



Australian Government

Australian Centre for
International Agricultural Research

Final report

Penelitian Pendahuluan dan Aktivitas Pengembangan

SRA

Pengembangan manual kultur embrio dan teknik transplantasi embrio untuk pemindahan plasma nutfah kelapa dan produksi bibit jenis kelapa unggul

tanggal diterbitkan

Agustus 2008

disusun oleh

Dr Stephen W. Adkins
School of Land, Crop and Food Sciences, University of Queensland

*Penulis lain /
Contributor /
kolaborator*

Mrs Erlinda Rillo
Mr Osmundo Orense
Albay Research Centre, Philippines Coconut Authority, The Philippines

disetujui oleh

Les Baxter

nomor proyek

HORT/2006/006

FR2008-19b

ISBN

978 1 921434 77 8

diterbitkan oleh

ACIAR
GPO Box 1571
Canberra ACT 2601
Australia

Karya tulis ini diterbitkan oleh ACIAR ABN 34 864 955 427. Kehati-hatian telah dilakukan untuk menjamin kebenaran informasi yang terkandung dalam karya tulis ini. Namun demikian, ACIAR tidak bertanggung jawab atas kebenaran atau kelengkapan informasi atau pendapat yang terkandung di dalamnya. Anda dianjurkan untuk menyelidiki lebih jauh sebelum menggunakan informasi tersebut.

© Commonwealth of Australia 2008 – Dilindungi oleh hak cipta. Selain penggunaan seperti yang tertulis dalam Undang-Undang Hak Cipta 1968, karya tulis ini tidak boleh dicetak ulang tanpa persetujuan dari Persemakmuran. Permintaan dan permohonan untuk pencetakan ulang dapat dikirimkan ke Commonwealth Copyright Administration, Attorney General's Department, Robert Garran Offices, National Circuit, Barton ACT 2600 atau dengan mengunjungi <http://www.ag.gov.au/cca>.

Daftar Isi

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1 | Ucapan terima kasih | 3 |
| 2 | Ringkasan eksekutif | 3 |
| 3 | Pendahuluan | 4 |
| 4 | Manual Kultur Embrio..... | 5 |
| 5 | Pengembangan teknik transplantasi embrio..... | 5 |
| 6 | Masalah yang dihadapi dan keuntungan yang diperoleh | 9 |
| 7 | Kesimpulan dan saran..... | 11 |
| 8 | Referensi | 12 |
| 9 | Lampiran | 13 |
| | Lampiran 1: Manual kultur embrio..... | 13 |
| 1 | Pendahuluan | 14 |
| 2 | Tujuan | 15 |
| 3 | Bahan peralatan dan fasilitas | 15 |
| 3.1 | Bahan tanaman | 15 |
| 3.2 | Peralatan | 15 |
| 3.3 | Media dan reagen | 16 |
| 3.4 | Kondisi inkubasi kultur | 17 |
| 4 | Prosedur | 17 |
| 4.1 | Persiapan, reagen dan media | 17 |
| 4.2 | Persiapan bahan tanaman | 18 |
| 4.3 | Protokol | 18 |
| 5 | Pengamatan | 21 |
| 6 | Hasil | 21 |
| 7 | Penerapan pada mutan | 22 |
| 8 | Masalah keselamatan | 22 |
| 9 | Referensi | 23 |
| 10 | Sekilas tentang protokol | 24 |

1 Ucapan terima kasih

Terima kasih diucapkan kepada semua anggota pelaksana proyek yang didanai ACIAR tentang Kultur Jaringan Kelapa untuk Propagasi Klonal dan Pertukaran Plasma Nutfah (Propagation and Safe Germplasm Exchange) (HORT/1998/061 - sebelumnya CS/1998/061) atas sumbangan mereka dalam penyusunan manuskrip manual tentang kultur embrio kelapa. Mereka berasal dari *Cacao Coconut Institute*, PNG (Dr Mathias Faure dan Alfred Kambu), *Indonesian Coconut and Other Palms Research Institute*, Indonesia (Dr Hengky Novatianto dan Ibu Nurhaini Mashud), *Oil Plant Institute*, Viet Nam (Ibu Vu Thi My Lien), *University of the Philippines at Los Banos*, *Institute of Plant Breeding*, Philippines (Dr Pablito Magdalita, Dr Olivia Damasco). Terima kasih juga kami ucapkan secara khusus kepada Dr Yohannes Samosir, *University of Queensland*, atas kontribusinya yang tak ternilai pada proyek-proyek kelapa di masa lalu dan sekarang.

2 Ringkasan eksekutif

Penanaman kembali kelapa sawit yang telah tua di kawasan Asia Pasifik merupakan permasalahan utama bagi negara-negara produsen. Penanaman kembali tersebut membutuhkan pengumpulan dan pertukaran plasma nutfah yang saat ini ada di dalam kawasan atau pembiakan kultivar baru yang lebih produktif dan telah beradaptasi dengan lingkungan setempat. Pengumpulan dan pertukaran plasma nutfah kelapa sangat membutuhkan teknik kultur embrio agar kita tidak perlu memindahkan tanaman tersebut serta mencegah penularan hama dan penyakit yang terbawa bersamaan dengan tanaman. Namun demikian, protokol kultur embrio yang ada pada saat ini tidak efisien dan protokol kultur embrio baru yang lebih baik sangat dibutuhkan. Protokol baru diharapkan dapat membantu produksi bibit jenis aromatis bernilai tinggi dan kelapa Kopyor serta Makapuno yang sudah sangat dikenal.

Melalui dukungan ACIAR, teknik kultur embrio baru telah dikembangkan untuk kelapa (proyek HORT/1998/061 - sebelumnya CS/1998/061). Proyek ini bertujuan untuk menghasilkan sebuah manuskrip manual tentang teknik baru tersebut. Tujuan kedua dari proyek ini adalah untuk mengembangkan lebih lanjut teknik transplantasi embrio yang mungkin dapat menghasilkan bibit kelapa bernilai tinggi dengan cepat.

Informasi yang dihasilkan dari proyek ACIAR terdahulu (HORT/1998/061 – sebelumnya CS/1998/061) dikumpulkan dan disusun menjadi manuskrip manual kultur embrio yang baru. Manuskrip manual ini kemudian ditelaah dan diperbaiki dengan masukan dari para mitra yang terlibat dalam proyek awal. Versi akhir manuskrip manual yang telah selesai diperbaiki siap untuk diterbitkan dalam tiga bahasa (Inggris, Indonesia dan Vietnam) oleh ACIAR. Manual tersebut akan sangat berguna bagi banyak laboratorium termasuk *Coconut Genetic Network (COGENT) International Coconut Gene* yang berlokasi di lima daerah utama penghasil kelapa dunia.

Bagian kedua dari proyek ini mencakup tentang peningkatan teknik transplantasi embrio untuk produksi bibit kelapa bernilai tinggi dengan cepat. Bagian ini dilaksanakan di *Albay Research Center (ARC)* yang berada di bawah *Philippines Coconut Authority (PCA)*, serta pemanfaatan peralatan laboratorium dan pelatihan karyawan di *University of Queensland*.

Sejumlah percobaan telah dilaksanakan di ARC dengan tujuan untuk meningkatkan teknik transplantasi embrio yang telah dikembangkan sebelumnya. Namun demikian, usaha tersebut belum menghasilkan peningkatan germinasi batok yang telah ditransplantasi. Hal ini mungkin disebabkan karena rendahnya kualitas buah yang digunakan dalam percobaan. Penurunan kualitas buah disebabkan oleh angin taifun yang melanda di wilayah percobaan. Percobaan masih dilaksanakan hingga sekarang dengan menggunakan buah yang berkualitas tinggi.

Manfaat proyek ini telah sangat dirasakan oleh mitra proyek dari Filipina (ARC). Kapasitas mereka mengadakan penelitian kelapa mengalami peningkatan, sehingga memungkinkan

adanya keberlanjutan penelitian, dengan bantuan dana yang tidak besar dari pemerintah, setelah proyek sekarang berakhir. Bahkan pusat penelitian tersebut dapat mengembangkan hasil penelitiannya, khususnya hasil yang berkaitan dengan kultur embrio, untuk memasuki tahap berikutnya, misalnya komersialisasi. Penelitian awal diperlukan untuk pengembangan metode, khususnya untuk kelapa bernilai tinggi seperti jenis aromatis, Kopyor dan Makapuna. Pada saat yang sama, kapasitas negara mitra juga meningkat apabila gen kelapa jenis ini dapat dikembangkan di negara bersangkutan. Pusat penelitian kemudian dapat menunjukkan nilai komersial teknik tersebut pada investor dan petani kelapa yang berminat. Kegiatan tersebut memungkinkan proyek yang sedang dikerjakan saat ini (juga proyek-proyek sebelumnya yang didanai oleh ACIAR) menghasilkan manfaat yang lebih besar dan dampak tersebut dapat dilihat lebih cepat.

3 Pendahuluan

Kelapa (*Cocos nucifera* L.) adalah tanaman palma yang paling penting di kawasan tropis lembab. Luas areal tanaman kelapa berjumlah lebih dari 12 juta ha yang tersebar di lebih dari 90 negara, khususnya di kawasan Asia Pasifik. Filipina memiliki 3,2 juta ha perkebunan kelapa dan merupakan penghasil kelapa terbesar kedua di dunia (setelah Indonesia, dengan 3,8 juta ha). Tanaman tersebut dibudidayakan oleh lebih dari 50 juta petani kecil di seluruh dunia yang pada umumnya memiliki sumber daya terbatas. Kelapa disebut juga sebagai 'pohon kehidupan' oleh karena banyaknya alat-alat yang dapat dihasilkan dari kelapa serta pemanfaatannya yang begitu luas bagi masyarakat sekitar. Di samping produk-produk tradisional seperti kopra, minyak kelapa serta buah kopra, kelapa juga dapat menghasilkan beragam jenis makanan serta produk bukan makanan yang ramah lingkungan, yang digunakan di dalam negeri ataupun di ekspor. Di beberapa negara Pasifik, produk kelapa tersebut merupakan satu-satunya sumber penghasilan. Kelapa juga telah menjadi faktor penyeimbang dalam sistem pertanian di daerah yang rentan terhadap perubahan lingkungan seperti daerah pesisir pantai.

