

Pembentukan Embrio Endospermik Sekunder Mangga (*Mangifera indica* L.) Gedong Gincu Klon 289

Secondary Endospermic Embryos Formation in Mango (*Mangifera indica* L.) Gedong Gincu Clone 289

Irni Furnawanthi Hindaningrum¹, Ni Made Armini Wiendi^{2*}, dan Winarso Drajad Widodo²

¹Balai Pengkajian Bioteknologi, BPPT

Kawasan Puspiptek Gedung 630, Serpong, Tangerang Selatan 15320, Indonesia

²Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University), Jl. Meranti, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680, Indonesia

Diterima 8 Oktober 2013/Disetujui 17 Februari 2014

ABSTRACT

The improvement of Mangifera indica L. by conventional breeding approaches has been confounded by the long generation cycle, low fruit set, single seed per fruit and high degree of cross pollination. Biotechnology complements conventional breeding and expedite the mango improvement programs. Endosperm culture is a direct method to produce triploid plants. This study aimed to obtain embryo from endosperm culture. The system of secondary somatic embryogenesis in mango described here represents a source of embryogenic material may be used for mass propagation and genetic manipulation of this crop. The method consisted of induction, proliferation, maturation, germination, and histological analysis of the obtained embryos. A protocol for plantlet regeneration was developed for Gedong Gincu mango clone 289 through secondary somatic embryogenesis. Primary somatic embryos (proembryo and cotyledonary embryos) were cultured in induction medium to induce the secondary somatic embryos. The best proliferation rate was 0.22 in medium with 1 g L⁻¹ Poly Vinyl Pyrrolidone (PVP) for multiplication of secondary somatic embryos. Maturation of inoculum derived from the proliferation medium supplemented with 2 g L⁻¹ of activated charcoal on medium containing 0.4 mg L⁻¹ BAP provides the average 2.39 embryo formation of cotyledonary phase. The highest germination frequency (20%) was obtained in media with GA3 1.5 mg L⁻¹.

Keywords: endosperm, Gedong Gincu, Mangifera indica L, secondary endospermic embryo

ABSTRAK

Pemuliaan tanaman mangga (Mangifera indica L.) secara konvensional terkendala oleh fase juvenil tanaman yang panjang, sedikitnya benih yang diperoleh dan tingkat penyerbukan silang yang tinggi. Bioteknologi merupakan solusi dalam pengembangan buah mangga untuk menghasilkan klon unggul melalui teknik kultur in vitro sel endosperma. Penelitian ini bertujuan untuk pengembangan tanaman mangga melalui perbanyakan embrio endospermik sekunder mangga gedong gincu klon 289 untuk menghasilkan tanaman triploid dengan ukuran biji yang lebih kecil. Embriogenesis mangga dapat digunakan untuk perbanyakan embrio dengan tujuan produksi massal dan manipulasi genetik dari tanaman ini. Metode penelitian meliputi tahapan induksi, proliferasi, maturasi, perkecambahan, dan analisis histologi terhadap embrio yang dihasilkan. Penelitian menghasilkan media proliferasi terbaik untuk pembentukan embrio endospermik sekunder pada fase kotiledon adalah media dengan penambahan Poly Vinyl Pyrrolidone (PVP) 1 g L⁻¹ sebanyak 0.22. Maturasi pada media dengan penambahan BAP 0.4 mg L⁻¹ dengan inokulum yang berasal dari media proliferasi dengan penambahan arang aktif (AA) 2 g L⁻¹ memberikan rata-rata pembentukan embrio fase kotiledonari sebesar 2.39. Perkecambahan embrio sebesar 20% terjadi pada media dengan penambahan GA3 dengan konsentrasi 1.5 mg L⁻¹.

Kata kunci: embrio endospermik sekunder, endosperma, Gedong Gincu, Mangifera indica L.

* Penulis untuk korespondensi. e-mail: nmarmini@gmail.com

PENDAHULUAN

Mangga (*Mangifera indica* L.) varietas Gedong Gincu merupakan salah satu komoditas buah unggulan ekspor Indonesia. Pemuliaan tanaman ini secara konvensional terkendala oleh fase juvenil tanaman yang panjang, jumlah benih yang diperoleh sedikit, penyerbukan silang tinggi, poliembrioni, heterozigositas, sifat panikula dan bunga yang kompleks dan memerlukan area luas untuk mengevaluasi hibrida (Iyer dan Degani, 2009). Hal tersebut menyebabkan lamanya siklus seleksi dan evaluasi tanaman hasil penyiilangan, sehingga tanaman dengan sifat dan kemampuan yang baru akan diperoleh tidak kurang dari 20 tahun. Program pemuliaan paling efektif untuk mengembangkan varietas mangga dengan cara pemuliaan non konvensional melalui bioteknologi. Pengembangan kultivar mangga dengan bioteknologi dapat mempercepat perolehan klon yang diinginkan dan memperbaiki kekurangan genetik dari varietas yang ada (Krishna dan Singh, 2007).

