



# JURNAL

## BIOTEKNOLOGI & BIOSAINS INDONESIA

Homepage Jurnal: <http://ejurnal.bppt.go.id/index.php/JBBI>



### PERBANYAKAN AKASIA HIBRIDA (*Acacia mangium* × *Acacia auriculiformis*) MELALUI SUBKULTUR BERULANG

#### Multiplication of Acacia Hybrid (*Acacia mangium* × *Acacia auriculiformis*) through Repeated Subculture

Yelnitis\*, Sri Sunarti

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan  
Jl. Palagan Tentara Pelajar KM 15 Purwobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta - 55582

\*Email: [yelnitis@yahoo.com](mailto:yelnitis@yahoo.com)

#### ABSTRACT

*In vitro* culture is a promising technique for mass propagation of high-value plant species. This study was conducted to obtain the best treatment for mass propagation of hybrid acacia shoots (*A. mangium* × *A. auriculiformis*) through *in vitro* culture. Single-node stem from seedlings was used as explants to be grown on the modified Murashige and Skoog (MS) medium, the Woody Plant Medium (WPM), and Gamborg (B5) medium. The study was conducted in two stages namely, shoot induction and shoot propagation. The treatments tested were the use of benzyl adenine (BA) with a concentration of 0.3; 0.7 and 1.0 mg L<sup>-1</sup>. Visual observations were made on shoot induction time, the number of shoots, shoot height, and culture morphology. The results showed that BA 0.7 mg L<sup>-1</sup> treatment on modified MS medium was the best for shoot induction, shoot multiplication, shoot height, and culture morphology. This treatment produced an average of 2.6; 5.0 and 7.7 shoots in the first, second, and third subculture, respectively. The use of different base media in the fourth subculture showed that the BA treatment of 0.7 mg L<sup>-1</sup> was the best with 12.60 shoots, an average shoot height of 6.97 cm, as well as good and normal culture morphology.

**Keywords:** acacia hybrid, benzyl adenine, *in vitro*, multiplication, subculture

#### ABSTRAK

Kultur *in vitro* merupakan teknik yang menjanjikan untuk perbanyakan massal spesies tanaman bernilai tinggi. Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan perlakuan terbaik pada perbanyakan tunas akasia hibrida (*A. mangium* × *A. auriculiformis*) melalui kultur *in vitro*. Batang satu buku dari anakan digunakan sebagai eksplan dengan media tumbuh berupa media dasar Murashige dan Skoog (MS) yang sudah dimodifikasi, media dasar Woody Plant Medium (WPM), dan Gamborg (B5). Penelitian dilakukan dua tahap yaitu induksi tunas dan perbanyakan tunas. Perlakuan yang diuji adalah penggunaan *benzyl adenine* (BA) dengan konsentrasi 0,3; 0,7 dan 1,0 mg L<sup>-1</sup>. Pengamatan visual dilakukan terhadap waktu induksi tunas, jumlah tunas, tinggi tunas, dan penampilan biakan. Hasil menunjukkan bahwa perlakuan BA 0,7 mg L<sup>-1</sup> pada media MS modifikasi merupakan yang terbaik untuk induksi tunas, perbanyakan tunas, tinggi tunas, dan kondisi biakan. Perlakuan ini menghasilkan rata-rata 2,6; 5,0 dan 7,7 tunas pada subkultur pertama, kedua dan ketiga. Penggunaan media dasar berbeda pada subkultur keempat menunjukkan bahwa perlakuan BA 0,7 mg L<sup>-1</sup> adalah yang terbaik dengan 12,60 tunas, rata-rata tinggi tunas 6,97 cm, serta penampilan biakan yang baik dan normal.

**Kata Kunci:** akasia hibrida, *benzyl adenine*, *in vitro*, perbanyakan, subkultur

## PENDAHULUAN

*Acacia mangium* Wild. merupakan salah satu jenis tanaman hutan yang banyak dikembangkan dalam pembangunan hutan tanaman industri (HTI) di Sumatera dan Kalimantan. Jenis ini merupakan tanaman cepat tumbuh yang banyak digunakan untuk kayu, *pulp* dan produksi kertas serta beberapa produk akhir seperti *furniture* (Akeng et al. 2014; Nambiar et al. 2014; Asif et al. 2017; Sunarti 2018). *A. mangium* mempunyai batang lurus, bebas cabang yang tinggi tetapi tidak toleran terhadap serangan penyakit. Sebaliknya *A. auriculiformis* bersifat toleran terhadap penyakit tetapi memiliki penampilan morfologi yang kurang baik karena batangnya tidak lurus, tinggi bebas cabangnya pendek dan bercabang banyak. Jenis ini cocok digunakan untuk penanaman skala besar di Indonesia (Hendrati dan Nurrohmah 2018).

