

PENCEGAHAN BROWNING PADA EKSPLAN IN VITRO UNTUK PERBANYAKAN TANAMAN *Lilium longiflorum*

Ni Kadek Dwipayani Lestari^{1*}, Ni Wayan Deswiniyanti¹,
Ida Ayu Astarini², Luh Made Arpiwi²

¹Program Studi Biologi, FIKST, Universitas Dhyana Pura, Dalung, Badung 80361

² Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Udayana University

Email: dwipayanilestari@undhirabali.ac.id*

ABSTRAK

Tanaman *Lilium longiflorum* pada umumnya diperbanyak dengan menggunakan pemisahan umbi, namun terdapat kendala yaitu tanaman yang diperbanyak terbatas, memerlukan lahan dan tergantung kondisi cuaca dengan waktu yang relatif cukup lama. Maka, diperlukan metode baru yaitu salah satunya metode kultur in vitro karena metode ini tidak tergantung pada lahan, cuaca dan dapat memperbanyak tanaman dengan jumlah yang banyak dan cepat, namun metode ini pun memiliki kelemahan yaitu adanya kontaminasi serta terjadi browning pada eksplan, maka diperlukan suatu metode untuk mengatasinya. Penelitian ini bertujuan mengetahui metode eliminasi browning yang efektif diantara perlakuan perendaman eksplan dalam asam askorbat dan asam sitrat. Pengamatan meliputi waktu rata-rata eksplan mengalami browning, intensitas browning seluruhnya atau sebagian dan persentase eksplan browning hingga 35 hari setelah tanam (HST). Berdasarkan hasil yang diperoleh dari perlakuan perendaman asam sitrat 500 mg/l dan asam askorbat 300 mg/l selama 30 menit dapat menurunkan waktu inisiasi browning hingga 88 % pada eksplan daun muda, 100 % pada eksplan pedicel dan 64 % pada eksplan ovarium. Menurunkan intensitas browning pada eksplan daun muda dan ovarium. Menurunkan persentase browning sebesar 80% pada eksplan daun, 0% pada eksplan pedicel dan 36% pada eksplan ovarium.

Kata kunci : browning, eksplan, asam sitrat, asam askorbat, lilium

ABSTRACT

Lilium longiflorum plants are generally propagated by using bulbs, but there are some so-called limited-multiplied plants, broad conditions and depending on the conditions for a long time. So, a new method is needed, which is one of the culture methods in vitro because this method does not depend on the land, weather and can multiply plants in large and fast numbers, but this method also has weaknesses, such as mathematics and browning occurs in explants, so some things required. methods to overcome them. This study aims to eliminate the effect of effective skin color between soaking treatment in ascorbic acid and citric acid. Observations include the average time of brown, brown, or part and all explants explants to reach 35 days after planting (HST). The results obtained from soaking citric acid 500 mg / l and ascorbic acid 300 mg / l for 30 minutes can reduce browning initiation time by 88% on young leaf explants, 100% on pedicel explants and 64% on ovarian explants. Reduces browning intensity on young leaf and ovarian explants. Reducing the amount of browning by 80% on leaf explants, 0% on pedicel explants and 36% on ovarian explants.

Keywords: browning, explants, citric acid, ascorbic acid, lilium

1. Pendahuluan

Bunga lili berasal dari kelompok family Liliium yang terdiri dari kurang lebih 100 spesies di Eurasia dan benua Amerika Utara. Kebanyakan spesies lily berasal dari Asia Tenggara yaitu dari Cina, semenanjung Korea dan Jepang. Sekelompok besar spesies lainnya berasal dari Amerika Utara (Veli and Pelkonen, 2005). Bunga lili diklasifikasikan menjadi tiga kelompok yaitu hibrida Longiflorum, Asiatic dan Oriental. Bunga lily merupakan bunga potong yang mempunyai nilai ekonomi tinggi (Zhou et al., 2008; Saetiew and Umamait, 2015; Deswiniyanti dkk., 2012). Namun untuk perbanyakan bunga tersebut ditemui kendala antara lain keterbatasan bahan tanam yang berkualitas baik dalam jumlah besar (Sri et al., 1998)

