

OPTIMASI DAYA ADAPTASI PLANLET KELAPA KOPYOR HASIL KULTUR EMBRIO

Weda Makarti Mahayu, Sukmawati Mawardi, dan Nurhaini Mashud
Balai Penelitian Tanaman Palma, Manado

ABSTRAK

Kelapa kopyor merupakan jenis kelapa bernilai ekonomi tinggi yang pengembangannya dapat dilakukan secara alami maupun melalui teknik kultur *in vitro* atau kultur embrio. Penggunaan teknik kultur embrio untuk pengembangan kelapa kopyor bertujuan untuk meningkatkan persentase buah kopyor per pohon.

Teknik kultur embrio kelapa kopyor hingga saat ini belum optimal, yaitu pada tahap aklimatisasi (*ex vitro*) karena daya adaptasi planlet pada kondisi *ex vitro* masih rendah sehingga benih kelapa kopyor siap tanam yang dihasilkan rendah. Oleh karena itu, daya adaptasi planlet harus ditingkatkan. Peningkatan daya adaptasi dapat dilakukan melalui 2 cara: 1) Perbaikan kondisi aklimatisasi, 2) Modifikasi lingkungan tumbuh *in vitro*. Cara pertama diarahkan pada peningkatan daya adaptasi melalui aklimatisasi bertahap terhadap lingkungan *ex vitro* dari segi pencahayaan, media tanam dan iklim mikro. Cara kedua dilakukan dengan memodifikasi lingkungan *in vitro* dari kondisi lingkungan yang terkontrol di laboratorium menjadi lingkungan normal di *green house* dengan suhu dan kelembaban sebagai perlakuan (terkendali dan tidak terkontrol). Cara kedua diarahkan untuk menghasilkan planlet *in vitro* yang memiliki daya adaptasi yang tinggi pada saat aklimatisasi sehingga meningkatkan jumlah benih kelapa kopyor yang siap tanam. Tingkat keberhasilan tumbuh yang tinggi diharapkan menjadikan harga bibit kelapa kopyor hasil kultur embrio dapat terjangkau oleh petani.

Kata kunci: Kelapa kopyor, kultur embrio, aklimatisasi, *green house*, daya adaptasi, planlet.
Aklimatisasi, *in vitro*, *ex vitro*,

PENDAHULUAN

Kelapa kopyor merupakan salah satu kelapa unik, daging buahnya lembut dan sebagian besar tidak melekat pada tempurung seperti daging buah kelapa pada umumnya. Ketidaknormalan daging buah kopyor tersebut diduga disebabkan oleh terjadinya defisiensi salah satu enzim yang berperan dalam pembentukan daging buah kelapa, yaitu enzim α -D-Galaktosidase seperti yang terjadi pada kelapa Makapuno berdasarkan hasil penelitian biokimia (Maskromo dan Novianto, 2007). Tanaman kelapa ini memiliki fenotipe seperti kelapa normal pada umumnya namun membawa gen untuk sifat kopyor pada salah satu alel dalam lokus yang mengatur sifat kopyor (Sukendah *et al.*, 2008).

Berdasarkan hasil survei Balitka pada tahun 2006 diketahui bahwa kelapa kopyor terdiri atas dua tipe, yaitu tipe Dalam dan tipe Genjah. Saat ini, Balai Penelitian Tanaman Palma memiliki

koleksi *ex situ* kelapa Genjah kopyor sebanyak enam aksesori berdasarkan warna buahnya, yaitu hijau, hijau kekuningan, coklat tua, coklat muda, kuning (gading wulan) dan orange (gading) yang semuanya ditanam di kebun Percobaan Kima Atas, Manado. Kelapa tipe ini banyak ditemukan di Kabupaten Pati (Jawa Tengah) dan Jember (Jawa Timur), sedangkan kelapa kopyor tipe Dalam terdiri dari tiga warna yaitu, hijau, hijau kekuningan dan coklat. Kelapa tipe ini ditemukan di Kalianda (Lampung Selatan), Ciomas (Bogor), Pati (Jawa Tengah), Sumenep dan Jombang (Jawa Timur).