Sangat disayangkan, produktivitas kelapa dunia mengalami penurunan dalam beberapa dekade terakhir, dan hampir 2/3 tanaman yang masih ada saat ini tidak lagi berada pada puncak produktivitas sehingga perlu diganti dengan jenis baru yang lebih produktif dan dapat beradaptasi dengan kondisi setempat. Hal ini membutuhkan program pemuliaan yang terencana dengan baik dan ketersediaan plasma nutfah yang sesuai. Pada saat ini pengumpulan dan pertukaran plasma nutfah dilaksanakan dengan menggunakan teknik kultur embrio sebab pemindahan tanaman sangatlah tidak praktis dan tidak aman dari aspek fitosanitari.

Keberhasilan teknik kultur embrio untuk beberapa jenis kelapa yang ada saat ini belum dapat diandalkan sehingga protokol baru telah dikembangkan (proyek yang didanai oleh ACIAR - HORT/1998/061) dengan masukan dari Australia, Indonesia, Filipina, PNG dan Vietnam. Protokol baru ini lebih efisien untuk menghasilkan plantlet yang lebih bagus dengan keberhasilan penanaman yang lebih tinggi. Protokol ini juga dapat diterapkan untuk produksi bibit kelapa unggul (seperti Makapuno, Kopyor dan Aromatis), yang memiliki nilai ekonomis tinggi.

Namun demikian, protokol baru tersebut sampai saat ini belum disebarluaskan kepada semua negara penghasil kelapa.

Hasil penting lainnya dari proyek sebelumnya (proyek yang didanai oleh ACIAR - HORT/1998/061) adalah penelitian awal untuk transplantasi embrio. Dengan teknik tersebut, saat ini sudah memungkinkan untuk memasukkan embrio ke dalam batok dan memeliharanya menjadi bibit yang sehat. Tingkat keberhasilan metode tersebut saat pertama sekali dikembangkan di Brisbane sangat rendah. Hal ini disebabkan karena rendahnya kualitas buah yang tersedia, dan hasil yang lebih baik dapat dicapai kalau menggunakan buah segar yang berasal dari negara penghasil. Ketika teknik ini berhasil dan berjalan, teknik ini dapat digunakan sebagai alternatif penghasil tanaman menggantikan kultur embrio yang seringkali melelahkan dan mahal.

Proyek lain (HORT/2006/006) dengan dana dari ACIAR telah dilaksanakan untuk mengembangkan lebih lanjut aspek-aspek penelitian sebelumnya. Manual mengenai

Laporan Akhir: Perkembangan manual kultur embrio dan teknik transplantasi embrio untuk kelapa
protokol baru kultur embrio akan dicetak dalam tiga bahasa (Inggris, Indonesia dan Vietnam)
dan didistribusikan oleh ACIAR. Disamping itu, proyek baru ini juga akan melakukan studi
lebih lanjut dengan menggunakan kelapa segar yang tumbuh di Filipina untuk memperbaiki
teknik transplantasi embrio. Laporan ini menekankan pada hasil kedua metode baru ini.

4 Manual Kultur Embrio

Informasi yang dihasilkan dari proyek sebelumnya (HORT/1998/061) dikumpulkan dan
disusun dalam suatu manuskrip manual yang akan diterbitkan oleh ACIAR sebagai
laporan teknis. Manuskrip tersebut telah direvisi dengan masukan dari berbagai
peneliti yang secara aktif terlibat dalam proyek-proyek sebelumnya. Versi akhir
manuskrip manual (Lampiran 1) tersedia dalam bahasa Inggris, dan akan
diterjemahkan ke dalam bahasa Indonesia dan Vietnam serta kemudian didistribusikan
oleh ACIAR.

5 Pengembangan teknik transplantasi embrio

Komponen kegiatan dari proyek ini meliputi; 1) pengembangan kapasitas, 2) pelatihan dan 3)
penelitian untuk mengembangkan prosedur transplantasi embrio.

Komponen pengembangan kapasitas meliputi pembelian peralatan untuk mendukung
penelitian pengembangan prosedur transplantasi embrio (Gambar 1- 3), pengiriman ke ARC di
Filipina, dan rekrutmen seorang asisten peneliti untuk membantu kegiatan penelitian , juga di
ARC, Filipina.



Gambar 1. a) Meja bor dengan tempat pegangan batok, b) Pembersih debu genggam



Gambar 2. Laboratorium transplantasi embrio kelapa. a) Ruang persiapan; b) Ruang pembersihan



Gambar 3. Tempat germinasi embrio yang telah ditransplantasi

Komponen pelatihan meliputi kunjungan ilmuwan senior ARC yaitu Bpk Osmundo Orense ke University of Queensland selama 10 hari (2-12 Oktober 2006) untuk belajar teknik transplantasi embrio. Seperti yang telah disebutkan sebelumnya, metode ini merupakan pendekatan baru, pertama kali dikembangkan oleh UQ melalui proyek HORT/1998/061, dan berpotensi untuk menggantikan teknik kultur embrio di laboratorium yang tidak bisa melaksanakan kultur jaringan.

Komponen penelitian (Agustus 2006 sampai Desember 2007) dilaksanakan di ARC untuk memperbaiki teknik transplantasi embrio. Pertama, studi pendahuluan dilaksanakan untuk membandingkan laju germinasi buah bersekam (buah utuh, seperti yang biasanya digunakan untuk pembiakan kelapa) dan tidak bersekam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kedua metode tersebut memberikan tingkat germinasi yang sama (berturut-turut 20 dan 16%). Persentasi tersebut sangat rendah dibandingkan dengan tingkat germinasi yang biasanya dicapai oleh ARC (75-85%). Hal ini disebabkan karena kualitas buah yang rendah yang diperoleh dari sisa panen kelapa setelah serangan angin topan pada tahun 2006 dan 2007.

Studi pendahuluan kedua dilaksanakan untuk menetapkan langkah-langkah dasar dalam melakukan transplantasi embrio dan germinasi batok hasil transplantasi. Dalam melaksanakan studi tersebut, teknik baru dikembangkan di UQ diadopsi dengan menggunakan alat-alat baru yang ada di ARC. Pada ujicoba pertama, beberapa batok sisa dari Laguna Tall digunakan untuk mempraktekan teknik transplantasi isolasi embrio. Dalam pelaksanaannya, larutan pembersih komersial yang mengandung 5,25% NaOCl disiramkan pada bagian batok yang terpotong menggunakan botol selama 30-60 menit (Gambar 4). Setelah itu, batok dibilas dengan air bersih (Gambar 5) dan batok dibiarkan mengering. Bagian atas batok kemudian dibuang sehingga terlihat bagian testa (Gambar 6). Testa dan lapisan tipis dari endosperm kemudian dipotong menggunakan pisau bedah sehingga embrionya tampak (Gambar 7). Embrio kemudian diambil menggunakan pisau bedah yang ujungnya telah dilekukkan untuk memudahkan pengambilan embrio (Gambar 8). Dengan pisau yang sama, *germpore* dibelah membentuk sebuah lubang untuk memasukkan embrio asing. Setelah embrio asing dimasukkan (Gambar 9), potongan testa diletakkan kembali untuk menutup embrio yang telah dimasukkan tadi (Gambar 10) dan direkatkan (Lem cair) sebelum irisan batok diletakkan pada tempat semula (Gambar 11). Perekat juga ditambahkan pada bagian tepi antara batok dan potongan tutup batok (Gambar 12). Biarkan lem mengering selama satu malam sebelum batok dipindahkan ke tempat pembibitan keesokan harinya. Batok diletakkan dengan tegak pada media germinasi yang basah (campuran tanah dan serabut kelapa) sehingga hanya bagian yang dilem yang terletak diatas permukaan media (Gambar 13). Fungisida dan insektisida disemprotkan di atas batok dan media. Penyemprotan berikutnya dilakukan dengan interval satu minggu. Bedengan tempat pembibitan terlindung dari pengaruh sinar matahari dan hujan. Tingkat kelembaban media pembibitan dijaga dengan cara pengairan yang teratur.



Gambar 4. Membersihkan batok



Gambar 5. Membilas batok dengan air steril



Gambar 6. Membuka tutup batok



Gambar 7. Memotong testa agar embrio kelihatan (gambar kecil)



Gambar 8. Mengambil dan membuang embrio



Gambar 9. Memasukkan embrio asing ke dalam *germpore* (pori-pori nutfah)



Gambar 10. Meletakkan kembali testa yang telah dipotong



Gambar 11. Meletakkan lem pada bagian pinggir lubang batok



Gambar 12. Merekat celah antara batok/tempurung Dengan potongan batok



Gambar 13. Peletakkan batok yang telah ditransplantasi dengan embrio dalam bedengan

Pada studi lain, transplantasi embrio kedua (memasukkan endosperm yang mengandung embrio) dilakukan dengan menggunakan kultivar kelapa yang sama. Proses yang sama mulai dari pembersihan, penutupan, dan germinasi diterapkan. Akan tetapi, pada percobaan ini endosperm diambil dari batok penerima maupun donor dengan menggunakan bor (diameter 2 cm, Gambar 14). Embrio yang ditransplantasikan dan endosperm penutup kemudian dimasukkan pada batok penerima dan dirapatkan dengan lem seperti yang telah dijelaskan sebelumnya (Gambar 15).