Perbanyakan lili pada umumnya dilakukan dengan benih umbi berukuran lebih dari 3,5 cm. Namun, perbanyakan dengan benih umbi kurang disukai karena hasil perbanyakan sangat rendah dan memakan waktu lama, sedangkan permintaan terhadap lili makin meningkat. Oleh karena itu, perlu dikembangkan teknik perbanyakan yang dapat menghasilkan tanaman dalam jumlah besar dalam waktu singkat (Chen et al., 2000; Marlina, 2009). Untuk mendapatkan tanaman yang seragam dalam jumlah besar dan umur produksi lebih singkat dengan kualitas bunga yang baik dapat diperoleh dari perbanyakan lili secara *in vitro* (Priyono, 2001; Nursyamsi, 2010). Pemanfaatan teknologi kultur jaringan untuk tujuan perbanyakan bibit telah diaplikasikan pada berbagai tanaman liliium antara lain *Lilium ledebourii* (Azadi and Khosh-Khui, 2007), *Lilium orientalis* dan *Lilium longiflorum* (Farah et al., 2013), *Lilium longiflorum* (Lestari dkk., 2012).

Perbanyakan melalui kultur *in vitro* juga memiliki kelemahan yaitu dalam teknik perbanyakannya eksplan berubah menjadi coklat (*browning*) atau hitam (*blackening*) setelah isolasi yang selanjutnya dapat menghambat pertumbuhan dan akhirnya menyebabkan kematian jaringan (Hutami, 2008). Upaya mengatasi *browning* pada kultur tanaman dapat dilakukan antara lain dengan penambahan senyawa antioksidan seperti asam askorbat, modifikasi lingkungan kultur dengan menempatkan dalam ruang gelap total, subkultur berulang atau pencelupan dalam cairan seperti arang aktif dan sukrosa. Pada beberapa kasus, satu jenis perlakuan pencegahan *browning* seringkali tidak cukup efektif sehingga kadang kala kombinasi perlakuan perlu dilakukan (Admojo dan Indrianto, 2016)

Penelitian metode pencegahan *browning* yang telah dilakukan oleh Admojo dan Indrianto (2016) pada tanaman karet dengan perendaman asam askorbat 100 mg/L steril dan arang aktif 2 g/L dapat menurunkan jumlah eksplan *browning* sebanyak 7,5%. Pada tanaman *Sideritis trojana* Bornm., penambahan antioksidan 100 mg/L asam askorbat dan 50 mg/L asam sitrat pada media, penyimpanan kultur dalam ruang gelap dan subkultur secara cepat setiap minggu lebih efektif dalam mencegah *browning* dibandingkan dengan perlakuan tunggal (Corduk dan Aki, 2011) Pada tanaman pir (*Pyrus communis* L.), kombinasi antioksidan (100 mg/L asam askorbat dan 150 mg/L asam sitrat) sebagai pra perlakuan selama 1 jam + Polyvinyl pyrrolidone (PVP) 160 mg/L dan arang aktif 200 mg/L yang ditambahkan pada media signifikan mengurangi nekrosis dan *browning* (Esmail et al., 2014).

