

Enkapsulasi dan Regenerasi Kalus Embriogenik Mangga (*Mangifera indica* L.) Kultivar Bapang dan Gadung 21

Encapsulation and Regeneration of Mango (*Mangifera indica* L.) Embryogenic Callus Cultivar Bapang and Gadung 21

Tri Muji Ermayanti¹, Robertus Sigit Adi Nugroho², dan Hamim²

¹Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Jalan Raya Bogor Km 46 Cibinong

²Departement Biologi, FMIPA-IPB, Bogor

E-mail: tmermayanti@hotmail.com*Penulis untuk korespondensi

Abstract

The mother plant and genetic variability of Indonesian mango need to be conserved. Encapsulation is one of *in vitro* conservation used for many plant species. The aim of this research was to study the regeneration of encapsulated mango cultivar Bapang and Gadung 21 embryogenic callus after storage at -14, 3–5, and 26–27°C for 0, 1, 2, 4, and 8 weeks. Embryogenic callus was treated with 3% Na-alginate (in liquid 3M), then it was dropped into 100 mM CaCl₂. Encapsulated callus beads were dehydrated and stored at -14, 3–5, and 26–27°C for 0, 1, 2, 4, and 8 weeks. After storage, the callus was cultured in 3M medium containing 2,4-D at 0, 1, and 2 mg/l for the regeneration. The results showed that after 8-week storage, callus of Bapang cultivar was more viable (67.3%) and resulted more number of somatic embryos (191.6%) than Gadung 21 cultivar. The callus which was cultured in 3M medium without addition of 2,4-D was more viable (20.9%) and had more number of somatic embryos (1062.5%) than that which was cultured on medium containing 2,4-D. After 2-week storage, callus had viability of 7.6%. No storage callus formed more somatic embryos than storage callus. Storage at 26–27°C gave higher viability as well as higher number of somatic embryo than stored at -14 and 3–5 °C. The callus did not regenerate into shoots after storage at -14°C. Embryogenic callus could be stored at 3–5 and 26–27°C for 4 weeks.

Key words: Encapsulation, embryogenic callus, mango (*Mangifera indica* L.), cv Bapang, Gadung 21

Abstrak

Induk tanaman mangga yang tumbuh di Indonesia sudah sangat tua sehingga perlu dikonservasikan. Enkapsulasi merupakan konservasi secara *in vitro* yang telah diterapkan pada berbagai jenis tanaman. Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan regenerasi kalus embriogenik mangga kultivar Bapang dan Gadung 21 yang dienkapsulasi dan disimpan pada suhu 14; 3–5 dan 26–27°C selama 0, 1, 2, 4 dan 8 minggu. Kalus embriogenik diberi pelakuan 3% Na-alginat (pada media 3M), kemudian ditetaskan pada larutan CaCl₂ 100 mM. Butiran enkapsulasi didehidrasi dan disimpan pada suhu 14; 3–5 dan 26–27°C selama 0, 1, 2, 4 dan 8 minggu. Setelah penyimpanan, kalus dikulturkan pada media 3M yang mengandung 0, 1, dan 2 mg/l 2,4-D untuk regenerasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa setelah penyimpanan selama 8 minggu, kalus Bapang dapat hidup 67,3% dan menghasilkan 191,6% embrio somatik lebih banyak daripada Gadung 21. Kalus yang dikulturkan pada media 3M tanpa 2,4-D dapat tumbuh (20,9%) dan membentuk embrio somatik (1062,5%). Setelah disimpan 2 minggu, kalus mempunyai viabilitas sebanyak 7,6%. Kalus yang tidak disimpan membentuk embrio somatik lebih banyak daripada yang disimpan 2–8 minggu. Penyimpanan suhu 26–27°C menghasilkan kalus yang hidup dan jumlah embrio somatik lebih banyak daripada penyimpanan suhu -14 dan 3–5°C. Kalus tidak mengalami regenerasi tunas pada penyimpanan -14°C. Kalus embriogenik dapat disimpan pada 3–5 dan 26–27°C selama 4 minggu.

Kata kunci: Enkapsulasi, kalus embriogenik, mangga (*Mangifera indica* L.), Bapang, Gadung 21

Diterima: 25 Januari 2010, disetujui: 14 Agustus 2010

Pendahuluan

Pembiakan tanaman mangga (*Mangifera indica* L.) secara konvensional biasa dilakukan secara generatif melalui biji atau secara vegetatif melalui cangkok, sambung, ataupun okulasi (Rifai dan Lubis, 1980). Pembiakan secara generatif memiliki resiko bahwa sifat dari tanaman hibrid yang dihasilkan tidak sama dengan sifat tanaman induknya (Purnomosidhi *et al.*, 2002), sedangkan pembiakan secara vegetatif memiliki kelemahan yaitu perakaran tidak kuat dan keterbatasan jumlah batang (atau dahan) yang berasal dari kultivar unggul. Oleh karena itu, diperlukan teknik pembiakan yang dapat menghasilkan bibit dengan sifat yang stabil seperti tanaman induknya sekaligus mempunyai perakaran kuat.

Teknik yang telah diketahui untuk menghasilkan bibit tanaman yang secara genetik sama dengan induknya adalah melalui kultur jaringan antara lain dengan metode embriogenesis somatik (Ermayanti *et al.*, 2005). Embriogenesis somatik adalah suatu proses sel somatik berdiferensiasi menjadi embrio somatik. Terdapat dua jalur terbentuknya planlet dari embriogenesis somatik yakni secara langsung (Kuo *et al.*, 2005) atau melalui kalus (Onay *et al.*, 2007). Pada penelitian ini digunakan jalur embriogenesis somatik melalui kalus. Metode embriogenesis somatik melalui kalus telah berhasil dicobakan pada mangga dengan menggunakan nuselus sebagai eksplan (Bhojwani dan Razdan, 1983; Lad *et al.*, 1997; Thomas, 1999; Patena *et al.*, 2002). Penelitian embriogenesis somatik mangga ditujukan untuk memperoleh protokol untuk keperluan pemuliaan tanaman dan konservasi plasma nutfah kultivar mangga yang unggul.

