan plantlet ke dalam media  $Y_3$  cair saat sub kultur II juga dapat merangsang pertumbuhan akar lateral karena proses penyerapan nutrisi di dalam media cair lebih mudah dibandingkan di media padat.

Protokol media V menunjukkan pertumbuhan plantlet yang tertinggi dengan ditunjukkan tingginya rata-rata dari panjang plantlet, lebar daun, jumlah daun, panjang akar primer dan jumlah akar lateral dari semua protokol media termasuk kontrol, namun ditinjau dari vigor plantlet maka protokol media II menunjukkan vigor yang paling baik bagi pertumbuhan embrio kelapa kopyor daripada protokol media V dan protokol media kontrol.

Protokol media yang terbaik dari semua protokol yang diujikan adalah protokol media II karena berhasil memberikan vigor plantlet yang tinggi dibandingkan dengan protokol media V dan protokol media lain (I, III dan IV) karena vigor plantlet yang tinggi berarti mampu menghasilkan plantlet yang sehat dan normal dengan jumlah yang banyak. Meskipun pertumbuhan daun dan akar plantlet pada protokol media II tidak sebaik pertumbuhan daun dan akar plantlet pada protokol media V, namun seiring dengan waktu, pertumbuhan daun dan akar dapat bertambah sehingga menjadi plantlet yang siap dan layak untuk diaklimatisasi.

Berdasarkan dari fenomena yang terjadi dari berbagai protokol yang diujikan, media yang dapat digunakan untuk tahap inisiasi pada embrio kelapa kopyor adalah media MS dan  $Y_3$  dalam bentuk cair atau padat. Pada tahap sub kultur I

lebih baik menggunakan media  $Y_3$  daripada menggunakan media MS karena nutrisi yang terkandung di dalam media  $Y_3$  lebih lengkap dan lebih sesuai untuk pertumbuhan plantlet kelapa kopyor. Bentuk media yang dapat digunakan pada tahap sub kultur I lebih baik menggunakan dalam bentuk padat karena apabila menggunakan media cair kemungkinan akan terjadi *transplant shock* yang menyebabkan stagnasi/berhenti tumbuh. Selanjutnya pada tahap sub kultur II, bentuk media yang digunakan lebih baik dalam bentuk cair agar nutrisi lebih mudah terserap dan dapat memacu pertumbuhan akar lateral.

## B. Pengujian Berbagai Bahan Aditif

Embrio yang dikulturkan pada media air kelapa menunjukkan pertambahan panjang embrio yang paling besar diantara berbagai macam bahan aditif yang diuji. Bahkan air kelapa memberikan pertambahan panjang embrio yang lebih besar daripada media tanpa bahan aditif. Selain itu plantlet yang ditanam pada media air kelapa menampilkan pertumbuhan yang sempurna seperti pertumbuhan tunas dan akar yang paling baik, persentase plantlet yang terbentuk yang paling tinggi (50 %). Sedangkan pertumbuhan embrio pada perlakuan bahan aditif lainnya tidak sebaik pada media air kelapa. Hal ini karena kandungan nutrisi dari tiap bahan aditif yang diuji berbeda sehingga menampilkan pertumbuhan yang beragam. Air kelapa mengandung senyawa organik kompleks. Selain itu air kelapa mengandung Diphenil Urea yang mempunyai aktifitas seperti kinetin untuk pembelahan sel (Hendaryono dan Wijayani, 1984). Lagipula air kelapa adalah salah satu sumber nutrisi selain endosperm pada perkecambahan embrio kelapa di alam.

Menurut George dan Sherington (1984) air kelapa mengandung sitokinin tetapi kadarnya sulit ditentukan karena tergantung jenis dan umur buah kelapa. Penambahan air kelapa pada media menghasilkan pertumbuhan plantlet yang lebih berwarna hijau serta berbatang tegar.

Pertumbuhan embrio pada media ekstrak ragi memiliki daya kecambah yang tinggi sekitar 53% menyamai media air kelapa. Sel-sel ragi mengandung nitrogen yang terdiri dari protein dan asam nukleat yang dapat meningkatkan pertumbuhan embrio kelapa kopyor. Tampaknya, ragi tidak menunjang pertumbuhan plantlet, meskipun Wattimena (1987) mengemukakan bahwa ragi yang mengandung vitamin dan mineral dapat menunjang pertumbuhan embrio sampai menjadi plantlet.

Sari buah tomat yang ditambahkan pada media kultur tidak dapat dimanfaatkan secara optimal oleh embrio kelapa kopyor. Bahkan pertumbuhan embrio kelapa kopyor terlihat terhambat dengan penambahan bahan aditif ini.

Persentase plantlet yang terbentuk juga tergolong rendah (8,3%) dan waktu yang dibutuhkan untuk melalui sub kultur II jauh lebih lama jika dibandingkan tanpa bahan aditif. Unsur vitamin C, asam amino dan mineral yang terkandung dalam sari buah tomat ternyata tidak dapat terserap sehingga plantlet mengalami kelambatan pertumbuhan.

