

Metode Mengatasi *Browning* pada Eksplan Ulin (*Eusideroxylon zwageri*) untuk Inisiasi Regenerasi Secara *In Vitro*

Examination to Overcome Browning in Ulin (*Eusideroxylon zwageri*) for Regeneration Initiation (In Vitro)

TRIOS CARITO TARAMPAK¹⁾, SULISTIAWATI²⁾, RATNA NIRMALA³⁾

^(1,2,3)Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Mulawarman, Jalan Pasir Belengkong
Kampus Gunung Kelua, Universitas Mulawarman, Samarinda, Kalimantan Timur, Indonesia.
E-Mail: tri.oscarito@yahoo.com¹⁾

Abstract. Ulin (*Eusideroxylon zwageri*) is one of the native plants of Indonesia whose growth is spread in tropical forest, among others in southern Sumatra and Kalimantan. Based on the results of the 1998 Asia Regional Workshop meeting held at the Hanoi (Vietnam) International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN), it was determined that ironwood is on Vulnerable A1cd + 2cd status which means sensitive or is facing a high risk of extinction. Tissue culture is a technique that needs to be applied to overcome the problem of ironwood regeneration initiation. However, the concentration of tannin with high concentration so that the formation of browning which leads to the death of ulin tissue is one of the causes of the low success of ironwood tissue culture. This study was formulated based on the potential of activated charcoal and vitamin C to overcome browning, so that it can significantly affect the growth of Ulin regeneration initiation (*Eusideroxylon zwageri*). The analytical method used is Observation of Qualitative Parameter Treatment, namely explant color and the quantitative parameter observed is the number of explants that have browned and not browned in this case are calculated in percent. Based on the results of the research that has been done, obtained methods to overcome browning in ulin explants (*Eusideroxylon zwageri*) which is divided into 2 stages. In stage 1 (pre-condition) browning can be overcome with a 100% success rate, explants soaked for 24 hours in 50% MS liquid media with pH 4. In stage 2, browning can be overcome with a 100% success rate on 100% MS solid media addition of BAP 1.0 mg / L with A2B3 treatment (Vitamin C / 1 mg / L ascorbic acid, 4.00 g / L activated charcoal) placed in the dark room.

Keywords: ironwood (*Eusideroxylon zwageri*), browning, activated charcoal, vitamin C

PENDAHULUAN

Ulin (*Eusideroxylon zwageri*) merupakan salah satu tumbuhan asli Indonesia yang pertumbuhannya tersebar di hutan tropika, antara lain di Sumatera bagian selatan dan Kalimantan. Tanaman ulin mempunyai manfaat baik sebagai produk kayu maupun produk non kayu yang mempengaruhi ekologi dan kehidupan sosial budaya. Ulin sebagai salah satu komoditas ekspor yang bernilai ekonomi tinggi. Tanaman khas Kalimantan yang bernilai ekspor tinggi ini, saat ini keberadaannya sudah mulai punah, disebabkan adanya kegiatan eksploitasi yang secara besar-besaran untuk memenuhi permintaan pasar. Berdasarkan hasil pertemuan Asia Regional Workshop tahun 1998 yang diselenggarakan di Hanoi (Vietnam) *International Union for Conservation of Nature and Natural Resource* (IUCN), ditetapkan bahwa ulin berada pada status *Vulnerable A1cd+2cd* artinya peka atau sedang menghadapi resiko yang tinggi untuk mengalami kepunahan dan telah dievaluasi untuk dimasukkan kedalam *Appendix II Conservation on International Trade in Endangered Species of Flora and Fauna* (CITES), yaitu spesies yang terancam punah terlebih lagi bila ekspor terus berlanjut tanpa adanya pengaturan (IUCN, 2014). Oleh karena itu, perlu konservasi yang bertujuan untuk mengembangkan metode menghindari kepunahan spesies.

Pembiakan ulin dengan biji membutuhkan waktu yang cukup lama, karena perkecambahannya bijinya membutuhkan waktu yang lama antara 6–12 bulan. Sedangkan benih ulin merupakan benih rekalsitran, artinya viabilitasnya cepat menurun, sehingga tidak dapat bertahan dalam jangka waktu yang lama. Oleh karena itu, untuk mengatasi ancaman kepunahan ulin diperlukan penyediaan bibit secara vegetatif. Solusi tepat untuk tumbuhan yang sulit dikembangbiakan secara generatif konvensional ini ialah dengan cara kultur *in vitro*. Perbanyakannya melalui kultur *in vitro* dapat menghasilkan anakan dalam jumlah besar, seragam, tidak tergantung musim dan lebih cepat daripada secara konvensional (Anjum, 2006).

