

Embriogenesis Somatik Mangga Varietas Madu dengan Eksplan Nuselar

(Somatic Embriogenesis of Mango Var. Madu through Nucellar Explant)

Yati Supriati^{1*}, Mia Kosmiatin¹, Ali Husni¹, dan Karsinah²

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: yati_sbudiman@yahoo.com

²Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika
Jl. Raya Tlekung No. 1, Junrejo, Kota Batu, Jawa Timur 65327, Indonesia

Diajukan: 5 Januari 2016; Direvisi: 29 Februari 2016; Diterima: 28 April 2016

ABSTRACT

In order to obtain a good growth rate and to fasten the harvest time, farmer usually use mango seedlings of shoot grafting. Therefore, a lots of mango rootstock was needed. Mango var. Madu is one of very populars rootstock due to its strong rooting system and has a good compatibility with other manggo varieties. *In vitro* culture through somatic embriogenesis is one alternative technique which is possible for seedlings production in uniform size, fast, and in a large quantity. The main objective of this research was to obtain the best method for embriogenic callus production. The research consist of two experiments are decreasing of phenol oxidation shoot of Madu mango explants and nduction of embriogenic callus from nucellar. The experiments one were arranged in Complete Randomized Design with six replications. The results showed that between of four treatment, explants submersion at 0.125% Potasium nitrat in 3 second, then planted in MS medium suplemented with active charcoal of 0.3% is the best treatment of decreasing phenol oxidation. The best formula for callus induction of mango nucellar explants was ½ MS media with 3.0 mg of TDZ with callus percentage of 50%, which was occur at 3 weeks and 6 weeks after planting. To optimalize callus proliferation, 300 mg/l charcoal active was added in a half strong basal media, which is completted with 2 mg/l BA, 1 mg/l 2,4-D, and 3 mg/l AgNO₃. This formula producing callus with white color, crumb, with globular and torpedo form, indicated as embryogenic callus.

Keywords: Mango var. Madu (*Mangifera indica* L.), callus induction, phenol oxidation, somatic embriogenesis, nucellar explants.

ABSTRAK

Perbanyak bibit mangga umumnya dilakukan melalui teknik sambung pucuk agar laju pertumbuhan dan panen lebih cepat. Mangga Madu sering digunakan sebagai batang bawah karena memiliki sifat perakaran yang kuat dan daya gabung yang baik dengan varietas mangga lain. Kendala yang dihadapi adalah rendahnya ketersediaan batang bawah karena pohon induk yang ada selain sudah tua, jumlahnya sangat terbatas. Mikropropagasi tanaman melalui embriogenesis somatik diharapkan dapat membantu perbanyak batang bawah secara cepat, seragam, dan dalam jumlah tak terbatas. Penelitian bertujuan mendapatkan metode untuk mengatasi masalah oksidasi fenol (pencokelatan yang berlebih) pada eksplan dan metode pembentukan kalus embriogenik dan regenerasi embrio somatik mangga varietas Madu. Percobaan disusun berdasarkan Rancangan Acak Lengkap dengan enam ulangan. Hasil penelitian menunjukkan, dari empat perlakuan yang diuji, perendaman dengan Potasium nitrat 0,125% selama 1 menit, lalu ditanam pada media MS yang diberi arang aktif 0,3% merupakan perlakuan terbaik untuk membantu mengurangi oksidasi fenol. Induksi kalus dengan menggunakan eksplan nuselar (*nucellar explants*) menunjukkan persentase eksplan menjadi kalus mencapai 50% pada media ½ MS yang diberi TDZ 0,4 mg/l. Induksi kalus mulai terjadi pada 3 mst dan 6 mst. Formulasi terbaik untuk pertumbuhan kalus adalah media ½ MS dengan kombinasi BAP 2 mg/l, 2,4-D 1 mg/l, dan AgNO₃ 3 mg/l, serta diberi arang aktif 0,3%. Struktur kalus lebih banyak bersifat remah dan berwarna putih. Dari perkembangan kalus, terbentuk struktur embrio somatik globular, hati, torpedo sampai kecambah.