Regenerasi tanaman mangga dengan kultur *in vitro* dapat dilakukan melalui proses organogenesis (pembentukan tunas ganda dan atau tunas adventif) serta proses embriogenesis (pembentukan embrio). Embriogenesis somatik memiliki potensi yang sangat besar untuk memperbanyak klonal tanaman secara massal, transformasi gen dan produksi benih sintetik. Embriogenesis sel somatik secara umum dapat dibagi menjadi empat fase yaitu (1) induksi kalus embriogenik, (2) induksi dan proliferasi embrio somatik, (3) pematangan embrio, dan (4) perkecambahan embrio.

Induksi kalus dan pembentukan embrio pada mangga dapat dilakukan dengan eksplan embrio zigotik (Xiao *et al.*, 2004), nuselus (Ermayanti dan Deritha, 2009), atau endosperma (Hanayanti, 2011). Keunggulan kultur endosperma dapat menghasilkan tanaman triploid yang memiliki buah tidak berbiji atau berbiji tapi steril. Endosperma adalah jaringan triploid yang terdapat pada biji, hasil dari penyatuan dua inti polar gametofit betina dengan satu inti gamet jantan, yang berbeda dengan embrio dalam jumlah kromosomnya (Sukanto, 2010). Pengembangan tanaman mangga melalui kultur endosperm diharapkan dapat menghasilkan tanaman triploid ($2n=3x$) yang memiliki buah dengan ukuran biji lebih kecil atau tidak berbiji. Pembentukan embrio secara berkelanjutan melalui pembentukan embrio endospermik sekunder (EES) dilakukan dari kalus embriogenik embrio endospermik primer (EEP). Pembentukan EEP mangga Gedong Gincu menggunakan media dengan komposisi hara makro media Gamborg, hara mikro media MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh NAA, BAP, dan GA3 (Hanayanti, 2011). Keberhasilan pengembangan teknik *in vitro* untuk menginduksi pembentukan EES akan mendukung usaha memperbanyak klonal tanaman yang dihasilkan (Kim *et al.*, 2012).

Keberhasilan kultur endosperma dipengaruhi oleh umur endosperma, formulasi media, perkecambahan embrio yang dihasilkan dan umur kultur (Sukanto, 2010). Keberhasilan regenerasi embrio mangga menjadi plantlet

masih terkendala oleh adanya pengeluaran senyawa fenolik yang berlebihan, nekrosis pada inokulum, kurangnya embrio yang bipolar dan perkecambahan yang terlalu cepat. Frekuensi keberhasilan masih relatif rendah untuk mendukung penggunaan teknik *in vitro* dengan tujuan produksi bibit secara komersial dan mendapatkan varian somaklonal dengan sifat unggul tertentu. Evaluasi teknik *in vitro* yang dapat meregenerasikan plantlet dengan frekuensi keberhasilan yang lebih tinggi perlu dilakukan.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari tahapan perkembangan embrio endospermik sekunder (EES), daya proliferasi EES, maturasi EES, dan frekuensi perkecambahan dalam pembentukan plantlet dari EES dan analisis histologi perkembangan EES mangga Gedong Gincu klon 289.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, dari bulan November 2011 sampai dengan Mei 2013.

Bahan tanaman adalah embrio endospermik primer (EEP) mangga Gedong Gincu klon 289 (Hanayanti, 2011). Bahan kimia yaitu media dasar M3 (komposisi hara makro B5, hara mikro dan vitamin MS), *benzyl amino purine* (BAP), *naphtalene acetic acid* (NAA), *gibberelic acid* (GA3), *poly vinyl pyrrolidone* (PVP), arang aktif (AA), asam amino glutamin, air kelapa, sukrosa, agar, alkohol 96%, dan 70% (v/v). Peralatan yang digunakan adalah peralatan gelas, peralatan diseksi, bunsen, *hand sprayer*, *laminar air flow cabinet*, *autoclave*, oven pengering, timbangan analitik, pH meter, kamera, rak kultur, dan lampu.

Induksi Embrio Endospermik Sekunder

Inokulum yang digunakan adalah dua tipe EEP mangga Gedong Gincu klon 289 yaitu embrio fase proembryo dan embrio fase kotiledon (*cotyledonary stage*), dikulturkan dalam media dasar M3 dengan penambahan *Benzyl Amino Purine* (BAP), *Naphtalene Acetic Acid* (NAA) dan *Gibberelic Acid* (GA3), diinkubasi di ruang thermostatik gelap dengan suhu antara 21-22 °C selama delapan minggu setelah dikulturkan (MSK).

Pengaruh Jenis Absorban Senyawa Fenolik terhadap Daya Proliferasi Embrio Endospermik Sekunder

Percobaan disusun dalam rancangan acak lengkap satu faktor yaitu jenis media dengan penambahan senyawa absorban fenolik PVP dan AA. Perlakuan dari tujuh jenis media dengan komposisi media dasar M3 tanpa penambahan senyawa absorban fenolik (MP1), tiga taraf dengan penambahan PVP yaitu 0.5 g L⁻¹ (MP2), 1 g L⁻¹ (MP3), dan 2 g L⁻¹ (MP4), tiga taraf dengan penambahan AA yaitu 0.5 g L⁻¹ (MP5), 1 g L⁻¹ (MP6), dan 2 g L⁻¹ (MP7). Kultur diinkubasi di ruang thermostatik gelap pada suhu 22±3 °C selama 4 MSK. Inokulum berupa proembryo sebanyak lima ulangan, setiap ulangan terdiri dari lima

belas *clumps* berukuran 4-5 mg per *clumps*. Peubah meliputi persentase pembentukan EES, warna dan struktur kalus, bobot kalus, frekuensi proliferasi, dan jumlah embrio yang terbentuk pada berbagai fase.