Pembentukan embrio somatik beberapa kultivar mangga yang tumbuh di Indonesia telah berhasil diinisiasi dari jaringan nuselus (Ermayanti *et al.*, 2003; 2006). Permasalahan pada embriogenesis somatik mangga antara lain frekuensi terbentuknya kalus embriogenik yang sangat rendah. Hal ini antara lain disebabkan oleh pencoklatan (*browning*) yang sangat tinggi (Patena *et al.*, 2002). Pencoklatan pada sel-sel kalus embriogenik dapat menghambat pertumbuhan dan diferensiasinya. Oleh karena

itu, perlu dilakukan konservasi terhadap kalus embriogenik.

Konservasi sel ataupun jaringan dapat dilakukan dengan metode kriopreservasi (kering beku dengan nitrogen cair) (Fang *et al.*, 2004) dan metode pertumbuhan lambat. Kedua metode ini dapat dilakukan antara lain dengan enkapsulasi sel atau jaringan dalam kalsium alginat. Pada penelitian ini dilakukan konservasi kalus embriogenik mangga pada berbagai perlakuan suhu penyimpanan terhadap kalus yang telah dienkapsulasi dalam kalsium alginat. Pada perlakuan suhu penyimpanan tersebut diharapkan dapat memperlambat pertumbuhan kalus embriogenik mangga. Dalam penelitian ini dilakukan enkapsulasi dengan kalsium alginat yang berfungsi untuk melindungi kalus embriogenik dari pengaruh fisik lingkungan dan kandungan mineral serta senyawa organik di dalamnya menyediakan nutrisi bagi kalus untuk tetap hidup. Evaluasi kemampuan tumbuh kalus embriogenik yang telah dienkapsulasi dilakukan secara bertahap pada kurun waktu tertentu.

Penelitian ini bertujuan mengetahui daya tumbuh dan perkembangan jumlah embrio somatik kalus embriogenik dan kultivar mangga yang telah dienkapsulasi kemudian disimpan pada variasi suhu dan lama penyimpanan. Selain itu juga untuk mengetahui respons tumbuhnya pada media regenerasi yang di variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D.

Metode Penelitian

Di dalam penelitian ini dipilih 2 kultivar mangga yaitu Bapang dan Gadung 21. Mangga kultivar Bapang meskipun rasa buahnya kurang manis, tanamannya memiliki perakaran dan batang yang kokoh sehingga sering digunakan sebagai batang bawah pada teknik pembiakan sambung, sedangkan kultivar Gadung 21 memiliki rasa buah yang manis.

Bahan tanaman yang digunakan ialah kalus embriogenik yang berasal dari jaringan nuselus mangga kultivar Bapang dan Gadung 21 yang ditumbuhkan pada media 3M (*Modified Mango Medium*) yang mengandung 1 mg/l 2,4-D. Media 3M (Monsalud *et al.*, 1995; Ermayanti *et al.*, 2003 dan 2006); terdiri dari garam makro dari media Gamborg (B5) (Gamborg *et al.*,

1968), garam mikro dari media Murashige dan Skoog (MS) (Murashige dan Skoog, 1962), vitamin MS, Na₂EDTA, FeSO₄.7H₂O, sukrosa, myo-inositol, L-asam glutamat, 2,4-D dan media 3M dalam bentuk cair tanpa CaCl₂ pada makro B5. Fitagel digunakan sebagai bahan pematid media. Selain itu juga digunakan larutan CaCl₂; Na-alginat; 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) dalam bufer fosfat (KH₂PO₄ dan Na₂HPO₄); acetoorcein; dan sukrosa.

Pembuatan Media Enkapsulasi dan Media Regenerasi

Media enkapsulasi dibuat dengan cara melarutkan 3% Na-alginat ke dalam media 3M cair tanpa CaCl₂. Media regenerasi adalah media 3M yang mengandung 2,4-D dengan konsentrasi 0, 1, dan 2 mg/l. Semua media tersebut disterilisasi dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Media regenerasi ditempatkan pada cawan petri berdiameter sekitar 5 cm dengan volume 6 ml.

Enkapsulasi

Enkapsulasi dilakukan dengan mengikuti metode Benson (1994) yang dimodifikasi yakni sebagai berikut: kalus embriogenik dimasukkan ke dalam 3% Na-alginat yang dilarutkan dengan media 3M cair tanpa CaCl₂, kemudian dengan pipet tetes diambil kalus embriogenik berikut media enkapsulasinya lalu ditetaskan pada larutan 100 mM CaCl₂ untuk memperoleh butir enkapsulasi kalus. Pembuatan butir enkapsulasi diusahakan seseragam mungkin dengan banyaknya kalus yang terkandung di dalamnya sama. Diameter butir enkapsulasi dibuat sekitar 5 mm. Selanjutnya butir-butir enkapsulasi dipindahkan pada larutan sukrosa 0,3 M lalu dikocok pada *shaker* dengan kecepatan 82 rpm untuk didehidrasi selama sekitar 18 jam. Setelah itu butir-butir enkapsulasi dipindahkan pada kertas saring agar sisa-sisa larutan sukrosa terserap, kemudian dikeringkan di dalam *laminar air flow cabinet* dengan aliran udara steril selama kira-kira 1 jam. Selanjutnya butir-butir enkapsulasi ditempatkan dalam tabung mikro. Setiap tabung mikro berisi sekitar 10 butir.