Embrio kelapa kopyor yang dikulturkan pada media sari taoge kacang hijau tidak mampu tumbuh lagi setelah fase perkecambahan. Kandungan nutrisi yang terdapat dalam



taoge kacang hijau seperti vitamin, lemak dan karbohidrat (Marzuki dan Soeprapto, 2001).

Zat pengatur tumbuh Gibberellin Acid ( $GA_3$ ) yang banyak terkandung pada kotiledon dapat memacu perkecambahan embrio dan pertumbuhan plantlet. Ternyata, embrio kelapa kopyor mengalami hambatan pada perkecambahan embrio dan pertumbuhan plantlet. Embrio memberikan reaksi negatif terhadap bahan aditif ini, sehingga mengakibatkan browning embrio.

Pencoklatan atau browning embrio yang tertinggi terjadi pada media sari taoge kacang hijau jika dibandingkan dengan embrio yang ditanam pada media tanpa bahan aditif atau dengan bahan aditif lainnya. Terjadinya browning diduga karena munculnya senyawa phenol. Embrio mengalami stagnasi pada awal tahap inisiasi sehingga embrio tidak dapat menyerap nutrisi yang terkandung dalam media kultur, akibatnya embrio sulit membentuk tunas dan akar yang merupakan pertumbuhan awal dari embrio untuk melanjutkan fase berikutnya.

Menurut Santoso dan Nursandi (2002) embrio yang mengalami browning menyebabkan kerusakan jaringan sehingga pertumbuhan embrio terhambat.

## KESIMPULAN

1. Embrio kelapa kopyor dapat diselamatkan dengan menggunakan teknik kultur embrio secara *in-vitro*.
2. Embrio kelapa kopyor dapat ditanam di berbagai protokol media yang diujikan dengan respon yang beragam dan umumnya dapat berkecambah sekitar 70%-90%.
3. Terdapat satu protokol media yang dapat dikembangkan menjadi protokol media yang baku yaitu protokol media II ( $Y_3$  padat:  $Y_3$  padat:  $Y_3$  padat).
4. Embrio kelapa kopyor sangat lambat berkecambah pada serangkaian media Eeuwens cair (protokol media  $Y_3$  cair:  $Y_3$  cair:  $Y_3$  cair).
5. Bahan aditif yang cocok untuk ditambahkan dalam media kultur adalah air kelapa.
6. Pertumbuhan embrio kelapa kopyor mengalami stagnasi pada media dengan bahan aditif ekstrak kacang hijau.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ir. Sukendah, MSc selaku dosen pembimbing dan Kepala Laboratorium Bioteknologi Jurusan Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Pembangunan Nasional "Veteran" Jawa Timur, Surabaya yang telah memberikan arahan, bimbingan, nasehat dari awal hingga akhir penelitian.
2. Seluruh jajaran fakultas dan universitas yang telah mendukung penelitian ini.

3. Seluruh rekan sejawat penulis yang telah meluangkan waktu dan tenaga demi terselesaikannya karya ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Batugal P.A dan F. Engelmann. 1998. Coconut Embryo *In-Vitro* Culture. Proceedings of the First Workshop on Embryo Culture 27 – 31 October 1997 Banao, Guinobatan, Albay, Philippines.
- Dwijoseputro, 1981, Dasar-Dasar Mikrobiologi, Djambatan, Malang, 187 Hal.
- Frazier, W. C dan D. C. Westhoff. 1967, Food Microbiology. 2<sup>nd</sup> Edition, Mc Grow Hill Inc, New York.
- George, K.F. dan P. D. Sharrington. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Estem Press, Reading, Breks, Great Britain. 330 p.
- Gunawan, L.W., 1992. Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan. Pusat Antar Universitas IPB, Bogor.
- \_\_\_\_\_, 1997. Teknik Kultur Jaringan.. Institut Pertanian Bogor, 252 Hal.
- Hendaryono, S dan A. Wijayani. 1994, Teknik Kultur Jaringan Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakan Tanaman Secara Vegetatif Modern, Kanisius, Yogyakarta, 139 Hal.
- Marzuki, R dan H. S. Soeprapto. 2001, Bertanam Kacang Hijau, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Priyono dan Danimiharja. 1991, Peranan Air Kelapa Terhadap Produksi Tunas Adventif *In-Vitro* Beberapa Varietas Kopi Arabika. Peta Perkebunan, Jember, Hal 57-61.4
- Santoso dan Nursandi. 2002, Kultur Jaringan Tanaman, UMM Press, Malang.
- Tahardi, J.S. 1997. Kelapa Kopyor sebagai Komoditi Alternatif Agribisnis. Warta Puslit Bioteknologi Perkebunan 1997 Vol III(1), Hal 16 – 21.
- Tugiyono, H. 1999, Bertanam Tomat, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Sukamto, I.T.N. 2001. Kelapa Kopyor: Pembibitan, Budidaya. Penebar Swadaya. Jakarta. 80 Hal.
- Wattimena, G. A. 1987, Zat Pengatur Tumbuh, Fakultas Pertanian IPB, Bogor, 317 halaman.
- \_\_\_\_\_. 1992. Bioteknologi Tanaman. Pusat Antar Universitas IPB, Bogor.