

08012015 ✓
205/FP/2015

LAPORAN AKHIR

PENELITIAN HIBAH FUNDAMENTAL



**PERAKITAN EMBRIO SOMATIK MANGGIS (*Garcinia mangostana* L.)
SECARA *IN VITRO* DAN ANALISIS KERAGAMAN SOMAKLONAL
DENGAN RAPD**

Peneliti Utama:
Dr. Innaka Ageng Rineksane, S.P., M.P.
NIDN: 0512107201
Anggota:
Ir. Agung Astuti, MSi
NIDN: 0523096201



Dibiayai oleh:

**Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional, sesuai
dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penugasan Penelitian Hibah Fundamental**

Nomor: 1141.9/K5/KL/2013, tanggal 21 Mei 2013

UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH YOGYAKARTA
NOVEMBER 2013

UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH YOGYAKARTA	
Diterima tgl. :	
Jaw / Proy. :	
Klasifikasi :	
Anal Buku :	Bell / Hadiah /

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
RINGKASAN KEGIATAN.....	iv
PRAKATA	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
I. PENDAHULUAN.....	1
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	2
III. PETA JALAN (ROADMAP), TUJUAN DAN MANFAAT KEGIATAN	5
IV. METODE PENELITIAN	9
V. URAIAN PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	12
1. Induksi Kalus Embriogenik dari Eksplan Biji Manggis.....	12
2. Induksi Kalus Embriogenik dari Eksplan Daun Manggis	15
3. Regenerasi Embrio Somatik dalam Kultur Cair.....	19
VI. URAIAN HASIL DAN KEBARUAN DALAM BIDANG PENELITIAN	22
1. Induksi Kalus Embriogenik dari Eksplan Biji Manggis.....	22
2. Induksi Kalus Embriogenik dari Eksplan Daun Manggis	23
3. Regenerasi Embrio Somatik dalam Kultur Cair.....	23
4. Penutup	24
VII. KESIMPULAN DAN SARAN	25
VIII. DAFTAR PUSTAKA.....	26
LAMPIRAN	29
1. Induksi Kalus Embriogenik dari Eksplan Biji Manggis.....	33
2. Regenerasi Embrio Somatik dalam Kultur Cair.....	36

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Kegiatan : Perakitan Embrio Somatik Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Secara In Vitro dan Analisis Keragaman Somaklonal dengan RAPD

Peneliti / Pelaksana

Nama Lengkap : INNAKA AGENG RINEKSANE S.P., M.P.

NIDN : 0512107201

Jabatan Fungsional :

Program Studi : Agroteknologi

Nomor HP : 082132254854

Surel (e-mail) : rineksane@gmail.com

Anggota Peneliti (1)

Nama Lengkap : AGUNG ASTUTI

NIDN : 0523096201

Perguruan Tinggi : UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH YOGYAKARTA

Institusi Mitra (jika ada)

Nama Institusi Mitra :

Alamat :

Penanggung Jawab :

Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun

Biaya Tahun Berjalan : Rp. 30.000.000,00

Biaya Keseluruhan : Rp. 99.250.000,00

Mengetahui
Dekan



Yogyakarta, 23 - 11 - 2013,
Ketua Peneliti,

(INNAKA AGENG RINEKSANE S.P., M.P.)

RINGKASAN KEGIATAN

Manggis (*Garcinia mangostana* L.) merupakan tanaman buah tropis yang pemanfaatannya semakin meningkat dalam bentuk buah segar maupun produk olahan berupa minuman kesehatan dan suplemen yang mengandung antioksidan, anti tumor, anti nyeri, anti alergi, anti bakteri, anti jamur dan antivirus. Penelitian ini terdiri dari tiga percobaan. Percobaan pertama menguji eksplan biji yang diinduksi kalus dengan menggunakan variasi konsentrasi Thidiazuron (0,1; 0,5 dan 1 mg/L) dan 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (4, 6, 8 dan 10 mg/L) dalam medium setengah Murashige dan Skoog yang ditambah 500 mg/L glutamin. Percobaan kedua menguji eksplan daun yang diinduksi kalus dengan menggunakan variasi konsentrasi Thidiazuron (0,1; 0,5 dan 1 mg/L) dan 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (0, 5, 10 dan 20 mg/L) dalam medium setengah Murashige dan Skoog yang ditambah 500 mg/L glutamine. Percobaan ketiga menguji subkultur kalus embriogenik dari medium padat ke dalam medium $\frac{1}{2}$ MS0 cair serta medium $\frac{1}{2}$ MS cair yang ditambahkan Thidiazuron (0, 1, 2, 4, 8 mg/L) dan Casein hydrolysate 500 mg/L. Percobaan 1 dan 2 menggunakan faktor tunggal, terdiri dari 12 perlakuan, setiap perlakuan diulang 5 kali. Percobaan 3 menggunakan rancangan faktor tunggal, terdiri dari 5 perlakuan, setiap perlakuan diulang 3 kali.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa eksplan biji manggis membentuk kalus setelah satu minggu inokulasi. Diantara perlakuan yang diuji, Medium $\frac{1}{2}$ MS dengan penambahan TDZ 0,1 mg/L + 2,4-D 6 mg/L memberikan pertumbuhan kalus terbaik dari eksplan biji manggis, ditunjukkan oleh parameter diameter kalus terbesar (7,52 cm) dan persentase browning terendah (1 %). Kalus yang diperoleh pada perlakuan tersebut mencirikan kalus embriogenik ditunjukkan oleh tekstur kalus remah dan warna kekuningan. Kalus yang diperoleh dari eksplan daun belum menunjukkan struktur remah sebagaimana ditunjukkan oleh kalus yang tumbuh dari eksplan biji. Diantara perlakuan yang diujikan, $\frac{1}{2}$ MS + 0,1 mg/L TDZ + 20 mg/L 2,4-D memberikan pertumbuhan kalus terbaik sebagaimana ditunjukkan oleh parameter persentase browning (0%), persentase eksplan hidup (100%), saat tumbuh kalus (14,75 hari), persentase kalus (76,67 %) dan luas kalus (14,33 mm). Kalus embriogenik yang disubkultur ke dalam medium $\frac{1}{2}$ MS0 cair mampu membentuk kultur suspensi sel. Struktur embrio somatik berupa globular, heart dan torpedo telah terbentuk dalam waktu 8 minggu pada suspensi sel yang diperoleh dari kalus yang sebelumnya ditumbuhkan pada medium $\frac{1}{2}$ MS padat yang mengandung 20 mg/L 2,4-D dan 1 mg/L TDZ.

PRAKATA

Dengan mengucapkan syukur kehadirat Allah SWT akhirnya laporan akhir penelitian yang berjudul "Perakitan Embrio Somatik Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Secara *In Vitro* dan Analisis Keragaman Somaklonal dengan RAPD" ini selesai disusun sesuai waktu yang ditentukan. Penelitian ini merupakan penelitian fundamental yang didanai oleh Dikti pada tahun 2013.

Penulis tertarik dengan tanaman manggis dan perbanyak *in vitro* manggis mengingat manggis merupakan buah asli daerah tropis yang mengandung gizi dan antioksidan yang saat ini banyak diperlukan bagi kesehatan manusia, serta nilai ekonomisnya semakin tinggi seiring permintaan akan buah manggis yang terus meningkat. Sementara itu upaya memenuhi kebutuhan bibit manggis melalui kultur *in vitro* belum dilakukan di Indonesia, terutama bibit yang diperoleh dari embrio somatik.

Tujuan penelitian ini telah tercapai seperti yang diharapkan, dan sebagian hasil penelitian ini telah ditulis menjadi artikel ilmiah yang telah diseminarkan pada seminar nasional Perhorti 2013 di Bogor. Artikel ilmiah dan buku ajar sebagai luaran dari penelitian ini telah direncanakan untuk disusun dan dipublikasikan pada jurnal nasional terakreditasi. Namun demikian, penelitian ini tak lepas dari kekurangan, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun diperlukan untuk perbaikan penelitian ini. Hasil penelitian yang diperoleh insya allah akan dilanjutkan untuk diperbanyak dan dianalisis keragaman genetiknya apabila disetujui oleh Dikti untuk didanai pada tahun kedua.

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada: 1) Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi melalui Hibah Fundamental tahun 2013 dengan Nomor: 1141.9/K5/KL/2013 sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan; 2) Rektor UMY melalui Ketua LP3M yang telah memfasilitasi dan membantu informasi sehingga penelitian ini dapat berjalan lancar; 3) Dekan Fakultas Pertanian UMY yang telah memberikan ijin dan fasilitas; 4) Tim peneliti atas kerjasamanya sehingga penelitian ini dapat diselesaikan.

Akhirnya semoga penelitian ini bermanfaat.

DAFTAR TABEL

1	Pengaruh Konsentrasi Thidiazuron dan 2,4-D dalam $\frac{1}{2}$ MS terhadap Pertumbuhan Kalus dari Eksplan Biji pada Minggu ke-4 Setelah Tanam, Minggu ke-2 dan ke-8 Setelah Subkultur.....	13
2	Pengaruh Konsentrasi 2,4-D dan Thidiazuron dalam Medium $\frac{1}{2}$ MS terhadap Pertumbuhan Kalus dari Eksplan Daun pada Minggu ke-8 Setelah Tanam.....	16
3	Pengaruh Konsentrasi 2,4-D dan Thidiazuron dalam Medium $\frac{1}{2}$ MS terhadap Pertumbuhan Kalus dari Eksplan Daun pada Minggu ke-8 Setelah Tanam.....	--

DAFTAR GAMBAR

1	Tahapan Produksi Embrio Somatik Manggis dan Analisis Keragaman Somaklonal dengan RAPD.....	9
2	Pertumbuhan kalus manggis dari eksplan biji setelah disubkultur pada minggu ke-8.....	14
3	Pertumbuhan Kalus Manggis pada Daun setelah Subkultur 4 minggu.....	19
4	Kultur suspensi sel setelah inkubasi selama 6 minggu.....	20
5	Struktur embrio somatik yang diperoleh setelah inkubasi suspensi sel	

DAFTAR LAMPIRAN

1	Cover Buku Program Seminar Nasional Perhorti Tahun 2013.....	29
2	Abstrak Seminar Nasional Perhorti 2013.....	30
3	Sertifikat Sebagai Presenter Oral pada Seminar Nasional Perhorti 2013...	30
4	Draft Naskah Jurnal Ilmiah	31

I. PENDAHULUAN

Latar Belakang

Manggis (*Garcinia mangostana* L.) merupakan buah tropis yang permintaannya semakin meningkat karena dimanfaatkan sebagai bahan produk kesehatan. Kandungan antioksidan dalam kulit manggis seperti xanthone, alpha dan beta mangostin digunakan sebagai agen anti kanker. Manggis dapat dikonsumsi dalam bentuk segar atau diproses menjadi jus sebagai minuman kesehatan dan suplemen. Rasa buah yang lezat menyebabkan buah ini mendapat julukan sebagai ratu buah. Permintaan manggis yang meningkat tidak diiringi dengan produksinya disebabkan manggis masih diusahakan secara konvensional. Pengusahaan manggis dalam skala perkebunan dengan kualitas seragam terkendala oleh pertumbuhan tanaman yang lambat, perakaran yang lemah karena terbatasnya rambut akar, masa berbuah dwi tahunan dan jumlah biji layak tanam yang sedikit per buah menyebabkan ketersediaan bahan tanam yang sedikit sepanjang tahun. Alternatif untuk memproduksi bahan tanam manggis adalah melalui perbanyakan *in vitro*.

Produksi plantlets *in vitro* telah dilakukan melalui organogenesis dengan menggunakan kultur padat. Induksi embrio somatik juga telah dilakukan dengan menggunakan kultur padat dan cair, namun produksi embrio somatik sehingga menjadi plantlet belum dilakukan. Plantlet yang diproduksi melalui kultur *in vitro* memiliki sifat genetik yang sama karena berasal dari eksplan vegetatif, namun demikian penggunaan zat pengatur tumbuh dengan konsentrasi dan masa inkubasi yang berbeda dapat menyebabkan variasi genetik antar plantlet. Keragaman genetik plantlet manggis yang diperoleh dari organogenesis telah dideteksi dengan menggunakan penanda genetik *random amplified polymorphic DNA* (RAPD). RAPD merupakan penanda genetik yang mudah, murah dan cepat untuk mendeteksi keragaman genetik antar tanaman atau plantlet. RAPD juga akan digunakan untuk menilai keragaman genetik antar plantlet.

II. TINJAUAN PUSTAKA

Manggis merupakan tanaman buah tropis yang banyak ditemukan di hutan hujan tropis di Asia Tenggara seperti Thailand, Malaysia, Indonesia dan Philipina yang kemudian didomestikasi sebagai tanaman pekarangan atau tanaman tepi jalan (Osman dan Milan, 2006). Hampir semua bagian tanaman manggis dapat dimanfaatkan. Buah manggis selain dikonsumsi segar juga diproses menjadi berbagai produk seperti selai, sirup, perasa jus dan bir (Osman dan Milan, 2006). Antioksidan xanthones telah diisolasi dari pericarp, buah, kulit kayu dan daun. Kandungan xanthones dari manggis seperti α , β - dan γ mangostins, garcinone E, 8-deoxygartanin dan gartanin menunjukkan aktivitasnya sebagai antioksidan, anti tumor, anti nyeri, anti alergi, anti bakteri, anti jamur dan anti virus (Suksamrarn *et al.*, 2006; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2008).