Penyimpanan

Butir-butir enkapsulasi dalam tabung mikro disimpan pada suhu -14°C (suhu freezer),

3–5°C (suhu kulkas), dan 26–27°C (suhu ruang kultur). Lama penyimpanan ialah 0, 1, 2, 4, dan 8 minggu.

Regenerasi Kalus Embriogenik setelah Enkapsulasi

Setelah perlakuan penyimpanan, butir-butir enkapsulasi dipindahkan ke dalam media regenerasi. Masing-masing perlakuan menggunakan 4 cawan petri dan setiap cawan petri berisi 5 butir enkapsulasi. Selanjutnya, kultur butir enkapsulasi tersebut diletakkan dalam ruang kultur bersuhu 26–27°C tanpa penyinaran untuk diketahui kemampuan regenerasi sel kalus embriogeniknya. Perkembangan respon tumbuh diketahui dengan pengamatan visual menggunakan kaca pembesar dan mikroskop stereo (Olympus SZ-PT SZ-60).

Uji Viabilitas Kalus Embriogenik

Sesudah tujuh minggu setelah tanam (mst) dilakukan uji viabilitas terhadap kalus embriogenik yang tidak dapat tumbuh maupun yang dapat tumbuh (viabel, sebagai kontrol). Kalus dalam butir enkapsulasi dan kalus yang diketahui masih viabel (berwarna putih kekuningan) direndam secara terpisah dalam botol vial berisi larutan uji 1% TTC. Lama perendaman antara 24–48 jam dalam suhu ruang kultur (26–27°C) dengan kondisi gelap. Setelah itu dilakukan pengamatan terhadap perubahan warna kalus dengan menggunakan mikroskop stereo dan perubahan warna larutan uji yang terjadi. Jaringan (kalus) yang berubah warnanya setelah uji menunjukkan bahwa jaringan masih hidup (Enescu, 1991).

Selain uji dengan larutan TTC, juga dilakukan pengamatan morfologi sel-sel kalus embriogenik mangga secara mikroskopis. Pembuatan preparat dilakukan dengan menggunakan metode remasan (*squash*) dengan pewarna acetoorcein 2% (w/v). Preparat diamati dengan mikroskop cahaya (Nikon AFX-DX) dengan perbesaran 100 kali. Pengambilan foto preparat dilakukan dengan kamera yang menyatu dengan mikroskop.

Analisis Data

Pengamatan perkembangan kultur dilakukan berkala setiap minggu, dimulai saat secara umum kultur mulai tumbuh yakni saat 3

minggu setelah tanam (mst). Pengamatan berakhir dilakukan pada saat 7 mst dengan perkiraan seluruh kalus telah memberikan respons maksimal. Perubahan yang diamati setiap minggunya ialah persentase daya tumbuh dan jumlah embrio somatik yang terbentuk dari butir enkapsulasi. Data kemudian dianalisis ragamnya untuk mengetahui pengaruh tiap-tiap faktor perlakuan dan interaksi antarfaktor yang terjadi. Uji jarak berganda Duncan dilakukan apabila terdapat pengaruh nyata pada perlakuan.

Hasil dan Pembahasan

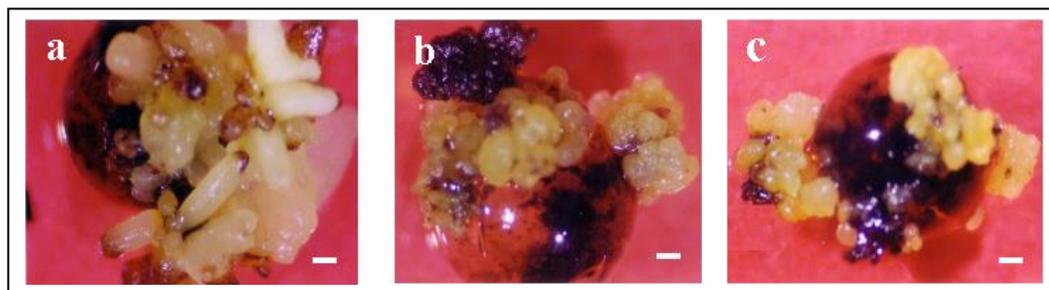
Daya Tumbuh

Pada ketiga jenis media regenerasi yaitu media 3M tanpa penambahan 2,4-D, dengan penambahan 1 dan 2 mg/l 2,4-D, hasil pengamatan secara visual menunjukkan bahwa terdapat perbedaan respons tumbuh pada kultur kalus kedua kultivar setelah dienkapsulasi yakni kalus hanya memperbanyak diri, kalus langsung berkembang membentuk embrio somatik, dan kalus memperbanyak diri serta membentuk embrio somatik (Tabel 1). Pembentukan embrio somatik terjadi pada kalus kultivar Bapang dan Gadung 21 yang dikulturkan pada media 3M tanpa 2,4-D. Kalus embriogenik yang dikulturkan pada media 3M yang mengandung 1 atau 2 mg/l 2,4-D cenderung memperbanyak diri, baik pada kultivar Bapang maupun kultivar Gadung 21 (Gambar 1). Dengan demikian konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan pada media 3M mempengaruhi perkembangan kalus embriogenik mangga. Menurut Ibaraki dan Kurata (2001) zat pengatur tumbuh 2,4-D secara

umum dapat menginduksi kalus embriogenik sekaligus mempertahankan pertumbuhan kalus embriogenik tersebut. Dengan demikian konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan pada media 3M memengaruhi perkembangan kalus embriogenik mangga.