Gbr 14. Pengambilan embrio menggunakan bor



Gbr 15. Memasukkan potongan embrio asing ke dalam batok penerima

Untuk mengetahui apakah respons germinasi disebabkan oleh perlakuan yang diberikan maka batok control yang tidak diperlakukan sama sekali dan batok yang telah diperlakukan (dipotong, dibersihkan, dibuang, dilekatkan kembali dan dilem) ditempatkan pada bedengan pembibitan yang sama.

Beberapa bulan setelah transplantasi, germinasi masih belum terlihat. Kontaminasi dan kerusakan akibat semut juga tidak terlihat pada batok hasil transplantasi. Sebagian besar batok masih hidup.

Teknik transplantasi embrio kemudian diperbaiki. Perbaikan ini meliputi penyempurnaan langkah sterilisasi permukaan dimana batok yang terpotong terbalik dan dicelupkan pada larutan pemberish (bleach) (seluruh bagian potongan batok dicelupkan dalam larutan pemberish). Konsentrasi larutan pembersih dan lama pencelupan dibuat bervariasi untuk menentukan kombinasi terbaik untuk sterilisasi permukaan. Hasil pengujian menunjukkan bahwa konsentrasi 40 % pemutih (v/v) dan penyelupan selama 1 jam merupakan metode yang paling efektif, dan prosedur ini kemudian diterapkan pada percobaan selanjutnya.

Kegagalan pada batok hasil transplantasi untuk germinasi kemungkinan disebabkan karena tidak terjadinya ekspansi embrio selama proses awal germinasi. Hal ini mungkin disebabkan oleh minimnya kontak antara embrio hasil transplantasi dengan endosperm dalam batok penerima. Sebuah percobaan kemudian dilaksanakan dengan memasukkan embrio hasil inkubasi in vitro dan telah mengalami ekspansi ke dalam batok penerima. Untuk melakukan hal tersebut, embrio dari batok yang telah matang diisolasi dan permukaannya disterilkan menggunakan teknik yang diterapkan pada prosedur baru kultur embrio (lihat Lampiran 1). Embrio kemudian diinkubasikan dalam medium Y3 yang telah dimodifikasi (lihat Lampiran 1) selama 3-5 hari sebelum dimasukkan dalam batok penerima. Media inkubasi yang sama juga digunakan sebagai 'media pengisi' untuk mengisi ruang antara gempore (pori-pori nutfah) dan embrio setelah dimasukkan. Batok hasil transplantasi ini kemudian diletakkan dalam bedengan pembibitan seperti yang telah dijelaskan di atas. Namun, sama seperti sebelumnya bahwa proses germinasi tidak terjadi. Percobaan yang serupa selanjutnya diulang dengan menggunakan media MS yang dikeraskan (Murashige dan Skoog, 1962), tetapi batok hasil transplantasi masih juga belum bisa berkecambah.

Penambahan kombinasi zat pengatur tumbuh ke dalam media diperkirakan akan mendorong terjadinya germinasi embrio. Sebuah percobaan kemudian dilaksanakan menggunakan 0 atau 0,1 ppm BAP dan 0, 0,05 atau 0,10 ppm NAA yang ditambahkan ke dalam media Y3, dan embrio terisolasi diinkubasikan selama 3-5 hari. Embrio kemudian dimasukkan pada batok penerima. Namun demikian, batok hasil transplantasi masih belum juga berkecambah.

Seperti yang telah disebutkan sebelumnya, batok utuh (tidak mengalami ransplantasi) yang dipelihara dalam bedengan pembibitan sebagai control tingkat germinasinya sangat rendah (16-53 %) dibandingkan dengan tingkat germinasi di ARC (85 %). Hal ini menunjukkan bahwa kualitas buah kelapa yang digunakan sangat rendah.

6 Masalah yang dihadapi dan keuntungan yang diperoleh

Dalam proyek sebelumnya (HORT/1998/061), tingkat keberhasilan transplantasi embrio rendah namun signifikan. Rendahnya tingkat keberhasilan diperkirakan karena penggunaan buah kualitas rendah baik yang berfungsi sebagai sumber embrio maupun batok penerima.. Buah tersebut dibeli dari took swalayang dan diimpor dari negara-negara produsen melalui jalur komersial yang memakan waktu berminggu-minggu. Selain itu, teknik transplantasi juga masih sangat mendasar sehingga perlu perbaikan pada beberapa aspek. Penggunaan batok kualitas rendah dalam penelitian tersebut turut berperan pada kegagalan teknik transplantasi.

Batok yang digunakan dalam kegiatan tersebut berasal dari pohon yang rusak berat karena badai topan (Gambar 16 dan 17), tetapi bahan tersebut merupakan bahan terbaik saat itu.



Gambar 16. Pohon-pohon kelapa yang hancur akibat badai topan Reming



Gambar 17. Fasilitas kultur jaringan kelapa yang hancur oleh Topan Reming: a) bangunan laboratorium tambahan; b) rumah kaca / ruang dengan pengatur kelembaban; c) tempat pembibitan

Sejumlah percobaan yang telah direncanakan untuk membantu pengembangan teknik transplantasi tidak memberi manfaat oleh karena keterbatasan buah kelapa yang tersedia. Kegagalan tersebut disebabkan berbagai faktor meliputi umur batok (sebagai embrio dan juga penerimai), kondisi penyimpanan batok setelah panen sampai pemakaian, dan kompatibilitas teknik yang ada terhadap semua varietas kelapa.

Di samping rendahnya germinasi embrio hasil transplantasi, manfaat yang diperoleh selama proyek berlangsung adalah pengembangan kapasitas dan pelatihan di ARC. Pelatihan karyawan yang dilakukan di UQ dan pengembangan fasilitas di ARC memungkinkan keberlanjutan kegiatan setelah proyek berakhir (Desember 2007). Percobaan akan dilanjutkan pada saat buah yang berkualitas tersedia.

Manuskrip manual tentang manual kultur embrio saat ini telah siap untuk diterbitkan oleh ACIAR (Lampiran 1). Manual ini diterbitkan setelah diadakan komunikasi yang intensif dengan orang-orang yang terlibat dalam proyek ACIAR sebelumnya. Dilaporkan pula bahwa jaringan yang telah terbentuk (ICOPRI Indonesia, Madang Research Station PNG, Albay Research Centre Philippines dan OPI Vietnam) masih tetap ada dan berfungsi secara penuh. Meskipun mitra lain, selain Filipina, tidak mendapatkan keuntungan langsung, mereka akan merasakan manfaat dari dihasilkannya manual kultur embrio. Manual tersebut tidak hanya bermanfaat untuk mendorong kegiatan pertukaran plasma nutfah tetapi juga produksi kelapa bernilai tinggi seperti Kopyor, Makapuno dan bibit jenis aromatis dalam jumlah besar.

7 Kesimpulan dan saran

Pertukaran informasi dan pendapat beberapa mitra yang telah disampaikan pada proyek sebelumnya (HORT/1998/061) juga sangat diharapkan selama proyek ini berlangsung karena sangat berguna bagi perbaikan manual kultur embrio yang baru. Manual baru tersebut saat ini telah siap untuk diterbitkan dalam tiga bahasa (Inggris, Indonesia dan Vietnam). Para mitra telah terlibat dalam proses penerjemahan, dan setelah manual dapat diselesaikan mereka dapat membantu dalam proses distribusi.

Kapasitas untuk dapat menjalankan pekerjaan kultur embrio dan transplantasi embrio telah dibangun di ARC. Hal ini dicapai dengan adanya pelatihan di UQ, perbaikan fasilitas kultur jaringan di ARC dan latihan kerja yang berkesinambungan bagi asisten setempat di ARC.

Sejumlah penelitian telah diadakan di ARC untuk memperbaiki teknik transplantasi embrio. Akan tetapi, sampai saat ini tidak ada batok yang berhasil berkecambah. Batok yang digunakan dalam percobaan ini adalah sisa dari badai topan yang menyerang wilayah ini dan menghancurkan sebagian besar pohon kelapa yang ada serta fasilitas ARC, selama proyek ini berlangsung. Batok berkualitas rendah ini merupakan faktor penyebab lambannya kemajuan yang dicapai dalam germinasi embrio yang telah ditransplantasi. Beberapa percobaan yang telah direncanakan juga turut terpengaruh oleh keterbatasan jumlah buah kelapa yang tersedia untuk penelitian.

Di masa mendatang, beberapa penelitian dasar dibutuhkan untuk mengembangkan teknik baku transplantasi embrio. Penelitian harus lebih dititikberatkan pada transplantasi embrio potongan (bukannya transplantasi sumbatan) sebab metode ini menunjukkan kemungkinan besar untuk berhasil. Selain itu, respons fisiologis embrio potongan untuk transplantasi harus dipelajari lebih jauh. Hal tersebut dapat meliputi penelitian konsumsi jumlah air yang dibutuhkan, perubahan yang terjadi pada area kontak antara embrio yang dimasukkan dengan endosperm, dan mobilisasi serta pemindahan makanan ke embrio. Kompatibilitas antara endosperm dan embrio asing, khususnya dalam sifat genotipe umur dan perlakuan sebelum penyimpanan, juga harus diteliti.