Maturasi dan Perkecambahan Embrio Endospermik Sekunder

Percobaan disusun dalam rancangan acak lengkap dua faktor. Faktor pertama adalah media asal inokulum (media proliferasi EES yaitu media MP1 – MP7), faktor kedua media maturasi yaitu media dasar M3 dengan penambahan BAP 0, 0.2, dan 0.4 mg L⁻¹ media, sehingga terdapat 21 kombinasi perlakuan, tiga ulangan, setiap ulangan terdiri dari 5 *clumps* proembrio. Kultur diinkubasi di ruang thermostatik gelap pada suhu 22±3 °C selama 8 MSK. Pengamatan setiap minggu terhadap waktu pembentukan embrio fase kotiledon, jumlah rata-rata embrio berkotiledon yang terbentuk dan warna embrio fase kotiledon.

Embrio hasil maturasi dikecambahkan dalam media dengan komposisi hara makro B5, hara mikro, vitamin, dan myo inositol MS, sukrosa 30 g L⁻¹, agar 5 g L⁻¹, air kelapa 20% (v/v), AA 1 g L⁻¹, glutamin 400 mg L⁻¹, dan GA3 0; 0.5; 1; 1.5, dan 2 mg L⁻¹ media. Kultur diinkubasi di ruang thermostatik terang pada suhu 28±3 °C selama 8 MSK. Pengamatan dilakukan setiap 2 minggu sampai 8 MSK terhadap embrio fase kotiledon pada pola pertumbuhan, jumlah yang tumbuh, jumlah yang berkecambah, dan persentase perkecambahan.

Analisis Histologi Embrio Endospermik Sekunder

Analisis histologi terhadap embrio endospermik sekunder mangga Gedong Gincu pada semua fase (proembrio, globular, hati, torpedo, dan kotiledon) dengan metode parafin melalui tahapan fiksasi, dehidrasi, infiltrasi, *embedding*, pengirisan, dengan mikrotome Leica RM2125RT, pewarnaan dengan fast green 2%, dan pengamatan dibawah mikroskop.

Analisis Data

Data dianalisis dengan uji F. Bila hasil yang diperoleh berbeda nyata pada taraf 5%, dilakukan uji lanjut menggunakan Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

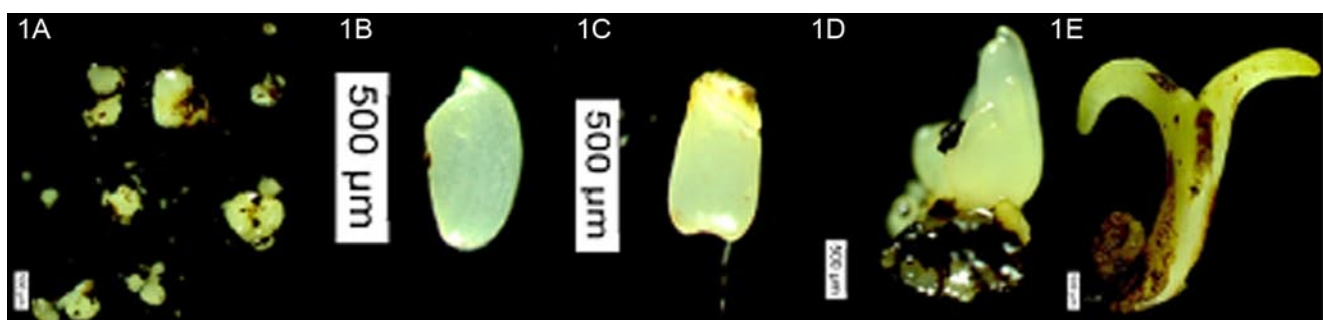
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembentukan embrio endospermik sekunder (EES) merupakan salah satu cara untuk meningkatkan faktor perbanyakannya embriogenesis mangga. Embrio yang dihasilkan dapat digunakan untuk kegiatan perbanyak bibit secara klonal dan untuk keperluan transformasi genetik. Tahapan perkembangan EES mangga Gedong Gincu yang terbentuk dari EEP memiliki pola seperti tersaji pada Gambar 1 yaitu fase proembryo (PE), embrio fase globular (EG), embrio fase torpedo (ET), embrio fase hati (EH), dan embrio fase kotiledon (EK), dan hasil analisis sitologi fase embrio tersaji pada Gambar 2. Pola ini terjadi juga pada mangga varietas Ratnagiri (Malabadi *et al.*, 2011).