Cara perbanyak kelapa kopyor dapat dilakukan melalui : 1) secara alami, yaitu dengan menggunakan buah yang berasal dari tandan buah yang menghasilkan kelapa kopyor 2) teknik *in vitro* atau teknik kultur embrio, yaitu dengan menanam embrio kelapa kopyor pada media tumbuh buatan dalam kondisi lingkungan steril dan terkontrol. Tanaman kelapa kopyor hasil perbanyak alami menghasilkan buah kopyor yang memiliki genotype berbeda dengan tetuanya sebagai akibat dari penyerbukan silang. Kelapa Dalam memiliki peluang terjadinya penyerbukan silang sebesar 95%, sedangkan kelapa Genjah memiliki peluang penyerbukan sendiri 95% (Novarianto, 2005). Persentase buah kopyor per tandan yang dihasilkan kelapa kopyor alami tipe Dalam 10-20% dan tipe Genjah 20-60% (Mashud *et al*, 2006). Tanaman kelapa kopyor hasil perbanyak dengan teknik kultur embrio menghasilkan buah kopyor mencapai 90-100% (Mashud *et al*, 2006).

Hasil penelitian Hutapea (2007) usahatani kelapa kopyor yang paling menguntungkan adalah pengembangan kelapa kopyor tipe Genjah hasil kultur embrio yang diikuti dengan pengembangan kelapa kopyor tipe Dalam hasil kultur embrio dan pengembangan kelapa Genjah kopyor secara alami. Harga bibit kelapa kopyor hasil kultur embrio saat ini mencapai Rp 385.000,00. Harga bibit kelapa kopyor hasil kultur embrio yang mahal sebanding dengan potensi hasil yang sangat menjanjikan, namun tidak terjangkau petani. Para pengusaha mulai tertarik pada usaha tani kelapa kopyor dan menyebabkan kebutuhan benih hasil kultur embrio meningkat, namun hingga saat ini permintaan benih kelapa kopyor belum terpenuhi. Hal ini merupakan peluang pasar yang perlu ditindaklanjuti. Balai Penelitian Tanaman Palma telah menghasilkan teknik kultur embrio kelapa kopyor, namun presentase benih yang dihasilkan masih rendah, karena daya adaptasi planlet yang rendah pada tahap aklimatisasi. Beberapa modifikasi saat aklimatisasi telah dilakukan berkaitan dengan kondisi iklim mikro, komposisi media tumbuh *ex vitro* (pada saat aklimatisasi), dan takaran pupuk organik maupun anorganik. Untuk mengatasi permasalahan ini, aspek penelitian diarahkan pada perbaikan kondisi *ex vitro* baik media tumbuh, pupuk, maupun iklim mikro. Aspek lain yang perlu dipertimbangan adalah menumbuhkan embrio kelapa kopyor secara *in vitro* tetapi dipelihara di *green house* dengan temperatur terkontrol dan tidak terkontrol dengan sumber cahaya sinar matahari. Di CICY (Centro de Investigacion Cientifica de Yucatan), Mexico, teknik ini telah dilakukan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa planlet *in vitro* yang dipelihara di rumah kaca memiliki daun lebih banyak, berat kering yang tinggi, dan laju fotosintesis yang paling tinggi dibandingkan planlet *in vitro* yang dipelihara dalam laboratorium. Setelah enam bulan diaklimatisasi planlet yang berasal dari rumah kaca memiliki daya adaptasi dan laju pertumbuhan yang tinggi dibandingkan planlet yang berasal dari laboratorium.