Penelitian ini diharapkan mendapatkan metode dan konsentrasi yang tepat pada perlakuan pra kultur untuk pencegahan *browning* pada ekplan daun, pedicel dan ovarium pada tanaman lili (*Lilium longiflorum*)

2. Metode

Metode penelitian ini terdiri dari tahap pembuatan media, sterilisasi eksplan, perlakuan pra kultur dan perlakuan kultur

Pembuatan media

Timbang agar 7,5 gram/lit, gula 20 gram/lit, media VW 4 gram/lit dan ditambahkan aquadest sampai 1 liter. Untuk media perlakuan NAA dan BAP dalam media ditambahkan masing – masing perlakuan 0mg/l IAA dan BAP, 0,5 mg/lit NAA dan 1 mg/lit BAP dan 1 mg/lit NAA dan BAP, ukur pH media, bila asam tambahkan NaCL dan bila basa tambahkan larutan HCl. Selanjutnya dimasukkan dalam botol kultur dan ditutup dengan aluminium foil dan autoklaf 15 menit degan tekanan 15 psi.

Sterilisasi eksplan

Sterilisasi eksplan daun muda, pedicel dan ovarium dengan cuci bersih dengan sabun lalu dibilas dengan air bersih dengan mengalir. Selanjutnya direndam dengan bakterisida dan fungisida 10% selama 15 menit dan dibilas air steril direndam dengan sodium hipoklorit 10%, 20% masing – masing selama 10 menit. Masing – masing eksplan dibilas dengan air steril.

Perlakuan Pra Kultur

Eksplan yang telah disterilisasi direndam dalam larutan steril asam sitrat 500 mg/l dan 300 mg/l asam askorbat selama 30 menit dengan sesekali diaduk perlahan. Selanjutnya eksplan direndam dalam alkohol 70% selama 5 menit dalam laminar air flow dan dibilas air steril. Dan perlakuan untuk kontrol tanpa perendaman asam askorbat dan asam sitrat. Masing – masing perlakuan pra kultur diulang sebanyak 3 kali.

Perlakuan Kultur

Masing – masing eksplan selanjutnya ditanam dalam media VW0 (tanpa NAA dan BAP), VW1 (0,5 mg/l NAA dan BAP), VW2 (1 mg/l NAA dan BAP). Kultur kemudian disimpan dalam ruang gelap dengan suhu 25^o C. Masing perlakuan pra kultur dan kultur diulang sebanyak 5 kali dengan jumlah total sampel 45 sampel.

Analisa Data dan Rancang Percobaan

Analisa data yang digunakan yaitu berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kuantitatif dianalisa dengan uji statistis SPSS versi 17. Untuk uji variabel menggunakan uji ANOVA apabila ($P > 0,05$) maka dilanjutkan dengan menggunakan uji Duncan untuk mendapatkan perbedaan antar perlakuan. Hasil disajikan dengan tabel dan gambar serta uraian secara deskriptif.

Variabel penelitian meliputi waktu rata-rata eksplan mengalami browning, intensitas browning seluruhnya atau sebagian dan persentase eksplan browning hingga 35 hari setelah tanam (HST). Untuk intensitas browning berdasarkan penelitian oleh Admojo dan Indrianto (2016), disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Skoring Intensitas Browning

No.	Skoring	Keterangan
1	0-0,24 0	<1/4 bagian eksplan mengalami browning
2	0,25-0,49	<1/2 bagian eksplan mengalami browning
3	0,50-0,74	1/2 - <3/4 bagian eksplan mengalami browning
4	0,75-0,99	3/4 - <1 bagian eksplan mengalami browning
5	1,00	Seluruh bagian eksplan mengalami browning

Rancang percobaan dengan rancangan acak lengkap dengan 2 faktor yaitu perlakuan pra kultur dan perlakuan media kultur. Adapun Diagram alir ditunjukkan Gambar 1.