Kedua proyek (proyek ini dan sebelumnya HORT/1998/061) telah menghasilkan banyak pengetahuan serta meningkatkan kapasitas tim peneliti kelapa di Indonesia, Pilipina, PNG dan Vietnam. Manual kultur embrio yang baru telah siap untuk digunakan sebagai dokumen referensi yang lengkap bagi tim tersebut. Hasil penelitian yang positif tentang kultur embrio memungkinkan tim peneliti untuk melangkah maju ke tahap pengembangan berikutnya – komersialisasi teknologi. Proyek pendahuluan dianjurkan untuk segera dilaksanakan di negara-negara produsen untuk mengembangkan teknologi tersebut lebih jauh, dan juga untuk menunjukkan bahwa produksi skala besar kultivar kelapa bernilai tinggi (Kopyor, Makapuno, aromatis) mungkin untuk dilaksanakan. Pembuatan koleksi plasma nutfah kelapa jenis tersebut dan juga jenis lain yang berguna harus segera dilaksanakan dalam tahap-tahap awal proyek tersebut, dan hal ini selanjutnya dapat mendorong proses komersialisasi. Kemungkinan untuk menyilangkan Kopyor atau Makapuno dengan kelapa aromatis perlu diteliti lebih lanjut sebelum protokol kultur embrio baru digunakan untuk perbanyak bibit hibrida baru. Keberhasilan dalam produksi bibit Makapuno dalam skala besar melalui kultur embrio dapat dilihat di Filipina, dan keberhasilan tersebut seharusnya dapat digunakan untuk menghasilkan ide baru dalam mengembangkan metode tersebut untuk tujuan komersialisasi. Beberapa kegiatan penelitian tambahan diperlukan untuk memperbaiki protokol dan keterlibatan tim yang berpengalaman dari Australia sangatlah dibutuhkan. Sektor swasta dan para petani harus diajak untuk berpartisipasi dalam proyek mulai dari tahap awal. Akan tetapi, apabila proyek pendahuluan tidak diarahkan untuk menunjukkan potensi komersialnya, maka pengaruh kedua proyek ini (dan beberapa proyek ACIAR terkait sebelumnya) bagi para petani dan pemegang kepentingan lainnya di negara-negara penghasil kelapa akan tetap rendah. Pengaruh yang rendah dari proyek-proyek kelapa yang didanai oleh ACIAR telah dilaporkan (lihat Samosir et al. 2006).

Dampak lain dari proyek tentang protokol kultur embrio ini adalah menyediakan metode bagaimana plasma nutfah dapat dipindahkan dari laboratorium satu ke laboratorium lain baik pada tingkat nasional maupun internasional. Oleh sebab itu, ACIAR perlu menyediakan manual kultur embrio bagi semua pengguna. Hal ini termasuk *International Coconut Genetic Resources Network* (COGENT) yang sedang membangun Bank Gen Kelapa Internasional (*International Coconut Genebanks*) untuk melestarikan plasma nutfah kelapa diseluruh dunia dan menyediakannya bagi negara yang berminat. Pelatihan oleh Tim Pengembang untuk mempromosikan penyebaran dan adopsi teknologi embrio baru sangat dianjurkan.

8 Referensi

Samosir Y M S, Foale M and Adkins S W (2006) Australian involvement in coconut research and development. In: Adkins S W, Foale M and Samosir Y M S (eds) *Coconut revival: new possibilities for the tree of life*. Proceedings of the International Coconut Forum, Cairns, Australia, 22-24 November 2005. p. 36-42.

Murashige T and Skoog F (1962) A revised media for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiology Plantarum* 15:473-497.

9 Lampiran

Lampiran 1: Manual Kultur Embrio

Protokol Kultur Embrio Baru untuk Pelestarian Plasma Nutfah Kelapa dan Produksi Bibit Unggul

Yohannes M S Samosir
Nurhaini Mashud
Hengky Novianto
Vu Thi My Lien
Erlinda Rillo
Pablito Magdalita
Olivia Damasco
Alfred Kembu
Mathias G Faure
Stephen W Adkins

Australian Centre for International Agricultural Research
Canberra
2008

1 Pendahuluan

Kelapa (*Cocos nucifera* L.) merupakan tanaman palma di daerah tropis yang paling penting, tetapi pengalaman produsen tanaman ini masih rendah dan hasilnya terus menurun. Sebagian besar produsen cenderung untuk memelihara tanaman yang sudah tua dan bukan merupakan hasil seleksi. Perkebunan-perkebunan tua ini perlu diremajakan dengan varietas baru yang lebih produktif serta tahan penyakit. Oleh karena itu, pengembangan varietas lokal yang telah beradaptasi dengan lingkungan setempat dan lebih berkualitas sangat dibutuhkan. Hal ini dapat dicapai melalui pemanfaatan plasma nutfah kelapa yang berasal dari berbagai tempat di dunia. Akan tetapi, plasma nutfah yang bernilai tinggi tersebut berkurang dengan cepat karena berbagai faktor seperti bencana alam, kekeringan, berkurangnya lahan akibat perluasan wilayah permukiman, dan kebutuhan bidang pertanian lainnya.

Dalam sepuluh tahun terakhir, banyak usaha yang telah dilakukan oleh *The Coconut Genetic Resources Network - International Plant Genetic Resources Institute* (COGENT-IPGRI) untuk mendanai dan membangun bank pelestarian plasma nutfah kelapa diberbagai tempat (*international coconut germplasm conservation bank - ICG*). Jaringan ini beroperasi di lima wilayah COGENT, yaitu; Asia Tenggara dan Timur, Asia Selatan, Pasifik Selatan, Afrika dan Samudera India, serta Amerika Latin dan Karibia. Jaringan bank gen kelapa ini diharapkan mampu memelihara sebagian besar plasma nutfah kelapa yang ada di dunia dan melindunginya untuk penggunaan di masa mendatang oleh industri kelapa.

Untuk membantu pembangunan bank pelestarian bagi jejaring ICG atau program koleksi dan pengembangan plasma nutfah kelapa lainnya, mekanisme yang aman serta terpercaya untuk mengumpulkan, memindahkan dan pengembangan kembali plasma nutfah kelapa perlu segera ditetapkan. Pengumpulan dan pemindahan buah kelapa secara utuh tidak praktis karena ukurannya yang besar serta risiko terkait dengan fitosanitasi buah yang tidak dibersihkan.

Dengan alasan-alasan tersebut, pengumpulan plasma nutfah kelapa dalam bentuk kultur *in vitro*, baik sebagai embrio atau embrio yang ada dalam penyumbat jaringan endosperm, merupakan cara yang lebih praktis untuk memindahkan plasma nutfah kelapa. Embrio varietas yang umum dibudidayakan mempunyai berat 10.000 kali lebih ringan dibandingkan dengan berat buah utuh (Harries 1982), dan embrio tersebut juga tidak membawa penyakit.

Kultur embrio zigot kelapa secara *in vitro* telah dihasilkan dalam beberapa percobaan (De Guzman dan Del Rosario 1974; Assy Bah 1986; Rillo dan Paloma 1992a; Samosir et al. 1999). Teknik-teknik tersebut juga berguna untuk menyelamatkan embrio dari mutan kelapa bernilai tinggi (contoh Makapuno, Kopyor), yang memiliki jaringan endosperm seperti jeli dan tidak berfungsi (Rillo and Paloma 1992b), serta menghasilkan vaerietas baru hasil persilangan di antara varietas-varietas tersebut. Teknik tersebut juga dapat digunakan untuk seleksi *in vitro* berbagai sifat tanaman (misalnya, tahan terhadap kekeringan; Karunaratne et al., 1991) dan juga untuk kriopreservasi plasma nutfah kelapa (Assy-Bah and Engelmann 1992; Sisunandar et al., 2005).

Sampai saat ini, teknik kultur embrio kelapa yang diakui secara internasional telah digunakan untuk membangun koleksi plasma nutfah dan untuk menghasilkan bibit bernilai tinggi dari tipe kelapa mutan. 'Teknik kultur embrio hibrida' (Batugal 2002) telah digunakan dalam produksi tanaman kelapa di berbagai tempat tujuan setelah dilakukan pertukaran internasional. Menggunakan protocol Engelmann dan Batugal (2002) tingkat germinasi tinggi dapat dicapai secara *in-vitro*, tetapi perbedaan hasil antar laboratorium cukup besar sehingga protokol ini dinilai tidak efisien dan tidak terpercaya.

Banyak aspek fisiologi plantlet yang ditumbuhkan secara *in vitro* tidak optimal dan hal ini berkontribusi dalam rendahnya tingkat aklimatisasi dan pemapanan plantlet secara *ex vitro*. Sifat fisiologi bibit yang sangat mungkin dipengaruhi oleh teknik ini adalah perkembangan sistem perakaran, kapasitas melakukan fotosintesa, dan kepekaan terhadap infeksi.

Protokol yang baru dikembangkan untuk mengatasi masalah tersebut dan masalah lain yang terkait dengan perkembangan bibit. Protokol ini merupakan hasil kerja sekelompok ilmuwan dari berbagai negara (Australia, Indonesia, PNG, Filipina dan Vietnam) selama tiga tahun. Beberapa kemajuan yang signifikan telah diinkorporasikan ke dalam protocol, dan protocol ini dapat diterapkan untuk pemindahan plasma nutfah kelapa serta pengembangan kembali dan bibit unggul, seperti Makapuno dan Kopyor.

2 Tujuan

Tujuan kegiatan dari penyusunan manual ini adalah untuk mengembangkan protokol baru yang lebih baik untuk i :

- isolasi dan pemindahan embrio kelapa
- inisiasi kultur embrio kelapa secara *in vitro*
- pemeliharaan kultur embrio kelapa sampai bibit yang dihasilkan siap untuk ditanam di tanah
- aklimatisasi bibit kelapa yang dihasilkan
- pendewasaan bibit kelapa dalam kebun pembibitan.