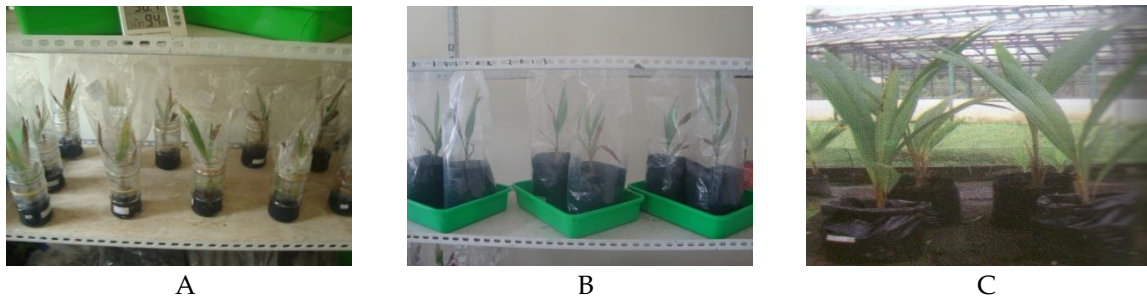
AKLIMATISASI KULTUR EMBRIO KELAPA KOPYOR

Teknik kultur embrio kelapa telah berhasil dilakukan untuk tujuan koleksi, pertukaran plasma nutfah, dan *phytosanitary* (Engelmann, 1998; Ashburner dan Thompson, 1993), penyelamatan aksesori kelapa spesifik (Tahardi, 1997; Rillo, 1997), kelapa kenari (Mashud *et al*, 2002) dan untuk perbaikan bahan tanaman kelapa (Damasco, 2000). Kultur embrio kelapa kopyor merupakan teknik perbanyakan kelapa dengan menggunakan teknologi *in vitro*, yaitu menanam embrio kelapa kopyor pada media tumbuh buatan dalam kondisi steril dan terkontrol. Kultur embrio digunakan untuk menghasilkan tanaman kelapa kopyor yang menghasilkan buah kopyor >90%, dari satu embrio kelapa kopyor menghasilkan satu planlet. Teknik kultur embrio terdiri atas dua tahap yaitu *in vitro* dan *ex vitro*. Tahap *in vitro* dimulai dari sterilisasi embrio dan dilanjutkan dengan menanam embrio dalam media tumbuh buatan hingga dihasilkan planlet yang siap di aklimatisasi. Tahap *ex vitro* adalah tahap aklimatisasi planlet kelapa kopyor pada kondisi lingkungan yang tidak terkontrol.

Aklimatisasi merupakan masa adaptasi tanaman hasil kultur embrio dari kondisi *in vitro* dengan kondisi lingkungan terkendali, bersifat aseptik dengan memperoleh senyawa organik secara eksogenous (heterotrof) ke lingkungan alami yang tidak terkendali dan memperoleh senyawa organik secara endogenous (autotrof). Aklimatisasi menjadi tahapan yang penting pada proses kultur embrio dan merupakan titik kritis dalam keberhasilan kultur embrio. Pada umumnya planlet yang dihasilkan pada kultur embrio memiliki lapisan lilin serta kutikula tipis dan belum berkembang baik, sel-sel dalam palisade belum berkembang maksimal, jaringan pembuluh dari akar ke pucuk kurang berkembang, dan stomata seringkali tidak berfungsi maksimal untuk mencegah penguapan tinggi (Muhit, 2007). Kondisi tersebut menyebabkan planlet sangat peka terhadap evapotranspirasi yang tinggi, intensitas cahaya yang tinggi, infeksi mikroorganisme, dan ketidakmampuan tanaman menyerap unsur hara dari media tanam. Selain itu perubahan drastis dari kondisi lingkungan terkendali ke lingkungan tidak terkendali menyebabkan tanaman mengalami stres sehingga dapat menurunkan daya hidup planlet tersebut.

Faktor penting yang perlu diperhatikan pada proses aklimatisasi yaitu, iklim mikro (kelembaban, cahaya, suhu) dan media tanam. Media tanam yang biasa digunakan pada aklimatisasi yaitu pasir, sekam, *cocopeat*, tanah, kompos dan vermikulit. Media dapat berupa media tunggal ataupun kombinasi dari beberapa jenis media. Media tumbuh awal yang digunakan biasanya disterilisasi terlebih dahulu untuk mengurangi kontaminasi.

Pada prinsipnya tahap aklimatisasi ini terdiri atas tiga tahap, yaitu: (1) *Hardening* (penguatan), planlet kelapa kopyor yang siap di aklimatisasi dan masih dalam botol kultur dipindah ke screen house selama 2 minggu, (2) *Weaning* (penyapihan), planlet yang telah melewati fase *hardening* dicuci dengan air mengalir, kemudian ditanam dalam pot atau polibag dengan media pasir steril tanpa pupuk selama 2 minggu, dan (3) Planlet-planlet yang telah melewati fase *weaning* dipindah ke dalam pot berisi media tumbuh yang terdiri atas campuran beberapa media tumbuh dengan perbandingan tertentu. Setelah 2-3,5 bulan, planlet siap pindah ke lapangan.