Menurut Nirmala. R. 2017 (*personal communication*), kendala utama untuk memperoleh bibit tanaman ulin melalui kultur jaringan adalah terjadinya *browning* karena adanya oksidasi fenol dari irisan eksplan yang dilukai pada saat inisiasi regenerasi. Hal ini diketahui dari hasil penelitian terdahulu yang menunjukkan hasil yang tidak signifikan, dengan hanya menggunakan vitamin C dan arang aktif, sehingga diperlukan prakondisi dengan

perlakuan pH rendah. Sesuai yang dinyatakan (George dan Sherrington 1984) tingkat oksidasi fenol dapat dikurangi pada pH yang rendah karena dapat mengurangi aktivitas enzim spesifik atau pengurangan substrat untuk oksidasi.

Metode untuk mengatasi permasalahan pencokelatan telah dilakukan menggunakan arang aktif sebagai adsorban (Abdelwahd *et al.*, 2008, Arditti, 2008, Thomas, 2008) dan vitamin C sebagai antioksidan (Ko *et al.*, 2009, Rabha, 2008, Taji *et al.*, 1997). Beberapa penelitian terkait mengenai metode mengatasi *browning*, dengan penggunaan arang aktif pada tanaman anggrek (*Dendrobium lasianthera*) (Muhammad Heikal, 2011), penggunaan vitamin C pada tanaman pisang Cavendish (Ko *et al.*, 2009), tanaman Faba beans (*Vicia faba*) (Rabha, 2008) sudah pernah dikaji, namun kajian secara optimal penggunaan arang aktif dan vitamin C untuk mengatasi *browning* pada tanaman ulin masih belum dikembangkan dengan baik.

Penelitian ini difokuskan untuk mengetahui metode yang tepat dalam mengatasi *browning*, yang menjadi hambatan untuk inisiasi regenerasi. Berdasarkan uraian diatas, maka perlu dilakukan suatu penelitian yang diawali dengan perendaman eksplan pada media cair dengan pH rendah, selanjutnya disubkultur ke media padat yang dilengkapi dengan pemberian arang aktif dan vitamin C kemudian ditempatkan diruang inkubasi dengan pencahayaan gelap dan terang untuk mengatasi *browning* pada eksplan ulin, sehingga inisiasi regenerasi Ulin secara *in vitro* dapat tercapai dengan optimal.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan selama tiga bulan (April - Juni 2018), di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Mulawarman, Samarinda. Penelitian ini terbagi atas 2 tahapan yang berkelanjutan. Pada tahap 1 pra kondisi dengan perlakuan pengaturan pH yang kemudian dilanjutkan pada tahap 2 perlakuan vitamin C dan arang aktif yang dilengkapi pengaturan pencahayaan gelap dan terang diruang inkubasi.

Bahan yang digunakan sebagai eksplan adalah biji ulin (*Eusideroxylon zwageri*). Bahan yang digunakan untuk sterilisasi eksplan yaitu alcohol, aquades, sabun cair, fungisida, bakterisida, detol, asam sitrat dan betadin. Sedangkan bahan yang digunakan untuk media kultur adalah media MS (Murishage dan Shoog), benzyl amino purin (BAP), sukrosa, agar-agar, larutan pengatur pH (KOH dan HCL), aquades, vitamin C dan arang aktif. Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *laminar air flow cabinet* (L AFC), spatula, pH meter, hand sprayer, gunting, timbangan analitik, pinset, Lampu Bunsen, botol kultur, Erlenmeyer, pipet, autoklap, petridisc, label perlakuan plastic, karet, tisu, alat tulis dan alat dokumentasi.

Prosedur Penelitian meliputi: Persiapan Eksplan, Sterilisasi Alat, Pembuatan media prakondisi atau tahap 1, Pembuatan media perlakuan atau tahap 2, Sterilisasi Eksplan, Inokulasi Eksplan.