Kata kunci: Mangga Madu (*Mangifera indica* L.), induksi kalus, oksidasi fenol, embriogenesis somatik, eksplan nuselar.

PENDAHULUAN

Mangga (*Mangifera indica* L.) merupakan salah satu komoditas hortikultura yang cukup penting. Produksi nasionalnya berada pada urutan ketiga tertinggi setelah pisang dan nanas. Produksi mangga pada tahun 2010 sekitar 1,3 juta ton dan meningkat hingga mencapai 2,4 juta ton pada tahun 2014 (Pusdatin, 2015). Akan tetapi, nilai ekspornya pada tahun tersebut tidak lebih dari 1% produksi nasional, masih jauh di bawah India dan Cina. Rendahnya nilai ekspor tersebut antara lain disebabkan oleh kualitasnya yang belum memenuhi keinginan konsumen di luar negeri. Bahkan saat ini impor mangga berkualitas tinggi cenderung meningkat, terutama saat bukan musimnya. Kecenderungan ini sangat memprihatinkan karena Indonesia merupakan salah satu *center of origin* mangga dunia dengan keragaman genetik yang sangat tinggi, terutama di Sumatera dan Kalimantan (Iyer dan Schnell, 2009). Di sisi lain, pemuliaan mangga di Indonesia masih tertinggal dibanding dengan India. Australia dan Amerika banyak melakukan pemuliaan melalui introduksi dan seleksi mangga yang adaptif di daerah subtropis (Suwarno, 2008).

Peningkatan produksi mangga di Indonesia dilakukan melalui perluasan areal tanam dan peremajaan tanaman mangga yang sudah tua. Untuk itu, benih mangga yang berkualitas diperlukan dalam jumlah banyak dan tentunya diperlukan suatu teknik yang efisien sehingga benih dapat tersedia dalam waktu cepat. Menurut Hartman *et al.* (1990), teknik sambung pucuk merupakan salah satu teknik yang diminati penangkar benih karena dapat mempercepat pertumbuhan dan produksi buah serta memperpendek ukuran tanaman. Di antara varietas yang ada, mangga Madu dikenal luas oleh para penangkar benih untuk digunakan sebagai batang bawah karena memiliki sistem perakaran yang baik dan kuat sehingga mampu menopang pertumbuhan batang atas. Selain itu, batang bawahnya memiliki tingkat kompatibilitas/daya gabung yang tinggi dengan berbagai jenis batang atas lainnya (Sukarmin *et al.*, 2010).

Saat ini, dalam penyediaan benih mangga Madu sebagai batang bawah masih digunakan teknik konvensional sehingga jumlah benih sangat terbatas dan diperlukan waktu yang lama. Sebagai alternatif, perbanyakan benih batang bawah secara cepat dan seragam dapat dilakukan dengan teknologi kultur *in vitro*. Kelebihan teknologi ini adalah benih dapat diperbanyak dalam jumlah banyak dengan sifat yang sama dengan pohon induknya dan seragam. Namun demikian, penguasaan sistem regenerasi merupakan salah satu faktor penting sebelum memproduksi be-

nih dalam jumlah banyak. Sistem regenerasi mangga menghadapi beberapa kendala, antara lain kontaminasi mikroba yang bersifat sistemik, sifat rekalsitran terutama pada tanaman berkayu, dan oksidasi fenol yang tinggi yang menghambat regenerasi eksplan (Chavan *et al.*, 2000; Raghuvanshi dan Srivasyava, 1995; Sharma dan Singh, 2002). Tingkat oksidasi fenol dapat dikurangi, baik melalui pra perlakuan bahan induk maupun pada eksplan sebelum dikulturkan pada media tumbuh (Khrisna *et al.*, 2007).