Gambar 1. Planlet pada tahap *ex vitro* : (A) *Hardening*; (B) *Weaning*; (C) Planlet siap pindah ke lapangan (Sumber : Mashud, 2007)

Balai Penelitian Tanaman Palma telah melakukan aklimatisasi planlet kelapa kopyor pada beberapa jenis media tanam, namun hingga saat ini keberhasilan planlet yang tumbuh menjadi bibit siap tanam masih rendah. Media tanam yang digunakan antara lain adalah campuran media arang sekam dan debu sabut steril. Pada media ini terjadi kontaminasi jamur yang menyebabkan planlet menjadi busuk dan akhirnya mati. Kontaminasi kemungkinan disebabkan tingginya kelembaban media karena debu sabut memiliki sifat menahan air lebih lama. Selain itu kandungan senyawa organik dan anorganik pada media debu sabut merupakan media tumbuhnya jamur (Roostika *et al.*, 2006).

Selain itu, campuran media pasir, tanah, vermikulit, dan pasir digunakan sebagai media tanam. Planlet pada media ini memperlihatkan perkembangan yang baik di awal aklimatisasi, namun tidak mampu bertahan hingga ke lapangan. Kendala yang ditemukan, yaitu pangkal batang menghitam, jaringan menjadi lunak kemudian diikuti dengan putusnya jaringan pada pangkal batang. Hal ini diduga disebabkan oleh kondisi iklim mikro pada saat aklimatisasi.

Kendala lain yang ditemukan saat aklimatisasi yaitu daya adaptasi planlet terhadap iklim mikro. Planlet memberikan respon negatif terhadap lingkungan terutama suhu dan kelembaban. Daun mengkerut dan layu karena hilangnya sebagian besar air dari dalam jaringan. Kondisi tersebut disebabkan ketidakmampuan stomata merespon laju respirasi yang cukup tinggi. Menurut Robinson *et al.* (2009), daun dari tanaman yang dihasilkan secara *in vitro* memiliki daun yang lemah secara anatomi dan memiliki jaringan floem yang sangat sedikit. Sehingga tanaman hasil *in vitro* memiliki daya adaptasi yang rendah terhadap perubahan iklim mikro yang tidak terkendali.

MODIFIKASI AKLIMATISASI

Pengembangan metode aklimatisasi kelapa kopyor hingga saat ini belum bisa menunjang perolehan bibit kopyor secara optimal. Kondisi khusus selama pelaksanaan teknik kultur jaringan dapat menyebabkan planlet yang dihasilkan abnormal, baik dari segi morfologi, anatomi maupun fisiologi (Paspisilova, 1999). Kemampuan autotrofik tanaman yang dikembangkan dengan teknik kultur jaringan biasanya sangat rendah sehingga tanaman tidak memiliki bahan organik yang

cukup untuk pertumbuhan. Hal ini disebabkan oleh laju sintesis senyawa organik dari bahan anorganik yang sangat rendah (Adiputra, 2011). Kondisi inilah yang menjadi penyebab kegagalan planlet beradaptasi dengan lingkungan tumbuh yang tidak terkontrol pada saat aklimatisasi.

Beberapa cara aklimatisasi dapat dilakukan untuk meminimalisir kegagalan planlet beradaptasi menjadi bibit yang siap tanam di lapang, yaitu :

Perbaikan Kondisi Aklimatisasi

Planlet yang telah terbiasa tumbuh pada lingkungan biotik dan abiotik yang optimum akan mengalami cekaman apabila dipindahkan ke lingkungan *ex vitro* yang tidak terkendali. Aklimatisasi dilakukan dengan tujuan agar planlet mampu menyesuaikan diri secara bertahap dengan lingkungan yang tidak terkendali dan mampu memberikan kesempatan planlet untuk tumbuh secara autotrof. Oleh karena itu cara aklimatisasi yang telah dilakukan perlu di modifikasi.