Perbanyakan manggis secara konvensional dilakukan dengan menggunakan biji. Sifat biji rekalsitran menyebabkan biji manggis harus segera ditanam setelah dipisahkan dari buah (Chin dan Roberts, 1980). Penundaan penanaman biji akan menyebabkan kehilangan atau penurunan vigor dan viabilitas biji. Biji untuk penanaman tidak tersedia sepanjang tahun karena manggis tidak berbuah sepanjang tahun melainkan sekali dalam setahun atau setiap dua tahun. Hal ini membatasi pengembangan kebun buah manggis secara komersial. Perbanyakan manggis secara vegetatif seperti grafting dan okulasi menunjukkan keberhasilan tumbuh sebanyak 87% dan 77% (Husan, 1990). Akan tetapi penyediaan bahan tanam manggis dari perbanyakan vegetatif untuk tujuan komersial belum dilaporkan.

Ketersediaan bahan tanam yang tidak kontinu dapat dipenuhi dengan menggunakan teknik perbanyakan *in vitro*. Teknik ini dapat menyediakan bahan tanam dalam jumlah banyak dari bagian kecil tanaman. Perbanyakan *in vitro* atau mikropropagasi didefinisikan sebagai teknik untuk menumbuhkan sebagian kecil tanaman dalam medium buatan dengan lingkungan yang steril dan terkendali (Pierik, 1987; Hartmann *et al.*, 1990; George, 1993; Razdan, 2005). Teknik ini berkembang setelah teori sel yang dikemukakan oleh Schwann dan Schleiden yang menyatakan bahwa setiap sel memiliki sifat totipotensi yaitu kemampuan berkembang menjadi tanaman utuh.

Perbanyakan manggis secara *in vitro* telah dilakukan melalui induksi tunas dari eksplan biji (Normah *et al.*, 1995) dan daun (Goh *et al.*, 1990; Goh *et al.*, 1994; Te-chato *et al.*, 1995b; Lakhsmanan *et al.*, 1997; Sirchi *et al.*, 2008) dalam medium yang mengandung sitokinin. Plantlets dari eksplan daun juga telah diperoleh melalui organogenesis tak langsung setelah 4 subkultur selama 32 minggu (Te-chato dan Lim, 2000). Selain organogenesis, perbanyakan *in vitro* dapat menggunakan embriogenesis somatik. Teknik ini lebih menguntungkan dibanding organogenesis karena plantlet yang dihasilkan lebih banyak, tunas dan akar diperoleh sekaligus dalam satu plantlet tanpa melalui tahap pengakaran. Usaha mendapatkan embrio somatik telah dilakukan dengan mengkulturkan biji manggis dalam medium mengandung auksin (Te-chato *et al.* 1995a) tetapi belum berhasil. Dalam penelitian sebelumnya, Rineksane (2011) telah berhasil menginduksi embrio somatik tahap torpedo dalam kultur suspensi atau kultur cair. Rekayasa untuk mengecambahkan embrio somatik dari medium cair ke medium padat masih dapat dilakukan sehingga produksi embrio somatik secara massal dapat diperoleh.

Embriogenesis somatik untuk perbanyakan tanaman dapat menginduksi perubahan genetik yang menyebabkan keragaman somaklonal antara embrio somatik yang diperoleh. Hal ini menguntungkan dari sisi perbaikan sifat tanaman. Apabila keragaman genetik telah diketahui, maka seleksi sifat yang baik di antara embrio somatik yang dihasilkan dapat dilakukan. Pengujian keragaman somaklonal antara embrio somatik manggis dapat dilakukan dengan menggunakan penanda genetik berbasis DNA seperti *random amplified polymorphic DNA* (RAPD). Penanda genetik berbasis DNA mempunyai multifungsi dalam bidang taksonomi, fisiologi, embriologi, rekayasa genetik dan lainnya. Penanda DNA menjadi jalan pintas untuk pemetaan genetik, pemilihan sifat genetik dan sebagai indikator keragaman genetik (Karp dan Edwards, 1997).

Keragaman genetik pada manggis dikatakan tidak ada karena biji manggis dihasilkan oleh proses parthenogenesis. Dalam kenyataannya, terdapat keragaman antar manggis berdasar lokasi dimana tanaman tersebut tumbuh (Ramage *et al.*, 2004; Sobir *et al.*, 2009). Rineksane (2011) pada penelitian sebelumnya telah mendeteksi adanya sedikit perubahan genetik antara tunas

III. PETA JALAN (ROADMAP), TUJUAN DAN MANFAAT KEGIATAN

Peta Jalan (Roadmap)

Peta jalan penelitian manggis secara *in vitro* telah dimulai tahun 2001 melalui organogenesis untuk menghasilkan plantlet manggis. Biji manggis diinokulasi dalam medium MS yang mengandung BAP, NAA dan air kelapa untuk multiplikasi tunas. Tunas yang diperoleh diakarkan dalam medium cair dengan penambahan IBA konsentrasi tinggi dan air kelapa yang berfungsi sebagai antioksidan dan memberikan kondisi gelap dalam medium perakaran. Metode jembatan kertas saring atau *filter paper bridge* diaplikasikan dalam medium cair untuk menyangga tunas manggis *in vitro*.

Organogenesis manggis dilakukan lagi tanpa menggunakan air kelapa pada tahun 2008. Planlet yang diperoleh diaklimatisasi dalam medium perlakuan, medium terbaik untuk aklimatisasi adalah kombinasi pasir dan bahan organik. Hasil penelitian organogenesis manggis baik tunas *in vitro* maupun planlet hasil aklimatisasi dianalisis kemungkinan terjadinya perubahan genetik.. Hasil analisis menggunakan RAPD menunjukkan terjadinya sedikit keragaman antara planlet hasil kultur *in vitro* dengan induk asalnya.

Selain organogenesis, upaya perbanyak manggis melalui embriogenesis somatik juga dilakukan mulai tahun 2007. Identifikasi jenis auksin untuk menghasilkan kalus embriogenik telah dilakukan; 2,4-D merupakan auksin yang terbukti dapat menginduksi eksplan biji manggis untuk membentuk kalus yang bersifat embriogenik. Subkultur kalus dari medium padat ke medium cair untuk menginduksi terbentuknya struktur embrio juga telah dilakukan, namun struktur embrio yang diperoleh hanya sampai bentuk torpedo. Pada penelitian tersebut, pertumbuhan kalus dan suspensi sel dalam medium cair lambat.

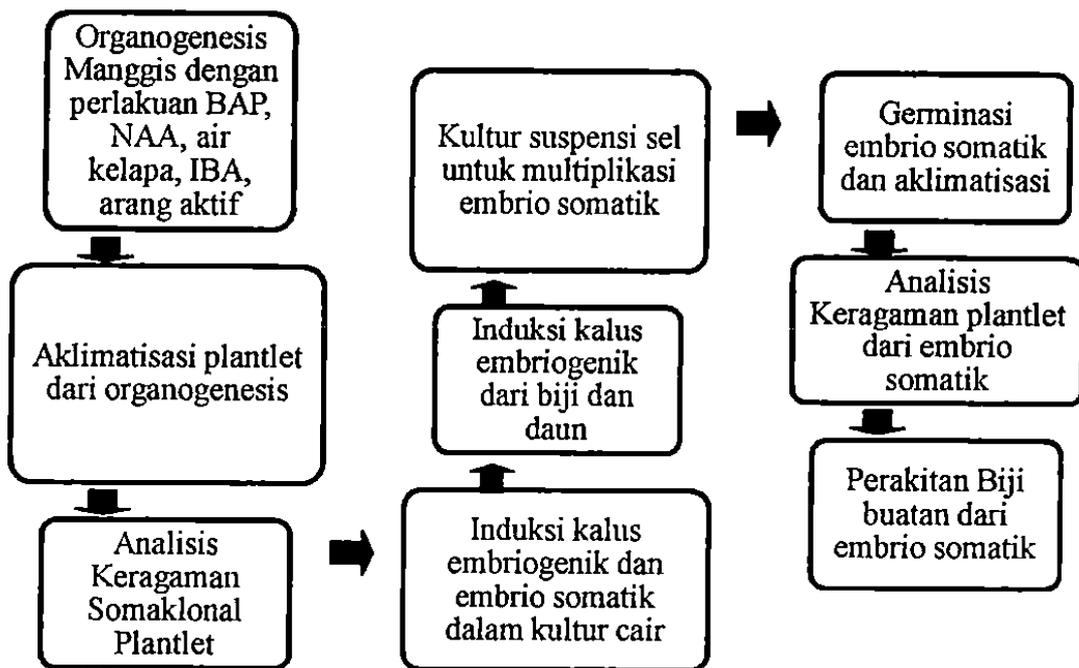
Penelitian ini mencoba mendapatkan embrio somatik dengan beberapa modifikasi perlakuan. Eksplan yang digunakan tidak hanya biji tetapi juga daun. Harapannya dengan menggunakan daun, maka penyediaan eksplan tidak tergantung pada ketersediaan buah manggis. Hasil penelitian ini menunjukkan pertumbuhan kalus lebih cepat dibandingkan penelitian sebelumnya, begitu pula pertumbuhan kalus embriogenik sel dalam medium cair. Pada penelitian ini, pertumbuhan kalus embriogenik sel dalam medium cair lambat.

diperoleh dari penelitian ini. Inkubasi masih terus dilakukan untuk mendapatkan struktur kotiledon dan embrio somatik. Kalus dari eksplan daun juga tetap disubkultur untuk menginduksi kalus yang remah sebagai salah satu ciri kalus embriogenik.

Apabila embrio somatik telah diperoleh, maka penelitian lanjutan yang akan dilakukan adalah:

1. Analisis keragaman genetik antara plantlet dari embrio somatik
2. Optimasi pertumbuhan plantlet dari embrio somatik dan aklimatisasi plantlet
3. Optimasi pertumbuhan plantlet di lapangan
4. Perakitan biji buatan dari embrio somatik dengan menggunakan natrium alginat

Secara ringkas peta jalan penelitian manggis *in vitro* dapat dilihat pada bagan berikut:



Tujuan Khusus

Penelitian ini secara khusus bertujuan untuk menghasilkan embrio somatik manggis dengan menggunakan teknik kultur *in vitro*. Teknik produksi embrio somatik tersebut diharapkan akan menjadi alternatif penyediaan bahan tanam yang lebih baik, lebih banyak, lebih cepat dan lebih murah.

dengan teknik konvensional menggunakan biji. Embrio somatik yang diperoleh selanjutnya dapat digunakan untuk memproduksi biji buatan yang secara praktis dapat dimanfaatkan untuk penyediaan bahan tanam ke lokasi yang berjauhan dari tempat produksinya.

Penelitian ini juga akan menguji keragaman genetik antara embrio somatik manggis yang diperoleh. Informasi keragaman somaklonal yang diperoleh diharapkan dapat digunakan untuk seleksi tanaman manggis dengan sifat yang lebih baik.