Regenerasi melalui jalur embriogenesis somatik, baik langsung maupun tidak langsung, telah banyak dilaporkan, terutama pada mangga monoembrionik, meskipun keberhasilannya masih belum optimal (Khrisna dan Singh, 2007; Litz dan Yurgalevith, 1997; Thomas dan Ravindra, 1997; Xiao *et al.*, 2004). Di Indonesia, perbanyakan batang bawah mangga dengan teknik kultur *in vitro* belum banyak dilaporkan sehingga perlu dilakukan penelitian sistem regenerasi yang dapat mengawali produksi benih batang bawah. Langkah awal sistem penguasaan regenerasi secara embriogenesis somatik adalah menghasilkan kalus embriogenik yang selanjutnya diharapkan dapat membentuk embrio somatik dan selanjutnya kecambah dalam jumlah banyak karena dapat berasal dari satu sel somatik (Chavan *et al.*, 2000; Khrisna *et al.*, 2008; Raghuvanshi dan Srivastava, 1995; Sharma dan Singh, 2002; Thomas dan Ravindra, 1997).

Penggunaan eksplan ovul atau jaringan nuselar (*nucellar explants*) dapat meminimalkan kendala pencokelatan pada regenerasi *in vitro* tanaman mangga karena eksplan tersebut merupakan jaringan muda sehingga lignin belum banyak terbentuk (Litz *et al.*, 1984). Pada tanaman mangga, umumnya eksplan berhasil membentuk kalus embriogenik dengan menggunakan nuselar yang diisolasi dari buah berumur 40–60 hari setelah antesis (Khrisna dan Singh, 2007) dan formulasi media yang digunakan umumnya menggunakan media dasar Murashige dan Skoog (1962) (Ara *et al.*, 1999; Laxmi *et al.*, 1999; Litz *et al.*, 1982, 1984; Xiao *et al.*, 2004), walaupun beberapa penelitian terdahulu menggunakan modifikasi media dasar Gamborg (B5) (Thomas, 1999). Zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan dalam regenerasi melalui jalur embriogenesis somatik juga beragam dan sangat bergantung pada genotipe tanaman dan jenis eksplan. Pada umumnya, untuk induksi kalus embriogenik digunakan 2,4-D dan BAP (Ara *et al.*, 2004; Dewald *et al.*, 1989; Lad *et al.*, 1997). Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan metode untuk mengatasi masalah oksidasi fenol (pencokelatan yang berlebih) pada eksplan dan metode pembentukan kalus embriogenik dan regenerasi embrio somatik mangga varietas Madu.

BAHAN DAN METODE

Bahan Penelitian

Bahan tanaman yang digunakan untuk penelitian adalah buah muda mangga varietas Madu yang berumur 40 hari setelah antesis, berasal dari tanaman induk terpilih di KP Cukurgondang dan KP Kraton, Malang, Jawa Timur. Disinfektan yang digunakan adalah detergen dan fungisida, sedangkan bahan pensteril adalah alkohol 96%. Untuk mengatasi masalah pencokelatan (*browning*) akibat oksidasi fenol, berdasarkan pengujian sebelumnya, digunakan Kalium nitrat dan berbagai antioksidan, seperti asam askorbat, *polyvinylpyrrolidone* (PVP), dan arang aktif. Formulasi media terdiri atas media dasar MS (Murashige dan Skoog, 1962) yang ditambahkan bahan organik dan ZPT sesuai dengan perlakuan yang diuji.

Metode

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen) dari bulan Januari sampai dengan Desember 2015. Penelitian terdiri atas dua kegiatan, yaitu (1) Penghambatan masalah oksidasi fenol pada eksplan dan (2) Induksi pembentukan kalus embriogenik dari jaringan nuselar dan regenerasinya membentuk struktur embrio somatik.