Kondisi ini dapat dimulai dengan menempatkan planlet pada tahap subkultur terakhir pada lingkungan *ex vitro* sebagai pra aklimatisasi. Cara ini diharapkan dapat menjadi stimulus bagi planlet untuk mulai beradaptasi dengan lingkungan luar terutama dari segi sumber cahaya, periode pencahayaan dan suhu lingkungan. Keadaan ini menyebabkan planlet mampu meningkatkan kandungan klorofil sehingga meningkatkan fungsi dan jumlah stomata, membentuk kutikula dan lapisan lilin yang lebih banyak sehingga vigoritas daun menjadi lebih baik. Menurut Paspisilova (1999), daun tanaman yang tumbuh dalam botol yang rapat mengakibatkan tidak memiliki lapisan pelindung yang tebal sehingga apabila dipindahkan ke lingkungan *ex vitro* maka laju transpirasi sangat cepat. Bibit tanaman yang dikembangkan secara *in vitro* memiliki jaringan floem yang sedikit (Robinson *et al.*, 2009) dan aktivitas autotrofik yang rendah (Daisy dan Wijayani, 1994). Oleh karena itu, perbaikan anatomi daun sebagai organ yang berperan penting dalam fotosintesis, respirasi dan transpirasi menjadi prioritas sebelum aklimatisasi dilaksanakan. Setelah melalui tahap ini, planlet dipindah ke dalam pot/polibag menggunakan sungkup plastik untuk weaning (penyapihan).

Pada saat anatomi daun planlet sudah beradaptasi dan nutrisi pada media semakin sedikit maka plastik sungkup dapat dipotong. Lubang pada sungkup berfungsi sebagai jalur sirkulasi udara. CO₂ dan O₂ pada udara dibutuhkan tanaman untuk respirasi dan fotosintesis. Kondisi ini mendorong planlet yang semula bersifat heterotrof beralih ke autotrof secara bertahap.

Pemotongan sungkup dilakukan secara bertahap sejalan dengan meningkatnya vigoritas planlet. Pada pemotongan sungkup tahap ketiga planlet dipindah ke lingkungan *ex vitro* yang ternaungi untuk proses aklimatisasi. Planlet yang telah cukup vigor dapat dipindahkan ke polibag berisi campuran pasir dan vermikulit steril. Pada tahap ini kontak planlet dengan udara luar sangat besar sehingga diperlukan rekayasa iklim mikro untuk mengantisipasi cuaca ekstrim yang sulit diprediksi. Usaha ini dapat dilakukan dengan meletakkan planlet di atas benda masif yang ditempatkan pada wadah yang berisi air. Penggunaan alas ini dimaksudkan untuk mencegah terjadinya kontak langsung antara air dengan polibag yang bisa menyebabkan pembusukan akar. Rekayasa iklim mikro ini dilakukan untuk menjaga suhu dan kelembaban di sekitar planlet. Untuk memenuhi kebutuhan air planlet perlu dilakukan penyiraman. Pada cuaca panas suhu udara naik, maka air dalam wadah akan mengalami evaporasi dan uap air yang dihasilkan akan menurunkan suhu dan menjaga kelembaban disekitar planlet tersebut. Apabila suhu dan kelembaban udara

dalam keadaan normal maka tingkat evaporasi air pada wadah pun rendah dan tidak berpengaruh negatif terhadap pertumbuhan planlet.

Proses aklimatisasi selanjutnya setelah periode penyapihan, yaitu planlet yang telah menjadi bibit sempurna perlu dipupuk dan diberi zat pengatur tumbuh auksin. Auksin memiliki peran penting dalam pertumbuhan dan perkembangan terutama akibat perubahan lingkungan (Tomas dan Perrot-Rechenmann, 2010). Planlet kelapa kopyor masih membutuhkan auksin eksogen untuk menyempurnakan pertumbuhan dan aktivitas autotrofiknya. Air kelapa diketahui mengandung senyawa organik (gula dan vitamin), anorganik (P, Mg, dan K), asam amino (asam glutamate, asparagin, prolin, dan glisin), dan sejumlah hormon pertumbuhan seperti auksin, sitokinin dan giberelin. (Raghavan, 1977). Menurut Unagul *et al* (2007), air kelapa mengandung monosakarida dengan kandungan gula setara 60g/l dan sejumlah vitamin untuk menjaga pertumbuhan biomasa rumput laut secara *in vitro*. Oleh karena itu, pemberian air kelapa sebagai sumber hara dan fitohormon bagi pertumbuhan planlet kelapa kopyor pada lingkungan *ex vitro* perlu dipertimbangkan. Pemberian unsur hara melalui daun merupakan salah satu alternatif untuk menunjang proses fisiologis planlet karena jaringan pembuluh dari akar ke daun belum kuat (Adiputra, 2011).