Manfaat Kegiatan

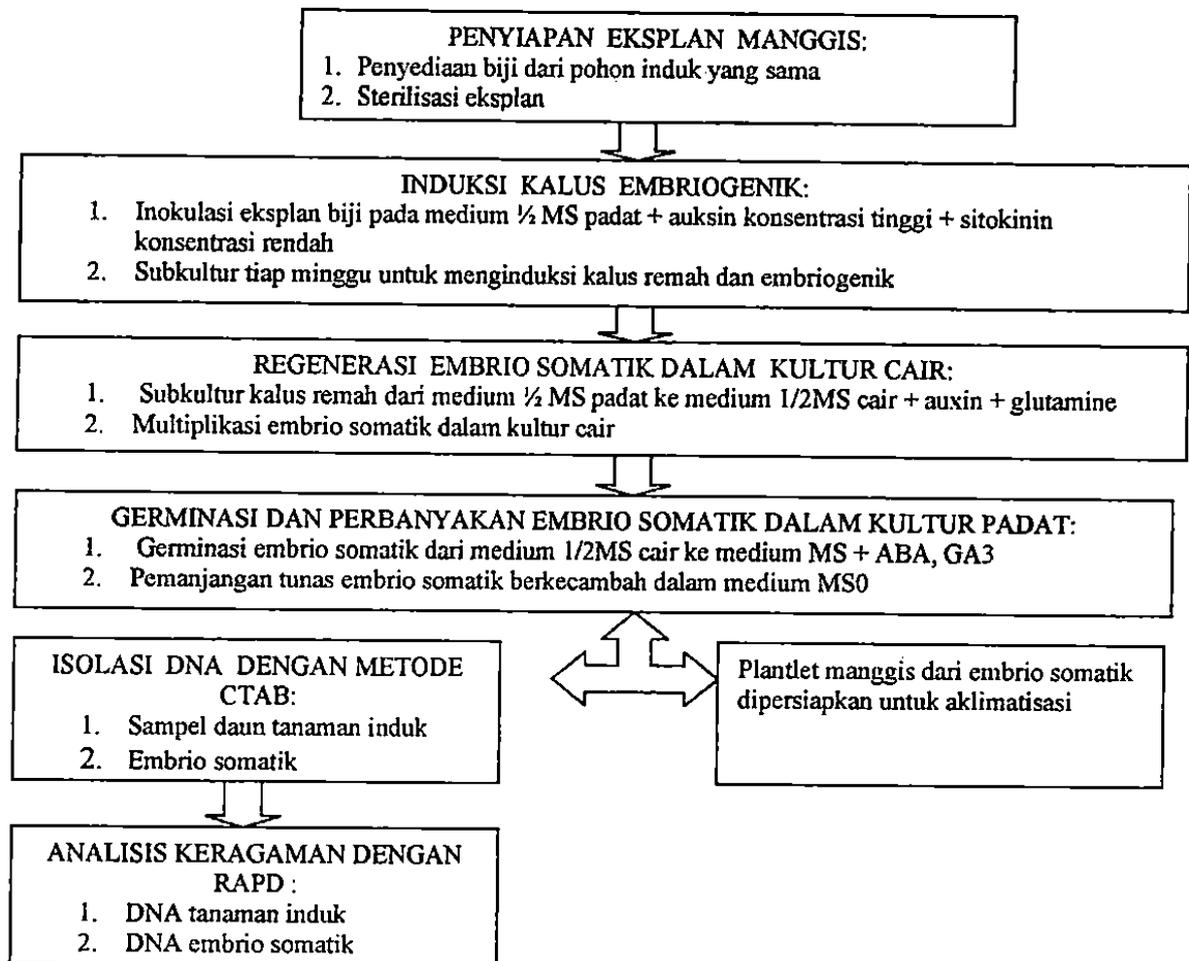
Penelitian ini akan mempunyai pengaruh sangat penting, baik dari segi aplikasi praktis maupun ilmiah, karena penelitian akan diarahkan untuk menghasilkan bahan tanam yang lebih banyak, lebih cepat dan kesamaan genetik dengan induknya dapat diketahui dibanding dengan penyediaan bahan tanam secara konvensional. Buah manggis diketahui hanya menghasilkan biji layak tanam 1-2 biji per buah dan buah tidak tersedia sepanjang tahun. Dengan menggunakan teknik perbanyakan *in vitro*, maka diharapkan penyediaan bahan tanam manggis menjadi lebih mudah dan tersedia sepanjang tahun. Bahan tanam yang tersedia dengan mudah dapat digunakan untuk pengembangan penanaman manggis dalam skala perkebunan sehingga diperoleh buah dengan kualitas seragam dan untuk memenuhi pasar dalam maupun luar negeri baik dalam bentuk buah segar atau olahan sebagai produk kesehatan. Embrio somatik yang dihasilkan dari kultur *in vitro* lebih efisien dibandingkan plantlet yang diperoleh dari organogenesis, karena embrio somatik sudah memiliki primordia tunas dan akar sekaligus dibanding plantlet dari organogenesis yang memerlukan tahap induksi tunas dan induksi akar dalam yang berbeda.

Pendugaan keragaman genetik antar embrio somatik dengan penanda RAPD yang diperoleh dalam penelitian ini mempunyai implikasi yang sangat penting. Manggis diketahui memiliki keragaman genetik yang sangat rendah sehingga keragaman somaklonal yang diperoleh dari penelitian ini dapat digunakan untuk seleksi tanaman manggis dengan sifat yang lebih baik.

Selain penting dari sisi penerapan, penelitian ini juga berkontribusi dalam pengembangan ilmu. Penelitian ini akan memberikan sumbangan penting terhadap pemahaman kultur *in vitro* manggis, variasi somaklonal dalam kultur *in vitro* dan metode embriogenesis somatik yang diperoleh dapat dijadikan acuan

IV. METODE PENELITIAN

Metode yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas beberapa tahapan yang dikerjakan selama dua tahun. Kegiatan penelitian pada tahun pertama meliputi : (1) Induksi kalus embriogenik manggis dari eksplan biji, (2) Regenerasi embrio somatik dalam kultur cair, (3) Germinasi dan perbanyakkan embrio somatik dalam kultur padat. Kegiatan penelitian pada tahun kedua meliputi : (4) Isolasi DNA dari tanaman induk dan embrio somatik (5) Analisis keragaman genetik antara tanaman induk dan embrio somatik dengan menggunakan penanda genetik RAPD. Tahapan penelitian seperti tersaji pada gambar 1.



Gambar 1. Tahapan Produksi Embrio Somatik Manggis dan Analisis Keragaman Genetik dengan RAPD

1. Induksi Kalus Embriogenik Manggis dari Eksplan Biji

Eksplan biji manggis diperoleh dengan memisahkan biji dari buah manggis yang berasal dari pohon yang sama. Buah manggis yang dipilih varietas Kaligesing, Purworejo, Jawa Tengah. Sterilisasi biji dilakukan dengan menggunakan deterjen, fungisida benomyl, 10 % dan 5 % chlorox® (sodium hypochlorite 5.25 %) (Rineksane, 2011). Biji yang telah steril dibuang bagian terluarnya dan dipotong menjadi empat. Setiap potongan ditanam pada medium perlakuan.

Medium yang digunakan adalah $\frac{1}{2}$ MS padat dengan penambahan Thidiazuron (0,1; 0,5 dan 1 mg/L) dan 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (4, 6, 8 dan 10 mg/L), dan ke dalam setiap medium ditambah 500 mg/L glutamin. Total perlakuan adalah 12, setiap perlakuan diulang 5 kali. Percobaan dirancang menggunakan rancangan acak lengkap faktor tunggal. Parameter yang diamati meliputi saat tumbuh kalus, diameter kalus, persentase kalus browning dan tekstur kalus.

2. Induksi Kalus Embriogenik Manggis dari Eksplan Daun

Persiapan dan sterilisasi biji yang digunakan dalam percobaan ini sama seperti pada percobaan menggunakan eksplan biji, tetapi biji tidak dipotong. Biji yang telah steril ditanam pada MS0 padat dan diinkubasi selama 1 bulan. Daun berwarna merah yang tumbuh dari biji tersebut digunakan sebagai eksplan. Daun dipisahkan dari induknya, dipotong berukuran 1x1 cm dengan menyertakan tulang daun dan ditanam pada medium perlakuan.

Medium yang digunakan adalah $\frac{1}{2}$ MS padat dengan penambahan Thidiazuron (0,1; 0,5 dan 1 mg/L) dan 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (0, 5, 10 dan 20 mg/L), dan ke dalam setiap medium ditambah 500 mg/L glutamin. Total perlakuan adalah 12, setiap perlakuan diulang 5 kali. Percobaan dirancang menggunakan rancangan acak lengkap faktor tunggal. Parameter yang diamati

3. Regenerasi embrio somatik dalam kultur cair

Regenerasi kalus embriogenik dari kultur padat ke kultur cair dilakukan melalui dua eksperimen. Eksperimen 1 : Kalus embriogenik seberat 1 g dari medium MS padat disubkultur dalam medium $\frac{1}{2}$ MS0 cair. Kultur cair tersebut diinkubasi di atas shaker dengan kecepatan 125 rpm. Eksperimen 2 : Kalus embriogenik seberat 1 g dari medium MS padat disubkultur dalam medium $\frac{1}{2}$ MS cair yang mengandung TDZ (0, 1, 2, 4 dan 8 mg/L) dan Casein hydrolysate 500 mg/L. Modifikasi konsentrasi sitokinin TDZ dan penambahan senyawa N organik Casein hydrolysate dilakukan untuk meningkatkan persentase embrio somatik yang dihasilkan. Subkultur dan penggantian medium cair dilakukan setiap 4 minggu untuk meregenerasi kalus embriogenik menjadi fase globular, heart, torpedo dan embrio somatik. Pengamatan kultur cair di bawah mikroskop dilakukan setiap 4 minggu untuk mengetahui perkembangan fase embrio.

V. URAIAN PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Induksi Kalus Embriogenik dari Eksplan Biji Manggis

Kalus manggis tumbuh pada eksplan biji manggis mulai 1 minggu setelah tanam, ditunjukkan oleh bentukan baru berwarna putih kekuningan. Sampai empat minggu setelah tanam, kalus masih bertekstur padat yang menandakan ciri kalus non embriogenik. Kalus mempunyai tekstur remah pada saat pengamatan 2 minggu dan 8 minggu setelah subkultur (Tabel 1). Subkultur kalus dilakukan agar kalus memiliki tekstur yang remah sebagaimana dinyatakan oleh Te-chato *et al.* (1995a). Kalus padat dapat diinduksi menjadi kalus embriogenik dengan tekstur remah melalui subkultur atau pemindahan kalus ke medium baru yang mengandung zat pengatur tumbuh yang sama dengan medium asalnya. Razdan (2003) juga menyatakan bahwa subkultur berulang dapat menyebabkan kalus menjadi remah yang mencirikan embriogenik.

Berdasar hasil analisis yang reratanya dapat dilihat pada tabel 1, konsentrasi Thidiazuron dan 2,4-D yang diberikan dalam medium $\frac{1}{2}$ MS tidak berpengaruh terhadap skor kalus. Hal ini tidak sesuai dengan hasil penelitian Rineksane (2011) yang menyatakan bahwa penggunaan auksin akan berpengaruh nyata terhadap skor kalus. Skor kalus diukur berdasar luasan kalus yang menutupi eksplan. Parameter ini diamati untuk mengetahui pertumbuhan kalus pada tiap perlakuan. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa semua eksplan dapat membentuk kalus dengan skor kalus maksimal karena hampir semua bagian eksplan tertutupi oleh kalus. Skor kalus antar perlakuan tidak berbeda nyata karena auksin yang digunakan pada penelitian ini hanya 2,4-D yang merupakan auksin terbaik untuk induksi kalus embriogenik manggis, sebagaimana dinyatakan oleh Rineksane (2011). Sementara jenis auksin yang digunakan pada penelitian Rineksane (2011) ada empat sehingga perbedaan skor kalus dipengaruhi oleh jenis auksin yang berbeda.

Kalus mengalami browning selama masa inkubasi. Ini terjadi karena eksplan biji yang digunakan dilukai dengan menghilangkan bagian terluar dari biji. Pelukaan ini menyebabkan senyawa fenolik yang terkandung dalam biji

dan Newton, 2004). Perlakuan yang diuji secara nyata berpengaruh terhadap persentase browning kalus yang tumbuh pada eksplan pada 4 minggu setelah tanam dan 2 serta 8 minggu setelah subkultur. Persentase kalus browning terendah diperoleh eksplan yang ditanam pada 3 dan 4 minggu setelah tanam (Tabel 1). Persentase browning mengalami peningkatan pada 2 minggu setelah subkultur. Ini terjadi karena kalus mengalami pelukaan saat dipindahkan ke medium baru. Persentase browning ini menurun pada pengamatan 8 minggu setelah subkultur. Ini menunjukkan kalus telah beradaptasi dan menyerap senyawa dalam medium untuk pertumbuhan.

Tabel 1. Pengaruh Konsentrasi Thidiazuron dan 2,4-D dalam ½ MS terhadap Pertumbuhan Kalus dari Eksplan Biji pada Minggu ke-4 Setelah Tanam, Minggu ke-2 dan ke-8 Setelah Subkultur

Perlakuan	4 Minggu Setelah Tanam			2 Minggu Subkultur			8 Minggu Subkultur		
	Skor kalus	Persentase browning (%)	Tekstur Kalus	Diameter kalus (cm)	Persentase browning (%)	Tekstur Kalus	Diameter kalus (cm)	Persentase browning (%)	Tekstur Kalus
1	5 a	5,83 b	Padat	3,52 ab	25 ab	Remah	4,42 a	1 b	Remah
2	5 a	15 ab	Padat	4,98 a	21 ab	Remah	7,52 a	1 b	Remah
3	5 a	3,33 b	Padat	3,9 ab	46,67 ab	Remah	5,2 a	35 ab	Remah
4	4,6 a	9 ab	Padat	2,76 b	54 ab	Remah	3,44 a	50 a	Remah
5	4,5 a	5 b	Padat	4,38 ab	27 ab	Remah	6,1 a	9,17 ab	Remah
6	4,8 a	5 b	Padat	3,8 ab	9 b	Remah	5,46 a	1 b	Remah
7	5 a	5,83 b	Padat	3,85 ab	37,5 ab	Remah	5,23 a	24,17 ab	Remah
8	5 a	13,33 ab	Padat	3,83 ab	41,67 ab	Remah	5,28 a	18 ab	Remah
9	5 a	15,83 ab	Padat	4,9 ab	8,33 b	Remah	6,91 a	0,83 b	Remah
10	4,6 a	9 ab	Padat	4,2 ab	31 ab	Remah	5,62 a	24 ab	Remah
11	5 a	17,5 ab	Padat	3,8 ab	26,25 ab	Remah	5,87 a	1,25 b	Remah
12	5 a	20,83 a	Padat	2,96 ab	55 a	Remah	4,42 a	36 ab	Remah

Keterangan :