3 Bahan, peralatan dan fasilitas

3.1 Bahan tanaman

Untuk memperoleh tingkat produksi bibit yang tinggi, embrio harus berasal dari tanaman yang berumur 10-11 bulan setelah polinasi. Pada umur tersebut, embrio ada dalam buah dengan *exsocarp* (kulit) baru saja berubah menjadi coklat (Gambar 1). Rumus dasar yang dapat digunakan dalam perjalanan pengumpulan plasma nutfah adalah pemanenan embrio hanya akan dilakukan apabila satu diantara sekelompok buah dari tandan yang sama telah menjadi coklat. Langkah-langkah pemilihan buah kelapa lainnya juga perlu diterapkan, khususnya yang berhubungan dengan kesehatan buah. Hanya buah berkualitas tinggi yang dapat digunakan untuk isolasi embrio. Namun demikian, buah tidak harus disingkirkan apabila tidak menghasilkan 'bunyi riak air' saat digoncang. Tatacara pemilihan tersebut sering digunakan di pembibitan saat memilih buah untuk germinasi, tetapi hal itu tidak bermanfaat di lapangan. Buah yang dipanen pada umur 10-11 bulan mungkin tidak akan menghasilkan bunyi ketika digoncang karena rongga di dalam buah penuh dengan air.

Semakin pendek waktu antara panen sampai isolasi embrio dan inokulasi ke media kultur jaringan semakin diinginkan. Saat mengumpulkan plasma nutfah dari daerah yang jauh sangat dianjurkan untuk mengumpulkan embrio kira-kira 20% lebih dari yang jumlah yang dibutuhkan. Hal ini dimaksudkan untuk mengganti embrio yang mati selama proses transportasi ke laboratorium. Selama transportasi, embrio dapat dipindahkan dalam bentuk bungkusan silinder endosperm atau penutup (Rillo dan Paloma 1992) atau sebagai embrio telanjang dan terisolasi (Ashburner *et al.* 1995; Samosir *et al.* 1999).

3.2 Peralatan

Peralatan dan fasilitas dasar yang dibutuhkan dalam kultur jaringan meliputi ruang kultur, rak jaringan, autoclave, alat pemotong, wadah kultur dan berbagai media. Alat bor (No. 10 atau yang lebih besar, Gambar 2) diperlukan untuk menarik endosperm penutup (mengandung embrio) dari batok. Jika tidak ada, bor dapat juga diganti dengan pipa besi yang tajam di bagian ujung dan dimasukkan ke dalam endosperm menggunakan palu.

Wadah kultur polikarbonat (2,5 cm diameter dan 8 cm tinggi, Gambar 3a) umum digunakan untuk germinasi dan pemeliharaan bibit awal sampai sedikitnya bibit tersebut mempunyai satu daun mengembang sempurna. Wadah yang lebih besar dibutuhkan untuk langkah berikutnya sejalan dengan pertumbuhan bibit. Sistem wadah ganda, yang dihasilkan dengan membalikkan wadah kultur kedua di atas yang pertama digunakan untuk bibit besar (Gambar 3b). Alternatif lain dari sistem wadah kultur ini adalah penggunaan kantong plastik polietilen (yang dapat di autoklaf) yang diletakkan di atas wadah kultur (Gambar 3c).

Sistem pengayaan atmosfer karbon dioksida (CO₂) (Gambar 4) digunakan untuk memperbaiki metode tradisional dengan melanjutkan inkubasi bibit dalam kantong plastik jernih terbalik. Sistem pengayaan atmosfer CO₂ dapat dibangun dengan beberapa cara, tetapi unit laboratorium yang efisien dapat dibuat dari kertas plastik perplex (ketebalan 0,6 cm) yang di rekatkan.

Setelah pengayaan atmosfer CO₂ di laboratorium, langkah selanjutnya adalah aklimatisasi bibit. Untuk melakukan hal itu, kotak aklimatisasi di dalam rumah kaca (Gambar 5a) digunakan untuk proses *hardening-off* (pengerasan) sampai sebelum bibit ditanam di luar kotak di dalam rumah kaca. Kotak aklimatisasi menciptakan kelembaban relatif tinggi di sekitar bibit sehingga mendorong perkembangan bibit dan pada saat yang sama menyediakan ruang yang cukup untuk pertumbuhan bibit lebih lanjut. Kotak tersebut terbuat dari kayu yang ditutupi dengan lembaran plastik transparan dilengkapi dengan empat lubang (10 cm diameter, dua setiap sisi). Keempat lubang tersebut dimaksudkan untuk memaparkan bibit pada kondisi alami rumah kaca sehingga mendorong proses pengerasan. Kotak yang biasa digunakan memiliki ukuran panjang 100 cm, lebar 22 cm dan tinggi 30 cm. Kotak ini diletakkan di dalam rumah kaca dengan diberi alas agar terkena sinar matahari. Kotak yang lebih besar atau tenda yang terbuat dari plastik (Gambar 5b) dapat digunakan untuk jumlah bibit yang banyak. Tutup plastik pada kotak atau tenda dapat dibuka sewaktu-waktu untuk perawatan bibit seperti penyiraman air atau pengendalian hama.

3.3 Media dan reagen

Formulasi media yang dikembangkan untuk kultur embrio kelapa (Tabel 1) didasarkan pada mineral Y3 (Eeuwens 1976) dengan modifikasi pada vitamin dan zat besi.

Tabel 1. Formulasi dan komponen media untuk kultur embrio kelapa

| Nama bahan | Rumus Kimia | Jumlah (mg/L) |
|--|---|---------------|
| Zat-zat Makro (Y3) | | |
| Potassium nitrat | KNO ₃ | 2020,00 |
| Potassium klorida | KCl | 1492,00 |
| Amonium klorida | NH ₄ Cl | 535,00 |
| Sodium dihidrogen <i>ortho</i> -fosfat | NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O | 312,00 |
| Kalsium klorida | CaCl ₂ .2H ₂ O | 294,00 |
| Magnesium sulfat | MgSO ₄ .7H ₂ O | 247,00 |
| Zat-zat Mikro (Y3) | | |
| Mangan sulfat | MnSO ₄ .4H ₂ O | 11,20 |
| Potassium iodide | KI | 8,30 |
| Zinc sulfat | ZnSO ₄ .7H ₂ O | 7,20 |
| Asam Borik | H ₃ BO ₃ | 3,10 |
| Kuprik sulfat | CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,250 |

| | | |
|--|---|------------------|
| Kobalt klorida | CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,240 |
| Sodium molybdate | NaMoO ₄ .H ₂ O | 0,240 |
| Nikel klorida | NiCl.6H ₂ O | 0,024 |
| Ferrous sulfat ¹⁾ | Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O | 41,70 |
| Asam Disodium etilen diamin tetra-asetik ¹⁾ | Na ₂ EDTA | 55,80 |
| <i>Vitamin dan asam amino (UPLB+ARC)</i> | | |
| Piridoksin HCl (Vitamin B ₆) | C ₈ H ₁₁ NO ₃ .HCl | 0,05 |
| Tiamin HCl (Vitamin B ₁) | C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS.HCl | 0,05 |
| Asam Nikotin (Vitamin B ₃) | C ₆ H ₅ NO ₂ | 0,05 |
| Kalsium -D-pantotenat (Vitamin B ₅) | (C ₉ H ₁₆ NO ₅) ₂ Ca | 0,05 |
| Biotin (Vitamin H) | C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S | 0,05 |
| Asam Folik acid (Vitamin B _c , Vitamin M) | C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆ | 0,05 |
| Glisin | C ₂ H ₅ NO ₂ | 1,00 |
| <i>Lain-lain</i> | | |
| Asam Abscisik (ABA) ²⁾ | C ₁₅ H ₂₀ O ₄ | 0,25 |
| Asam α-Naftaleneasetik (NAA) ³⁾ | C ₁₂ H ₁₀ O ₂ | 18,6 |
| Sukrosa ⁴⁾ | C ₆ H ₂₂ O ₁₁ | 60,0, 45,0, 25,0 |
| Agar (hanya subkultur pertama dan kedua) ⁵⁾ | | 7,0 |
| Arang aktif ⁶⁾ | | 1,0 |
| pH | | 5,6 |

¹⁾ Solusi stok selat besi dipersiapkan dalam botol stok secara terpisah

²⁾ ABA yang telah disterilisasi dengan saringan ditambahkan ke dalam media ntuk meningkatkan germinasi.

³⁾ NAA diberikan hanya selama 1 bulan untuk mendorong pembentukan dan perkembangan akar.

⁴⁾ Sukrosa bernilai rendah dapat juga digunakan. Sukrosa (60 g L⁻¹) digunakan mulai dari inisiasi kultur sampai kuncup dan akar telah terbentuk (3 sampai 4 bulan pertama kultur) kemudian sukrosa dengan konsentrasi lebih rendah (45 g L⁻¹) digunakan sebelum pengurangan akhir (ke 25 g L⁻¹) untuk dua subkultur terakhir.

⁵⁾ Langkah subkultur berikutnya dilakukan dengan menggunakan media cair

⁶⁾ Gunakan arang aktif yang dicuci dengan asam. Untuk hasil yang konsisten, gunakan merek yang sama pada keseluruhan proses kultur.

3.4 Kondisi inkubasi kultur

Untuk pertumbuhan terbaik, kultur diinkubasikan pada temperatur 28-30⁰C dalam kondisi terang (c. 40 μmol m⁻² s⁻¹) dengan periode 14 jam cahaya, 10 jam tanpa cahaya. Cahaya merah (kira-kira 660 nm) dapat ditambahkan untuk mendorong pertumbuhan bibit. Intensitas cahaya yang lebih tinggi (c. 90 μmol m⁻² s⁻¹) sebaiknya digunakan saat menumbuhkan bibit dalam kondisi fotoautotropik (lihat Seksi 4.3.3.).

4 Prosedur

4.1 Persiapan, reagen dan media

Prosedur umum untuk penyiapan larutan stok dan media, silahkan lihat petunjuk kultur jaringan standar (contoh George 1993). Larutan stok (setiap stok adalah 10 x konsentrasi akhir yang diharapkan) dari enam garam makro dianjurkan untuk mencegah presipitasi. Zat-zat mikro, kecuali zat besi, dapat disiapkan dalam larutan stok 100 x konsentrasi akhir yang dibutuhkan.