Metode Analisis Pengamatan Perlakuan, Parameter kualitatif yang diamati adalah warna eksplan, yaitu coklat dan tidak coklat. Apabila pada tepi eksplan terdapat warna coklat maka eksplan dinyatakan mengalami pencokelatan, jika warna eksplan tetap berwarna putih kecoklatan maka dinyatakan hidup. Parameter kuantitatif yang diamati adalah jumlah eksplan yang mengalami pencoklatan dan tidak mengalami pencoklatan dalam hal ini dihitung dalam persen. Eksplan yang mengalami *browning* diberi tanda negatif (-) dan eksplan yang tidak mengalami *browning* di beri tanda positif (+).

HASIL DAN PEMBAHASAN

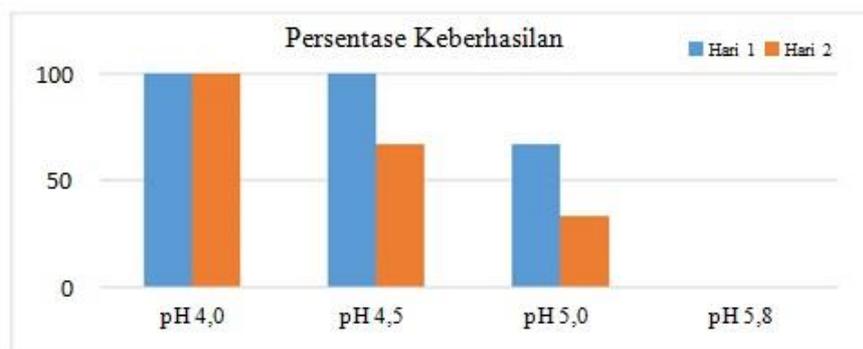
Penelitian Tahap I Pra kondisi (Media Cair MS 50% dengan perlakuan pH dan L-cystein)

Tahapan 1 prakondisi perendaman eksplan ulin pada media cair MS 50% dengan pengaturan pH untuk mengatasi *browning* terhadap eksplan ulin dilakukan sebanyak 3 kali percobaan dengan ulangan masing-masing perlakuan sebanyak 3 ulangan. Hasil penelitian perendaman eksplan ulin selama 2 hari, diperoleh data rata-rata persentase keberhasilan dalam mengatasi *browning* sebagai berikut.

Table 1. Data pengamatan rata-rata keberhasilan mengatasi *browning* dengan perlakuan pengaturan pH dan L-Cystein

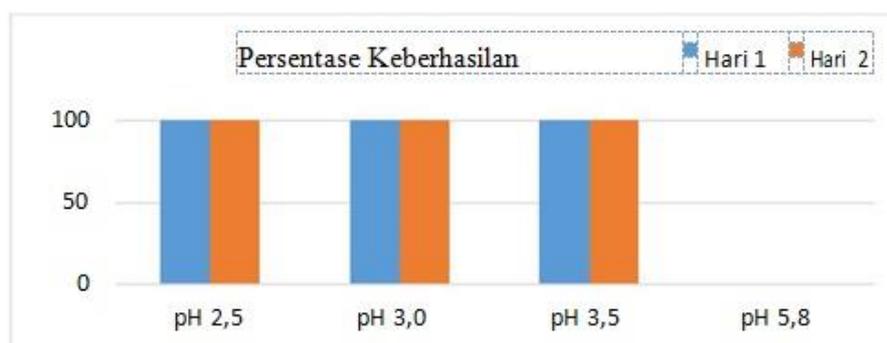
Perlakuan pH	Pengamatan Keberhasilan Mengatasi <i>browning</i> (%)	
	Hari ke-1	Hari ke-2
5,8	0	0
5	66,67	33,33
4,5	100	66,67
4	100	100
3,5	100	100
3	100	100
2,5	100	100

Pada percobaan Pra kondisi perlakuan perendaman eksplan selama 2 hari dengan menggunakan media cair MS 50% dengan pengaturan pH. Berdasarkan hasil pengamatan pada hari ke 2, diperoleh pada perlakuan pH 4,0; 3,5; 3,0; 2,5 yang terbaik dengan tingkat keberhasilan 100% (dapat dilihat pada grafik gambar 1 dan gambar 2). Percobaan pertama dengan perendaman eksplan ulin pada media cair MS 50% dengan pH 5,8 : 5 ; 4,5 ; 4. Setiap perlakuan pH sebanyak 3 ulangan, perendaman eksplan selama 2 hari.



Gambar 1. Grafik percobaan pertama rata-rata persentase keberhasilan dengan perlakuan pH

Percobaan kedua dengan perendaman eksplan ulin pada media cair MS 50% dengan pH 5,8 : 3,5 ; 3,0 ; 2,5. Setiap perlakuan pH sebanyak 3 ulangan, perendaman eksplan selama 2 hari.