Perlakuan yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf $\alpha = 5\%$

Perlakuan 1 : TDZ 0,1 mg/L + 2,4-D 4 mg/L

2 : TDZ 0,1 mg/L + 2,4-D 6 mg/L

3 : TDZ 0,1 mg/L + 2,4-D 8 mg/L

4 : TDZ 0,1 mg/L + 2,4-D 10 mg/L

5 : TDZ 0,5 mg/L + 2,4-D 4 mg/L

6 : TDZ 0,5 mg/L + 2,4-D 6 mg/L

7 : TDZ 0,5 mg/L + 2,4-D 8 mg/L

8 : TDZ 0,5 mg/L + 2,4-D 10 mg/L

9 : TDZ 1 mg/L + 2,4-D 4 mg/L

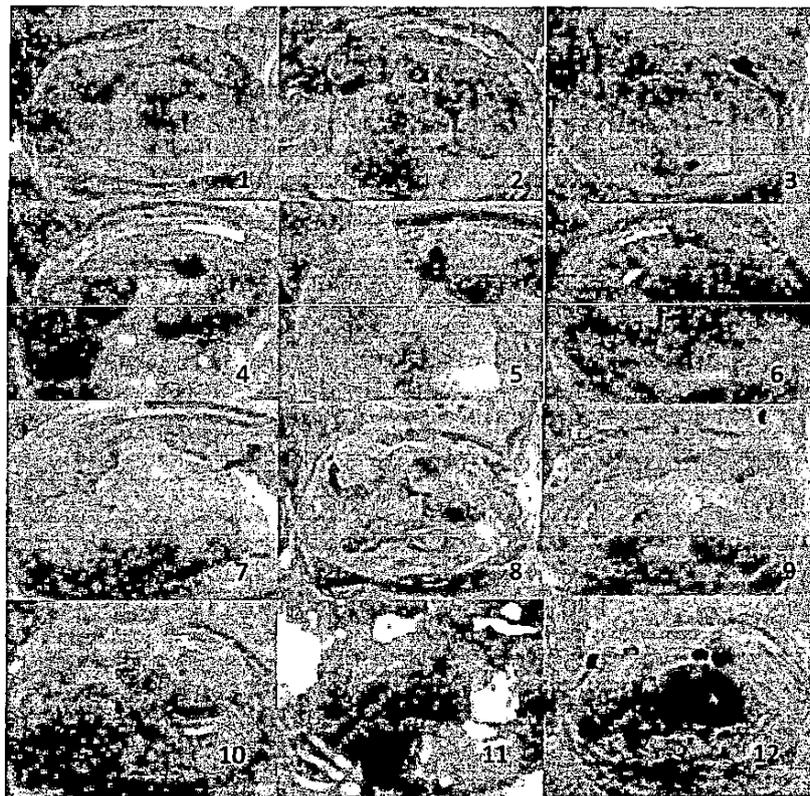
10 : TDZ 1 mg/L + 2,4-D 6 mg/L

11 : TDZ 1 mg/L + 2,4-D 8 mg/L

12 : TDZ 1 mg/L + 2,4-D 10 mg/L

Kalus yang disubkultur selama 8 minggu mengalami pertumbuhan yang signifikan (Gambar 2) ditunjukkan oleh diameter kalus yang bertambah rata-rata dua kali lipat jika dibandingkan pertumbuhan kalus pada minggu ke-2 setelah

subkultur. Ini berarti Thidiazuron dan 2,4-D yang digunakan dalam penelitian ini dapat mendorong pertumbuhan kalus. George (1993) menyatakan bahwa kombinasi sitokinin dan auksin merangsang pembelahan sel dan morfogenesis sel dalam kultur *in vitro*. Selain itu penambahan glutamin ke dalam medium juga berpengaruh terhadap keremahan kalus, hal ini sesuai dengan pernyataan George (1993). Kalus yang diperoleh menunjukkan ciri embriogenik yaitu tekstur yang remah dan warna kekuningan sebagaimana dilaporkan oleh Nanda dan Rout (2003). Di antara perlakuan yang diujikan, medium $\frac{1}{2}$ MS dengan penambahan TDZ 0,1 mg/L + 2,4-D 6 mg/L memberikan pertumbuhan kalus terbaik ditunjukkan oleh diameter kalus terbesar (7,52 cm) dan persentase browning terendah (1. %). Kalus yang diperoleh pada perlakuan tersebut mencirikan kalus embriogenik ditunjukkan oleh tekstur kalus remah dan warna kekuningan (Te-chato *et al.*, 1995a).



Gambar 2. Pertumbuhan kalus manggis dari eksplan biji setelah disubkultur pada minggu ke-8

Selain itu persentase kalus browning menurun jika dibandingkan dengan kalus yang tumbuh pada minggu ke-2 setelah subkultur. Pada akhir tahapan penelitian, kalus remah ini akan disubkultur ke medium cair untuk menginduksi embrio somatik.

2. Induksi Kalus Embriogenik dari Eksplan Daun Manggis

Pertumbuhan kalus pada eksplan daun lebih lambat jika dibandingkan pada eksplan biji. Kalus manggis mulai tumbuh pada eksplan daun 2 minggu setelah tanam, diawali dengan permukaan daun yang melengkung atau bergelombang sebagai respon eksplan menyerap air dan unsur hara serta zat pengatur tumbuh yang terdapat dalam medium tanam. Perlakuan yang diujikan berpengaruh secara nyata terhadap saat tumbuh kalus. Kalus paling cepat tumbuh pada eksplan yang ditanam dalam medium $\frac{1}{2}$ MS + 0,5 mg/L TDZ + 10 mg/L 2,4-D tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan medium $\frac{1}{2}$ MS + 0,5 mg/L TDZ + 0 mg/L 2,4-D ; $\frac{1}{2}$ MS + 1 mg/L TDZ + 0 mg/L 2,4-D ; $\frac{1}{2}$ MS + 0,5 mg/L TDZ + 5 mg/L 2,4-D ; $\frac{1}{2}$ MS + 1 mg/L TDZ + 5 mg/L 2,4-D ; $\frac{1}{2}$ MS + 0,1 mg/L TDZ + 20 mg/L 2,4-D ; $\frac{1}{2}$ MS + 1 mg/L TDZ + 20 mg/L 2,4-D. Eksplan yang ditumbuhkan pada semua perlakuan, menunjukkan persentase hidup yang cukup tinggi (33 – 100%) dan persentase browning yang rendah (0 – 66,66%) (Tabel 1.10).

Tabel 2. Pengaruh Konsentrasi 2,4-D dan Thidiazuron dalam Medium $\frac{1}{2}$ MS terhadap Pertumbuhan Kalus dari Eksplan Daun pada Minggu ke-8 Setelah Tanam

Perlakuan	Persentase Browning (%)	Persentase Eksplan Hidup (%)	Saat Tumbuh Kalus (hari)
A	0	100	24,67 a
B	0	100	16,00 bc
C	0	100	16,50 bc
D	0	100	17,00 b
E	0	100	15,00 bc
F	66,67	33,33	15,67 bc
G	0	100	14,00 bc
H	0	66,67	13,33 c
I	66,67	33,33	22,67 a
J	0	100	14,75 bc
K	33,33	66,67	17,20 b
L	66,67	33,33	13,75 bc

Keterangan :

Perlakuan yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf $\alpha = 5\%$

Perlakuan A : TDZ 0,1 mg/L + 2,4-D 0 mg/L
 B : TDZ 0,1 mg/L + 2,4-D 5 mg/L
 C : TDZ 0,1 mg/L + 2,4-D 10 mg/L
 D : TDZ 0,1 mg/L + 2,4-D 20 mg/L
 E : TDZ 0,5 mg/L + 2,4-D 0 mg/L
 F : TDZ 0,5 mg/L + 2,4-D 5 mg/L
 G : TDZ 0,5 mg/L + 2,4-D 10 mg/L
 H : TDZ 0,5 mg/L + 2,4-D 20 mg/L
 I : TDZ 1 mg/L + 2,4-D 0 mg/L
 J : TDZ 1 mg/L + 2,4-D 5 mg/L
 K : TDZ 1 mg/L + 2,4-D 10 mg/L
 L : TDZ 1 mg/L + 2,4-D 20 mg/L

Konsentrasi Thidiazuron dan 2,4-D yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda terhadap pertumbuhan kalus pada daun manggis. Berdasarkan hasil analisis yang reratanya dapat dilihat pada tabel 3, konsentrasi Thidiazuron dan 2,4-D yang diberikan dalam medium $\frac{1}{2}$ MS berpengaruh terhadap persentase kalus dan luas kalus. Persentase kalus tertinggi (76,67 %) diperoleh pada medium $\frac{1}{2}$ MS + 0,1 mg/L TDZ + 20 mg/L 2,4-D, tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan medium $\frac{1}{2}$ MS + 0,1 mg/L TDZ + 0 mg/L 2,4-D ; $\frac{1}{2}$ MS + 0,5 mg/L TDZ + 0 mg/L 2,4-D ; $\frac{1}{2}$ MS + 1 mg/L TDZ + 0 mg/L 2,4-D ; $\frac{1}{2}$ MS + 0,1 mg/L TDZ + 5 mg/L 2,4-D ; $\frac{1}{2}$ MS + 0,5 mg/L TDZ + 5 mg/L 2,4-D ; $\frac{1}{2}$ MS + 0,1 mg/L TDZ + 10 mg/L 2,4-D ; $\frac{1}{2}$ MS + 0,5 mg/L TDZ + 10 mg/L 2,4-D. Perlakuan medium $\frac{1}{2}$ MS + 0,1 mg/L TDZ + 20 mg/L 2,4-D juga menunjukkan luas kalus tertinggi (14,33) dan tidak berbeda nyata dengan $\frac{1}{2}$ MS + 0,1 mg/L TDZ + 0 mg/L 2,4-D ; $\frac{1}{2}$ MS + 0,5 mg/L TDZ + 0 mg/L 2,4-D ; $\frac{1}{2}$ MS + 1 mg/L TDZ + 0 mg/L 2,4-D ; $\frac{1}{2}$ MS + 0,1 mg/L TDZ + 5 mg/L 2,4-D ; $\frac{1}{2}$ MS + 0,5 mg/L TDZ + 5 mg/L 2,4-D ; $\frac{1}{2}$ MS + 0,1 mg/L TDZ + 10 mg/L 2,4-D ; $\frac{1}{2}$ MS + 0,5 mg/L TDZ + 10 mg/L 2,4-D.

+ 1 mg/L TDZ + 0 mg/L 2,4-D ; ½ MS + 0,1 mg/L TDZ + 5 mg/L 2,4-D ; ½ MS + 0,5 mg/L TDZ + 5 mg/L 2,4-D ; ½ MS + 0,1 mg/L TDZ + 10 mg/L 2,4-D ; ½ MS + 0,5 mg/L TDZ + 10 mg/L 2,4-D ; ½ MS + 0,5 mg/L TDZ + 20 mg/L 2,4-D ; ½ MS + 1 mg/L TDZ + 20 mg/L 2,4-D.

Semua perlakuan yang diujikan dapat menginduksi kalus manggis dengan tekstur padat. Kalus padat dapat diinduksi menjadi kalus embriogenik dengan tekstur remah melalui subkultur atau pemindahan kalus ke medium baru yang mengandung zat pengatur tumbuh yang sama dengan medium asalnya.

Diantara perlakuan yang diujikan, medium ½ MS + 0,1 mg/L TDZ + 20 mg/L 2,4-D memberikan pertumbuhan kalus terbaik sebagaimana ditunjukkan oleh parameter persentase browning, persentase eksplan hidup, saat tumbuh kalus, persentase kalus dan luas kalus.

Tabel 3. Pengaruh Konsentrasi 2,4-D dan Thidiazuron dalam Medium ½ MS terhadap Pertumbuhan Kalus dari Eksplan Daun pada Minggu ke-8 Setelah Tanam

Perlakuan	Persentase Kalus (%)	Luas Kalus (mm ²)	Tekstur Kalus
A	51 abc	11 ab	Padat
B	61,67 abc	11,33 ab	Padat
C	63 abc	13,67 a	Padat
D	65,67 ab	14,67 a	Padat
E	53 abc	13,67 a	Padat
F	8,33 de	4,67 b	Padat
G	62 abc	11,67 ab	Padat
H	45,5 abcd	9,5 ab	Padat
I	3,67 e	3,67 b	Padat
J	76,67 a	14,33 a	Padat
K	32,67 bcde	8,67 ab	Padat
L	25,50 cde	8 ab	Padat

Keterangan :