Pemaparan hasil secara rinci hanya diberikan pada saat seluruh kalus telah memberikan respons maksimal yakni 7 minggu setelah tanam (mst). Pada Tabel 2 terlihat bahwa kalus kultivar Bapang tumbuh maksimum setelah disimpan 0 minggu (tanpa disimpan) lalu dikulturkan pada media 3M tanpa atau dengan 1 mg/l 2,4-D, setelah disimpan selama 2 minggu pada suhu 3–5 dan 26–27°C lalu dikulturkan pada media 3M tanpa 2,4-D. Hal serupa terjadi setelah penyimpanan pada suhu 26–27°C selama 4 minggu, kemudian ditanam pada media tanpa 2,4-D. Pada kultivar Gadung 21, kalus tumbuh semua (100%) setelah disimpan selama 2 minggu pada suhu 3–5°C yang kemudian dikulturkan pada media 3M yang mengandung 1 mg/l 2,4-D; atau pada suhu 26–27°C pada media regenerasi 3M tanpa 2,4-D.

Saat 7 mst, dari 2 kultivar yang diteliti, kalus dari kultivar Bapang memiliki daya tumbuh lebih tinggi dibandingkan kalus dari kultivar Gadung 21. Dari 3 suhu yang diteliti, kalus yang disimpan pada suhu 26–27°C memiliki daya tumbuh paling besar. Dari 5 lama penyimpanan yang diteliti, kalus yang disimpan selama 2 minggu memiliki daya tumbuh paling tinggi. Dari 3 jenis media regenerasi, kalus yang dikulturkan pada media 3M tanpa 2,4-D memiliki daya tumbuh lebih tinggi dibandingkan media 3M yang mengandung 1 atau 2 mg/l 2,4-D (Tabel 3).



Gambar 1. Kalus embriogenik dan embrio somatik mangga kultivar Bapang setelah dienkapsulasi tanpa penyimpanan saat 3 minggu setelah tanam. Pembentukan embrio somatik pada media 3M tanpa 2,4-D (a), pembentukan kalus pada media 3M dengan 2,4-D konsentrasi 1 mg/l (b), dan 2 mg/l (c). Garis skala = 1,5 mm.

Tabel 1. Perkembangan kalus embriogenik mangga kultivar Bapang dan Gadung 21 dalam butir enkapsulasi pada berbagai jenis media regenerasi.

Media Regenerasi	Perkembangan Kalus Embriogenik Mangga dalam Butir Enkapsulasi
3M tanpa 2,4-D	Kalus berkembang menjadi embrio somatik, tanpa atau disertai perbanyakan kalus, dan embrio somatik dapat mencapai fase dewasa (kotiledon)
3M + 1 mg/l 2,4-D	Kalus tumbuh memperbanyak diri, tanpa atau disertai pembentukan embrio somatik, dan embrio somatik maksimal mencapai fase torpedo
3M + 2 mg/l 2,4-D	Kalus tumbuh memperbanyak diri, tanpa atau disertai pembentukan embrio somatik, dan embrio somatik maksimal mencapai fase torpedo

Tabel 2. Rata-rata daya tumbuh kalus embriogenik mangga terenkapsulasi kultivar Bapang dan Gadung 21 setelah disimpan dengan variasi suhu dan lama penyimpanan serta media regenerasi.

Media Regenerasi	Kultivar Bapang			Kultivar Gadung 21		
	Rata-rata Daya Tumbuh (%) Saat Tidak Disimpan (kontrol) pada Suhu					
	-14°C	3-5°C	26-27°C	-14°C	3-5°C	26-27°C
3M tanpa 2,4-D	100a	100a	66,7 ± 33,3a	26,7 ± 26,7a	50 ± 10a	45 ± 9,6a
3M + 1 mg/l 2,4-D	100a	75 ± 15b	95 ± 5a	0b	13,3 ± 6,7b	15 ± 9,6b
3M + 2 mg/l 2,4-D	93,3 ± 6,7b	90 ± 10a	66,7 ± 12,5a	25 ± 15a	10 ± 5,8b	35 ± 22,2a
Media Regenerasi	Rata-rata Daya Tumbuh (%) Setelah Penyimpanan 1 Minggu pada Suhu					
	-14°C	3-5°C	26-27°C	-14°C	3-5°C	26-27°C
	3M tanpa 2,4-D	0a	85 ± 9,6a	75 ± 9,6a	0a	60 ± 14,1a
3M + 1 mg/l 2,4-D	0a	57,5 ± 8,5b	80 ± 8,2ab	0a	30 ± 10b	33,3 ± 17,6a
3M + 2 mg/l 2,4-D	0a	93,3 ± 6,7a	50 ± 19,1b	0a	6,7 ± 6,7c	5 ± 5b
Media Regenerasi	Rata-rata Daya Tumbuh (%) Setelah Penyimpanan 2 Minggu pada Suhu					
	-14°C	3-5°C	26-27°C	-14°C	3-5°C	26-27°C
	3M tanpa 2,4-D	0a	100a	100a	0a	90 ± 10a
3M + 1 mg/l 2,4-D	0a	95 ± 5ab	93,3 ± 6,7a	0a	100a	85 ± 5b
3M + 2 mg/l 2,4-D	0a	78,8 ± 8,3b	51,1 ± 24,7b	0a	95 ± 5a	95 ± 5ab
Media Regenerasi	Rata-rata Daya Tumbuh (%) Setelah Penyimpanan 4 Minggu pada Suhu					
	-14°C	3-5°C	26-27°C	-14°C	3-5°C	26-27°C
	3M tanpa 2,4-D	0a	70 ± 5,8a	100a	0a	85 ± 9,6a
3M + 1 mg/l 2,4-D	0a	53,3 ± 29,6a	75 ± 5c	0a	50 ± 12,9b	48,9 ± 8,9b
3M + 2 mg/l 2,4-D	0a	56,3 ± 16,3a	90 ± 5,8b	0a	55 ± 12,6b	75 ± 5a
Media Regenerasi	Rata-rata Daya Tumbuh (%) Setelah Penyimpanan 8 Minggu pada Suhu					
	-14°C	3-5°C	26-27°C	-14°C	3-5°C	26-27°C
	3M tanpa 2,4-D	0a	0a	20 ± 8,2a	0a	0a
3M + 1 mg/l 2,4-D	0a	0a	20 ± 2a	0a	0a	15 ± 5a
3M + 2 mg/l 2,4-D	0a	0a	35 ± 17,1a	0a	0a	15 ± 5a