Penghambatan masalah oksidasi fenol pada eksplan

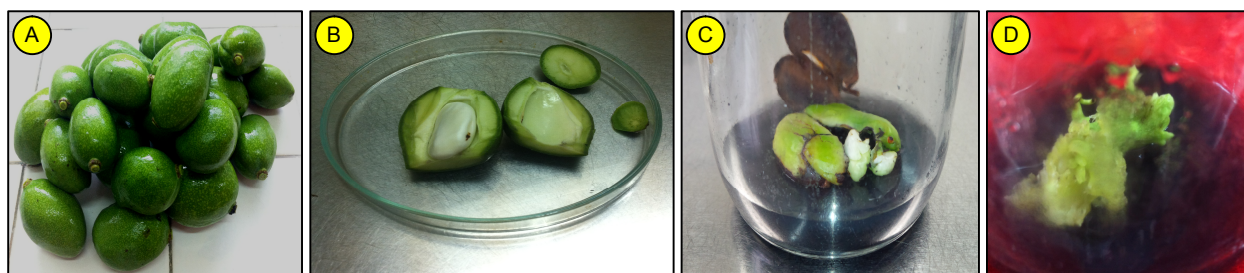
Eksplan yang digunakan pada kegiatan ini adalah jaringan nuselar dari biji buah muda yang berukuran 2–3 cm, berumur 40 hari setelah antesis. Reduksi oksidasi fenol dilakukan melalui beberapa perlakuan, yaitu (a) merendam eksplan selama 60 detik dalam larutan PVP 500 mg/l, (b) mencuci eksplan dengan larutan kalium nitrat 125 mg/l, (c) merendam eksplan dalam kultur cair media MS yang ditambah dengan PVP 100 mg/l, kemudian digoyang

dengan *shaker* dengan kecepatan 75 rpm dan diinkubasi selama 24 jam, dan (d) sama dengan perlakuan c tetapi ditambah dengan asam askorbat 12,5 mg/l. Eksplan yang telah diperlakukan kemudian ditanam pada media MS ditambah dengan arang aktif 300 mg/l atau media MS ditambah dengan PVP 100 mg/l. Eksplan jaringan nuselar disterilisasi melalui pembakaran buah muda pada bunsen, kemudian dibelah sehingga diperoleh jaringan nuselar untuk diletakkan pada media perlakuan (Gambar 1A dan 1B). Peubah yang diamati adalah saat terjadi pencokelatan, intensitas warna pencokelatan secara visual, dan persentase eksplan mati.

Induksi pembentukan kalus embriogenik dari jaringan nuselar

Bahan eksplan yang digunakan adalah jaringan nuselar yang diperoleh dari buah muda dengan diameter 2–3 cm, berumur 5 minggu setelah antesis. Buah muda terpilih disterilisasi, kemudian dipotong secara longitudinal untuk mendapatkan ovul/kantung embrio. Tahap selanjutnya, ovul dibelah secara simetris. Jaringan nuselar diisolasi dari ovul muda, kemudian ditanam pada media perlakuan, yaitu (a) $\frac{1}{2}$ MS + thidiazuron (TDZ) (0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, dan 3,2 mg/l) tanpa 2,4-D dan (b) $\frac{1}{2}$ MS + TDZ (0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, dan 3,2 mg/l) + 2,4-D 1 mg/l. Peubah yang diamati adalah saat induksi kalus, persentase eksplan membentuk kalus, dan visual kalus (embriogenik dan non embriogenik).

Perlakuan yang dicoba adalah $\frac{1}{2}$ MS + BAP (1, 2, 3, 4, dan 5 mg/l) + 2,4-D 1 mg/l + AgNO₃ 3 mg/l + arang aktif 300 mg/l. Peubah yang diamati adalah bobot kalus dan jumlah embrio somatik. Setiap percobaan disusun berdasarkan Rancangan Acak Lengkap dengan enam ulangan. Selama percobaan berlangsung, seluruh biakan disimpan pada ruang kultur dengan suhu 25±2°C, intensitas cahaya lampu TL 1.000 lux, dan lama penyinaran 16 jam per hari.



Gambar 1. Tahap kegiatan induksi kalus mangga Madu. A = buah muda berumur 5 minggu setelah antesis yang digunakan sebagai eksplan, B = buah yang dibelah untuk mendapatkan jaringan nuselar, C = nuselar yang diletakkan pada media perlakuan, D = eksplan nuselar mulai membentuk kalus.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penghambatan Masalah Oksidasi Fenol pada Eksplan

Tabel 1 menunjukkan bahwa dari empat perlakuan yang diuji, ternyata perendaman dalam kalium nitrat 125 mg/l selama 1 menit (B), kemudian ditanam pada media MS yang diberi arang aktif 300 mg/l merupakan perlakuan yang terbaik untuk menghambat masalah oksidasi fenol. Tingkat kematian cukup rendah, yaitu hanya 20%. Demikian pula, perendaman dengan PVP 500 mg/l lalu ditanam pada media MS yang mengandung PVP 100 mg/l cukup baik dalam menekan oksidasi fenol. Bahkan pada perlakuan ini, kalus dapat cepat terbentuk (Gambar 1D).