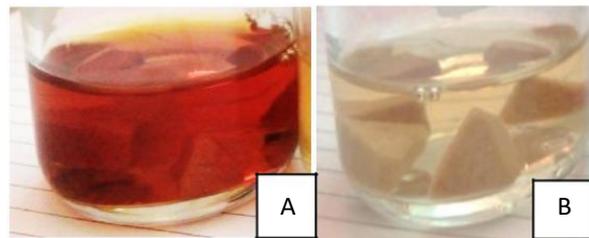


Gambar 2. Grafik percobaan kedua rata-rata persentase keberhasilan dengan perlakuan pH

Berdasarkan hasil pengamatan pada hari ke 2 eksplan tidak mengalami *browning* pada pH 4,0; 3,5; 3,0; 2,5, diperoleh pada pH terbaik 4,0 dan 3,5 eksplan tidak mengalami *browning*. Pada pH 3,0 dan 2,5 eksplan menunjukkan gejala kematian. Hal ini diakibatkan karena pH terlalu rendah unsur-unsur dalam media tidak dapat diserap maksimal oleh eksplan, yang disebabkan tingginya kadar asam pada media mengakibatkan

pertumbuhan sel-sel eksplan terhambat. Reaksi pencoklatan umumnya terjadi pada pH 9 sampai pH 10,5. Pada pH rendah, banyak gugus amino yang terprotonasi sehingga hanya sedikit asam amino yang tersedia untuk reaksi pencoklatan (Eriksson, 1981) dengan cara menurunkan pH dapat menyebabkan enzim polifenolase (PPO) menjadi inaktif. Hal ini disebabkan karena pada pH rendah tingkat oksidasi fenol tidak berlangsung sehingga terhambatnya aktivitas enzim spesifik atau pengurangan substrat untuk oksidasi. Aktivitas oksidasi polifenol tertinggi pada pH 6,5 dan menurun pada pH lebih rendah (Ichihashi dan Kako 1977 dalam George dan Sherrington 1984).

Perendaman eksplan pada pra kondisi dilakukan selama 2 hari dengan menggunakan media cair MS 50%. Berdasarkan pengamatan perendaman terbaik dengan menggunakan media cair MS 50% selama 1 hari yang dapat mempertahankan sel-sel eksplan tetap hidup karena mendapatkan suplai nutrisi yang dibutuhkan eksplan dalam proses pertumbuhan. Pada pengamatan hari ke 2 terjadi penurunan tingkat keberhasilan dalam mengatasi *browning*.



Gambar 4. Warna eksplan pada perlakuan pra kondisi dengan perlakuan pH (A) eksplan mengalami pencoklatan (B) eksplan tidak mengalami pencoklatan.

Penelitian Tahap II (Perlakuan Penambahan Vitamin C dan Arang Aktif serta Perlakuan Pengaturan Pencahayaan Penyimpanan Eksplan pada Ruang Inkubasi Gelap dan Ruang Inkubasi Terang)