Perlakuan yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf $\alpha = 5\%$

Perlakuan A : TDZ 0,1 mg/L + 2,4-D 0 mg/L

B : TDZ 0,1 mg/L + 2,4-D 5 mg/L

C : TDZ 0,1 mg/L + 2,4-D 10 mg/L

D : TDZ 0,1 mg/L + 2,4-D 20 mg/L

E : TDZ 0,5 mg/L + 2,4-D 0 mg/L

G : TDZ 0,5 mg/L + 2,4-D 10 mg/L

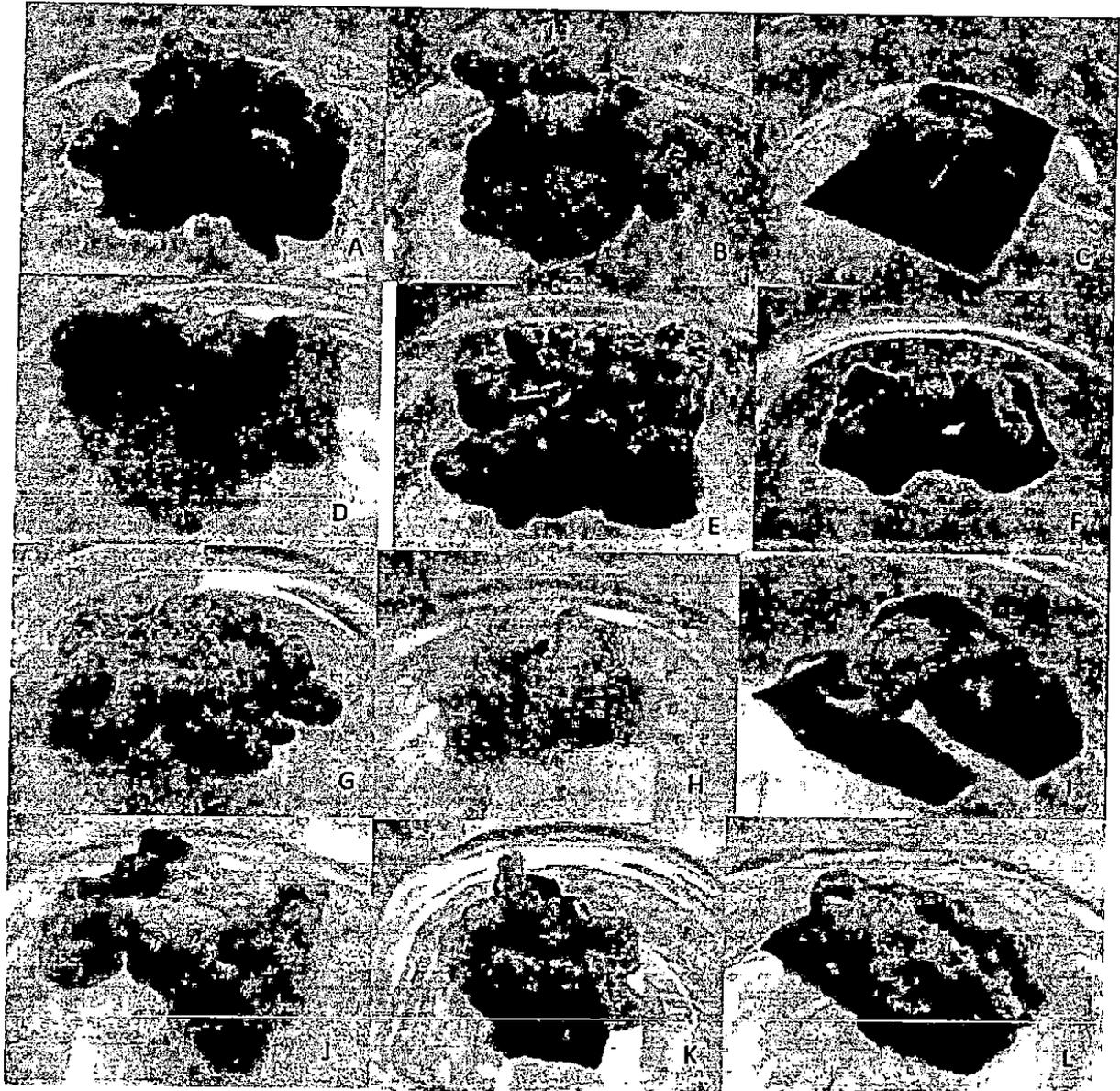
H : TDZ 0,5 mg/L + 2,4-D 20 mg/L

I : TDZ 1 mg/L + 2,4-D 0 mg/L

J : TDZ 1 mg/L + 2,4-D 5 mg/L

K : TDZ 1 mg/L + 2,4-D 10 mg/L

Berdasarkan bentuk dan tekstur kalus dari eksplan daun setelah 4 minggu subkultur, penambahan Thidiazuron tanpa 2,4-D ke dalam medium $\frac{1}{2}$ MS menunjukkan pertumbuhan kalus yang berbeda jika dibandingkan dengan medium yang mengandung 2,4-D (Gambar 3). Kalus yang dihasilkan dari medium tanpa 2,4-D menunjukkan tekstur padat, warna kehijauan dan membentuk struktur bulat bahkan tumbuh menjadi tunas. Sementara kalus yang ditumbuhkan pada medium yang mengandung kombinasi 2,4-D dan Thidiazuron menunjukkan tekstur yang padat, struktur melebar dan berwarna kekuningan. Kalus belum menunjukkan



Gambar 3. Pertumbuhan Kalus Manggis pada Daun setelah Subkultur 4 minggu

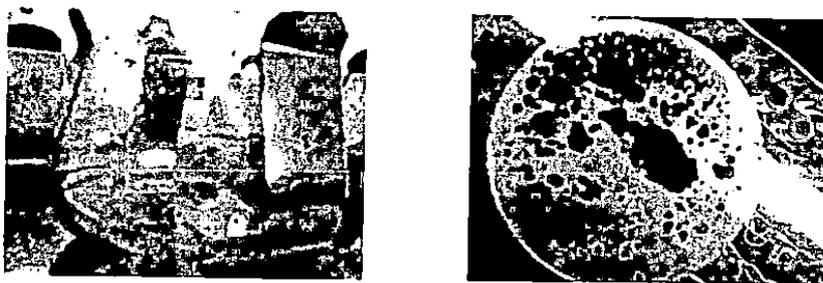
3. Regenerasi Embrio Somatik dalam Kultur Cair

Kalus yang diperoleh dari eksplan biji yang ditanam pada medium padat disubkultur agar kalus memiliki sifat embriogenik yang ditunjukkan oleh tekstur kalus remah, mudah dipisahkan dan berwarna putih kekuningan. Kalus embriogenik hasil subkultur satu kali tersebut kemudian digunakan sebagai eksplan dalam kultur medium cair. Kalus embriogenik sebanyak 1 gram ditidur

dari medium padat dan disubkultur ke medium cair sesuai perlakuan, dan diinkubasi di atas *shaker* dengan kecepatan 125 rpm. Medium cair digunakan karena tahap pembentukan embrio somatik manggis diharapkan terjadi secara tidak langsung melalui kultur suspensi sel. Kultur suspensi sel didefinisikan sebagai pertumbuhan sel tunggal atau sekumpulan sel dalam medium cair (Gamborg dan Phillips, 1995). Kultur suspensi dari kalus remah dapat digunakan untuk menginduksi embrio somatik (Dodds dan Roberts, 1982; Razdan, 2005) pada medium dengan kandungan senyawa yang sesuai.

Sel-sel tunggal akan diperoleh dalam kultur cair karena gerakan *shaker* dapat memisahkan sel dari kalus embriogenik. Sel-sel tersebut kemudian karena adanya auksin, sitokinin bahkan senyawa nitrogen, akan membelah dan apabila terjadi proses embryogenesis, maka dari pembelahan dan diferensiasi sel-sel tersebut akan terbentuk struktur embriosomatik yang meliputi struktur globular, heart, torpedo dan kotiledon.

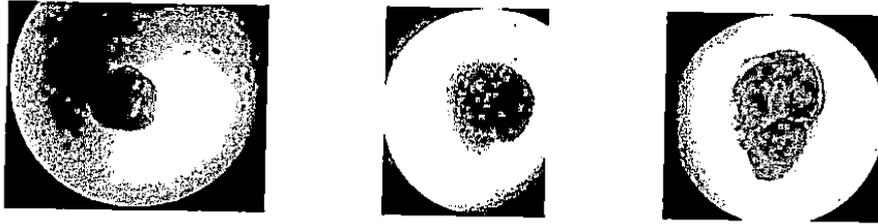
Kultur cair dalam penelitian ini diinkubasi selama 8 minggu. Berdasar hasil penelitian, semua kalus dari medium yang berbeda pada kultur padat, setelah disubkultur ke medium $\frac{1}{2}$ MS0 cair mampu membentuk suspensi sel. Hasil pengamatan visual menunjukkan bahwa sel-sel terpisah dari eksplan kalus dan terdispersi dalam medium cair menjadi kultur suspensi (Gambar 4). Kemudian dilakukan pengamatan di bawah mikroskop terhadap sampel yang diambil dari kultur suspensi, untuk mengamati struktur-struktur embrio yang terbentuk.



Gambar 4. Kultur Suspensi Sel Setelah Inkubasi Selama 6 Minggu

Berdasar pengamatan dari kultur suspensi dalam medium $\frac{1}{2}$ MS0 cair,

torpedo (Gambar 5). Struktur kotiledon belum diperoleh, diduga karena pembentukan struktur kotiledon memerlukan waktu inkubasi yang lebih lama. Oleh karena itu kultur suspensi tersebut masih diinkubasi untuk menginduksi terbentuknya struktur kotiledon sebagai tahap akhir dari proses embriogenesis.



Gambar 5. Struktur embrio somatik yang diperoleh setelah inkubasi suspensi sel manggis dalam medium $\frac{1}{2}$ MS0 selama 8 minggu

Selain menggunakan medium $\frac{1}{2}$ MS0, kalus embriogenik yang telah dihomogenkan dalam medium $\frac{1}{2}$ MS0 selama 2 minggu juga disubkultur ke medium cair dengan perlakuan penambahan TDZ (0, 1, 2, 4 dan 8 mg/L) dan Casein hydrolysate 500 mg/L. Kultur tersebut juga dapat membentuk suspensi sel, namun struktur embrio somatik belum terbentuk. Selain karena waktu inkubasi yang kurang lama yaitu 6 minggu, penambahan TDZ ke dalam medium regenerasi diduga menyebabkan penghambatan terhadap pembentukan struktur embrio. Sebaliknya kalus yang disubkultur ke dalam medium $\frac{1}{2}$ MS0 cair sudah membentuk struktur embrio dalam waktu 8 minggu karena kalus sudah mengandung zat pengatur tumbuh endogen yang diperoleh dari medium kultur padat. Hal ini terbukti bahwa struktur embrio yang diperoleh pada penelitian ini berasal dari suspensi sel yang diperoleh dari kalus yang sebelumnya ditumbuhkan pada medium $\frac{1}{2}$ MS padat yang mengandung 20 mg/L 2,4-D dan 1 mg/L TDZ.

Pembentukan suspensi dari kalus remah pada penelitian ini yang terbentuk setelah 8 minggu lebih cepat jika dibandingkan dengan hasil penelitian Rineksane

(2011) yang menyatakan bahwa pembentukan struktur embrio somatik

VI. URAIAN HASIL DAN KEBARUAN DALAM BIDANG PENELITIAN

1. Induksi Kalus Embriogenik dari Eksplan Biji Manggis

Kalus adalah sekumpulan sel yang terus membelah dan belum mengalami diferensiasi menjadi organ. Kalus terbentuk karena adanya auksin dalam medium yang mendorong terjadinya pembelahan dan pemanjangan sel serta sitokinin yang menginduksi pembelahan sel. Kalus dapat diinduksi menjadi organ daun, akar bahkan embrio somatik. Penelitian ini bertujuan mendapatkan kalus yang akan diinduksi menjadi embrio somatik. Oleh karena itu kalus yang diharapkan adalah kalus yang bersifat embriogenik. Kalus embriogenik dicirikan oleh kalus yang remah atau sel-sel nya mudah dipisahkan dan berwarna putih kekuningan.

Pada penelitian ini kalus diperoleh dari eksplan potongan biji manggis yang diinokulasi pada medium $\frac{1}{2}$ MS padat yang mengandung auksin 2,4-D dan sitokinin Thidiazuron. Kalus yang diperoleh bertekstur kompak atau padat dan berwarna putih kekuningan. Ini menunjukkan kalus belum embriogenik. Kalus menjadi embriogenik dengan tekstur remah setelah disubkultur ke medium baru dengan kandungan zat pengatur tumbuh yang sama dengan medium sebelumnya.

Kebaruan yang diperoleh dari tahap ini adalah : 1) Jumlah kalus yang diperoleh lebih banyak empat kali lipat dibandingkan dengan penelitian sebelumnya (Rineksane, 2011), karena penggunaan Thidiazuron dan medium $\frac{1}{2}$ MS untuk induksi kalus. Thidiazuron merupakan sitokinin yang paling aktif jika dibandingkan dengan BAP; 2) Waktu yang diperlukan oleh kalus untuk multiplikasi lebih cepat dibandingkan dengan penelitian sebelumnya; 3) Kalus cepat *recovery* dari pencoklatan karena pemotongan saat subkultur dan 4) Kalus yang sudah disubkultur menunjukkan karakteristik embriogenik dalam waktu

2. Induksi Kalus Embriogenik dari Eksplan Daun Manggis

Kalus embriogenik manggis juga diinduksi dari eksplan daun manggis steril. Biji manggis ditumbuhkan secara *in vitro*, kemudian daun dari bibit tersebut digunakan sebagai eksplan. Daun dipotong berukuran 1 x 1 cm dengan menyertakan tulang daun. Kalus embriogenik yang diperoleh dari daun diharapkan mengandung materi genetik yang sama dengan induknya karena daun merupakan organ vegetatif. Dengan demikian, embrio somatik yang diperoleh dari eksplan daun bersifat *true to type* terhadap induknya. Kalus berhasil diinduksi dari eksplan potongan daun, namun tekstur kalus yang diperoleh belum menunjukkan ciri kalus embriogenik. Kalus masih bertekstur padat. Kalus dari daun ini masih diinkubasi setelah disubkultur ke medium yang sama untuk mendorong terbentuknya tekstur kalus yang remah dan sel-selnya mudah dipisahkan.

Kebaruan yang diperoleh pada tahap ini adalah : 1) Jumlah kalus yang diperoleh pada eksplan lebih banyak dibanding penelitian sebelumnya, penggunaan 2,4-D dan Thidiazuron meningkatkan kemampuan sel daun untuk terinduksi menjadi kalus; 2) Kalus yang diperoleh bertekstur kompak, namun mencirikan kalus embriogenik dari warna kalus yang putih kekuningan.