Modifikasi Fase Kultur *In vitro*

Kelapa kopyor merupakan tanaman tropis, sehingga perlu dipertimbangkan untuk menumbuhkan embrio kelapa kopyor di *green house* dengan menggunakan cahaya matahari dan suhu terkontrol atau tidak terkontrol. Hasil penelitian Talavera *et al* (2005) menunjukkan bahwa planlet *in vitro* kelapa yang dipelihara di rumah kaca memiliki daun lebih banyak, berat kering yang tinggi, dan laju fotosintesis yang paling tinggi dibandingkan planlet *in vitro* yang dipelihara dalam laboratorium. Setelah enam bulan diaklimatisasi planlet yang berasal dari rumah kaca memiliki daya adaptasi dan laju pertumbuhan yang lebih tinggi dibandingkan planlet yang berasal dari laboratorium. Rendahnya intensitas cahaya dalam laboratorium dibandingkan rumah kaca menyebabkan rendahnya laju fotosintesis pada planlet. Hal ini menunjukkan bahwa pemeliharaan planlet kelapa pada fase *in vitro* di rumah kaca perlu dievaluasi lebih lanjut sebagai salah satu alternative untuk meningkatkan persentase keberhasilan perbanyak benih kelapa kopyor secara *in vitro*.

PENUTUP

Aklimatisasi merupakan tahap terakhir kultur embrio yang sangat menentukan tingkat keberhasilan bibit siap tanam. Kondisi morfologi dan fisiologis planlet yang belum sempurna menyebabkan rendahnya daya adaptasi terhadap lingkungan *ex vitro*. Saat ini belum diperoleh cara aklimatisasi planlet kelapa kopyor hasil kultur embrio dengan tingkat keberhasilan yang tinggi. Oleh karena itu, perlu dilakukan modifikasi aklimatisasi untuk meningkatkan daya adaptasi planlet kelapa kopyor hasil kultur embrio.

Peningkatan daya adaptasi planlet dapat dilakukan melalui 2 cara: 1) Perbaikan kondisi aklimatisasi, 2) Modifikasi lingkungan tumbuh *in vitro*. Cara pertama diarahkan pada peningkatan

daya adaptasi melalui aklimatisasi bertahap terhadap lingkungan *ex vitro* dari segi pencahayaan, media tanam dan iklim mikro. Cara kedua dilakukan dengan memodifikasi lingkungan *in vitro* dari kondisi lingkungan yang terkontrol di laboratorium menjadi lingkungan normal di *green house* dengan suhu dan kelembaban sebagai perlakuan (terkontrol dan tidak terkontrol). Cara kedua diarahkan untuk menghasilkan planlet *in vitro* yang memiliki daya adaptasi yang tinggi pada saat aklimatisasi sehingga meningkatkan jumlah bibit kelapa kopyor yang siap tanam.

Optimasi daya adaptasi planlet melalui modifikasi aklimatisasi diharapkan dapat meningkatkan jumlah benih kelapa kopyor hasil kultur embrio yang siap tanam. Tingkat keberhasilan yang tinggi akan menekan harga benih kelapa kopyor hasil kultur embrio, sehingga terjangkau oleh petani. Keberhasilan teknologi kultur embrio kelapa kopyor akan mendorong berkembangnya industri kelapa kopyor.