Gambar 1. Diagram Alir Penelitian

3. Hasil dan Pembahasan

Hasil

Hasil dari penelitian untuk eksplan daun muda disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Rerata Eksplan Daun

Pra kultur	Media kultur	Jumlah eksplan	Jumlah eksplan browning	inisiasi browning (hari)	intensitas browning	% browning
Kontrol	0 NAA dan BAP	5	4,8 ^a	3,6 ^a	1 ^a	96
	0,5 NAA dan BAP	5	4 ^a	3,75 ^a	0,8 ^{ab}	80
	1 NAA dan BAP	5	3,3 ^b	3,83 ^a	0,7 ^b	66
Perlakuan antioksidan	0 NAA dan BAP	5	2,2 ^c	26 ^b	0,3 ^c	44
	0,5 NAA dan BAP	5	1,2 ^d	26,4 ^b	0,2 ^c	24
	1 NAA dan BAP	5	0,8 ^d	30 ^b	0,2 ^c	16

Tabel 2. Hasil Rerata Eksplan Pedicel

Pra kultur	Media kultur	Jumlah eksplan	Jumlah eksplan browning	Inisiasi browning (hari)	Intensitas browning	% browning
Kontrol	0 NAA dan BAP	5	5 ^a	18 ^a	0,8 ^a	100
	0,5 NAA dan BAP	5	4.75 ^a	20 ^a	0.7 ^a	95
	1 NAA dan BAP	5	3 ^b	20 ^a	0,7 ^a	60
Perlakuan antioksidan	0 NAA dan BAP	5	2 ^b	26 ^{ab}	0,3 ^b	40
	0,5 NAA dan BAP	5	1,2 ^c	30 ^{ab}	0,1 ^c	24
	1 NAA dan BAP	5	0 ^d	0 ^c	0 ^c	0

Tabel 3 Hasil Rerata Eksplan Ovarium

Pra kultur	Media kultur	Jumlah eksplan	Jumlah eksplan browning	inisiasi browning (hari)	Intensitas browning	% browning
Kontrol	0 NAA dan BAP	5	5 ^a	11,5 ^a	1 ^a	100
	0,5 NAA dan BAP	5	4,7 ^a	14,1 ^{ab}	1 ^a	94
	1 NAA dan BAP	5	4,5 ^{ab}	15 ^b	0,9 ^{ab}	90
Perlakuan antioksidan	0 NAA dan BAP	5	3,8 ^{bc}	29,2 ^c	0,9 ^{ab}	76
	0,5 NAA dan BAP	5	3,2 ^{bc}	32 ^d	0,8 ^b	64
	1 NAA dan BAP	5	3.2 ^{bc}	32 ^d	0,8 ^b	64

Berdasarkan tabel di atas menunjukkan hasil perlakuan antioksidan dengan penambahan zat pengatur tumbuh dapat mengurangi jumlah eksplan browning memperlambat waktu inisiasi browning dan mengurangi intensitas browning pada eksplan daun, pedicel dan ovarium. Dengan perlakuan antioksidan dan dengan penambahan zat pengatur tumbuh sebesar 0,5 mg/l dan 1 mg/l NAA dan BAP merupakan perlakuan terbaik pada penelitian ini untuk memperlama waktu inisiasi browning dan mengurangi intensitas browning.

Pembahasan

Inisiasi browning

Hasil menunjukkan rata – rata inisiasi browning tercepat pada perlakuan kontrol pada eksplan daun yakni 3,6 HST, eksplan pedicel 18 HST dan pada eksplan ovarium 11,5 HST. Waktu inisiasi browning terlama pada perlakuan perendaman dengan asam sitrat dan asam askorbat dengan penambahan zat pengatur tumbuh NAA dan BAP yaitu secara berturut – turut pada eksplan daun dan pedicel 30 HST dan pada eksplan ovarium 32 HST. Hasil tersebut menunjukkan bahwa perlakuan perendaman dalam larutan antioksidan dan penambahan zat pengatur tumbuh dalam ruang gelap mampu memperlambat waktu kemunculan browning. Menurut Ahmad et al. (1995) waktu yang dibutuhkan untuk pencoklatan *Pistacia vera* dipengaruhi oleh konsentrasi dan kombinasi zat pengatur tumbuh dalam media induksi. Induksi kalus dalam media yang mengandung NAA (2 atau 5 mg/l) atau NAA (5 mg/l) dan kinetin (2,5 mg/l) dapat mempertahankan kalus tetapputih kehijauan selama 10-13 minggu. Sedangkan asam askorbat dan asam sitrat merupakan senyawa antioksidan yang berperan dalam menangkap radikal oksigen bebas sehingga mampu mencegah pengaktifan enzim PPO (*Polyphenol Oxidase*) yang merupakan enzim yang berperan dalam aktifitas browning pada jaringan dan sel Asam askorbat berperan dalam merubah radikal *tocopheryl* menjadi *semi-dehydroascorbic acid*, sehingga tidak berperan dalam membentuk senyawa hidrogen peroksida yang bersifat toksik (Veltman dan Peppelenbos, 2003; Chitbanchong et al., 2009; Krishna et al., 2008).