3. Regenerasi Embrio Somatik dalam Kultur Cair

Kalus embriogenik dari eksplan potongan biji manggis yang sudah bertekstur remah dan mencirikan karakteristik embriogenik digunakan sebagai eksplan pada induksi dan regenerasi embrio somatik dalam medium cair. Sel-sel akan terlepas dari kalus remah yang diinkubasi dalam medium $\frac{1}{2}$ MS0 cair. Sel tunggal yang berada dalam kultur suspensi sel tersebut mengalami pembelahan secara simultan dan membentuk struktur embrio somatik seperti globular, heart dan torpedo. Medium cair digunakan dalam penelitian ini karena apabila sel tunggal telah diperoleh dari suspensi sel, maka regenerasi sel tersebut menjadi struktur embrio somatik lebih cepat dibandingkan regenerasi embrio somatik pada medium padat. Kemampuan regenerasi sel dalam kultur cair lebih cepat dibandingkan kultur padat karena dalam kultur cair setiap sel mempunyai akses langsung ke nutrisi dan faktor pertumbuhan yang diperlukan.

dapat menyerap unsur hara dan zat pengatur tumbuh dari medium, sehingga mendorong pertumbuhan dan regenerasi yang lebih cepat. Sebaliknya eksplan yang ditanam pada medium padat hanya menyerap unsur hara dan zat pengatur tumbuh dalam medium dari bagian eksplan yang menempel pada medium saja, sehingga kecepatan tumbuh eksplan lebih lambat dari eksplan dalam medium cair.

Kebaruan yang diperoleh pada tahap ini adalah : 1) Kecepatan multiplikasi sel yang lebih cepat dibanding penelitian sebelumnya. Pada penelitian ini, inkubasi kalus dalam medium cair selama 4 minggu sudah dapat menghasilkan kultur suspensi dengan konsentrasi tinggi, ditunjukkan oleh kepekatan dan warna kultur suspensi. Suspensi nampak pekat dengan warna kekuningan, menunjukkan konsentrasi sel yang tinggi. Penggunaan eksplan kalus embriogenik sebanyak 1 gram dalam medium cair berpengaruh terhadap kecepatan multiplikasi dan regenerasi sel manggis; 2) Kecepatan diferensiasi sel menjadi struktur embrio somatik berupa struktur globular, heart dan torpedo yang diperoleh setelah suspensi sel diinkubasi selama 6 minggu. Pada penelitian sebelumnya, diperlukan waktu 6 bulan untuk memperoleh struktur embrio somatik tersebut dan jumlahnya lebih sedikit dibandingkan yang diperoleh pada penelitian ini.

4. Penutup

Berdasar hasil penelitian ini, diperoleh metode komprehensif untuk mendapatkan kalus embriogenik manggis dan regenerasinya menjadi struktur embrio somatik. Hasil ini dapat digunakan sebagai bahan tulisan dalam bahan ajar mata kuliah teknologi bahan tanam dan kultur in vitro tanaman, sehingga ilmu yang diperoleh dapat lebih berkembang lagi dan bermanfaat untuk pengajaran kepada mahasiswa Fakultas Pertanian

VII. KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Medium $\frac{1}{2}$ MS dengan penambahan TDZ 0,1 mg/L + 2,4-D 6 mg/L memberikan pertumbuhan kalus terbaik dari eksplan biji manggis, ditunjukkan oleh parameter diameter kalus terbesar (7,52 cm) dan persentase browning terendah (1 %). Kalus yang diperoleh pada perlakuan tersebut mencirikan kalus embriogenik ditunjukkan oleh tekstur kalus remah dan warna kekuningan.

Kalus yang diperoleh dari eksplan daun belum menunjukkan struktur remah sebagaimana ditunjukkan oleh kalus yang tumbuh dari eksplan biji. Diantara perlakuan yang diujikan, $\frac{1}{2}$ MS + 0,1 mg/L TDZ + 20 mg/L 2,4-D memberikan pertumbuhan kalus terbaik sebagaimana ditunjukkan oleh parameter persentase browning (0%), persentase eksplan hidup (100%), saat tumbuh kalus (14,75 hari), persentase kalus (76,67 %) dan luas kalus (14,33 mm).

Kalus embriogenik yang disubkultur ke dalam medium $\frac{1}{2}$ MS0 cair mampu membentuk kultur suspensi sel. Struktur embrio somatik berupa globular, heart dan torpedo telah terbentuk dalam waktu 8 minggu pada suspensi sel yang diperoleh dari kalus yang sebelumnya ditumbuhkan pada medium $\frac{1}{2}$ MS padat yang mengandung 20 mg/L 2,4-D dan 1 mg/L TDZ.

Saran

Subkultur berulang pada kalus yang diperoleh dari eksplan daun perlu dilakukan dalam waktu lebih cepat seperti dua minggu sekali untuk mempercepat terbentuknya kalus remah yang mencirikan embriogenik. Medium dengan penambahan sitokinin saja tanpa auksin tidak digunakan untuk induksi kalus embriogenik pada eksplan daun manggis, karena ketiadaan auksin menyebabkan kalus yang terbentuk mengalami nekrosis.

VIII. DAFTAR PUSTAKA

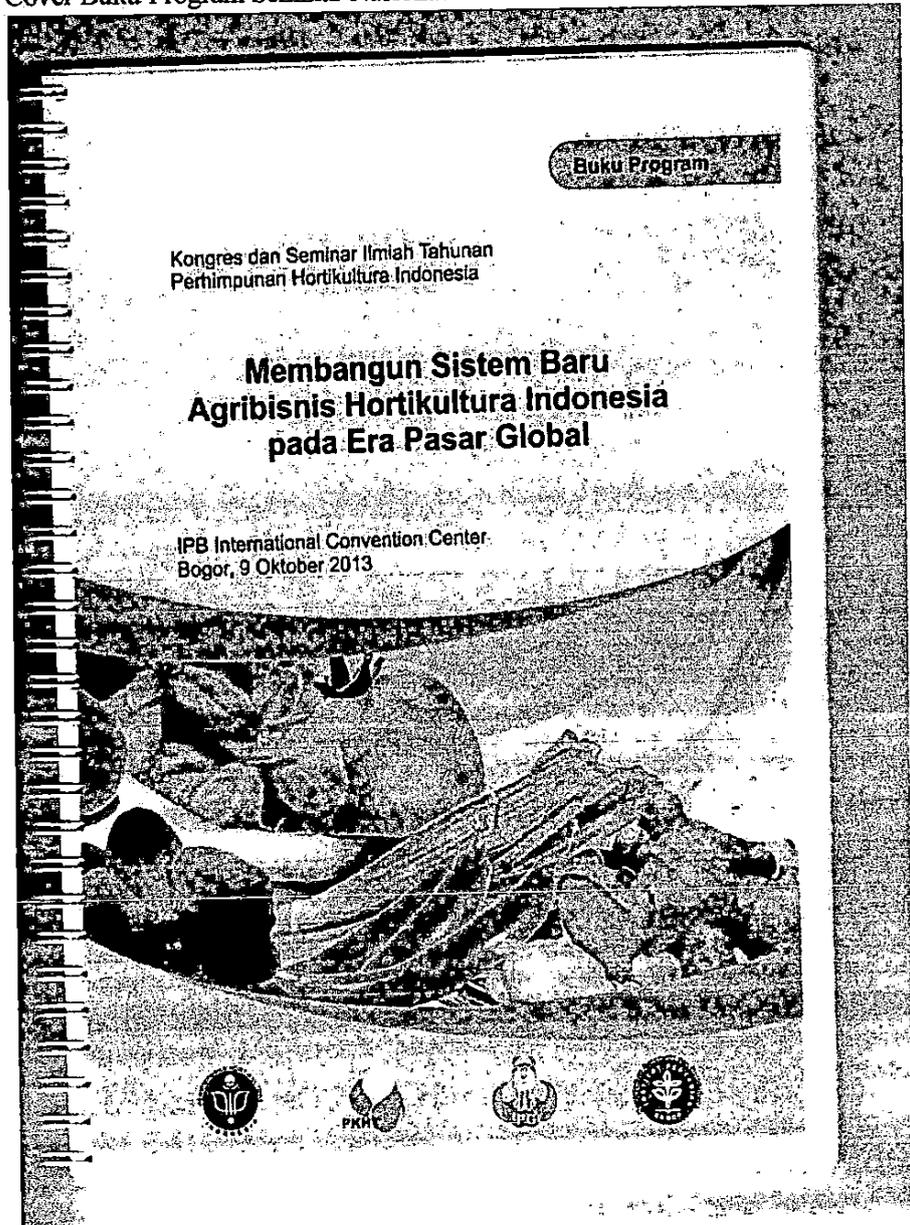
- Chin, H.F., and E.H. Roberts. 1980. *Recalcitrant Crop Seeds* Tropical Press Sdn. Bhd., Kuala Lumpur. 152p.
- Dodds, J.H., and L.W. Roberts. 1982. *Experiments in Plant Tissue Culture* Cambridge University Press, Cambridge. 178p.
- Gamborg, O.L., and G.C. Phillips. 1995. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture Fundamental Methods* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 358p
- George, E.F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture Part 1: The Technology*. 2nd edition. Exegetics Limited, England. 574p.
- Goh, C.J., P. Lakshmanan and C.S Loh. 1994. High frequency direct shoot bud regeneration from excised leaves of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *Plant Science* 101:173-180.
- Goh, H.K.L., A.N. Rao and C.S. Loh. 1990. Direct shoot bud formation from leaf explants of seedlings and mature mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) trees. *Plant Science* 68:113-121.
- Hartmann, H.T., D.E. Kester and F.T. Davies Jr. 1990. *Plant Propagation Principles and Practices*. Fifth Edition. Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey. 646 p.
- Husan, B.M. 1990. Vegetative propagation studies in mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Japan Journal of Tropical Agriculture* 34:78-83.
- Karp, A. and K.J. Edwards. 1997. DNA markers: a global overview, *In G. Caetano-Anolles and P.M. Gresshoff, eds. DNA Markers Protocols, Applications and Overviews*. Wiley-Liss, Inc. New York. 364p.
- Lakshmanan, P., S.K. Ng, C.S. Loh and C.J.Goh. 1997. Auxin, cytokinin and ethylene differentially regulate specific developmental states associated with shoot bud morphogenesis in leaf tissues of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) cultured in vitro. *Plant Cell Physiology* 38:59-64.
- Nanda, R.M. and G.R. Rout. 2003. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acacia arabica*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 73:131-135.
- Narayanaswamy, S. 1994. *Plant Cell and Tissue Culture* Tata McGraw-Hill

- Normah, M.N., A.B. Nor-Azza, and R. Aliudin. 1995. Factors affecting *in vitro* shoot proliferation and *ex vitro* establishment of mangosteen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43:291-294.
- Osman, M. and A.R. Milan. 2006. *Mangosteen-Garcinia mangostana*. Southampton Centre for Underutilised Crops. University of Southampton. Southampton, UK. 170p.
- Pedraza-Chaverri, J., N. Cardenas-Rodriguez, M. Orozco-Ibarra and J.M. Perez-Rojas. 2008. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food and Chemical Toxicology* 46:3227 – 3239.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. 344p.
- Ramage, C.M., L. Sando, C.P. Peace, B.J. Carrol and R.A. Drew. 2004. Genetic diversity revealed in the apomictic fruit species *Garcinia mangostana* L. (mangosteen). *Euphytica* 136: 1-10.
- Razdan, M.K. 2005. *Introduction to Plant Tissue Culture*. 2nd ed. Science Publishers, Inc, New Hampshire. 375p.
- Rineksane, I.A. 2011. *Embriogenesis, Organogenesis and Assessment of Somaclonal Variations in Mangosteen (Garcinia mangostana L.)*. PhD Thesis. Universiti Putra Malaysia
- Rohlf, E.J. 2000. NTSYSpc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.1. User Guide. Applied Biostatistics Inc.
- Sirchi, M.H.T., M.A. Kadir, M.A. Aziz, A.A. Rashid, A. Rafat and M.B. Javadi 2008. Plant regeneration as affected by plant growth regulators (PGR) in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *African Journal of Biotechnology*.7(15):2693-2701
- Sobir, S. Sinaga, R. Poerwanto, Rismitasari, and R. Lukman. 2009. Comparison analysis of genetic diversity of Indonesia mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) and related species by means isozymes and AFLP markers. *Biodiversitas* 10(4):163-167.
- Suksamrarn, S., O. Komutiban, P. Ratananukul, N. Chimnoi, N. Lartpornmatulee and A. Suksamrarn. 2006. Cytotoxic prenylated xanthenes from the young fruit of *Garcinia mangostana*. *Chemical Pharmacy Bulletin* 54:301-305.
- Tang, W. and R.J. Newton. 2004. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Science* 167:621-628.