Untuk memperoleh hasil yang paling konsisten, medium cairan (10 mL) digunakan dalam tabung (25 x 150 mm) untuk inisiasi kultur, medium padat (15 mL) kemudian digunakan, diikuti dengan medium cair (80 mL), dalam subkultur terakhir dalam wadah yang lebih besar (lihat Seksi 3.2). Dalam semua langkah, media harus tetap diaduk untuk mendistribusikan arangaktif (dicuci dengan asam, kulaitas kultur sel tumbuhan) saat pencucian terjadi.

4.2 Penyiapan bahan tanaman

1. Batok bersekam dibagi dua dan bagian endosperm yang mengandung embrio (silinder endosperm) diambil dengan menggunakan bor steril.
2. Silinder endosperm diletakkan dalam wadah bersih yang mengandung air kelapa segar atau air steril sebagai media inkubasi.
3. Dalam laboratorium, silinder endosperm dicuci dengan air bersih dan etanol (95%) selama 30 detik.
4. Silinder kemudian disterilkan permukaannya menggunakan larutan pencuci (mengandung 42 g L^{-1} sodium hipoklorit) selama 20 menit.
5. Silinder-silinder tersebut kemudian dibilas tiga kali dengan air steril dalam ruang bersih atau ruang laminar dengan udara mengalir (laminar airflow cabinet) untuk mengurangi kemungkinan terkontaminasi.
6. Untuk pemindahan, silinder-silinder yang telah disterilkan kemudian diletakkan dalam kantong plastik steril dengan kapas yang dibasahi dengan air steril. Kantong tersebut kemudian diletakkan dalam Styrofoam atau kotak insulasi.
7. Untuk memperlambat degradasi bahan selama transportasi, silinder-silinder dijaga suhunya rendah dengan menambahkan es yang diletakkan disekeliling kantong di dalam kotak yang dicampur dengan kapas.
8. Es diganti seperlunya selama perjalanan ke laboratorium. Es tidak dibutuhkan jika almari pendingin yang terhubung dengan baterai mobil tersedia.
9. Metode alternatif untuk transportasi plasma nutfah adalah dengan memisahkan embrio dari silinder endosperm di lapangan dan hanya membawa embrio ke laboratorium. Setelah diisolasi, embrio kemudian disterilkan permukaannya menggunakan larutan pembersih (10 % selama 1 menit), dicuci tiga kali dengan air steril dan diletakkan dalam tabung yang mengandung asam askorvik (10 mL dari 1 mg L^{-1}). Tabung-tabung tersebut kemudian diletakkan dalam kotak Styrofoam yang mengandung es atau pendingin sebagaimana dijelaskan diatas.
10. Pemindahan embrio harus dilakukan dalam waktu sesingkat mungkin, dan tidak boleh melebihi 4 hari termasuk waktu pengumpulan dan pemrosesan.

4.3 Protokol

Tahapan kultur yang dijelaskan di bawah ini dapat dirangkum menjadi sebuah diagram yang disajikan dalam bentuk poster berukuran A3 yang dipajang di laboratorium untuk kemudahan referensi.

4.3.1 Tahap 1 – Kultur awal

1. Apabila silinder endosperm dipindahkan, saat tiba di laboratorium, silinder tersebut harus disterilkan kembali permukaannya dan dibilas dengan air steril (Langkah 3 dan 4, Bagian 4.2).
2. Di dalam laminar *air flow cabinet*, embrio-embrio dipisahkan dari dari silinder endosperm dan diletakkan dalam cawan Petri steril.
3. Apabila yang di bawa ke laboratorium hanya embrio, saat tiba di laboratorium, embrio tersebut harus dipindahkan ke tabung steril dan dicuci tiga kali dengan air steril sebelum dipindahkan ke Petridis yang steril.
4. Dalam laminar air flow cabinet , embrio-embrio hasil dari kedua metode transportasi disterilkan dengan larutan pembersih 10% selama 1 menit dan dibilas dengan air steril tiga kali.

5. Embrio-embrio kemudian dipindahkan ke cawan Petri steril yang dilapisi dengan kertas saring untuk menyerap air yang masih tersisa pada permukaan.
6. Satu-persatu embrio-embrio tersebut diletakkan dalam tabung pengujian menggunakan media cair yang ditambahkan ABA (0.25 mg L⁻¹). ABA dibutuhkan untuk mendapatkan hasil germinasi yang seragam khususnya saat menggunakan embrio dari buah yang berbeda umur. Penambahan 10 µM GA3 untuk menggantikan ABA dibutuhkan saat bekerja dengan varietas yang memiliki tingkat germinasi rendah.
7. Embrio-embrio dalam media cair kemudian diinkubasikan dalam ruang gelap selama 1 bulan.
8. Setelah beberapa saat, haustoria embrio perlu (apabila telah tumbuh cukup besar untuk menghalangi pemindahan) atau tidak perlu dibuang (keputusan operator). Bagian yang tersisa kemudian dipindahkan ke media padat (media yang sama seperti yang dijelaskan diatas tetapi mengandung 2% agar dan tanpa ABA) serta disubkultur setiap bulan sampai terbentuk kuncup dan akar (dalam beberapa kasus, akar mungkin tidak berkembang).
9. Bibit hasil germinasi tersebut kemudian diletakkan dalam kondisi bercahaya (lihat Bagian 3.4) saat mereka telah memiliki kuncup dengan panjang minimum 1 cm.
10. Semua embrio yang tidak berhasil berkecambah kemudian dibuang pada akhir dari 12 minggu masa inkubasi.

4.3.2 Tahap 2 – Pertumbuhan Awal Bibit (sampai tahap daun 1)

1. Bibit tersebut disubkulturkan ke dalam media cair dengan formulasi yang sama tetapi mengandung 100 µM NAA (untuk mendorong pembentukan dan perkembangan akar).
2. Setelah 1 bulan dalam media yang menstimulasi system perakaran, bibit disubkulturkan ke dalam media kultur cair tanpa NAA.
3. Bibit tersebut kemudian disubkulturkan setiap bulan pada media segar sampai bibit mempunyai minimum satu daun yang telah membuka sempurna, dan pada tahap tersebut bibit dapat dipindahkan ke kondisi pertumbuhan kultur embrio konvensional atau lingkungan fotoautotropik (jika prasarana untuk melakukan hal ini tersedia) (Bagian 4.3.3).

4.3.3 Tahap 3 – Pertumbuhan akhir bibit (sampai tahap daun 3)

Kultur embrio konvensional

1. Demi menghemat media kultur, sub kultur bibit yang dilakukan setiap bulan dilanjutkan dengan menggunakan media cair segar dalam tabung reaksi yang panjang.
2. Pada saat bibit telah menghasilkan dua daun yang membuka serta akar-akar sekunder telah terbentuk pada akar primer, bibit tersebut dapat dipindahkan ke wadah yang lebih besar (lihat Bagian 3.2) dan penambahan tinggi bibit diakomodasi dengan menambahkan kantong plastik yang dapat di autoklaf di atas tabung sehingga bibit memiliki ruang yang cukup untuk pertumbuhan.
3. Pada subkultur terakhir, pemotongan akar mungkin diperlukan untuk menjamin kontak antara kuncup bagian bawah dan akar dengan media kultur. Apabila hal ini tidak dilakukan, akar dapat mendorong kuncup ke atas media sehingga mengurangi kontak dengan media yang akhirnya mengakibatkan pertumbuhan kultur buruk. Bahani substrat local yang tersedia, seperti abu serat (steril), dapat ditambahkan dalam media untuk mendorong perkembangan akar.
4. Bibit dengan daun 3-4 dan akar dengan akar sekunder serta tertier kemudian dapat diletakkan dalam pot. Keseluruhan masa kultur dapat membutuhkan waktu satu tahun atau lebih.

Fotoautotropik menggunakan kondisi kaya akan CO₂

Sebagai pengganti metode kultur embrio konvensional seperti dijelaskan di atas, saat bibit menghasilkan setidaknya satu daun membuka penuh, bibit dapat dipindahkan ke dalam sistem fotoautotropik dan kondisi kaya CO₂ (Gambar 4). Media yang digunakan dalam sistem ini adalah mineral Y3 dengan Fe-EDTA tanpa sukrosa.

1. Bibit, khususnya akar, dicuci dengan air dari keran
2. Bibit kemudian diletakkan dalam larutan fungisida BenlateTM (2 g L⁻¹) selama 15 menit.
3. Bibit-bibit tersebut kemudian dipindahkan ke dalam pot 100 mL mengandung 10 g vermikulit yang telah diautoklaf, atau substrat abu serat kelapa yang direndam dalam mineral Y3.
4. Pot kemudian diletakkan dalam wadah kultur 500 mL dengan 40 mL media cair yang mengandung mineral Y3.
5. Wadah, tanpa tutup, kemudian diletakkan dalam kotak pertumbuhan kaya CO₂.
6. Kotak kemudian dialiri dengan CO₂ (1600 ppm) pada saat periode ada cahaya dan dengan udara selama periode gelap.
7. Wadah diisi dengan mineral Y3 seperlunya (normalnya setiap minggu) dan larutan mineral Y3 seluruhnya harus diganti setiap bulan.