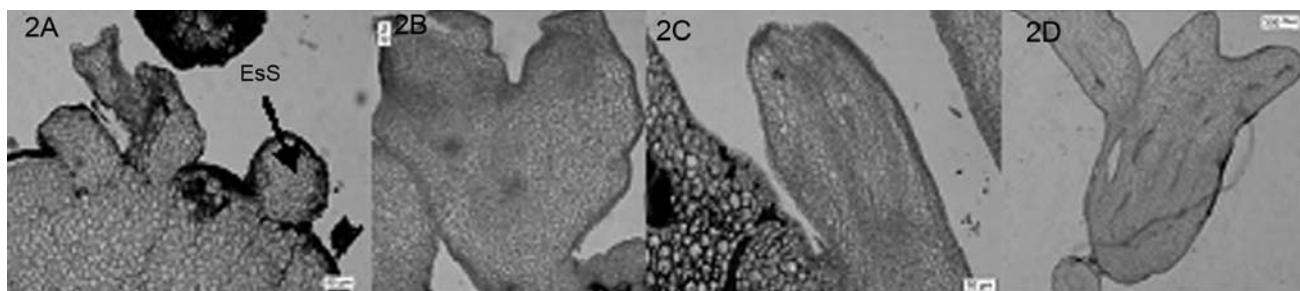
Induksi Embrio Endospermik Sekunder

Pembentukan EES dari inokulum EEP mangga Gedong Gincu klon 289 berupa PE dan EK terjadi 4 MSK dalam media induksi. Inokulum EEP berupa EK yang dikulturkan dalam media induksi berkembang membentuk EES berwarna kuning kehijauan langsung dari inokulum, tanpa pembentukan kalus embriogenik. EES tumbuh dari pinggir kotiledon dan bagian kotiledon yang terpotong (Gambar 3A dan 3B). Menurut Kim *et al.* (2012), embrio somatik sekunder sebagian besar tumbuh pada bagian hipokotil ujung calon akar. Ukuran EES yang tumbuh sekitar 1-3 mm pada fase torpedo atau berbentuk seperti terompet dan telah membentuk struktur embrio lengkap yaitu fase kotiledon.

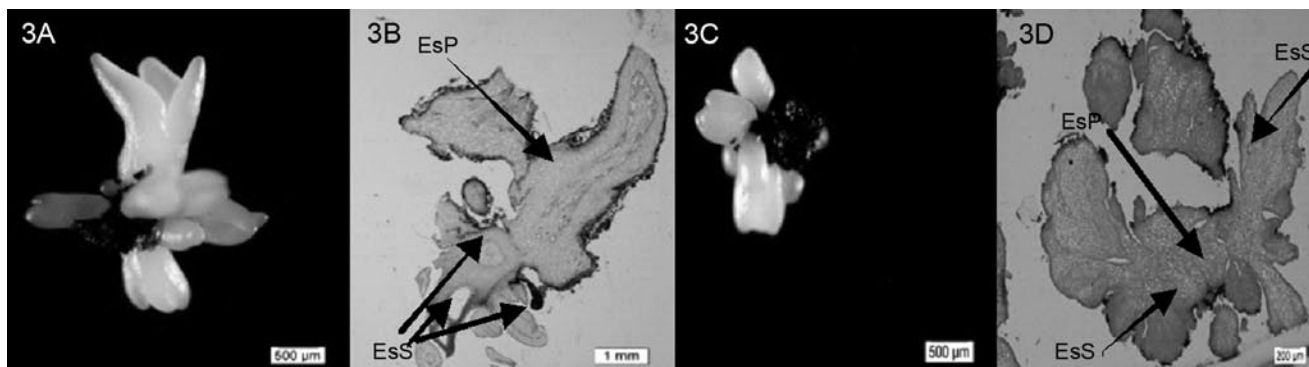
Embrio endospermik sekunder dari inokulum proembryo tumbuh sel embriogenik diatas EEP pada fase PE dan ET dengan struktur kompak, keras, dan memiliki warna putih kekuningan (Gambar 3C). Inokulum EEP yang tidak berkembang warnanya menjadi hitam dengan struktur kalus yang remah. Struktur kalus EES yang terbentuk pada penelitian ini berbeda dengan struktur kalus EEP, dimana kalus embriogenik adalah kalus dengan struktur remah, berwarna putih kekuningan, dan putih krem (Hanayanti, 2011). Kalus EES yang remah adalah kalus yang tidak embriogenik dan tidak beregenerasi ke tahap embrio selanjutnya. Rasio pembentukan EES dari PE lebih tinggi yaitu 29 PE yang membentuk EES jika dibandingkan dengan pembentukan EES dari inokulum EK yang hanya 11 embrio fase kotiledon dari 30 EEP (Tabel 1).