Nilai yang diikuti huruf yang sama pada baris dalam kolom perlakuan yang sama menandakan tidak berbeda nyata pada uji Duncan ($\alpha = 5\%$)

Tabel 3. Pengaruh kultivar, suhu penyimpanan, lama penyimpanan, dan media regenerasi terhadap rata-rata daya tumbuh saat 7 minggu setelah tanam (mst) dan jumlah embrio somatik saat 5 mst.

Parameter	Kultivar		Suhu Penyimpanan (°C)			Lama Penyimpanan (minggu)				Media Regenerasi			
	Bpg	G21	-14	3-5	26-27	0	1	2	4	8	3M0	3M1	3M2
Rata-rata daya tumbuh (%)	50,34a	30,09b	11,50a	53,31b	55,83b	55,93a	32,82c	60,18a	45,75b	6,39d	45,44a	37,82b	37,37b
Rata-rata jumlah embrio somatik	2,77a	0,95b	0,69a	2,34b	2,59b	4,21a	0,73d	2,82b	1,74c	0,09e	4,65a	0,65b	0,15c

Nilai yang diikuti huruf yang sama pada baris dalam kolom perlakuan yang sama menandakan tidak berbeda nyata pada uji Duncan ($\alpha = 5\%$)

Keterangan: Bpg = Bapang 3M0 = 3M tanpa 2,4-D 3M2 = 3M + 2 mg/l 2,4-D
 G21 = Gadung 21 3M1 = 3M + 1 mg/l 2,4-D

Sebagai pembanding berikut ini disampaikan beberapa hasil penelitian penyimpanan *in vitro* yang lain. Kultur embrio somatik *Hyoscyamus muticus* yang telah dienkapsulasi dapat mengalami regenerasi tunas setelah disimpan selama 15–60 hari pada suhu 4°C (Pandey dan Chand, 2005). Pada Phoenix dactylifera, penyimpanan embrio somatik pada suhu 5°C selama 12 bulan mampu mengalami regenerasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan penyimpanan pada suhu 25°C (Bekheet *et al.*, 2005). Hasil yang bervariasi pada penelitian-penelitian tersebut menjelaskan bahwa bagian tanaman dan jenis tumbuhan tertentu memerlukan perlakuan suhu tertentu untuk mempertahankan viabilitasnya. Dengan demikian pada mangga perlu dicari kondisi dan suhu yang tepat agar kalus embriogenik dapat disimpan lebih lama tanpa memengaruhi kemampuan regenerasinya.

Penambahan 2,4-D pada media regenerasi secara umum menurunkan daya tumbuh kalus kedua kultivar. Hal ini disebabkan oleh kalus yang dikulturkan pada media 3M dengan 2,4-D tumbuh memperbanyak diri tetapi tidak dapat langsung membentuk embrio somatik seperti pada pertumbuhan kalus yang dikulturkan pada media 3M tanpa 2,4-D. Meskipun demikian setelah penyimpanan 8 minggu pada suhu 26–27°C kemudian dikulturkan pada media 3M yang mengandung 2 mg/l 2,4-D, kalus dapat memberikan persentase daya tumbuh yang lebih besar dibandingkan bila dikulturkan pada media tanpa 2,4-D meskipun nilainya masih rendah yaitu kurang dari 40%. Hal ini diduga kemampuan kalus setelah disimpan 8 minggu pada suhu 26–27°C mempunyai kemampuan memperbanyak diri setelah ditanam pada media yang mengandung 2,4-D pada konsentrasi 2 mg/l dibandingkan pada media yang mengandung 2,4-D pada konsentrasi 1 mg/l atau tanpa 2,4-D.

Perkembangan Embrio Somatik

Setelah berumur 5 minggu, pertumbuhan embrio somatik sangat cepat sehingga memenuhi cawan petri. Untuk selanjutnya embrio somatik dipindahkan pada media pendewasaan. Pada 5 mst, jumlah embrio somatik yang dihasilkan kalus kultivar Gadung 21 secara umum lebih rendah dibandingkan dengan jumlah embrio

somatik yang dihasilkan oleh kalus kultivar Bapang pada suhu dan lama penyimpanan yang sama. Kalus kultivar Bapang tanpa penyimpanan menghasilkan jumlah embrio somatik tertinggi (21,37 per butir) setelah dikulturkan pada media 3M tanpa 2,4-D. Pada saat tersebut juga dihasilkan jumlah embrio somatik tertinggi dari kalus yang dienkapsulasi setelah dikulturkan pada media 3M dengan penambahan 2,4-D. Adapun pada kalus kultivar Gadung 21, jumlah embrio somatik tertinggi (6,30 per butir) dihasilkan setelah disimpan selama 4 minggu pada suhu 26–27°C kemudian dikulturkan pada media 3M tanpa 2,4-D. Pada kalus kultivar Gadung 21 ini, jumlah embrio somatik yang dihasilkan pada media 3M yang mengandung 1 mg/l 2,4-D memberikan jumlah embrio somatik tertinggi (5,95 per butir) setara dengan media 3M tanpa 2,4-D setelah kalus disimpan selama 2 minggu pada suhu 26–27°C (Tabel 4). Embrio somatik yang tumbuh dari kalus embriogenik tidak seluruhnya berkembang menjadi embrio somatik dewasa tetapi dapat pula mengalami dediferensiasi menjadi kalus kembali, sehingga jumlah embrio somatik menjadi menurun.