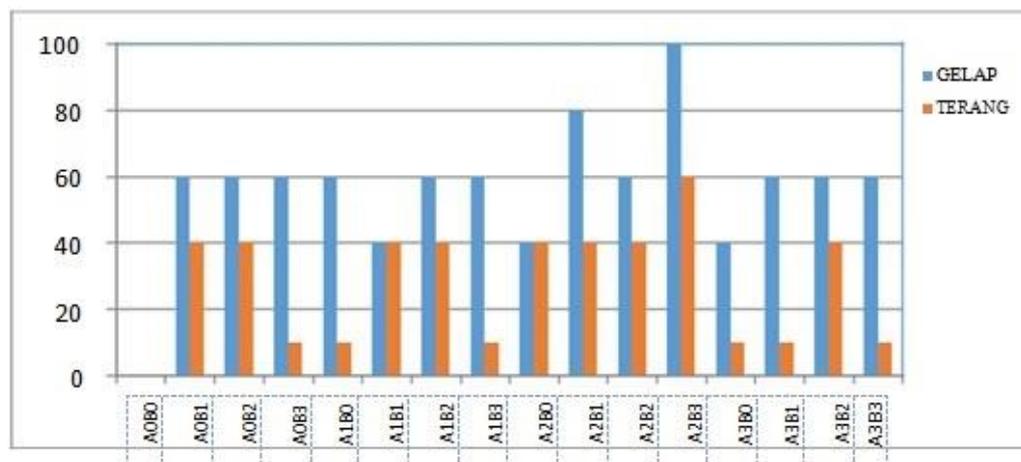
Percobaan tahapan kedua dengan media padat MS 100% dengan kombinasi BAP 1,0 mg/L. Faktor A terdiri dari empat taraf yaitu, A0: tanpa penambahan Vitamin C, A1: penambahan Vitamin C 0,5 mg/l, A2: penambahan Vitamin C 1 mg/, A3: penambahan Vitamin C 1,5 mg/l. Faktor B terdiri dari empat taraf yaitu, B0: tanpa penambahan arang aktif, B1: dengan penambahan arang aktif 2,00 g/l, B2: dengan penambahan arang aktif 3,00 g/l dan B3: dengan penambahan arang aktif 4,00 g/l dengan kombinasi perlakuan A0B0, A0B1, A0B2, A0B3, A1B0, A1B1, A1B2, A1B3, A2B0, A2B1, A2B2, A2B3, A3B0, A3B1, A3B2, A3B3 dengan ulangan sebanyak 10 kali. Pada setiap 16 perlakuan dengan 10 ulangan, yang dimana setiap perlakuan dibagi menjadi dua bagian yaitu 5 ulangan pada ruang terang dan 5 ulangan pada ruang gelap.

Table 2. Data pengamatan rata-rata keberhasilan mengatasi *browning* dengan perlakuan Vitamin C dan Arang Aktif yang ditempatkan di ruang gelap dan ruang terang.

Nomor	Kode Perlakuan	Pengamatan Keberhasilan Mengatasi <i>browning</i> (%) Hari ke-7	
		Ruang Gelap	Ruang Terang
1	A0B0	0	0
2	A0B1	60	40
3	A0B2	60	40
4	A0B3	60	10
5	A1B0	60	10
6	A1B1	40	40
7	A1B2	60	40
8	A1B3	60	10
9	A2B0	40	40
10	A2B1	80	40
11	A2B2	60	40
12	A2B3	100	60

13	A3B0	40	10
14	A3B1	60	10
15	A3B2	60	40
16	A3B3	60	10
Rata-rata		56,25	31,25

Pada percobaan perlakuan Vitamin C dan Arang Aktif yang ditempatkan di ruang gelap dan ruang terang, didapatkan rata-rata keberhasilan mengatasi *browning* terbaik pada pengamatan perlakuan A2B3 (Vitamin C/asam askrobat 1 mg/L, arang aktif 4,00 g/L) pada ruang gelap dengan tingkat keberhasilan 100% (dapat dilihat pada grafik gambar 5).



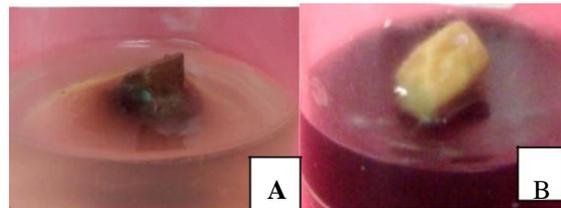
Gambar 5. Persentase tingkat keberhasilan mengatasi browning dengan perlakuan dengan pemberian Vitamin C dan Arang aktif yang ditempatkan pada ruang gelap dan ruang terang

Hasil pengamatan perlakuan dengan parameter kualitatif dan kuantitatif menunjukkan bahwa pengamatan dilakukan selama 7 hari dengan pemberian arang aktif dan vitamin C. Keberhasilan eksplan tidak mengalami *browning*, pada pengamatan perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan pada media A2B3 (Vitamin C/asam askrobat 1 mg/L, arang aktif 4,00 g/L) yang ditempatkan pada ruang gelap merupakan yang terbaik dengan tingkat keberhasilan 100%, dimana eksplan tidak mengalami *browning* dikarenakan arang aktif memiliki permukaan relatif bebas dari deposit, permukaan luas dari pori-pori telah terbuka sehingga memiliki daya serap tinggi terhadap phenol, rendered oksodase phenol, menginaktifkan peroksidase serta menghilangkan pewarnaan. Dengan penambahan arang aktif pada media MS berpengaruh terhadap eksplan. Menurut kumar et al (2005), arang aktif tidak hanya menstimulasi difusi nutrisi, gas dan respirasi dari tunas tetapi juga dapat menyerap eksudat yang tidak penting misalnya 5-hydroxymethylfurfural dan senyawa fenolik berbahaya lain. Didalam kultur in vitro arang aktif disamping menyerap senyawa toksik juga dapat memacu inisiasi akar dan embriogenetik somatik (George and Sherington, 1984). Arang aktif dapat menyerap cahaya pada permukaan permukaan medium sehingga tidak tembus sampai bawah medium. Oleh karena itu cahaya tidak dapat menstimulasi yang dapat mengoksidasi fenol.