Gambar 1. Fase perkembangan embrio endospermik sekunder: (1A) Proembryo; (1B) embrio fase globular; (1C) embrio fase hati; (1D) embrio fase torpedo; (1E) embrio fase kotiledon



Gambar 2. Analisis histologi embrio endospermik sekunder: (2A) Embrio fase globular; (2B) embrio fase hati; (2C) embrio fase torpedo; (2D) embrio fase kotiledonari



Gambar 3. Perkembangan inokulum embrio endospermik primer (EEP) pada media proliferasi: (3A) Pembentukan embrio endospermik sekunder (EES) langsung pada hipokotil; (3B) analisis histologi EEP embrio fase kotiledon; (3C) pembentukan EES dibagian atas EEP (3D) analisis histologi EEP fase proembryo

Pengaruh Jenis Absorban Senyawa Fenolik terhadap Daya Proliferasi Embrio Endospermik Sekunder

Penambahan absorban pada media proliferasi EES bertujuan untuk menyerap senyawa fenolik yang dihasilkan oleh inokulum yang ditanam, yang dapat menghambat proliferasi embrio. Jenis absorban PVP dan AA memberikan pengaruh nyata terhadap respon embrio mangga Gedong Gincu pada persentase pembentukan EES. Respon terendah terdapat pada perlakuan tanpa penambahan absorban fenolik, dimana pada 4 MSK warna kalus berubah menjadi hitam dengan struktur kalus yang remah. Toksisitas fenolik kemungkinan disebabkan oleh ikatan reversibel antara hidrogen dan protein, oksidasi fenolik berubah menjadi quinon dan senyawa lain yang sangat beracun menyebabkan pencoklatan medium dan kematian eksplan (Hutami, 2008).

Embrio endospermik sekunder dengan struktur kompak dan berwarna putih adalah embrio yang memiliki sifat embriogenik dan dapat beregenerasi menjadi fase embrio selanjutnya. Proses proliferasi satu atau sekelompok kecil sel di permukaan embrio akan membentuk embrio baru (embrio sekunder) (Pardal, 2004). Penambahan PVP 1 g L⁻¹ pada media proliferasi memberikan struktur kalus kompak terbanyak yaitu sebesar 73.33% dengan embrio yang berwarna putih (Tabel 2).

Tingginya eksudat senyawa fenolik pada embriogenesis mangga terjadi selama proses perkembangan tanaman, menurut Krishna dan Singh (2007) senyawa ini mengaktifkan sistem enzim oksidasi dan menyebabkan perubahan warna pada media tanam dan menyebabkan respon pertumbuhan tanaman menjadi lambat. Pada penelitian ini media tanpa penambahan absorban senyawa fenolik menghasilkan bobot terendah (18.36 mg) dan sebagian embrio mengalami

Tabel 1. Perkembangan embrio endospermik primer pada media induksi embrio endospermik sekunder

Inokulum EEP	Jumlah EEP	Jumlah EEP yang membentuk EES	Fase EES yang terbentuk (rata-rata/EEP)					Akar yang terbentuk		
			PE	EG	EH	ET	EK	Akar	Rata-rata jumlah	Rata-rata Panjang
PE	30	29	9.07 ± 0.7	-	-	0.33 ± 0.35	-	Tidak	-	-
EK	30	11	-	-	-	0.97 ± 0.7	2.4 ± 0.82	Ya	0.50 ± 0.32	0.97 ± 0.50

Keterangan: EEP = Embrio Endospermik Primer; EES = Embrio Endospermik Sekunder; PE = Proembryo, EG = Embrio Fase Globular; ET = Embrio Fase Torpedo; EH = Embrio Fase Hati dan EK = Embrio Fase Kotiledon

kematian pada 4 MSK. Penambahan absorban fenolik meningkatkan pembentukan EES (Tabel 2), bobot EES (29.51-46.49 mg) dan frekuensi proliferasi (5.9-9.29 kali) (Tabel 3).

Jenis absorban (PVP dan AA) menghasilkan bobot embrio yang tidak berbeda, namun penambahan AA (1 dan 2 g L⁻¹) meningkatkan jumlah embrio fase kotiledonari yang terbentuk (Tabel 4). Arang aktif digunakan untuk meningkatkan hasil dan kualitas pada tahap maturasi embrio, senyawa ini berperan menyerap senyawa inhibitor (asam absisat dan senyawa fenolik) dari media.

Maturasi dan Perkecambahan Embrio Endospermik Sekunder

Analisis varian menunjukkan interaksi media asal dan penambahan BAP tidak berbeda nyata, pengaruh tunggal asal media berbeda nyata pada jumlah rata-rata embrio dan persentase warna embrio fase kotiledon. Embrio endospermik sekunder (EES) berupa *clumps* dari

media asal dengan penambahan arang aktif 2 g L⁻¹ (MP7) memberikan jumlah pembentukan embrio fase kotiledon terbanyak sebesar 3.29 dengan warna embrio hijau (Tabel 5). Penambahan arang aktif pada proses maturasi embrio dapat meningkatkan perkecambahan embrio (Dragosavac *et al.*, 2010) dan meningkatkan perkembangan embrio somatik menjadi plantlet (Kim *et al.*, 2012). Peranan sitokinin penting dalam media kultur endosperma, yaitu untuk memproduksi tunas pada endosperma.