Dari 2 kultivar yang diteliti kalus kultivar Bapang menghasilkan jumlah embrio somatik lebih tinggi dibandingkan dengan kalus kultivar Gadung 21. Dari 3 suhu yang diteliti, kalus yang disimpan pada suhu 26–27°C menghasilkan jumlah embrio somatik paling besar walaupun hampir setara dengan jumlah yang dihasilkan oleh kalus setelah disimpan pada suhu 3–5°C. Dari 5 lama penyimpanan yang diteliti, kalus tanpa penyimpanan menghasilkan jumlah embrio somatik tertinggi (Tabel 2). Dari 3 jenis media regenerasi, kalus yang dikulturkan pada media 3M tanpa 2,4-D menghasilkan jumlah embrio somatik jauh lebih tinggi dibandingkan media 3M yang mengandung 1 dan 2 mg/l 2,4-D (Tabel 1).

Sebagian besar embrio somatik yang tumbuh pada media 3M tanpa 2,4-D mengalami proses pendewasaan hingga fase kotiledon (Tabel 1). Hal serupa juga dilaporkan oleh Mathe *et al.*, (2000) bahwa 2,4-D pada konsentrasi rendah (1 mg/l) menghasilkan kalus embriogenik pada *Phragmites australis*. Kalus tersebut berkembang menjadi embrio somatik dan menjadi bipolar dengan diferensiasi koleoptil dan akar saat dipindah pada media

tanpa zat pengatur tumbuh. Konsentrasi 2,4-D juga menentukan perkembangan embrio somatik menjadi fase dewasa pada tanaman *Pimpinella pruatjan* (Roostika *et al.*, 2007). Hasil penelitian tersebut mendukung dugaan bahwa untuk inisiasi embrio somatik mangga, kalus memerlukan 1 mg/l 2,4-D. Selanjutnya, setelah butir enkapsulasi pecah embrio somatik menyerap media tanpa 2,4-D hingga mencapai fase dewasa (kotiledon). Hal tersebut tidak terjadi pada embrio somatik yang tumbuh pada media 3M yang mengandung 1 dan 2 mg/l 2,4-D. Embrio somatik yang terinisiasi pada kedua media ini tidak mencapai fase dewasa (Tabel 1).

Perbedaan kultivar memberikan respons yang berbeda pada kemampuan regenerasi kalus embriogenik mangga setelah enkapsulasi dengan perlakuan penyimpanan. Perbedaan respons pada genotipe mangga yang berbeda saat embriogenesis somatik juga telah dilaporkan yakni pada beberapa kultivar mangga di India (Thomas, 1999); mangga Filipina kultivar 'Carabao' dengan galur yang berbeda-beda (Patena *et al.*, 2002). Perbedaan kemampuan tumbuh dan perkembangan embrio somatik dari genotipe tanaman yang berbeda mungkin disebabkan oleh perbedaan sensitivitas terhadap 2,4-D sehingga waktu yang dibutuhkan untuk pembentukan embrio somatik juga berbeda, sebagai contoh adalah pada tanaman bawang putih (Mariani *et al.*, 2003).

Uji viabilitas

Uji ini berguna sebagai indikator kalus embriogenik mangga dalam butir enkapsulasi yang dapat tumbuh dan yang tidak dapat tumbuh setelah perlakuan suhu dan lama penyimpanan. Hasil uji viabilitas menggunakan larutan TTC menunjukkan bahwa kalus embriogenik mangga yang tidak dapat tumbuh setelah penyimpanan pada suhu -14°C selama 1, 2, dan 8 minggu; dan pada suhu 3–5°C selama 8 minggu tidak memperlihatkan perubahan warna, larutan TTC juga tidak mengalami perubahan warna (tetap jernih). Adapun kalus yang mampu tumbuh

setelah penyimpanan pada suhu 26–27°C selama 1 dan 8 minggu berubah warna dari hitam menjadi berwarna coklat atau merah kecoklatan, larutan TTC pada kalus ini juga mengalami perubahan warna dari jernih menjadi kuning. Menurut Withers (1985) tidak adanya perubahan warna pada jaringan setelah diuji dengan larutan TTC menunjukkan tidak adanya aktivitas respirasi pada jaringan tersebut. Adanya aktivitas respirasi pada kalus yang viabel ditandai dengan timbulnya warna hasil reaksi TTC dengan ion-ion hidrogen yang dilepas oleh aktivitas enzim-enzim dehidrogenase (Enescu, 1991). Menurut Vajrabhaya (1988) aktivitas enzim dehidrogenase yang tinggi dari hasil pewarnaan TTC menandakan sel-sel bersifat embriogenik. Hal ini tampaknya terjadi pada kalus mangga yang tumbuh dari butir enkapsulasi sehingga dapat berkembang menjadi embrio somatik.