4.3.4 Tahap 4. Aklimatisasi bibit dan pemeliharaan sebelum pembibitan

Kultur embrio konvensional

1. Wadah dipindahkan dari laboratorium dan diletakkan dalam rumah kaca selama 1 minggu untuk memulai proses penguatan (hardening off).
2. Setelah 1 minggu dalam rumah kaca, bibit dikeluarkan dari wadah dan dicuci dengan air keran
3. Bibit dicelupkan dalam larutan fungisida BenlateTM (2 g L⁻¹) selama 15 menit dan masing-masing ditanam dalam kantong plastik berisi campuran tanah kebun dan abu serat kelapa dengan perbandingan 1:1) dan disiram dengan air.
4. Tanaman kemudian diletakkan dalam kotak aklimatisasi (Gambar 5) dimana bibit tetap ditutup selama 3 sampai 4 minggu atau sampai bibit tidak lagi menunjukkan adanya pengaruh kondisi in vitro.
5. Setelah masa ini, bibit perlahan-lahan dipaparkan dengan kondisi rumah kaca dan hal ini dilakukan dengan membuka sebagian tutup plastik kotak aklimatisasi.
6. Satu sampai dua minggu kemudian, tanaman dipaparkan secara penuh dengan kondisi rumah kaca.
7. Tanaman diberi air seperlunya dan pupuk cair diberikan pada daun setiap minggu.
8. Bibit kemudian dirawat dengan menggunakan prosedur pemeliharaan bibit kelapa seperti yang biasa dilakukan, termasuk pengendalian hama, sampai bibit tersebut siap untuk ditanam di lapangan.

Kultur fotoautotropik menggunakan kondisi kaya CO₂

Ketika bibit telah mencapai tahap daun 3 atau 4 (biasanya setelah 2 atau 3 bulan masa pertumbuhan dalam kondisi kaya CO₂), bibit telah siap untuk dipindahkan ke tempat pembibitan.

1. Pada tahap daun 3 atau 4, penyemprotan CO₂ dihentikan dan bibit perlahan-lahan dipaparkan dengan kondisi sekitar, dengan membuka sebagian tutup kotak CO₂, selama periode dua minggu.
2. Wadah diisi dengan mineral Y3 seperlunya.
3. Setelah dua minggu, bibit dipindahkan ke rumah kaca dan ditanam dalam kantong plastik hitam yang berisi media campuran steril.
4. Pupuk dengan laju pelepasan rendah (slow release fertilizer) diberikan dan pupuk cair diberikan setiap minggu pada bulan pertama.
5. Tanah disirami seperlunya dan pengendalian hama dilakukan sesuai dengan prosedur.

4.3.5 Tahap 5. Pemindahan bibit ke tempat pembibitan

Setelah tiga bulan aklimatisasi dalam kondisi teduh, bibit telah siap untuk dipindahkan ke tempat pembibitan.

1. Bibit ditanam dalam kantong polietilen besar yang mengandung campuran serat kelapa non-steril dan tanah.
2. Kantong kemudian diletakkan dalam tempat pembibitan dan diberi atap.
3. Tanaman disiram dengan air, dipupuk dan dilindungi dari hama dengan mengikuti prosedur yang biasa dilakukan untuk pengelolaan pembibitan.
4. Tiga sampai lima bulan setelah itu, saat bibit memiliki 4 sampai 6 daun dan setidaknya satu memiliki daun muda, bibit dapat dipindahkan ke lapangan dan dipelihara menurut prosedur penanaman di lapangan.

5 Pengamatan

Embrio biji kelapa terbungkus dalam endosperm dan berada di bawah operculum atau 'mata tempel', di dalam endocarp. Kerusakan pada embrio saat proses isolasi harus dicegah dan jika terjadi kerusakan, embrio yang rusak harus dibuang.

Sebagian embrio akan germinasi dalam waktu satu bulan pertama setelah kultur dimulai. Embrio tersebut kemudian dipindahkan ke media kultur padat dengan hati-hati agar embrio tersebut berada pada posisi yang benar, dengan akar dan kuncup dapat tumbuh dengan arah yang benar.

Apabila akar mendorong plantlet ke atas ke luar dari media maka akar tersebut harus dipotong. Namun demikian, pemotongan akar tidak perlu dilakukan jika bibit tumbuh dalam kondisi fotoautotropik sebab cara ini menggunakan vermikulit sebagai media pendukung. Dalam vermikulit, sistem perakaran berkembang dengan baik dan fenomena 'tumbuh ke atas' dapat diamati.

Pencegahan terjadinya kontaminasi oleh mikroorganisme harus dilakukan, dan kontaminasi-silang dari bibit ke bibit selama periode subkultur juga harus dicegah. Kebersihan, pengaturan yang efisien dan sterilisasi rutin semua bahan dan peralatan akan mengurangi kemungkinan terjadinya kontaminasi.

Ada banyak penyebab mengapa embrio dan plantlet memiliki fitur-fitur abnormal. Salah satunya adalah jaringan mengalami hidrasi yang berlebihan atau pertumbuhan embrio yang terhambat. Dalam banyak kasus fitur-fitur abnormal ini tidak dapat diperbaiki dan embrio harus dibuang. Disamping itu, embrio yang tidak berkecambah setelah masa 12 minggu harus dibuang sehingga media hanya akan dipergunakan oleh embrio yang bagus.

6 Hasil

Tergantung pada genotipe kelapa yang dikulturkan, laju germinasi in vitro berkisar antara 60 sampai 85 %. Kematian sampai dengan periode aklimatisasi bibit mungkin dapat mencapai 10%. Kehilangan ini belum termasuk yang disebabkan karena kontaminasi bibit sebagai akibat prosedur aseptik pada tahap awal. Kehilangan juga dapat terjadi selama penempatan bibit dalam tanah di bawah naungan atap. Tingkat keberhasilan sistem baru ini lebih tinggi dibandingkan dengan sistem kultur embrio hibrida dan teknik ini dapat diterapkan pada berbagai tipe kelapa.

Penggunaan sistem pengayaan $-CO_2$ sangat berguna untuk mengurangi kemungkinan kehilangan bibit selama periode aklimatisasi. Disamping itu, periode dimana bibit berada dalam kondisi in vitro dapat diperpendek (dari 1 tahun menggunakan metode lama EC hibrida menjadi 4 bulan menggunakan protokol baru). Saat bibit mencapai tahap daun 1, bibit tersebut telah siap untuk pertumbuhan fotoautotropik menggunakan sistem kaya CO_2 . Periode ini hanya memakan waktu tambahan dua bulan sebelum bibit siap untuk

Metode fotoautotropik membutuhkan tambahan peralatan, bahan, dan keahlian operator. Tambahan biaya tersebut dapat ditutupi dengan adanya penghematan jumlah media yang digunakan dan dengan peningkatan jumlah bibit yang dihasilkan.

7 Penerapan pada mutan

Sebagian besar pekerjaan yang dilakukan di *Albay Research Station of Philippines Coconut Authority* (PCA) (Gambar 6) dan di *University of Queensland* (UQ) untuk mengembangkan protokol baru dengan menggunakan *Laguna Tall* yang juga memiliki mutan kelapa *Makapuno*. Bahan lain yang digunakan dalam percobaan adalah *Malayan Yellow Dwarf* (MYD), *Nias Yellow Dwarf*, *Mapanget Tall*, *Bali Tall*, *PNG Brown Dwarf* dan varietas kelapa aromatik dari Vietnam. Untuk varietas aromatik, 2 mg/L IBA digunakan sebagai pengganti NAA (lihat Tabel 1) untuk mendorong pertumbuhan akar. Dalam kasus ini, IBA harus digunakan dalam seluruh proses subkultur sampai daun pertama terbentuk. MYD biasanya dipakai sebagai varietas control. Sejauh ini belum ada penelitian mendalam mengenai penerapan protokol baru ini pada kelapa mutan tipe *Makapuno* dan *Kopyor*. Namun, dari hasil yang diperoleh dan kenyataan bahwa embrio mutan memiliki reaksi *in vitro* yang serupa dengan embrio biasa, protokol baru disimpulkan dapat diterapkan pada semua tipe kelapa termasuk kelapa mutan. Penelitian dalam skala yang lebih besar dianjurkan untuk membuat protocol tersebut lebih efisien dan ekonomis.

8 Masalah keselamatan

Langkah-langkah yang dijelaskan dalam manual ini harus diikuti sesuai dengan standar keselamatan yang harus diterapkan di laboratorium dimana percobaan dilaksanakan. Kehati-hatian sangat dibutuhkan saat memasang dan menggunakan sistem pengayaan CO₂. Sistem pengayaan CO₂ telah digunakan di pembibitan tanaman selama beberapa dekade dan baru-baru ini di laboratorium kultur jaringan. Sistem pengayaan CO₂ yang digunakan dapat dikatakan sebagai sistem tertutup. Dengan sistem ini, CO₂ dapat mengalir keluar dari alat dan berkumpul di ruang kultur. Oleh sebab itu, tabung dan koneksi harus diperiksa dengan teratur untuk mencegah kebocoran. Konsentrasi maksimum CO₂ yang dapat diijinkan dalam bangunan menurut standar laboratorium Australia adalah 5.000 ppm. Meskipun gas ini tidak beracun, gas ini dapat mengakibatkan kekurangan O₂ dan kesulitan pernafasan. Oleh karena itu, monitor harus dipasang untuk mengetahui konsentrasi CO₂ dalam ruang kultur dan langkah-langkah antisipasi harus diambil jika batas maksimum tersebut tercapai.