Dalam reaksi pencoklatan enzimatis, asam askorbat berperan sebagai antioksidan yang menghasilkan oksigen pada permukaan. Selain itu secara langsung dengan mereduksi o-quinon kembali menjadi o-diphenol, bereaksi dengan quinon-quinon pada komponen yang mengalami perubahan warna dan menekan kerja enzim (Zawitowski, Biliaderis & Eskin, 1991). Menurut Winarno (1986), vitamin C atau asam askorbat merupakan suatu senyawa reduktor dan dapat bertindak sebagai prekursor untuk pembentukan warna coklat non-enzimatis. Asam askorbat berada dalam keseimbangan dengan asam dehidroaskorbat. Dalam suasana asam, cincin lakton asam dehidroaskorbat terurai secara irreversibel dengan membentuk senyawa diketoglukonat dan kemudian berlangsunglah reaksi pencoklatan. Asam askorbat mereduksi o-quinon dengan 2 gugus hidroksilnya (pada C2 dan C3), sehingga o-quinon yang dapat berperan sebagai oksidator yang baik, asam askorbat sebagai pereduksi mengakibatkan reaksi oksidasi-reduksi berlangsung relatif cepat. Reaksi ini mencegah terbentuknya polimer o-quinon. Oksigen dapat mengoksidasi vitamin C menghasilkan asam dehidroaskorbat dan hidrogen peroksida.

Oksigen yang telah bereaksi dengan vitamin C mencegah oksidasi o-difenol. Dengan tidak terbentuknya o.quinon sebagai hasil oksidasi o-diphenol berarti pencoklatan dapat dicegah (Schuler, 1990).

Hasil pengamatan pada perlakuan ruang penyimpanan atau inkubasi gelap dan ruang inkubasi terang selama 7 hari setelah tanam, pada ruang gelap rata-rata tingkat keberhasilan mengatasi browning yaitu 56,25% dibandingkan dengan ruang terang yaitu 31,25%. Pencoklatan pada eksplan tersebut kemungkinan terjadi karena faktor cahaya, pencoklatan dapat berkurang dan dapat dihindari dengan perlakuan ruang gelap. Perubahan warna eksplan menjadi coklat pada kultur jaringan tanaman ulin terjadi karena akumulasi polifenol oksidase yang dilepas atau disintesis jaringan dan kondisi teroksidasi ketika sel dilukai, aktivitas enzim, biosintesis dan oksidasi fenol akan meningkat dengan adanya cahaya. Ozyigil (2008) mengatakan bahwa sintesis senyawa fenol dipengaruhi oleh faktor genetik dan faktor lingkungan. Sementara itu, Kefeli (2003) mengatakan bahwa cahaya tampak dapat meningkatkan biosintesis senyawa fenol pada kloroplas, sintesis fenol terjadi pada kloroplas kemudian terakumulasi pada vakuola atau membentuk lignin.



Gambar 6. Warna eksplan pada pengamatan perlakuan dengan media padat MS 100% dengan perlakuan kombinasi vitamin C dan Arang aktif (A) eskpaln mengalami pencoklatan (B) eksplan tidak mengalami pencoklatan.