Induksi Pembentukan Kalus Embriogenik dari Jaringan Nuselar

Dari Tabel 2 dapat dilihat bahwa pemberian berbagai taraf konsentrasi TDZ 0–3,2 mg/l tanpa 2,4-D tidak dapat menghasilkan kalus yang bersifat embriogenik, walaupun pada konsentrasi TDZ 0,4 dan 1,6 mg/l diperoleh kalus, tetapi morfologinya kompak, tidak remah. Induksi kalus baru terjadi setelah 3 mst dan 6 mst (Gambar 2A) dengan pertumbuhan yang kurang optimal. Kalus yang dihasilkan warnanya berubah menjadi kecokelatan dalam waktu cepat, yaitu kurang dari 2 minggu dengan persentase eksplan membentuk kalus hanya mencapai 20%.

Berbeda dengan Tabel 3, terlihat bahwa pemberian TDZ yang ditambah dengan 2,4-D 1 mg/l memberikan respons positif terhadap induksi kalus. Pem-

bentukan kalus tertinggi (80%) dicapai pada kombinasi TDZ 1,6 mg/l ditambah dengan 2,4-D 1 mg/l, namun kalus yang dihasilkan bersifat kompak, tidak remah, sedangkan pada perlakuan TDZ 0,4 mg/l ditambah 2,4-D 1 mg/l dapat dihasilkan 50% kalus yang sangat remah dan berwarna putih kehijauan. Kalus remah merupakan salah satu ciri kalus embriogenik (Krisna dan Singh, 2007).

Dalam percobaan sebelumnya, diketahui bahwa pemberian arang aktif 300 mg/l berperan dalam penghambatan oksidasi fenol, maka pada pengujian selanjutnya, yaitu pada optimalisasi pembentukan kalus yang bersifat embriogenik digunakan arang aktif 300 mg/l. Formulasi yang dicoba adalah media $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah dengan kombinasi antara BAP dan 2,4-D, diberi AgNO_3 3 mg/l dan ditambah arang aktif 300 mg/l. Dengan formulasi tersebut, terjadi pembentukan dan pertumbuhan kalus yang lebih cepat, serta struktur kalus lebih baik, yaitu bersifat remah dan berwarna putih. Pada umumnya, keragaan kalus yang demikian mempunyai kemampuan regenerasi melalui jalur embriogenesis somatik (George *et al.*, 2008). Penambahan AgNO_3 ke dalam media dapat mengurangi aktivitas etilen yang terakumulasi dalam botol kultur. Etilen merupakan ZPT berupa gas yang dapat menyebabkan *senescence* pada biakan dan menghambat regenerasi, baik melalui jalur organogenesis maupun embriogenesis somatik. Dengan demikian, adanya AgNO_3 menyebabkan kalus embriogenik dan struktur embrio somatik tidak kecokelat atau tidak berpengaruh terhadap organ kotiledon dan struktur kecambah embrio somatik.

Tabel 1. Pengaruh perendaman terhadap oksidasi fenol eksplan mangga Madu pada media dasar MS yang ditambah arang aktif 300 mg/l atau PVP 100 mg/l.

Perlakuan	Inisiasi pencokelatan (HST)		Intensitas pencokelatan		Tingkat eksplan mati (%)	
	Arang aktif	PVP	Arang aktif	PVP	Arang aktif	PVP
A	5	Tidak terjadi	Hitam keruh	Jernih	60 b	20 a
B	Tidak terjadi	5	Jernih	Hitam	20 a	40 a
C	5	5	Hitam pekat	Hitam keruh	80 bc	60 b
D	10	10	Hitam pekat	Hitam pekat	60 b	80 bc

Angka pada satu lajur yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji DMRT. A = direndam dalam larutan PVP 500 mg/l selama 1 menit, B = direndam dalam larutan kalium nitrat 125 mg/l selama 1 menit, C = direndam dalam larutan media MS cair yang diberi PVP 100 mg/l, digoyang selama 24 jam, D = direndam dalam media MS cair yang diberi asam askorbat, digoyang selama 24 jam.