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari perlakuan perendaman asam sitrat dan asam askorbat dapat menurunkan waktu *browning* hingga 88 % pada eksplan daun muda, 100 % pada eksplan pedicel dan 64% pada eksplan ovarium. Lestari dan Indrianto (2016) melaporkan hasil penelitian menunjukkan perlakuan asam askorbat yang diinkubasi dalam ruang gelap menunjukkan hasil terbaik untuk keseluruhan respon. Waktu terjadinya *browning* yang lama (17 HST), intensitas *browning* lebih rendah (7,5%), dan persentase eksplan yang mengalami *browning* mampu ditekan hingga 30%. Eliminasi *browning* pada eksplan tanaman menggunakan bagian nodul, juga efektif digunakan 200 mg/l asam askorbat

(Ndakidemi, Mneney, dan Ndakidemi, 2014). Salah satu gen kunci yang berperan dalam jalur biosintesis asam askorbat, L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (L-GalLDH), terekspresi. Overekspresi dari L-GalLDH menyebabkan akumulasi asam askorbat dan mengurangi intensitas *browning* pada daun selada setelah dipotong. Hal ini membuktikan, adanya peran asam askorbat endogen sebagai agen pencegah *browning* (Landi et al., 2015).

Intensitas browning

Hasil penelitian pada intensitas browning tertinggi yakni pada seluruh perlakuan kontrol dan turun secara signifikan setelah diberikan perlakuan perendaman dalam asam sitrat dan asam askorbat serta penambahan zat pengatur tumbuh dalam media. Penurunan intensitas tertinggi pada eksplan pedicel eksplan mengalami browning dengan skoring 0,8 dan mengalami penurunan tidak terdapat eksplan yang browning dengan skoring 0, turun hingga 100%. dengan perlakuan larutan antioksidan dan zat pengatur tumbuh. Pada eksplan daun mengalami browning dengan skoring 1 pada perlakuan kontrol dan mengalami penurunan intensitas browning dengan skoring 0,2 dengan perlakuan asam sitrat dan asam askorbat dan zat pengatur tumbuh, turun hingga 80%. Sedangkan pada eksplan ovarium merupakan eksplan dengan penurunan intensitas browning terendah perlakuan kontrol dengan skoring 1 dan mengalami penurunan intensitas browning dengan skoring 0,8 turun sebesar 20% dengan perlakuan asam sitrat dan asam askorbat dan penambahan zat pengatur tumbuh. Ozyigit *et al.* (2007) melaporkan bahwa terbentuknya senyawa fenol yang berperan dalam pencoklatan sel atau browning di pengaruhi oleh struktur kimianya, spesies tanaman, jaringan tanaman atau eksplan yang digunakan, proses biologi (organogenesis atau somatik embriogenesis), dan tahap perkembangannya.