Gambar 7. Ruang Inkubasi Kultur Jaringan (A) ruang gelap (B) ruang terang

Pengamatan Fase Inisiasi

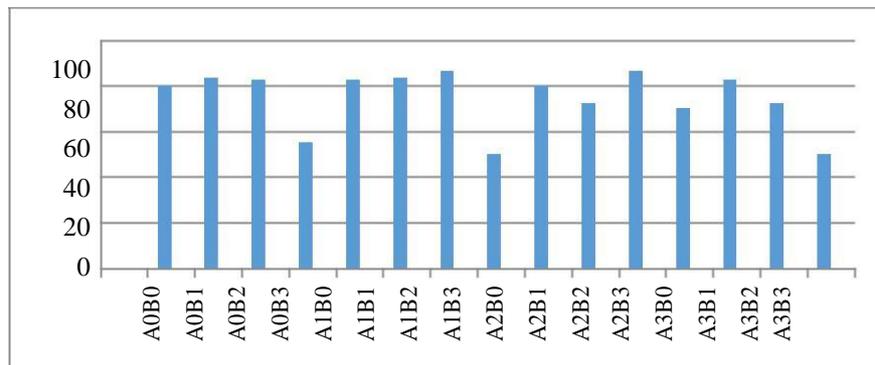
Pengamatan Fase inisiasi dilakukan pada 16 perlakuan dengan masing-masing perlakuan 10 ulangan sebagai berikut: A0B0, A0B1, A0B2, A0B3, A1B0, A1B1, A1B2, A1B3, A2B0, A2B1, A2B2, A2B3, A3B0, A3B1, A3B2, A3B3.

Tabel 3. Data pengamatan rata-rata serangan bakteri dan jamur pada fase inisiasi

Nomor	Kode Perlakuan	Persentase rata-rata (%) serangan bakteri dan jamur
1	A0B0	0
2	A0B1	80
3	A0B2	83,33
4	A0B3	82,5
5	A1B0	55
6	A1B1	82,5
7	A1B2	83,33
8	A1B3	86,66
9	A2B0	50
10	A2B1	80

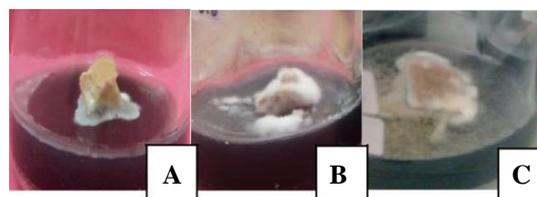
11	A2B2	72,5
12	A2B3	86,66
13	A3B0	70
14	A3B1	82,5
15	A3B2	72,5
16	A3B3	80

Berdasarkan hasil pengamatan yang telah dilakukan terhadap daya adaptasi eksplan dalam kondisi *in vitro*, didapatkan rata-rata tingkat kontaminasi tertinggi pada perlakuan A1B3 dan A2B3 dengan tingkat kontaminasi 86,66%. Pada Hari ke-4 HST terjadi kontaminasi bakteri sampai hari ke-7 terdapat kontaminasi bakteri dan jamur sehingga pengamatan tidak dapat dilanjutkan karena kondisi eksplan tidak memungkinkan untuk dilakukan pengamatan selanjutnya (dapat dilihat pada grafik gambar 8).



Gambar 8. Persentase rata-rata serangan bakteri dan jamur

Hasil pengamatan yang didapatkan dengan rata-rata kontaminasi tertinggi pada perlakuan A1B3 dan A2B3 dengan tingkat kontaminasi 86,66%. Pada hari ke-1 sampai hari ke-3 eksplan menunjukkan respon yang baik pada beberapa perlakuan. Pengamatan pada hari ke-4 terjadi kontaminasi dari bakteri dan jamur. Pada hari ke-4 kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri sedangkan kontaminasi bakteri dan jamur pada hari ke-7 sehingga pengamatan dihentikan pada hari ke-7, eksplan tidak dapat inisiasi regenerasi selanjutnya karena sumber kontaminan akan menurunkan aktivitas metabolisme eksplan. Adanya kontaminasi diduga karena adanya mikroba didalam jaringan yang tidak dapat hilang dengan sterilisasi permukaan saja karena beberapa bakteri dapat hidup didalam jaringan tanaman. Tanaman ulin merupakan tanaman berkayu yang berasal dari lapangan yang tumbuh dalam kelembaban yang tinggi yang dimana dapat mendukung keberlangsungan hidup mikroba.



Gambar 9. Pengamatan fase inisiasi (A) kontaminasi oleh bakteri (B) kontaminasi oleh jamur (C) kontaminasi oleh bakteri dan jamur

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diperoleh metode untuk mengatasi *browning* pada eksplan ulin (*Eusideroxylon zwageri*) yang terbagi atas 2 tahapan sebagai berikut:

1. Pada tahapan 1 (pra kondisi) *browning* dapat diatasi dengan tingkat keberhasilan 100%, eksplan yang direndam selama 24 jam pada media cair MS 50% dengan pH 4.
2. Pada tahapan 2, *browning* dapat diatasi dengan tingkat keberhasilan 100% pada media padat MS 100% penambahan BAP 1.0 mg/L dengan perlakuan A2B3 (Vitamin C/asam askrobat 1 mg/L, arang aktif 4,00 g/L) yang ditempatkan pada ruang gelap.