Tabel 2. Pengaruh taraf konsentrasi TDZ pada media MS terhadap induksi kalus mangga Madu.

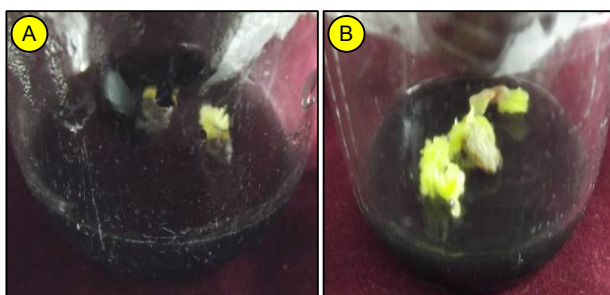
Perlakuan TDZ (mg/l)	Waktu inisiasi kalus (mst)	Eksplan berkalus (%)	Visual kalus
0,0	0 a	0 a	Tidak terbentuk kalus
0,2	0 a	0 a	Tidak terbentuk kalus
0,4	6 b	20 ab	Kompak, putih kecokelatan
0,8	0 a	0 a	Tidak terbentuk kalus
1,6	3 ab	20 ab	kompak, putih kekuningan
3,2	0 a	0 a	Tidak terbentuk kalus

Angka pada satu lajur yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji DMRT. TDZ = thidiazuron, mst = minggu setelah tanam.

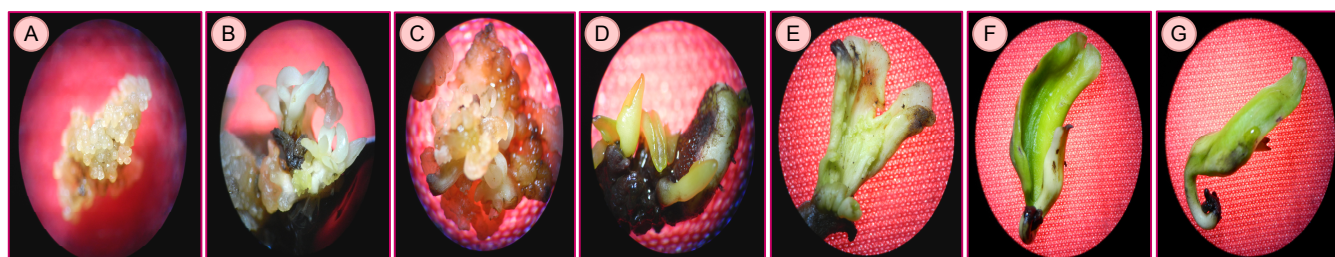
Gambar 3 menunjukkan tahapan regenerasi kalus embriogenik mangga Madu hingga terbentuknya kecambah embrio somatik.

Selain penambahan hormon 2,4-D, telah dicoba kombinasi ZPT lainnya, yaitu BAP pada berbagai taraf konsentrasi (1–5 mg/l). Kombinasi 2,4-D 1 mg/l dengan BAP 2 mg/l merupakan perlakuan yang terbaik untuk proliferasi kalus, yaitu dapat menghasilkan bobot kalus 4,35 g per botol. Peningkatan konsentrasi BAP sampai dengan 5 mg/l akan menurunkan bobot

kalus yang terbentuk (Tabel 4). Jumlah embrio somatik struktur kecambah yang terbentuk antar formulasi perlakuan cukup banyak, yaitu antara 63 sampai dengan 85, paling banyak berasal dari perlakuan media MS ditambah dengan BAP 2 mg/l dan 2,4-D 1 mg/l serta arang aktif 0,3%. Arang aktif banyak dilaporkan dapat mengatasi masalah oksidasi fenol yang dapat menghambat regenerasi dalam kultur jaringan. Selain itu, penggunaannya dapat membantu regenerasi tanaman melalui jalur embriogenesis somatik tidak langsung. Hal ini terbukti dari hasil



Gambar 2. Kalus yang terbentuk dari nuselar. A = tanpa 2,4-D, B = dengan perlakuan kombinasi TDZ dengan 2,4-D 1 mg/l.