Sel-sel kalus embriogenik yang dapat tumbuh setelah perlakuan tanpa penyimpanan; penyimpanan selama 1, 2, dan 4 minggu pada suhu 3–5°C; serta penyimpanan selama 1, 2, 4, dan 8 minggu pada suhu 26–27°C memperlihatkan sel-sel yang hidup dengan ditandai bentuk dan struktur yang utuh dan normal. Adapun sel-sel kalus embriogenik dalam butir enkapsulasi yang tidak dapat tumbuh khususnya setelah disimpan pada suhu -14°C memperlihatkan sel-sel yang diduga telah mati dengan ditandai bentuk serta struktur yang tidak utuh dan adanya kerusakan pada dinding sel. Pada suhu rendah terbentuk kristal es pada bagian dalam sel yang dapat menyebabkan kematian sel (Bomal dan Tremblay, 2000). Pada kultur jaringan pisang, penyimpanan pada suhu rendah mengubah pola pembentukan protein yang terbentuk (Hasan, 2002). Dengan demikian penyimpanan kalus embriogenik mangga pada suhu -14°C selama 1 minggu atau lebih maupun 3–5°C selama 8 minggu diduga mengalami hal serupa sehingga tidak dapat mengalami regenerasi.

Tabel 4. Rata-rata jumlah embrio somatik hasil pertumbuhan kalus embriogenik mangga terenkapsulasi kultivar Bapang dan Gadung 21 setelah disimpan dengan variasi suhu dan lama penyimpanan serta media regenerasi.

Media Regenerasi	Kultivar Bapang			Kultivar Gadung 21		
	Rata-rata Jumlah Embrio Somatik Saat Tidak Disimpan (Kontrol) pada Suhu:					
	-14°C	3-5°C	26-27°C	-14°C	3-5°C	26-27°C
3M tanpa 2,4-D	12,9 ± 1,9a	21,4 ± 2,7a	16,6 ± 2,9a	1,5 ± 0,5a	2,2 ± 1,1a	2,4 ± 0,7a
3M + 1 mg/l 2,4-D	3,8 ± 0,9b	2,4 ± 0,7b	3,1 ± 0,7b	0b	0b	0b
3M + 2 mg/l 2,4-D	1,1 ± 0,5c	2,2 ± 0,9b	0,6 ± 0,3c	0b	0b	0b
Media Regenerasi	Rata-rata Jumlah Embrio Somatik setelah Penyimpanan 1 Minggu pada Suhu					
	-14°C	3-5°C	26-27°C	-14°C	3-5°C	26-27°C
3M tanpa 2,4-D	0a	4,2 ± 1a	3,9 ± 0,9a	0a	2,8 ± 0,7a	1,2 ± 0,9a
3M + 1 mg/l 2,4-D	0a	0b	0b	0a	0b	0b
3M + 2 mg/l 2,4-D	0a	0b	0b	0a	0b	0b
Media Regenerasi	Rata-rata Jumlah Embrio Somatik setelah Penyimpanan 2 Minggu pada Suhu					
	-14°C	3-5°C	26-27°C	-14°C	3-5°C	26-27°C
3M tanpa 2,4-D	0a	15,3 ± 3,2a	13 ± 1,7a	0a	4,6 ± 0,7a	6 ± 0,8a
3M + 1 mg/l 2,4-D	0a	1,3 ± 0,4b	0,9 ± 0,3b	0a	0b	6 ± 0,8a
3M + 2 mg/l 2,4-D	0a	0,2 ± 0,2b	0,4 ± 0,2b	0a	0b	0b
Media Regenerasi	Rata-rata Jumlah Embrio Somatik setelah Penyimpanan 4 Minggu pada Suhu					
	-14°C	3-5°C	26-27°C	-14°C	3-5°C	26-27°C
3M tanpa 2,4-D	0a	4,9 ± 1a	11,1 ± 1,7a	0a	5,8 ± 1,1a	6,3 ± 2,1a
3M + 1 mg/l 2,4-D	0a	0,4 ± 0,4b	0,1 ± 0,1b	0a	0,2 ± 0,1b	0b
3M + 2 mg/l 2,4-D	0a	0b	0b	0a	0c	0,1 ± 0,1b
Media Regenerasi	Rata-rata Jumlah Embrio Somatik setelah Penyimpanan 8 Minggu pada Suhu					
	-14°C	3-5°C	26-27°C	-14°C	3-5°C	26-27°C
3M tanpa 2,4-D	0a	0a	0,1 ± 0,1a	0a	0a	1,4 ± 1,1a
3M + 1 mg/l 2,4-D	0a	0a	0a	0a	0a	0b
3M + 2 mg/l 2,4-D	0a	0a	0a	0a	0a	0b

Nilai yang diikuti huruf yang sama pada baris dalam kolom perlakuan yang sama menandakan tidak berbeda nyata pada uji Duncan ($\alpha = 5\%$).

Simpulan dan Saran

Simpulan

Kalus embriogenik yang dienkapsulasi dari mangga kultivar Bapang dan Gadung 21 menghasilkan persentase daya tumbuh dan jumlah embrio somatik yang berbeda setelah perlakuan suhu dan lama penyimpanan. Penyimpanan pada suhu 3-5°C dan 26-27°C dapat mempertahankan viabilitas kalus embriogenik hingga 4 minggu. Kalus embriogenik yang dapat tumbuh menghasilkan embrio somatik yang dikulturkan pada media 3M tanpa 2,4-D, pada media 3M dengan 1 atau 2 mg/l 2,4-D kalus hanya memperbanyak diri. Daya tumbuh dan jumlah embrio somatik hasil regenerasi kalus embriogenik menurun setelah

penyimpanan selama 2 minggu. Kalus embriogenik kedua kultivar tidak dapat mengalami regenerasi setelah disimpan pada suhu -14°C, dan suhu 3-5°C selama 8 minggu.