DAFTAR PUSTAKA

- Adiputra, I.G.K. 2011. Induksi auksin terhadap aktivitas autotrofik bibit anggrek botol pada lingkungan *ex-vitro*. Widya Biologi Vol. 02 No. 02.
- Ashburner, G.R and W.K. Thompson. 1993. Coconut embryo culture for international transfer of germplasm. Proceeding of the International Symposium on Coconut Research and Development II. Kasaragod, India.
- Daisy P. Sriyanti Hendaryono dan Ari Wijayani 1994. Teknik kultur jaringan, pengenalan dan petunjuk perbanyak tanaman secara vegetatif- modern. Penerbit Kanisius.
- Damasco, O.P. 2000. Utilization of embryo culture technology for germplasm conservation : Development of Medium-term Conservation for Coconut Zygotic Embryos in the Philipines. Coconut Embryo *In Vitro* Part II IPGRI/APO Serdang, Selangor, Malaysia.
- Engelmann, F. 1998. Current state of the art and proble *in vitro* culture of coconut embryos. Paper Presented at a Workshop on Embryo Culture, 27–31 October 1997. Banao, Guinobatan, Albay, Philippines, IPGRI/APO. Serdang Malaysia.
- Hutapea, R.T.P. 2007. Analisis usahatani kelapa kopyor. Monograf Kelapa Kopyor. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. Balai Penelitian Tanaman Kelapa dan Palma Lain. Manado.
- Mashud, N., M.A. Tulalo, V. Masing. 2002. Kultur *in vitro* embrio kelapa kenari pada beberapa jenis media tumbuh. Prosiding Seminar Regional Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Kelapa. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. Balai Penelitian Tanaman Kelapa dan Palma Lain. Manado.
- Mashud, N., I. Maskromo, R.T.P. Hutapea, dan H. Novarianto. 2006. Potensi dan peluang pengembangan kelapa kopyor di Indonesia. Prosiding Konferensi Nasional Kelapa VI. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan.
- Mashud, N. 2007. Perbanyak kelapa kopyor dengan kultur *in vitro*. Monograf Kelapa Kopyor. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. Balai Penelitian Tanaman Kelapa dan Palma Lain. Manado.

- Maskromo, I. dan H. Novarianto. 2007. Perbanyak kelapa kopyor secara alami. Monograf Kelapa Kopyor. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. Balai Penelitian Tanaman Kelapa dan Palma Lain. Manado.
- Muhit, A. 2007. Teknik produksi tahap awal benih vegetatif krisan. Buletin Teknik Pertanian Vol. 12 No.1.
- Novarianto, H. 2005. Plasma nutfah dan pemuliaan kelapa. Perbanyak kelapa kopyor secara alami. Monograf Kelapa Kopyor. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. Balai Penelitian Tanaman Kelapa dan Palma Lain.
- Pospisilova, J., Ticha I., Kadlecek P., Haisel D., and Plzakova S. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex-vitro* condition. *Biologia Plantarum* 42 (4): 481–497.
- Raghavan, V. 1977. Diets and culture media for plant embryos. *CRC Handbook Series in Nutrition and Food*. 361–413.
- Rillo, E.P. 1997. PCA's embryo culture technique in the mass production of Makapuno coconut. Paper Presented in International Embryo Culture and Acclimatization Workshop, 27–31 October 1997. PCA Guinobatan, Albay, Philippines.
- Robinson, J.P., Britto S.J., and Senthilkumar S. 2009. Comparative Anatomical Studies on *Emilia zeylanica* C. B. Clarke with *in vitro* Regenerated Plants. *Middle-East Journal of Scientific Research* 4 (3):140–143.
- Roostika, I., I. Darmawati, dan I. Mariska. 2006. Regeneration of pruatjan (*Pimpinella pruatjan* Molk) : Axillary bud proliferation and encapsulation. *Jurnal AgroBiogen* 2(2):68–73.
- Sukendah, Sudarsono, Witjaksono, dan N. Khumaida. 2008. Perbaikan teknik kultur embrio kelapa kopyor (*Cocos nucifera* L.) asal Sumenep Jawa Timur melalui penambahan bahan aditif dan pengujian periode subkultur. *Buletin Agronomi* (36) (1) 16–23.
- Tahardi, J.S. 1997. Kelapa kopyor sebagai komoditas alternatif agribisnis. *Warta Pusat Penelitian Bioteknologi Perkebunan III* (1):16–21.
- Talavera, C., F. Contreras, F. Espadas, G. Fuentes, J.M. Santamaria. 2005. Cultivating *in vitro* coconut palms (*Coconut nucifera*) under glasshouse conditions with natural lights, improves *in vitro* photosynthesis nursery survival and growth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 83:287–292. Springer DOI 10.1007/s11240-005-7052-2.
- Tromas, A., Perrot-Rechenmann C. 2010. Recent progress in auxin biology. *C. R. Biologies* 333 297–306. Elsevier Masson SAS doi:10.1016/j.crv.2010.01.005.
- Unagul, P., C. Assantachai, S. Phadungruengluij, M. Tanticharoen, C. Verduyn. 2007. Coconut water as a medium additive for the production of docosahexaenoic acid (C22:6 n3) by *Schizochytrium mangrovei* Sk-02. *Bioresource Tech.* 98:281–287.