Gambar 3. Tahapan perkembangan embriogenesis somatik mangga mulai dari induksi kalus sampai tahap akhir pembentukan kecambah. A = kalus embriogenik, B = *pre embriogenic mass*, C = struktur hati, D = struktur hati yang memanjang, E = tahap kotiledon, F = struktur bipolar, G = kecambah embrio somatik.

Tabel 3. Pengaruh taraf konsentrasi TDZ pada media $\frac{1}{2}$ MS terhadap induksi kalus mangga Madu.

Perlakuan TDZ (mg/l)	Saat induksi kalus (mst)	Eksplan berkalus (%)	Tipe kalus
0,1	0 a	0 a	-
0,2	6 b	20 a	Remah, putih kehijauan
0,4	7 b	50 b	Remah, putih kehijauan
0,8	4 a	70 b	Kompak, putih
1,6	3 a	80 bc	Kompak, putih pucat
3,2	5 ab	60 b	Kompak, putih

Angka pada satu lajur yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji DMRT - = kalus tidak dapat diamati karena tidak terbentuk.

Tabel 4. Rerata bobot kalus embriogenik dan jumlah embrio somatik struktur kecambah pada media $\frac{1}{2}$ MS yang diberi perlakuan BAP, 2,4-D 1 mg/l, dan arang aktif 0,3%.

Perlakuan (mg/l)	Bobot kalus per botol (g)	Jumlah embrio somatik struktur kecambah
$\frac{1}{2}$ MS + BAP 1 + 2,4-D 1	0,22 a	72 a
$\frac{1}{2}$ MS + BAP 2 + 2,4-D 1	4,35 c	85 c
$\frac{1}{2}$ MS + BAP 3 + 2,4-D 1	3,32 ab	76 ab
$\frac{1}{2}$ MS + BAP 4 + 2,4-D 1	3,05 b	78 bc
$\frac{1}{2}$ MS + BAP 5 + 2,4-D 1	1,22 a	63 a

Angka pada satu lajur yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji DMRT.

penelitian ini, yaitu jumlah kecambah yang terbentuk cukup banyak.

KESIMPULAN

Perendaman eksplan dalam kalium nitrat 0,125% selama 1 menit, kemudian ditanam pada media MS yang diberi arang aktif 0,3% merupakan perlakuan terbaik untuk menurunkan tingkat pencokelatan yang dapat menghambat regenerasi. Induksi kalus dengan menggunakan eksplan nuselar menunjukkan persentase eksplan menjadi kalus cukup tinggi mencapai 50% pada media MS yang diberi TDZ 0,4 mg/l. Induksi kalus mulai terjadi pada 3 mst dan 6 mst. Formulasi yang terbaik untuk perkembangan kalus adalah media $\frac{1}{2}$ MS yang ditambah kombinasi BAP 2 mg/l dan 2,4-D 1 mg/l dan diberi AgNO_3 3 mg/l serta arang aktif 0,3%. Struktur kalus lebih banyak bersifat remah, berwarna putih. Dari perkembangan kalus, terbentuk struktur embrio somatik globular, hati, torpedo sampai kecambah.