9 Referensi

- Ashburner GR, Faure MG, Franz PR, Tomlinson DR, Pulo P, Burch JM and Thompson WK (1994) Coconut embryo culture for remote locations. In: Ashburner GR and Faure MG (eds) Termination report: ACIAR Project No. 9025 Coconut improvement (pp 25-28). Institute for Horticultural Development. Victoria, Australia.
- Ashburner GR, Faure MG, Tomlinson DR and Thompson WK (1995) A guide to the zygotic embryo culture of coconut palms (*Cocos nucifera* L.). ACIAR Technical Reports No. 36. ACIAR, Canberra.
- Assy Bah B (1986) Culture in vitro d'embryons zygotiques de cocotiers. *Oléagineux* 41:321-328.
- Assy-Bah B and Engelmann F (1992) Cryopreservation of immature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Cryo Letters* 13:67-74.
- De Guzman EV and Del Rosario AG (1974) The growth and development in soil of makapuno seedlings cultured *in vitro*. National Research Council of the Philippines, Research Bulletin 29:1-16.
- Eeuwens C J (1976) Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) and cultured in vitro. *Physiologia Plantarum* 36:23-28.
- Engelmann F and Batugal P (2002) Background on the development and implementation of the coconut embryo *in vitro* culture project. In: Engelmann F, Batugal P and Oliver JT (eds) Coconut embryo *in vitro* culture part II. IPGRI-APO, Serdang. 1-4.
- George EF (1993) Plant propagation by tissue culture, Part 1, The technology. 2nd edition. Exegetics, Edington.
- Harries HC (1982) Coconut genetic resources and the plant breeder: some new approaches to collection, use and storage. In: Singh RB and Chomchalow N (eds) Genetic resources and the plant breeder. International Board for Plant Genetic Resources, Bangkok. 113-118.
- Karunaratne S, Santha S and Kovoov A (1991) An in vitro assay for drought-tolerant coconut germplasm. *Euphytica* 53(1):25-30.
- Rillo EP and Paloma MBF (1992a) Storage and transport of zygotic embryos of *Cocos nucifera* L. for in vitro culture. *Plant Genetic Resources Newsletter* 86:1-4.
- Rillo EP and Paloma MBF (1992b) In vitro culture of Macapuno coconut embryos. *Coconuts Today* 9:90-108.
- Samosir YMS, Godwin ID and Adkins SW (1999) Culturability of coconut embryos following cold incubation: A technique for germplasm collection in remote sites. *Australian Journal of Botany* 47:69-75.
- Sisunandar, Samosir YMS and Adkins S (2005) Desiccation of coconut embryo for cryopreservation. Poster presented at 8th International Seed Conference, Brisbane, 8-13 May 2005.

10 Sekilas tentang protokol

New Improved Protocol of COCONUT EMBRYO CULTURE

for Germplasm Collection and Mutant-Type Seedling Production

Yohannes Samosir, Stephen W Adkins, Nurhaini Mashud, Erlinda P. Rillo, Vu Thi My Lien, Pablito Magdalita, Olivia Damasco, Alfred Kembu

1. PREPARATION OF PLANT MATERIAL

2. START AND GROWING UP

CONVENTIONAL EMBRYO CULTURE

1. PREPARATION OF PLANT MATERIAL



Source materials



Spilt and dehusked nut



Endosperm isolation



Embryo isolation



Sterile embryo ready to culture



Embryo germinates in liquid medium supplemented with 0.25 mg/L ABA



Seeding after subculture into solid medium containing 10 µM NAA



Seeding after subculture into liquid medium without NAA. Subculture every month into fresh medium until they have unfolded leaf, then they can be transferred into next step

3. GETTING BIGGER SEEDLING



Seeding with expanded leaves and secondary root after subculturing into fresh liquid medium at every month regular basis



Seeding with 3-4 expanded leaves with secondary and tertiary roots are old enough for rooting (acclimatization)



Seeding after 1 month in CO₂ enrichment condition. The Medium used in this system is Y3 mineral including Fe-EDTA without sucrose. Refresh the media should be done every week (as necessary) with fresh medium solution



Schematic of CO₂-enrichment apparatus for photoautotrophic condition of seedling

4. ACCLIMATISATION AND NURSERY

CONVENTIONAL EMBRYO CULTURE



Seeding should be kept in the acclimatization box for 3-4 weeks until they have manifested complete recovery from stress condition



Seeding after 3 months of acclimatization are ready for transferring to big nursery



The plants with 4-5 leaves with at least one of them has a leaflet after another 3-5 months in the nursery are ready to be transferred to the field

PHOTOAUTOTROPHIC WITH CO₂-ENRICHMENT CONDITIONS



The seedling with 3 to 4 expanded leaves after 2-3 months growing under CO₂ enrichment condition are have been transferred to nursery



Australian Government
Australian Centre for International Agricultural Research
THE UNIVERSITY OF QUEENSLAND AUSTRALIA
ICOPRI
Pioneer Campus Building
ANALYTICAL RESEARCH CENTER



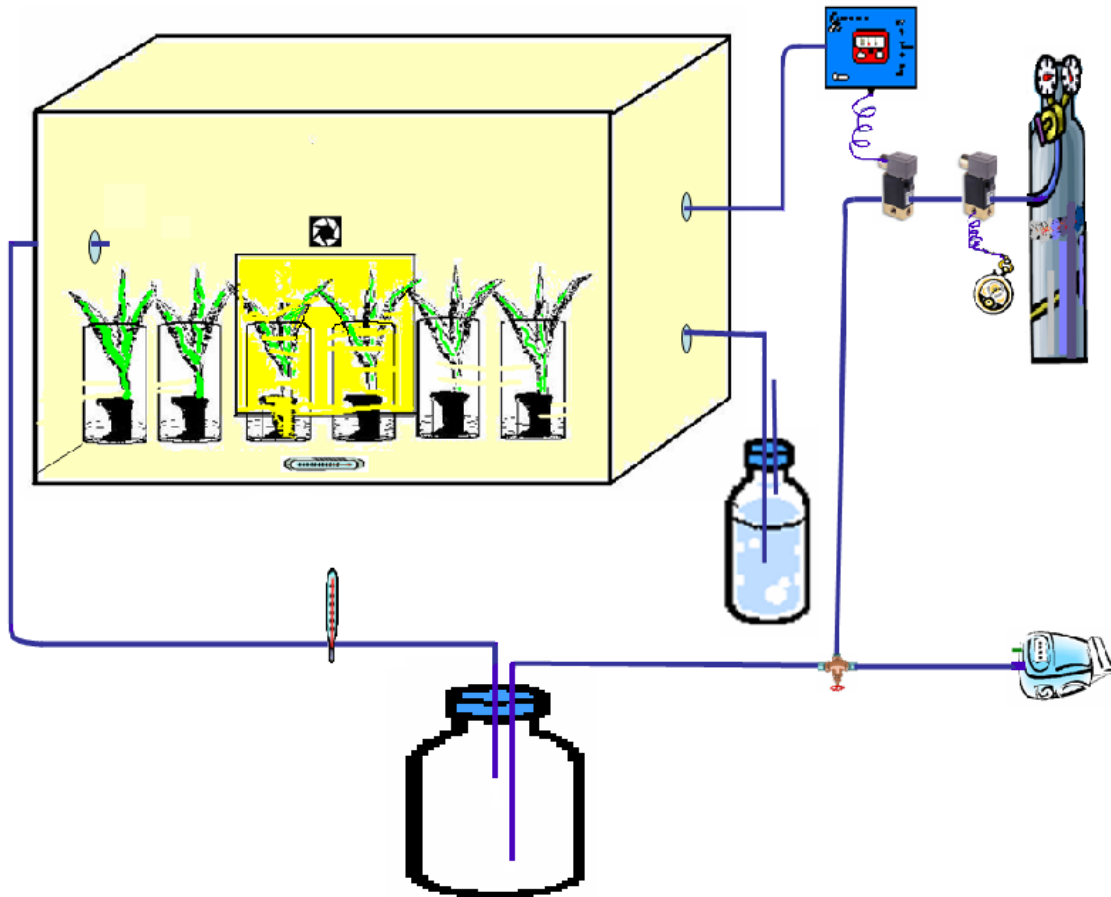
Gambar 1. Stadium ideal dari perkembangan buah kelapa untuk isolasi embrio zigot dan kultur adalah saat beberapa buah dalam satu tandan telah berubah warna menjadi coklat. Pada tahap ini, umur buah diperkirakan 10 sampai 11 bulan setelah polinasi.



Gambar 2. Bor yang digunakan untuk mengambil penyumbat endosperm dari batok yang telah dibelah.



Gambar 3. Berbagai jenis wadah yang digunakan dalam kultur embrio kelapa. Wadah kultur polikarbonat (diameter 2.5 cm dan tinggi 8 cm) yang biasanya digunakan untuk langkah pertama sampai setidaknya bibit mempunyai satu daun membuka penuh (a). Wadah yang lebih besar dibutuhkan sesuai dengan laju pertumbuhan bibit (b). Sistem wadah ganda yang digunakan untuk bibit paling besar (c). Kantong plastik polietilen (autoclavable) yang diletakkan diatas wadah kultur dapat digunakan sebagai pengganti system wadah ganda (d).



Gambar 4. Sistem pengayaan atmosfer CO₂ untuk kultur kelapa. Ruang terbuat dari lembaran akrilik transparan (tebal 6 mm , panjang 1100 mm, lebar 500 mm dan tinggi 400 mm). CO₂ murni kemudian dipompa dan dicampur dengan udara sekitar (dalam botol Schott 2 L) sebelum dimasukkan dalam kamar menggunakan tabung silikon (diameter dalam tabung 4 mm). Konsentrasi CO₂ (1600 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) yang dihasilkan dalam ruang diamati dan dijaga dengan menggunakan monitor CO₂.



Gambar 5. Kotak aklimatisasi (a) yang digunakan untuk menyelesaikan semua tahapan aklimatisasi sebelum bibit ditanam dalam tanah di rumah kaca. Kotak yang lebih besar atau tenda (b) dapat juga dipakai ketika jumlah bibit banyak. Tenda dilengkapi dengan sistem kelembaban otomatis dan kipas ventilasi.



Gambar 6. Penerapan teknik kultur embrio baru untuk produksi massal kelapa mutan Makapuno yang bernilai tinggi.