Pembentukan embrio fase kotiledon terbagi menjadi 4 kategori yaitu sangat cepat (2-4 MSK); lambat (4-6 MSK); sangat lambat (6-8 MSK), dan tidak ada perkembangan (embrio menjadi hitam). Hasil penelitian pada waktu pembentukan embrio, penambahan BAP dan media asal inokulum berbeda nyata dengan perlakuan tanpa penambahan BAP dan senyawa absorban. Regenerasi tunas dari endosperma *Actinidia deliciosa* cv Hayward hanya terjadi dengan penambahan Thidiazuron 0.5 mg L⁻¹ (Goralski *et al.*, 2005). Penambahan BAP 0.2 mg L⁻¹ (MP20) dan 0.4 mg L⁻¹ (MP21) berbeda nyata terhadap maturasi

Tabel 2. Perkembangan embrio endospermik sekunder umur 4 MSK pada media dengan absorban senyawa fenolik

Penambahan senyawa absorban	Jumlah inokulum awal (<i>clumps</i>)	Persentase pembentukan ESS (%)	Persentase warna ESS (%)			Persentase struktur ESS (%)		
			H	PH	P	R	KR	K
Tanpa absorban	75	69b	24.44a	40.00a	35.56c	75.56a	15.56	8.89b
PVP 0.5 g L ⁻¹	75	91a	15.56b	31.11a	53.33b	60.00a	26.67	15.56b
PVP 1 g L ⁻¹	75	98a	0.00c	2.22b	93.33a	6.67b	20.00	73.33a
PVP 2 g L ⁻¹	75	93a	0.00c	6.67b	88.89a	11.11b	33.33	55.56a
AA 0.5 g L ⁻¹	75	91a	2.22c	11.11b	86.67a	11.11b	40.00	48.89a
AA 1 g L ⁻¹	75	96a	2.22c	6.67b	91.11a	8.89b	40.00	51.11a
AA 2 g L ⁻¹	75	96a	0.00c	2.22b	97.78a	11.11b	42.22	46.67a
KK(CV)		11.17	3.87	5.84	3.94	10.89		7.86

Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada $\alpha = 5\%$. PVP = Poly vinyl pyrrolidone; AA = Arang Aktif; EES = Embrio Endospermik Sekunder; H = Hitam, PH = Putih kehitaman, P = Putih; R = Remah, KR = Kompak Remah, K = Kompak

Tabel 3. Pertambahan bobot dan frekuensi proliferasi embrio endospermik primer pada 4 MSK

Penambahan senyawa absorban	Rata-rata bobot kalus (mg)		Pertambahan bobot (%)	Frekuensi proliferasi
	Inokulum awal	ESS pada 4 MSK		
Tanpa absorban	5	18.36d	13.36d	3.67d
PVP 0.5 g L ⁻¹	5	29.51c	24.51c	5.90c
PVP 1 g L ⁻¹	5	46.49a	41.49a	9.29a
PVP 2 g L ⁻¹	5	39.49b	34.49b	7.89b
AA 0.5 g L ⁻¹	5	33.47c	28.47c	6.69c
AA 1 g L ⁻¹	5	41.78ab	36.78ab	8.35ab
AA 2 g L ⁻¹	5	42.29ab	37.29ab	8.45ab
KK (%)		8.21	9.54	9.52

Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada $\alpha = 5\%$

Tabel 4. Fase pembentukan embrio endospermik sekunder pada media dengan penambahan absorban fenolik

Penambahan senyawa absorban	Jumlah rata-rata fase embrio yang terbentuk pada 4 MSK					
	Proembryo	Globular	Hati	Torpedo	Kotiledon	Total embrio
Tanpa absorban	2.5e	0.0a	0.0b	0.1b	0.0c	2.6e
PVP 0.5 g L ⁻¹	4.9d	0.1ab	0.1b	0.3a	0.0c	5.4d
PVP 1 g L ⁻¹	7.0c	0.1ab	0.3a	0.4a	0.2b	8.0bc
PVP 2 g L ⁻¹	7.0c	0.0b	0.1b	0.2a	0.1bc	7.5c
AA 0.5 g L ⁻¹	5.6d	0.0b	0.1b	0.1b	0.0bc	5.8d
AA 1 g L ⁻¹	8.6b	0.1ab	0.1b	0.1b	0.6a	9.5b
AA 2 g L ⁻¹	10.6a	0.0b	0.0b	0.1b	0.7a	11.4a
KK (%)	5.6	3.7	5.5	5.5	7.6	5.5

Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada $\alpha = 5\%$ (data yang dianalisis ditransformasi dengan $\sqrt{x + 0.5}$)

proembryo, menghasilkan embrio fase kotiledon berwarna hijau sebesar 31% (Tabel 5). Embrio fase kotiledon yang diinginkan adalah yang berwarna hijau untuk selanjutnya ditanam ke dalam media perkecambahan.

Embrio endospermik sekunder mangga Gedong Gincu fase kotiledon (Gambar 4E) yang ditanam pada media perkecambahan memiliki tiga pola pertumbuhan yaitu kotiledon tidak menghasilkan tunas dan akar (T_dA_d), tidak membentuk tunas tetapi membentuk akar (T_dA_y), dan membentuk tunas dan akar (T_yA_y) (Gambar 4F). Menurut Kumar dan Kumari 2010, pola pertumbuhan kotiledon seperti ini terjadi juga pada tahap perkecambahan tanaman kembang pulu (*Carthamus tinctorius* L.). Embrio yang berkecambah normal dengan pola mampu membentuk tunas