DAFTAR PUSTAKA

- Ara, H., U. Jaiswal, and V.S. Jaiswal. 1999. Germination and plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of mango (*Mangifera indica* L.). *Plant Cell. Rep.* 19(2):166–170.
- Ara, H., U. Jaiswal, and V.S. Jaiswal. 2004. An improved method of proliferation of proembryogenic calli of *Mangifera indica* L. var. Amrapali for scale-up of somatic embryo production. *Indian J. Biotechnol.* 3:229–234.
- Chavan, S.S., S.S. Ranade, A.C. Deore, R.S. Deshpande, and B.L. Dhonukshe. 2000. Cloning of Alphonso mango through vegetative explants. *Ann. Plant Physiol.* 14(2):178–181.
- Dewald, S.G., R.E. Litz, and G.A. Moore. 1989. Optimizing somatic embryo production in mango. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 114:712–716.
- George, S., M.A. Hall, and G.J.D. Klerk. 2008. *Plant propagation by tissue culture*. 3rd ed. Vol. I. The Background. Springer, the Netherlands.
- Hartman, H.T., D.E. Kester, and F.T. Davies. 1990. *Plant propagation. Principles and practice*. Prentice Hall. Englewood Cliffs. New Jersey, US.
- Iyer, C.P.A. and R.J. Schnell. 2009. Breeding and genetic. The mango 2nd edition: Botany, produces, and uses. Wallingford Oxon. CAB International.
- Khrisna, H., R.K. Sairam, S.K. Singh, V.B. Patel, R.R. Sharma, M. Grover, L. Nain, and A. Sachdev. 2008. Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. *Sci. Hort.* 118:132–138.
- Krishna, H. and S.K. Singh. 2007. Biotechnological advances in mango (*Mangifera indica* L.) and their future implication in crop improvement-A review. *Biotechnol. Advan.* 25:223–243.
- Lad, B.L., S. Jayasankar, F. Pliego-Alfaro, P.A. Moon, and R.E. Litz. 1997. Temporal effect of 2,4-D on induction of embryogenic nucellar cultures and somatic embryo development of 'Carabao' mango. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant* 33:253–257.
- Laxmi, D.V., H.C. Sharma, P.B. Kirti, and M.L. Mohan. 1999. Somatic embryogenesis in mango (*Mangifera indica* L.). *Curr. Sci.* 77(10):1.355–1.358.
- Litz, R.E. and C. Yurgalevitch. 1997. Effects of 1 aminocyclopropane-1-carboxylic acid, aminoethoxyvinyl glycine, methylglyoxal bis-(guanyldrazone) and dicyclohexyl ammonium sulfate on induction of embryogenic competence of mango nucellar explants. *Plant Cell Tiss. Org.* 51:171–176.
- Litz, R.E., R.K. Knight, and S. Gazit. 1982. Somatic embryos from cultured ovules of polyembryonic *Mangifera indica* L. *Plant Cell Rep.* 1:264–266.
- Litz, R.E., R.K. Knight, and S. Gazit. 1984. *In vitro* somatic embryogenesis from *Mangifera indica* L. *Sci. Hortic.* 22:233–240.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture. *Plant. Physiol.* 15:473–497.
- Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian. 2015. Statistik makro sektor pertanian. Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian, Sekretariat Jenderal Kementerian Pertanian, Jakarta.
- Raghuvanshi, S.S. and A. Srivastava. 1995. Plant regeneration of *Mangifera indica* using liquid shaker to reduce phenolic exudation. *Plant Cell Tiss. Org.* 41:83–85.
- Sharma, R.R. and S.K. Singh. 2002. Etiolation reduces phenolic content and polyphenol oxidase activity at the preculture and *in vitro* exudation of phenols from mango explants. *Trop. Agric.* 79(2):94–99.
- Sukarmin, E. Angriani, dan Endriyanto. 2010. Teknik penyambungan mangga Arumanis 143 dengan batang bawah mangga Madu dan Saigon. *Bul. Teknik Pertanian* 15(1):16–18.
- Suwarno, W.B. 2008. Pemuliaan tanaman mangga. <http://willy.situshijau.co.id> (diakses 15 Maret 2008).
- Thomas, P. 1999. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from nucellar tissue of monoembryonic mango. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 74(1):135–139.
- Thomas, P. and M.B. Ravindra. 1997. Influence of media, genotype, explant factors, season, and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival, and axenic culture establishment. *J. Hortic. Sci.* 2:713–722.
- Xiao, J.N., X.L. Huang, Y.J. Wu, X.J. Li, M.D. Zhou, and F. Engelmann. 2004. Direct somatic embryogenesis induced from cotyledons of mango immature zygotic embryos. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40(2):196–199.