Saran

Disarankan agar dilakukan kriopreservasi untuk mengetahui kemampuan regenerasi embrio somatik setelah penyimpanan.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Deritha Elffy Rantau SP yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Bekheet, S.A., Taha, H.S. dan El-Bahr, M.K. 2005. Preservation of Date Palm Cultures using Encapsulated Somatic Embryos. *Arab J. Biotech.*, 8 (2): 319–328.
- Benson, E.E. 1994. *Cryopreservation of Plant Cell*. Oxford: IRL Pr.
- Bhojwani, S.S. dan Razdan, M.K. 1983. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Amsterdam: Elsevier.
- Bomal, C. dan Tremblay, F.M. 2000. Dried Cryopreserved Somatic Embryos of Two *Picea* Species Provide Suitable Material for Direct Planlet Regeneration and Germplasm Storage. *Ann Bot.*, 86: 177–183.
- Enescu, V. 1991. The Tetrazolium Test of Viability. Di dalam: *Three and Shrub Seed Handbook*. Zurich: The International Seed Testing Association. 9: 1–11.
- Ermayanti, T.M. dan Rantau, D.E. 2003. Somatic Embryogenesis of Some Mango Cultivars (*Mangifera indica* L.) Grown in Indonesia. Makalah dipresentasikan pada International Seminar on Biotechnology for Sustainable Agriculture. SEAMEO BIOTROP, Oktober: 7–8.
- Ermayanti, T.M., Hafizh, E.A., Aryanti dan Sutedia, L. 2005. Analisis Kandungan Artemisinin pada Kultur Tunas *Artemisia annua* L. dengan Lima Karakter Morfologi yang Berbeda. *Biota*, X (3): 154–160.
- Ermayanti, T.M., Susilorini, N., Nugroho, R.S.A. dan Rantau, D.F. 2006. Somatic Embryogenesis of Three Different Indonesian Mango Cultivars (*Mangifera indica* L.). *Proceedings the 7th ASEAN Science and Technology Week*. Sub-Committee for Biotechnology Conference. Jakarta, 5–7 August. 2005. 134–143.
- Fang, J.Y., Wetten, A. dan Hadley, P. 2004. Cryopreservation of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Somatic Embryos for Long-term Germplasm Storage. *Plant Science*, 166: 669–675.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. dan Ojima, K. 1968. Nutrient Requirement of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. *Exp. Cell. Res.*, 50: 151–158.
- Hassan, N.S. 2004. Storage of *in vitro* Banana Shoot Cultures at Low Temperature or under Mineral Oil Layer. *Int. J. of Agric. and Biol.*, 6 (2): 303–306.
- Ibaraki, Y. dan Kurata, K. 2001. Automation of Somatic Embryo Production [review]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 65: 179–199.
- Kuo, H.L., Chen, J.T. dan Chang, W.C. 2005. Efficient Plant Regeneration Through Direct Somatic Embryogenesis from Leaf Explants of *Phalaenopsis* ‘Little steve’. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 41: 453–456.
- Lad, B.L., Jayasankar, E., Pliego-Alfaro, E., Moon, P.A. dan Litz, R.E. 1997. Temporal Effect of 2,4-D on Induction of Embryogenic Nucellar Cultures and Somatic Embryo Development of ‘Carabao’ Mango. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 33: 253–257.
- Mariani, T.S., Miyake, H., Esyanti, R.R. dan Nurwendah, I. 2003. Effect of 2,4-D on Indirect Somatic Embryogenesis and Surface Structural Changes in Garlic (*Allium sativum* L.) cv. Lumbu Hijau. *J. Matematika dan Sains*, 8 (4): 133–139.
- Mathe, C., Hamvas, M.M., Grigorszky, I., Vasas, G., Molnar, E., Power, J.B., Davey, M.R. dan Borbely, G. 2000. Plant Regeneration from Embryogenic Cultures of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steud. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 63: 81–84.
- Monsalud, J.M., Mathews, H., Litz, R.E. dan Gray, D.J. 1995. Control of Hyperhydricity of Mango Somatic Embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 42: 195–206.
- Murashige, T. dan Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. *Physiol Plant*, 15: 473–497.
- Onay, A., Tilkat, E., Yıldırım, H. dan Suzerer, V. 2007. Indirect Somatic Embryogenesis from Mature Embryo Cultures of Pistachio, *Pistacia vera* L. *Propagation of Ornamental Plants*, 7 (2): 68–74.
- Patena, L.F., Carlos-Refuerzo, L.R. dan Barba, R.C. 2002. Somatic Embryogenesis and Planlet Regeneration in Mango (*Mangifera indica* L.). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 38: 173–177.
- Purnomosidhi, P., Suparman, Roshetko, J.M. dan Mulawarman. 2002. *Perbanyakan dan Budidaya Tanaman Buah-buahan*. Bogor: ICRAF, Winrock International, IFSP.
- Rifai, M. dan Lubis, I. 1980. *Fruits*. Roma: IBPGR.
- Roostika, I., Purnamaningsiha, R., Darwatib, I. dan Mariska, I. 2007. Regeneration of *Pimpinella pruatjan* Through Somatic Embryogenesis. *Indonesian J. of Agric. Sci.*, 8 (2): 60–66.
- Thomas, P. 1999. Somatic Embryogenesis and Planlet Regeneration from Nucellar Tissue of Monoembryonic Mango. *Hort Science*, 74: 135–139.
- Vajrabhaya, M. 1987. Embryogenesis. In: Petersen, J.B (Eds.). *Proceedings of the seminar cell and tissue culture in field crop improvement*. Tsukuba, 4–9 Okt 1987. Taipei: Food and Fertilizer Technology Center/ ASPAC. 24–31.
- Withers, L.A. 1985. Cryopreservation and Storage of Germplasm. In: Dixon, R.A. (Eds.). *Plant Cell Culture: A Practical Approach*. Oxford: IRL Pr. 169–191.