Nahid *et al.*, (2013) melaporkan hasil penelitian mengenai kontrol kontaminasi dan browning pada eksplan tunas dan tangkai daun dengan pra perlakuan PVP, asam askorbat dan asam sitrat (0.1%) selama 9 jam dengan hasil eksplan tunas berhasil dalam penurunan persentase browning dibanding eksplan tangkai daun. Ahmad *et al.*, (2016) juga melaporkan dengan eksplan nodul pada jambu (*Psidium guajava* L.) dapat menurunkan intensitas browning dan persentase browning pada perlakuan penambahan asam askorbat dan asam sitrat pada media dibandingkan dengan menggunakan arang aktif.

Jumlah dan Persentase browning

Berdasarkan hasil penelitian untuk variabel jumlah dan persentase browning terendah pada perlakuan kontrol pada seluruh eksplan. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa hampir seluruh eksplan yang diperlakukan tanpa asam sitrat dan asam askorbat dan zat pengatur tumbuh mengalami browning lebih cepat, lebih banyak mengalami browning dengan intensitas yang lebih tinggi. Newton *et al.* (2004) juga melaporkan bahwa penambahan antioksidan akan mengurangi dan menghambat pencoklatan melalui penurunan akumulasi peroksidase.

Selain adanya perlakuan antioksidan dapat menghambat aktivitas fenol perlakuan dengan penambahan zat pengatur tumbuh dapat membantu menghambat proses browning pada eksplan dan membantu pertumbuhan tanaman. Tabiyeh *et al.* (2006) mengemukakan bahwa pencoklatan dalam kultur jaringan disebabkan karena meningkatnya produksi senyawa fenolat yang diikuti oksidasi oleh aktivitas enzim oksidase (PPO) dan polimerasinya. Fenilalanin amonia liase (PAL) adalah salah satu enzim dalam fenilpropanoid yang sangat berpengaruh terhadap terjadinya pencoklatan. Salah satu penyebab utama pencoklatan dalam kultur *in vitro* adalah luka karena pemotongan pada jaringan. Luka tersebut memacu stres dan menyebabkan peningkatan aktivitas PAL yang diikuti oleh produksi fenilpropanoid dan menyebabkan pencoklatan. Metabolisme fenol mempengaruhi sistem kultur jaringan secara positif dengan metabolisme auksin

(kecepatan pembelahan sel dan sintesis dinding sel serta senyawa - senyawa lain yang berhubungan). Maka dengan penambahan zat pengatur tumbuh dalam media dapat membantu pertumbuhan dan pencegahan browning pada eksplan karena metabolisme fenol menghambat zat pengatur tumbuh auksin alami pada eksplan.

Titov et al (2006) melaporkan hasil penelitian yaitu dapat menurunkan persentase browning pada eksplan bunga dengan perendaman potassium sitrat dan penambahan zat pengatur tumbuh BA, IAA dan kinetin pada media. Munguastosha et al., (2014) melaporkan hal serupa dengan eksplan tunas daun *Musa spp.* Menunjukkan perlakuan perendaman dengan asam askorbat dan penambahan pada media asam askorbat dan BAP (Benzylaminopurine) efektif untuk menurunkan persentase browning. Penelitian yang telah dilakukan oleh Saputra dkk., (2016) juga menunjukkan bahwa ada beberapa upaya yang dapat dilakukan untuk mencegah atau mengurangi terjadinya browning seperti mulai dari membilas eksplan pada air mengalir, melakukan subkultur, pemakaian arang aktif, penggunaan polivinylpirolidone (PVP) dan meminimalisir kontak dengan oksigen. Selanjutnya diungkapkan oleh Abdelward (2008) bahwa arang aktif dan asam askorbat lebih efektif dibandingkan cysteine dan silver nitrate dalam mencegah pencokelatan pada tanaman *Vicia faba*. Penelitian serupa juga dilakukan oleh Ko et al., (2008) dengan eksplan daun *Cavendish banana* dapat menurunkan intensitas browning pada perlakuan perendaman dengan larutan asam askorbat hingga 100%.

4. Simpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah perlakuan dengan perendaman asam sitrat dan asam askorbat dan penambahan NAA dan BAP mampu menurunkan waktu inisiasi browning, intensitas browning dan persentase browning. Eksplan daun muda dan pedicel merupakan eksplan dengan persentase tertinggi menurunkan intensitas browning dan persentase browning dibandingkan dengan eksplan ovarium.

Pustaka Acuan

- Abdelward, R. 2008. Use of NA 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.
- Ahmad I., Muhammad J. J., Muhammad N., Irfan A. and Rahmatullah Q. 2016. Control Of Media Browning In Micropropagation Of Guava (*Psidium guajava* L.). *Pak. J. Bot.*, 48(2): 713-716.
- Ahmad Z., A. Hussain, N. Zaidi, Z. Iqbal, and F.H. Shah. 1995. A study of relationship between growth regulators and browning in *Pistacia vera* Calli. *Plant Tiss. Cult.* 5(2):125-129.
- Admojo, L., dan Indrianto A., 2016. Pencegahan Browning Fase Inisiasi Kalus Pada Kultur Midrib Daun Klon Karet (*Hevea Brasiliensis* MuelL. ARG) PB 330. *Jurnal Penelitian Karet*, 34 (1) : 25-34
- Azadi, P. and Khosh-Khui, M. 2007. Micropropagation of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss as affected by plant growth regulator, sucrose concentration, harvesting season and cold treatments. *Electronic Journal of Biotechnology* 10(4): 582-591.
- Corduk, N., dan Aki, C. (2011). Inhibition of browning problem during micropropagation of *Sideritis trojana* Bornm. an endemic medicinal herb of Turkey. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(6), 6760-6765
- Chen C., Chang T.C., Yu T.C., and Wei C.C. 2000. A Tissue Culture Protocol for Propagation Rare Plant, *Lilium speciosum* Thunb. Var. *glorisoides*. Baker. *Botanical Buletin of Academia Sinica* 41:139-142.