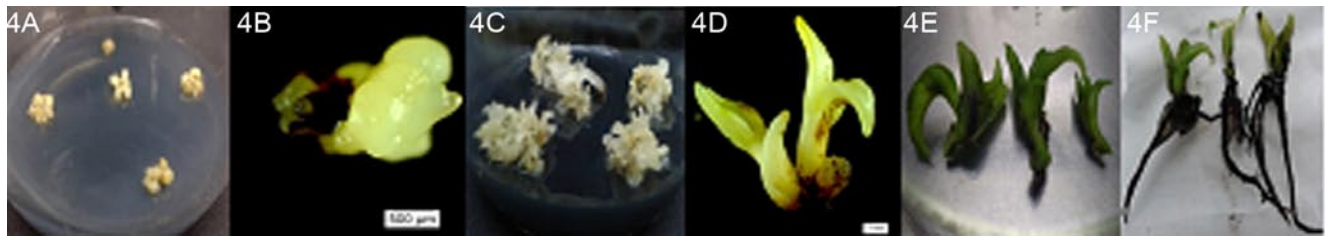
dan akar yang dapat berkembang menjadi plantlet (Avivi *et al.*, 2010).

Embrio mangga Gedong Gincu fase kotiledon yang memiliki pola pertumbuhan T_yA_y mampu berkecambah pada 8 MSK. Menurut Widoretno *et al.* (2003), ES yang telah masak ditandai dengan terbentuknya struktur embrio lengkap dengan kotiledon dan radikula, setelah dkecambahkan selama satu minggu pada media perkecambahan, ES kedelai yang telah masak mengalami pemanjangan hipokotil dan mulai membentuk akar dan daun primer. Evaluasi yang dilakukan terhadap media perkecambahan, penambahan GA3 1.5 mg L⁻¹ dapat mengecambahkan EES yang dikulturkan dengan persentase sebesar 20 % (Tabel 6).

Tabel 5. Jumlah embrio fase kotiledonari pada tahap maturasi embrio endospermik sekunder

Sumber keragaman	Waktu pembentukan embrio fase kotiledon (minggu)	Jumlah rata-rata embrio fase kotiledonari dari EES pada				Persentase warna kotiledon pada 8 MSK		
		2	4	6	8	Putih	Putih kehijauan	Hijau
Jenis absorban	MSK.....						
Tanpa absorban	6	0.0c	0.0e	0.2e	1.1d	18ab	29e	0c
PVP 0.5 g L ⁻¹	2	0.1c	0.3d	0.7d	2.0c	20a	51d	0c
PVP 1 g L ⁻¹	2	0.2b	0.6bc	0.9c	1.6c	2c	73abc	22ab
PVP 2 g L ⁻¹	2	0.0c	0.4cd	1.2c	2.1bc	7bc	84a	7c
AA 0.5 g L ⁻¹	2	0.2b	0.6b	1.9c	2.0c	9abc	82ab	2c
AA 1 g L ⁻¹	2	0.5a	0.9a	1.7b	2.7b	9abc	69bc	20b
AA 2 g L ⁻¹	2	0.41	0.9a	2.1a	3.3a	2c	67c	31a
Konsentrasi BAP (mg L ⁻¹)								
BAP 0	2	0.1e	0.4g	0.9h	1.8b	11d	58f	11d
BAP 0.2	2	0.2f	0.5g	1.2g	2.2a	7d	70f	13d
BAP 0.4	2	0.3f	0.7f	1.4f	2.4a	11d	68f	12d
KK (%)		9.1	11.1	8.3	11.1	8.95	5.96	7.16

Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada $\alpha = 5\%$ (data yang dianalisis ditransformasi dengan $\sqrt{x + 0.5}$)



Gambar 4. Perkembangan embrio endospermik sekunder (EES) mangga Gedong Gincu Klon 289 pada tahap maturasi dan perkecambahan: Inokulum EES yang dikulturkan ke media maturasi (4A dan 4B); Maturasi EES setelah 4 MSK (4C dan 4D); inokulum ESS yang dikecambahkan (4E); embrio yang berkecambah pada 8 msk (4F)

Tabel 6. Jumlah embrio endospermik sekunder fase kotiledon yang berkecambah pada media perlakuan GA3

Media perlakuan GA3 (ppm)	Jumlah embrio yang ditanam	Pola pertumbuhan kotiledon			Kotiledon yang berkecambah	Persentase perkecambahan (%)
		TdAd	TdAy	TyAy		
0	15	13	2	0	0	0
0.5	15	14	1	0	0	0
1	15	13	1	1	1	6
1.5	15	9	3	3	3	20
2	15	9	4	2	2	13.3

Keterangan: T_d = Tunas tidak ada; T_y = Tunas ada; A_d = Akar tidak Ada; A_y = Akar ada