SARAN

Disarankan perlu dilakukan penelitian lanjutan, sehingga dapat diperoleh hasil yang signifikan untuk regenerasi eksplan ulin menjadi planlet, dengan demikian kepunahan Ulin (*Eusideroxylon zwageri*) pun dapat dihindari. Untuk mendukung keberhasilan ini perlu diperhatikan sterilisasi agar tidak terjadi kontaminasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelwahd, R., N. Hakam, M. Labhilili & S.M. Udupa. 2008. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in vitro plantlet regeneration of Faba bean. *African Journal of Biotechnology* 7(8): 997-1002.
- Aliyu and O. Mashood. 2005. Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale L.*) breeding: An appraisal. *African Journal of Biotechnology* 4(13):1485-1489.
- Anjum, S., M. Zia & M.F. Chaudary. 2006. Investigations of different strategies for high frequency regeneration of *Dendrobium malones* 'Victory'. *African Journal of Biotechnology* 5(19): 1783-1743.
- Arditti, J. & R. Ernst. 1993. *Micropropagation of orchids*. John Wiley & Sons, Inc., New York: xiii + 682 hlm.
- Eka, Handayani I., Sakka, Samudin., dan Zainuddin Basri. 2013. The Growth Of Dragon Fruit Explants (*Hylocereus undatus*) at Various Planting Position And Media Composition Via In Vitro Culture. e-J. Agrotekbis 1.
- George, E.F., M.A. Hall & G.J. De Klerk. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. Springer, Dordrecht, Netherlands: ix + 501 hlm.
- Hutami, S. 2006. Penggunaan arang aktif dalam kultur *in vitro*. *Jurnal AgroBiogen* 4(2):83-88 (IUCN International Union for Conservation of Nature and Natural Resource. The IUCN red list of threatened species (Internet). (diunduh Agustus 2017) tersedia pada: <http://www.iucnredlist.org>.
- Ko, W. H., C. L. Chen and C. P. Chao. 2009. Control of Lethal Browning of Tissue Culture Plantlets of Cavendish Banana cv. Formosana with Ascorbic Acid. *Biomedical and Life Sciences* Vol. 96(2): 137-141.
- Mohammad Wahyu Dewanto. 2014. Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh BAP dan NAA terhadap Pertumbuhan Tunas Ulin (*Eusideroxylon zwageri T. et B.*) secara in Vitro. Skripsi. Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Muhammad Haikal. 2011. Pengaruh Arang Aktif Terhadap Pencoklatan Pada Kultur Daun (*Dendrobium lasianthera J.J.Sm*). Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Depok.
- Newton, R.J., W. Tang, and L.C.V. Outhavong. 2004. Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. *Physiol Plant* 122(3):386-395.
- Nirmala. R. 2017. Kendala utama untuk memperoleh bibit tanaman ulin melalui kultur jaringan, (*personal communication*). April 2017.
- Noorhidayah dan Sidiyasa, K. 2006. Konservasi Ulin (*Eusideroxylon zwageri teijsm & Binn*) dan Pemanfaatannya sebagai Tumbuhan Obat. *Info Hutan* III.
- Rabha, A., N. Hakam., M. Labhilili and S.M. Udupa. 2008. Use of an Adsorbent and Antioxidants to Reduce the Effects of Leached Phenolis in *In Vitro* Planlet Regeneration of *Faba Beans*. *African Journal of Biotechnology* Vol.7(8): 997-1002.
- Soerianegara, I. dan R.H.M.J. Lemmens. 1993. *Plant Resources of South-East Asia*. Pudoc Scientific Publishers. Wageningen.
- Tabiyeh, D.T., F. Bernard, and H. Shacker. 2006. Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in *Pistacia vera* shoot tips culture. *ISHS Acta Hort* 726.
- Taji, M., W.A. Dodd and R.R. Williams. 1997. *Plant Tissue Culture Practice*. 3rd Ed. University of New England Printery, Armidale. NSW, Australia.
- Thomas, T.D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* 26: 618-631. Widiastoety, D dab B. Marwoto. 2004. Pengaruh Berbagai Sumber Arang dalam Media Kultur in Vitro Terhadap Pertumbuhan Plantlet *Oncidium*. *J. Hort* 14:1-5.