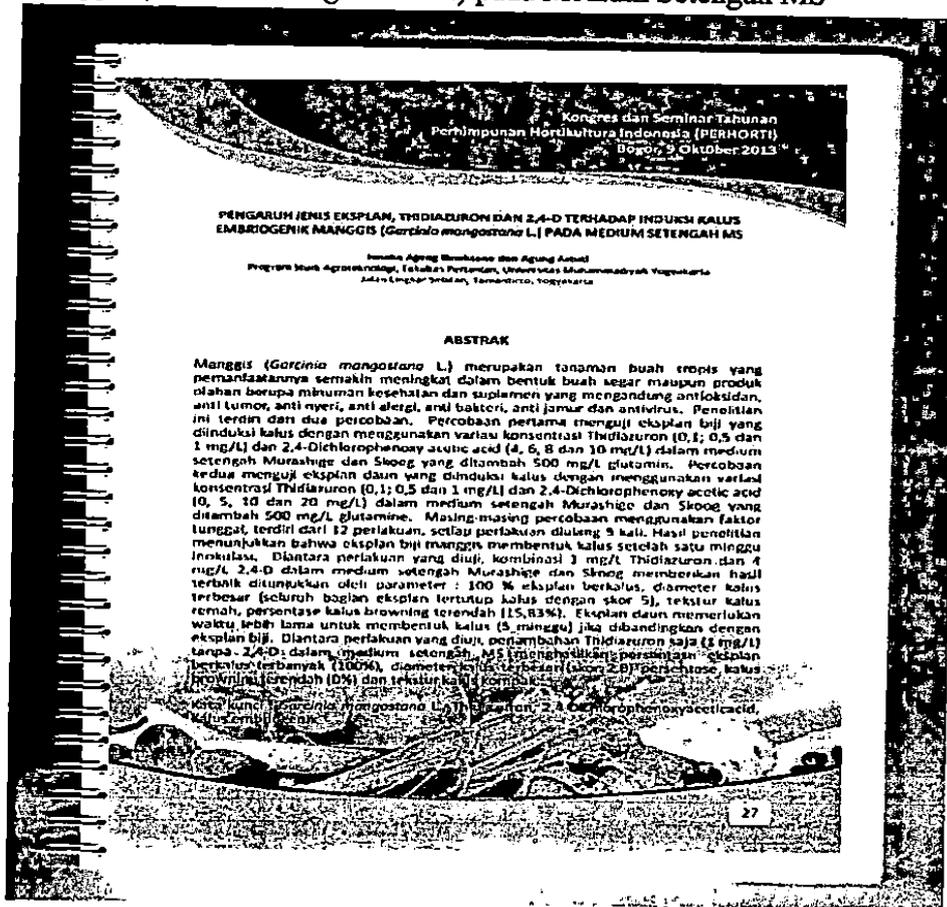
- Te-chato S, M. Lim and P. Suranilpong. 1995a. Embryogenic callus induction in mangosteen (*Garcinia mangostana* L). Songklanarin Journal of Science and Technology 17(2):115-20.
- Te-chato, S. and M. Lim. 2000. Improvement of mangosteen micropropagation through meristematic nodular callus formation from in vitro-derived leaf explants. 2000. Scientia Horticulturae 86:291-298.
- Te-chato, S., M. Lim, and P. Suranilpong. 1995b. Types of and Cytokinins in Relation with Purple Leaf and Callus Formation of Mangosteen. Songklanakarinn Journal of Science and Technology 17(2):121-127.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic

LAMPIRAN

1. Cover Buku Program Seminar Nasional Perhorti Tahun 2013



2. Abstrak Seminar Nasional Perhorti 2013, Judul artikel : Pengaruh Jenis Eksplan, Thidiazuron dan 2,4-D terhadap Induksi Kalus Embriogenik Manggis (*Garcinia mangostana* L.) pada Medium Setengah MS



3. Sertifikat Sebagai Presenter Oral pada Seminar Nasional Perhorti 2013



4. Draft Naskah Jurnal Ilmiah

Perakitan Embrio Somatik Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Secara *In Vitro*

Innaka Ageng Rineksane dan Agung Astuti
Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah
Yogyakarta
Email : rineksane@umy.ac.id

Abstract

Mangosteen is one of the most delicious tropical fruits which has an increasing demand due to its wide range of uses. It is used for its medicinal properties such as an antioxidant, antitumoral, anti-inflammatory, anti-allergy, antibacterial, antifungal and antiviral. One of the problems related to the establishment of mangosteen plantation is to obtain seedlings throughout the year, which can be solved by micropropagation.

*In attempts to establish the embryogenic calli of *G. mangostana*, the potential of uncoated seed explants in forming embryogenic callus was examined in the basal half strength Murashige and Skoog (MS) medium containing 500 mg/L glutamine supplemented with different concentration of 2,4-D and Thidiazuron. A study was also carried out to determine the growth and multiplication of cells in suspension cultures and the effect of Thidiazuron on the advanced formation of embryogenic stages of mangosteen.*

The result showed that half strength MS medium supplemented with TDZ 0,1 mg/L + 2,4-D 6 mg/L resulted the best growth of calli as shown by the biggest calli diameter (7.52 cm) and the lowest percentage of calli browning (1%). The calli showed the characteristic of embryogenic calli as friable texture and yellowish colour. All calli induced cell suspension in half strength MSO liquid medium. The somatic embryo stages such as globular, heart and torpedo were obtained in liquid medium after the calli derived from half strength MS solid medium which supplemented with 20 mg/L 2,4-D + 1 mg/L TDZ were incubated for 8 weeks.

*Keywords: *Garcinia mangostana* L., somatic embryo, in vitro*

Pendahuluan

Manggis (*Garcinia mangostana* L.) merupakan buah tropis yang permintaannya semakin meningkat karena dimanfaatkan sebagai bahan produk kesehatan. Kandungan antioksidan dalam kulit manggis seperti xanthone, alpha dan beta mangostin digunakan sebagai agen anti kanker. Manggis dapat dikonsumsi dalam bentuk segar atau diproses menjadi jus sebagai minuman kesehatan dan suplemen. Rasa buah yang lezat menyebabkan buah ini mendapat

dengan produksinya disebabkan manggis masih diusahakan secara konvensional. Pengusahaan manggis dalam skala perkebunan dengan kualitas seragam terkendala oleh pertumbuhan tanaman yang lambat, perakaran yang lemah karena terbatasnya rambut akar, masa berbuah dwi tahunan dan jumlah biji layak tanam yang sedikit per buah menyebabkan ketersediaan bahan tanam yang sedikit sepanjang tahun. Alternatif untuk memproduksi bahan tanam manggis adalah melalui perbanyakan *in vitro*.

Produksi plantlets manggis *in vitro* telah dilakukan melalui organogenesis dengan menggunakan kultur padat. Induksi embrio somatik juga telah dilakukan dengan menggunakan kultur padat dan cair, namun pembentukan kalus embriogenik maupun struktur embrio somatik dari medium cair masih lambat dan kecepatan multiplikasinya rendah. Penelitian ini akan mencoba mengkombinasikan 2,4-D dan Thidiazuron untuk menghasilkan kalus embriogenik dalam medium padat. Selain itu kalus embriogenik yang diperoleh dari kultur padat akan diinduksi membentuk struktur embrio somatik dalam kultur cair.

Metode Penelitian

1. Induksi Kalus Embriogenik Manggis dari Eksplan Biji

Eksplan biji manggis diperoleh dengan memisahkan biji dari buah manggis yang berasal dari pohon yang sama. Buah manggis yang dipilih varietas Kaligesing, Purworejo, Jawa Tengah. Sterilisasi biji dilakukan dengan menggunakan deterjen, fungisida benomyl, 10 % dan 5 % chlorox® (sodium hypochlorite 5.25 %) (Rineksane, 2011). Biji yang telah steril dibuang bagian terluarnya dan dipotong menjadi empat. Setiap potongan ditanam pada medium perlakuan.

Medium yang digunakan adalah $\frac{1}{2}$ MS padat dengan penambahan Thidiazuron (0,1; 0,5 dan 1 mg/L) dan 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (4, 6, 8 dan 10 mg/L), dan ke dalam setiap medium ditambah 500 mg/L glutamin. Total perlakuan adalah 12, setiap perlakuan diulang 5 kali. Percobaan dirancang

meliputi saat tumbuh kalus, diameter kalus, persentase kalus browning dan tekstur kalus.

2. Regenerasi embrio somatik dalam kultur cair

Regenerasi kalus embriogenik dari kultur padat ke kultur cair dilakukan melalui dua eksperimen. Eksperimen 1 : Kalus embriogenik seberat 1 g dari medium MS padat disubkultur dalam medium $\frac{1}{2}$ MS0 cair. Kultur cair tersebut diinkubasi di atas shaker dengan kecepatan 125 rpm. Eksperimen 2 : Kalus embriogenik seberat 1 g dari medium MS padat disubkultur dalam medium $\frac{1}{2}$ MS cair yang mengandung TDZ (0, 1, 2, 4 dan 8 mg/L) dan Casein hydrolysate 500 mg/L. Modifikasi konsentrasi sitokinin TDZ dan penambahan senyawa N organik Casein hydrolysate dilakukan untuk meningkatkan persentase embrio somatik yang dihasilkan. Subkultur dan penggantian medium cair dilakukan setiap 4 minggu untuk meregenerasi kalus embriogenik menjadi fase globular, heart, torpedo dan embrio somatik. Pengamatan kultur cair di bawah mikroskop dilakukan setiap 4 minggu untuk mengetahui perkembangan fase embrio.

Hasil dan Pembahasan

1. Induksi Kalus Embriogenik dari Eksplan Biji Manggis

Kalus manggis tumbuh pada eksplan biji manggis mulai 1 minggu setelah tanam, ditunjukkan oleh bentukan baru berwarna putih kekuningan. Sampai empat minggu setelah tanam, kalus masih bertekstur padat yang menandakan ciri kalus non embriogenik. Kalus mempunyai tekstur remah pada saat pengamatan 2 minggu dan 8 minggu setelah subkultur (Tabel 1). Subkultur kalus dilakukan agar kalus memiliki tekstur yang remah sebagaimana dinyatakan oleh Te-chato *et al.* (1995a). Kalus padat dapat diinduksi menjadi kalus embriogenik dengan tekstur remah melalui subkultur atau pemindahan kalus ke medium baru yang mengandung zat pengatur tumbuh yang sama dengan medium asalnya. Razdan (2005) juga menyatakan bahwa subkultur berulang dapat menyebabkan kalus menjadi remah yang mencirikan embriogenik.

Berdasar hasil analisis yang reratanya dapat dilihat pada tabel 1, konsentrasi Thidiazuron dan 2,4-D yang diberikan dalam medium $\frac{1}{2}$ MS tidak

berpengaruh terhadap skor kalus. Hal ini tidak sesuai dengan hasil penelitian Rineksane (2011) yang menyatakan bahwa penggunaan auksin akan berpengaruh nyata terhadap skor kalus. Skor kalus diukur berdasar luasan kalus yang menutupi eksplan. Parameter ini diamati untuk mengetahui pertumbuhan kalus pada tiap perlakuan. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa semua eksplan dapat membentuk kalus dengan skor kalus maksimal karena hampir semua bagian eksplan tertutupi oleh kalus. Skor kalus antar perlakuan tidak berbeda nyata karena auksin yang digunakan pada penelitian ini hanya 2,4-D yang merupakan auksin terbaik untuk induksi kalus embriogenik manggis, sebagaimana dinyatakan oleh Rineksane (2011). Sementara jenis auksin yang digunakan pada penelitian Rineksane (2011) ada empat sehingga perbedaan skor kalus dipengaruhi oleh jenis auksin yang berbeda.

Kalus mengalami browning selama masa inkubasi. Ini terjadi karena eksplan biji yang digunakan dilukai dengan menghilangkan bagian terluar dari biji. Pelukaan ini menyebabkan senyawa fenolik yang terkandung dalam biji teroksidasi oleh enzim polifenol oksidase sehingga kalus menjadi browning (Tang dan Newton, 2004). Perlakuan yang diuji secara nyata berpengaruh terhadap persentase browning kalus yang tumbuh pada eksplan pada 4 minggu setelah tanam dan 2 serta 8 minggu setelah subkultur. Persentase kalus browning terendah diperoleh eksplan yang ditanam pada 3 dan 4 minggu setelah tanam (Tabel 1). Persentase browning mengalami peningkatan pada 2 minggu setelah subkultur. Ini terjadi karena kalus mengalami pelukaan saat dipindahkan ke medium baru. Persentase browning ini menurun pada pengamatan 8 minggu setelah subkultur. Ini menunjukkan kalus telah beradaptasi dan menyerap senyawa dalam medium untuk pertumbuhan.