KESIMPULAN

Perbanyak klonal dari sel endosperma *Mangifera indica* L. varietas Gedong Gincu klon 289 memerlukan tahapan induksi embrio, proliferasi, maturasi, perkecambahan dan perkembangan menjadi plantlet. Proliferasi embrio endospermik sekunder memerlukan penambahan senyawa absorbansi senyawa fenolik yang dapat menghambat proliferasi dan merubah warna inokulum menjadi hitam, penambahan senyawa absorbansi arang aktif dan *Poly Vinyl Pyrrolidone* memberikan respon yang berbeda. Penambahan *Poly Vinyl Pyrrolidone* 1 g L⁻¹ merupakan media terbaik untuk proliferasi embrio endospermik primer, dengan persentase pembentukan embrio endospermik sekunder sebesar 98% dengan struktur kalus kompak (73.3%) dan fase proembrio yang berwarna putih (93.33%). Penambahan arang aktif 2 g L⁻¹ memberikan respon warna kalus terbaik yaitu hijau (97.78%) dan jumlah pembentukan embrio fase kotiledonari yang paling tinggi (0.71). Kalus dengan struktur kompak dan berwarna hijau merupakan embrio yang dapat berkembang ke fase selanjutnya. Media dengan penambahan arang aktif baik digunakan untuk media pemeliharaan embrio endospermik sekunder sebelum dilakukan tahap maturasi eksplan. Maturasi pada media dengan penambahan BAP 0.4 mg L⁻¹ dengan inokulum berupa *clumps* yang berasal dari media proliferasi dengan penambahan arang aktif (AA) 2 g L⁻¹ memberikan rata-rata pembentukan embrio fase kotiledon sebesar 2.39. Tahap perkecambahan embrio endospermik mangga Gedong Gincu pada media dengan penambahan *Gibberellic Acid* (GA3) 1.5 mg L⁻¹ menghasilkan perkecambahan tertinggi sebesar 20% dibandingkan dengan konsentrasi GA3 lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Avivi, S.A., A. Prawoto, R.F. Oetami. 2010. Regenerasi embriogenesis somatik pada beberapa klon kakao Indonesia dari eksplan bunga. *J. Agron. Indonesia* 38:138-143.
- Dragosavac, D.C., S.Z. Korac, B. Bohanec, L. Radojevic, B. Vinterhalter, S. Stevovic, A. Cingerl, J. Savic. 2010. Effect of activated charcoal, abscisic acid and polyethylene glycol on maturation, germination and conversion of *Aesculus hippocastanum* androgenic embryos. *African Journal of Biotechnology* 9:3786-3793.
- Ermayanti, T.M., E.R. Deritha. 2009. Establishment of somatic embryogenesis of some mango cultivars (*Mangifera indica* L.) grown in Indonesia. *J. Biotech Research in Tropical Region* 2:1-5.
- Goralski, G.M., M. Popielarska, H. Slesak, D. Siwinska, M. Batycka. 2005. Organogenesis in endosperm of *Actinidia deliciosa* cv Hayward culture *in vitro*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 47:121-128.
- Hanayanti, O. 2011. Embriogenesis sel endosperma untuk perakitan tanaman triploid mangga (*Mangifera indica* L.) varietas Gedong Gincu. Tesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Hutami, S. 2008. Masalah pencoklatan pada kultur jaringan [ulasan]. *J. Agro Biogen*. 4:83-88.

- Iyer, C.P.A., C. Degani. 2009. Classical breeding and genetics. p. 67-98. *Dalam* R.E. Litz, (Eds.). The Mango Botany. Production and Uses, 2nd Edition. Oxfordshire (GB): MPG Books Group Bodmin.
- Kim, Y.J., O.R. Lee, K.T. Kim, D.C. Yang. 2012. High frequency of plant regeneration through cyclic secondary somatic embryogenesis in *Panax Ginseng*. *J. Ginseng Res.* 36:442-448.
- Krishna, H., S.K. Singh. 2007. Biotechnological advances in mango (*Mangifera indica* L.) and their future implication in crop improvement- a review. *Biotechnology Advances* 25:223-243.
- Kumar, S.P., B.D.R. Kumari. 2010. Effect of primary and secondary somatic embryogenesis in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) at morphological and biochemical levels. *American-Euroasian J. Agric. Environ. Sci.* 8:784-792.
- Malabadi, R.B., J.A. Teixeira da Silva, K. Nataraja, S.Vijaykumar, S.M. Gangadhar. 2011. Induction of somatic embryogenesis in mango (*Mangifera indica* L.). *Int. J. of Biological Technology* 2:12-18.
- Pardal, S.J., G.A. Wattimena, H. Aswidinnoor, M. Herman, E. Listanto, Slamet. 2004. Transfer gen proteinase inhibitor II pada kedelai melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens* untuk ketahanan terhadap hama penggerek polong (*Etiella zinckenella* Tr.). *J. Bioteknologi Pertanian* 9:20-28.
- Sukamto, L.A. 2010. Kultur *in vitro* endosperma, protokol yang efisien untuk mendapatkan tanaman triploid secara langsung. *J. Agro Biogen* 6:107-112.
- Widoretno, W., R. Megia, Sudarsono. 2003. Respons embrio somatik terhadap polietilena glikol dan penggunaannya untuk seleksi *in vitro* terhadap stres kekeringan. *Hayati J. Biosci.* 10:134-139.
- Xiao, J.N., Xue-Lin Huang, Yong-Jie Wu, Xiao-Ju li, Ming-de Zhou, F. Engelmann. 2004. Direct somatic embryogenesis induced from cotyledons of mango immature zygotic embryos. *In vitro Cell Dev. Biol. plant.* 40:196-199.