- Chitbanchong W, Sardud V, Whangchai K, Koslanund R, Thobunluepop P (2009). Control of rotting and browning of Longan fruit cv. Biew Kiew after harvested by sulphur dioxide treatment under various storage temperatures. *PJBS* 12:1438-1447.
- Deswiniyanti, N. W., Astarini, I. A., dan Puspawati, N. M. (2012). Studi Fenologi Perbungaan *Lilium longiflorum* Thunb. *Metamorfosa Journal of Biological Sciences*, 1(1).6-10.
- Esmail, A. L. G., Haggag, L. F., Barakat, M. N., Farag, K. M., Zayed, N. S., & Fouad, A. A. (2014). Direct effect of medium types, explant type and antioxidant treatments on micropropagation of *Pyrus* "Lecont". *Middle East Journal of Agriculture Research*, 3(3), 618-622.
- Farah A., Shagufta N., Amina T., Saiqa I., and Kiran S. 2013. Rapid Multiplication Of Ornamental Bulbous Plants Of *Lilium orientalis* and *Lilium longiflorum* Pak. *J. Bot.*, 45(6): 2051-2055.
- Hutami, S. 2008. Masalah Pencoklatan pada Kultur Jaringan. *Jurnal AgroBiogen* 4(2):83-88.
- Krishna H, Sairam R, Singh S, Patel V, Sharma R, Grover M, Nain L, Sachdev A (2008). Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. *Sci. Hortic.* 118:132-138.
- Ko, W.H., C.C. Su, C.I. Chen and C.P. Chao, 2008. Control of Lethal Browning of Tissue Culture Plantlets of Cavendish Banana CV. Formasana with Ascorbic Acid. 96. 137-141.
- Lestari, N. K.D, Astarini, I. A., dan Oka Nurjaya, I. G. M. (2012). Perubahan Anatomi Stomata Daun Lili Trumpet (*Lilium longiflorum*) Setelah Pemaparan Radiasi Sinar X. *Metamorfosa Journal of Biological Sciences*, 1(1).1-5.
- Landi, M., Fambrini, M., Basile, A., Salvini, M., Guidi, L., and Pugliesi, C. (2015). Overexpression of *L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (L-GaLLDH)* gene correlates with increased ascorbate concentration and reduced browning in leaves of *Lactuca sativa* L. after cutting. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 123, 109-120.
- Marlina. 2009. Teknik Perbanyak Lili Dengan Kultur Jaringan. *Buletin Teknik Pertanian* Vol. 14 No. 1, 2009: 6-8.
- Nahid B., Nur A. P. A., Ghizan S., and Thohirah L. A. Control of contamination and explant browning in *Curculigo latifolia* in vitro cultures. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 7(8): 448-454.
- Newton, R.J., W. Tang, L.C. Harris, and V. Outhavong. 2004. Antioxidants enhance in vitro plant regeneration by inhibiting the accumulation of peroxidase in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Cell Rep.* 22(12):871-877.
- Nursyamsi. 2010. Teknik Kultur Jaringan Sebagai Alternatif Perbanyak Tanaman Untuk Mendukung Rehabilitasi Lahan. Makalah pada Ekspose Hasil-Hasil Penelitian Balai Penelitian Kehutanan Makassar. Makassar, 22 Juni 2010.
- Ndakidemi, C. F., Mneney, E., and Ndakidemi, P. A. 2014. Effects of ascorbic acid in controlling lethal browning in *in vitro* culture of *Brahylaena huillensis* using nodal segments. *American Journal of Plant Sciences*, 5(1), 187-191.
- Munguatosha N., Emerald M., and Patric N. 2014. Control of lethal browning by using ascorbic acid on shoot tip cultures of a local *Musa* spp. (Banana) cv. Mzuzu in Tanzania. *African Journal of Biotechnology*. 13(16):1721-1725.
- Ozyigit, I.I., M.V. Kahraman, and O. Ercan. 2007. Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African J. Biotechnol.* 6(1):003-008
- Priyono. 2001. Regenerasi Tanaman Kerk Lily (*Lilium longiflorum* Thunb.) Melalui embriogenesis Somatik Pada Eksplan Daun. *Berita Biologi* 5 (4): 395-403.
- Saputra, I.M.C.A., Rindang, D., Hestin, Y. 2016. Mikropropagasi Tanaman Stroberi (*Fragaria* sp.) melalui Induksi Organogenesis. *Agroekoteknologi Tropika*. 5 (4):332-343.

- Saetiew K., and Umamait T. Micropropagation of *Lilium formolongo* via Leaf Explants. *International Journal of Agricultural Technology* 11(4):855-862
- Sri W., Priyono dan Zaenudin. 1998. Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh terhadap Perbanyakan Kerk Lily secara In-vitro. *Jurnal Hortikultura* 8 (3), 1145-1152.
- 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.
- Titov, S., S.K. Bhowmik, A. Mandal, M.S. Alam and S.N. Udin, 2006. Control of phenolic compound secretion and effect of growth regulators for organ formation from *Musa* spp. cv. kanthali floral bud explants. *Am. J. Biochem. Biotechnol.*, 2: 97-104.
- Vely, P., and Pelkonen. 2005. *Biotechnological Approaches In Lily (Lilium) Production*. Oulu University Press: Finland.
- Veltman, R. H., & Peppelenbos, H. W. (2003). A proposed mechanism behind the development of internal browning in pears (*Pyrus Comunis* cv.Conference). *Acta Hort*, 600, 247-255.
- Zhou, S., Rammanna, M. S., Visser, R. G. F. and van Tuyl, J. M. 2008. Analysis of the meiosis in the F1 hybrids of Longiflorum x Asiatic (LA) of lilies (*Lilium*) using genomic in situ hybridization. *Journal of Genetic and Genomic* 32:687-695.