Tabel 1. Pengaruh Konsentrasi Thidiazuron dan 2,4-D dalam ½ MS terhadap Pertumbuhan Kalus dari Eksplan Biji pada Minggu ke-4 Setelah Tanam, Minggu ke-2 dan ke-8 Setelah Subkultur

Perlakuan	4 Minggu Setelah Tanam			2 Minggu Subkultur			8 Minggu Subkultur		
	Skor kalus	Persentase browning (%)	Tekstur Kalus	Diameter kalus (cm)	Persentase browning (%)	Tekstur Kalus	Diameter kalus (cm)	Persentase browning (%)	Tekstur Kalus
1	5 a	5,83 b	Padat	3,52 ab	25 ab	Remah	4,42 a	1 b	Remah
2	5 a	15 ab	Padat	4,98 a	21 ab	Remah	7,52 a	1 b	Remah
3	5 a	3,33 b	Padat	3,9 ab	46,67 ab	Remah	5,2 a	35 ab	Remah
4	4,6 a	9 ab	Padat	2,76 b	54 ab	Remah	3,44 a	50 a	Remah
5	4,5 a	5 b	Padat	4,38 ab	27 ab	Remah	6,1 a	9,17 ab	Remah
6	4,8 a	5 b	Padat	3,8 ab	9 b	Remah	5,46 a	1 b	Remah
7	5 a	5,83 b	Padat	3,85 ab	37,5 ab	Remah	5,23 a	24,17 ab	Remah
8	5 a	13,33 ab	Padat	3,83 ab	41,67 ab	Remah	5,28 a	18 ab	Remah
9	5 a	15,83 ab	Padat	4,9 ab	8,33 b	Remah	6,91 a	0,83 b	Remah
10	4,6 a	9 ab	Padat	4,2 ab	31 ab	Remah	5,62 a	24 ab	Remah
11	5 a	17,5 ab	Padat	3,8 ab	26,25 ab	Remah	5,87 a	1,25 b	Remah
12	5 a	20,83 a	Padat	2,96 ab	55 a	Remah	4,42 a	36 ab	Remah

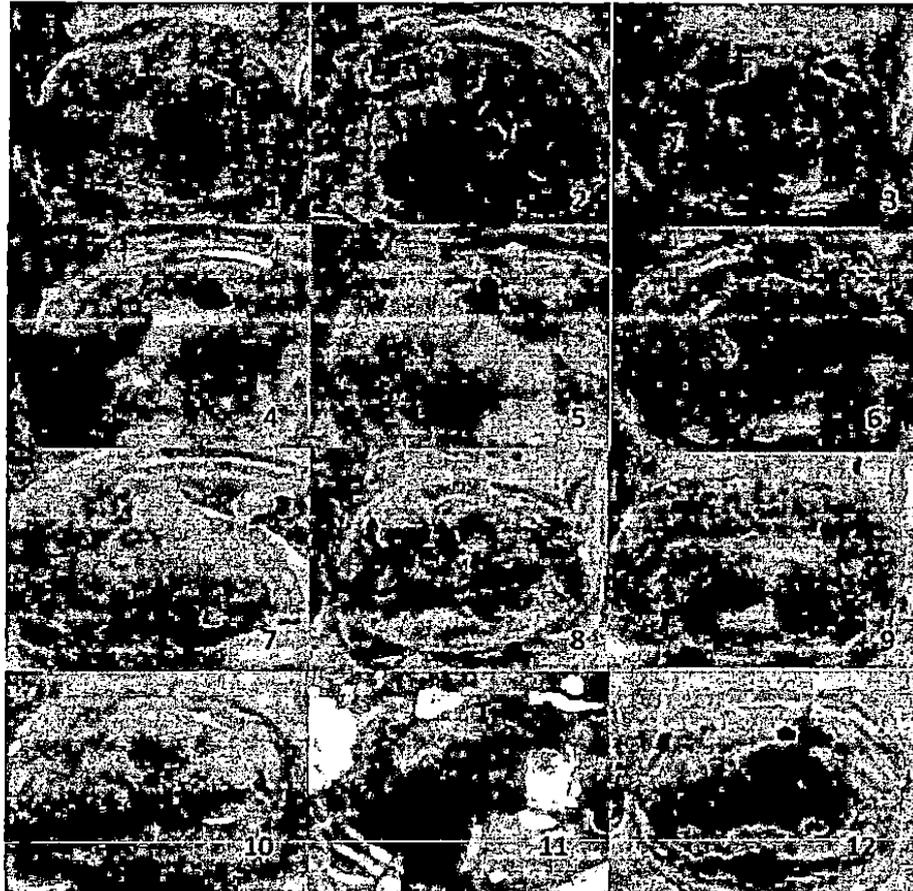
Keterangan :

Perlakuan yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf $\alpha = 5\%$

Perlakuan 1 : TDZ 0,1 mg/L + 2,4-D 4 mg/L	7 : TDZ 0,5 mg/L + 2,4-D 8 mg/L
2 : TDZ 0,1 mg/L + 2,4-D 6 mg/L	8 : TDZ 0,5 mg/L + 2,4-D 10 mg/L
3 : TDZ 0,1 mg/L + 2,4-D 8 mg/L	9 : TDZ 1 mg/L + 2,4-D 4 mg/L
4 : TDZ 0,1 mg/L + 2,4-D 10 mg/L	10 : TDZ 1 mg/L + 2,4-D 6 mg/L
5 : TDZ 0,5 mg/L + 2,4-D 4 mg/L	11 : TDZ 1 mg/L + 2,4-D 8 mg/L
6 : TDZ 0,5 mg/L + 2,4-D 6 mg/L	12 : TDZ 1 mg/L + 2,4-D 10 mg/L

Kalus yang disubkultur selama 8 minggu mengalami pertumbuhan yang signifikan (Gambar 1) ditunjukkan oleh diameter kalus yang bertambah rata-rata dua kali lipat jika dibandingkan pertumbuhan kalus pada minggu ke-2 setelah subkultur. Ini berarti Thidiazuron dan 2,4-D yang digunakan dalam penelitian ini dapat mendorong pertumbuhan kalus. George (1993) menyatakan bahwa kombinasi sitokinin dan auksin merangsang pembelahan sel dan morfogenesis sel dalam kultur in vitro. Selain itu penambahan glutamin ke dalam medium juga berpengaruh terhadap keremahan kalus, hal ini sesuai dengan pernyataan George (1993). Kalus yang diperoleh menunjukkan ciri embriogenik yaitu tekstur yang remah dan warna kekuningan sebagaimana dilaporkan oleh Nanda dan Rout (2003). Di antara perlakuan yang diujikan, medium ½ MS dengan penambahan TDZ 0,1 mg/L + 2,4-D 6 mg/L memberikan pertumbuhan kalus terbaik

browning terendah (1 %). Kalus yang diperoleh pada perlakuan tersebut mencirikan kalus embriogenik ditunjukkan oleh tekstur kalus remah dan warna kekuningan (Te-chato *et al.*, 1995a).



Gambar 1. Pertumbuhan kalus manggis dari eksplan biji setelah disubkultur pada minggu ke-8

Selain itu persentase kalus browning menurun jika dibandingkan dengan kalus yang tumbuh pada minggu ke-2 setelah subkultur. Pada akhir tahapan penelitian, kalus remah ini akan disubkultur ke medium cair untuk menginduksi embrio somatik.

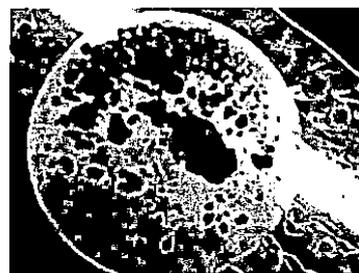
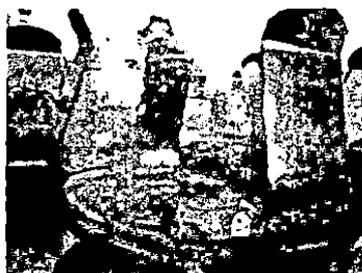
2. Regenerasi Embrio Somatik dalam Kultur Cair

Kalus yang diperoleh dari eksplan biji yang ditanam pada medium padat disubkultur agar kalus memiliki sifat embriogenik yang ditunjukkan oleh tekstur kalus remah, mudah dipisahkan, dan berwarna putih kekuningan. Kalus

embriogenik hasil subkultur satu kali tersebut kemudian digunakan sebagai eksplan dalam kultur medium cair. Kalus embriogenik sebanyak 1 gram diambil dari medium padat dan disubkultur ke medium cair sesuai perlakuan, dan diinkubasi di atas *shaker* dengan kecepatan 125 rpm. Medium cair digunakan karena tahap pembentukan embrio somatik manggis diharapkan terjadi secara tidak langsung melalui kultur suspensi sel. Kultur suspensi sel didefinisikan sebagai pertumbuhan sel tunggal atau sekumpulan sel dalam medium cair (Gamborg dan Phillips, 1995). Kultur suspensi dari kalus remah dapat digunakan untuk menginduksi embrio somatik (Dodds dan Roberts, 1982; Razdan, 2005) pada medium dengan kandungan senyawa yang sesuai.

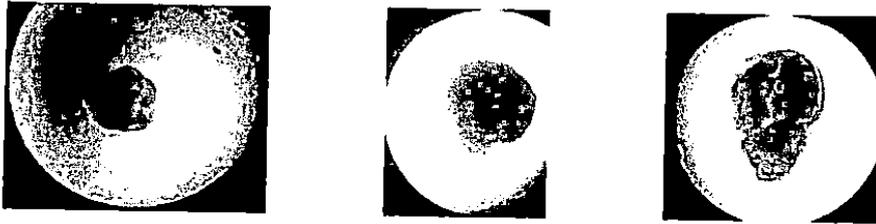
Sel-sel tunggal akan diperoleh dalam kultur cair karena gerakan *shaker* dapat memisahkan sel dari kalus embriogenik. Sel-sel tersebut kemudian karena adanya auksin, sitokinin bahkan senyawa nitrogen, akan membelah dan apabila terjadi proses embryogenesis, maka dari pembelahan dan diferensiasi sel-sel tersebut akan terbentuk struktur embriosomatik yang meliputi struktur globular, heart, torpedo dan kotiledon.

Kultur cair dalam penelitian ini diinkubasi selama 8 minggu. Berdasar hasil penelitian, semua kalus dari medium yang berbeda pada kultur padat, setelah disubkultur ke medium $\frac{1}{2}$ MS0 cair mampu membentuk suspensi sel. Hasil pengamatan visual menunjukkan bahwa sel-sel terpisah dari eksplan kalus dan terdispersi dalam medium cair menjadi kultur suspensi (Gambar 2). Kemudian dilakukan pengamatan di bawah mikroskop terhadap sampel yang diambil dari kultur suspensi, untuk mengamati struktur-struktur embrio yang terbentuk.



Gambar 2. Kultur embrio manggis pada medium cair selama 8 minggu

Berdasar pengamatan dari kultur suspensi dalam medium $\frac{1}{2}$ MS0 cair, diketahui bahwa struktur embrio telah terbentuk berupa globular, heart dan torpedo (Gambar 3). Struktur kotiledon belum diperoleh, diduga karena pembentukan struktur kotiledon memerlukan waktu inkubasi yang lebih lama. Oleh karena itu kultur suspensi tersebut masih diinkubasi untuk menginduksi terbentuknya struktur kotiledon sebagai tahap akhir dari proses embriogenesis.



Gambar 3. Struktur embrio somatik yang diperoleh setelah inkubasi suspensi sel manggis dalam medium $\frac{1}{2}$ MS0 selama 8 minggu

Selain menggunakan medium $\frac{1}{2}$ MS0, kalus embriogenik yang telah dihomogenkan dalam medium $\frac{1}{2}$ MS0 selama 2 minggu juga disubkultur ke medium cair dengan perlakuan penambahan TDZ (0, 1, 2, 4 dan 8 mg/L) dan Casein hydrolysate 500 mg/L. Kultur tersebut juga dapat membentuk suspensi sel, namun struktur embrio somatik belum terbentuk. Selain karena waktu inkubasi yang kurang lama yaitu 6 minggu, penambahan TDZ ke dalam medium regenerasi diduga menyebabkan penghambatan terhadap pembentukan struktur embrio. Sebaliknya kalus yang disubkultur ke dalam medium $\frac{1}{2}$ MS0 cair sudah membentuk struktur embrio dalam waktu 8 minggu karena kalus sudah mengandung zat pengatur tumbuh endogen yang diperoleh dari medium kultur padat. Hal ini terbukti bahwa struktur embrio yang diperoleh pada penelitian ini berasal dari suspensi sel yang diperoleh dari kalus yang sebelumnya ditumbuhkan pada medium $\frac{1}{2}$ MS padat yang mengandung 20 mg/L 2,4-D dan 1 mg/L TDZ.

Pembentukan suspensi dari kalus remah pada penelitian ini yang terbentuk setelah 8 minggu lebih cepat jika dibandingkan dengan hasil penelitian Rineksane

Kesimpulan

Medium $\frac{1}{2}$ MS dengan penambahan TDZ 0,1 mg/L + 2,4-D 6 mg/L memberikan pertumbuhan kalus terbaik dari eksplan biji manggis, ditunjukkan oleh parameter diameter kalus terbesar (7,52 cm) dan persentase browning terendah (1 %). Kalus yang diperoleh pada perlakuan tersebut mencirikan kalus embriogenik ditunjukkan oleh tekstur kalus remah dan warna kekuningan.

Kalus embriogenik yang disubkultur ke dalam medium $\frac{1}{2}$ MS0 cair mampu membentuk kultur suspensi sel. Struktur embrio somatik berupa globular, heart dan torpedo telah terbentuk dalam waktu 8 minggu pada suspensi sel yang diperoleh dari kalus yang sebelumnya ditumbuhkan pada medium $\frac{1}{2}$ MS padat yang mengandung 20 mg/L 2,4-D dan 1 mg/L TDZ.

Daftar Pustaka

- George, E.F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture Part 1: The Technology*. 2nd edition. Exegetics Limited, England. 574p.
- Nanda, R.M. and G.R. Rout. 2003. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acacia arabica*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 73:131-135.
- Razdan, M.K. 2005. *Introduction to Plant Tissue Culture*. 2nd ed. Science Publishers, Inc, New Hampshire. 375p.
- Rineksane, I.A. 2011. *Embriogenesis, Organogenesis and Assessment of Somaclonal Variations in Mangosteen (Garcinia mangostana L.)*. PhD Thesis. Universiti Putra Malaysia
- Tang, W. and R.J. Newton. 2004. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Science* 167:621-628.
- Te-chato S, M. Lim and P. Suranilpong. 1995a. Embryogenic callus induction in