Akasia hibrida merupakan hasil persilangan antara bunga betina dari pohon induk *A. mangium* dengan bunga jantan dari pohon induk *A. auriculiformis*. Persilangan antara dua spesies tanaman bertujuan untuk mendapatkan hibrid yang lebih baik dari kedua tetuanya. Menurut Sein dan Mitlöhner (2011) akasia hibrid mempunyai beberapa perbedaan dengan *A. mangium* dan *A. auriculiformis*. Selanjutnya Sunarti et al. (2013) melaporkan bahwa akasia hibrid lebih produktif dari kedua tetuanya sebanyak 17 %. Menurut Dinh dan Ha (2017) persilangan antara *A. mangium* × *A. auriculiformis* menghasilkan tanaman hibrid yang mempunyai perpaduan sifat keduanya terutama tahan terhadap penyakit. Kriteria tersebut merupakan syarat tanaman yang diinginkan sebagai bahan pulp dan kertas (Aimin et al. 2014).

Beberapa keunggulan dari akasia hibrida dibandingkan dengan tetuanya antara lain batang bulat dan lurus, pertumbuhan yang cepat serta bebas cabang yang tinggi (Kha et al. 2012), tahan terhadap penyakit busuk hati serta kandungan selulosa yang tinggi. Selanjutnya Praptoyo (2015) menyatakan bahwa kayu juvenil mempunyai kontribusi besar dalam penentuan kualitas kayu. Dilihat dari ukuran pembuluhnya, kayu akasia hibrida mempunyai tekstur kayu halus sampai sedang.

Secara konvensional perbanyakan tanaman akasia dilakukan dengan menggunakan biji. Shahinozzaman et al. (2012) menyatakan bahwa penggunaan biji, *cutting* dan *grafting* dalam perbanyakan skala massal mengalami keterbatasan karena kemampuan berakar yang kurang baik, sedangkan sifat unggul dari suatu tanaman dapat diturunkan lebih baik melalui perbanyakan vegetatif. Perbanyakan tanaman secara vegetatif merupakan teknik yang penting dalam perbanyakan tanaman hasil pemuliaan. Banerjee (2013) menyatakan bahwa multiplikasi klon merupakan alternatif untuk perbanyakan pohon elit dengan mempertahankan sifat-sifat yang diinginkan. Lebih lanjut Shahinozzaman et al. (2012) menyatakan bahwa teknik *in vitro* merupakan teknik yang sama dengan teknik perbanyakan konvensional yang secara ekstensif diaplikasikan dalam perbanyakan skala massal pada beberapa spesies tanaman hutan. Teknik *in vitro* merupakan salah satu solusi untuk perbanyakan massal secara cepat tanpa dipengaruhi oleh musim dan tempat dengan tingkat proliferasi yang tinggi (Naik et al. 2017; Koszeghi et al. 2014) material tanaman yang dihasilkan seragam dan bebas dari mikroba (Hassan dan Zayed 2018). Perbanyakan untuk produksi skala massal mempunyai genetik yang sama, dicapai melalui kultur *in vitro* dan menguntungkan khususnya untuk tanaman yang bernilai tinggi dan sulit diperbanyak melalui teknik konvensional (Babaei et al. 2014). Perbanyakan klonal dari tanaman hutan yang bernilai tinggi melalui organogenesis mempunyai potensi untuk mempercepat hasil persilangan tanaman dan memperbaiki kualitas serta keseragaman tanaman yang dihasilkan.

Perbanyakan akasia melalui kultur *in vitro* sudah dilaporkan oleh beberapa peneliti sebelumnya antara lain pada *A. nilotica* (Samake et al. 2011) pada *A. caesia* (Thambiraj dan Paulsamy, 2012); pada *A. auriculiformis* (Banerjee 2013; Ismail et al. 2012) dan lain-lain. Menurut Akeng et al. (2014), perbanyakan *in vitro* dapat memfasilitasi perbanyakan massal dari individu terseleksi untuk sifat yang diinginkan dan sangat berpotensi untuk memecahkan masalah.

Perbanyak melalui kultur *in vitro* dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain media tumbuh dan zat pengatur tumbuh. Menurut Poothong dan Reed, (2014) medium tumbuh merupakan salah satu faktor yang sangat penting dalam mikropropagasi tanaman. Mineral nutrisi adalah komponen utama medium tumbuh dan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Selanjutnya Arab et al. (2014) menyatakan bahwa salah satu faktor penting dalam kultur *in vitro* khususnya pada tahap perbanyak adalah zat pengatur tumbuh sitokinin. BA merupakan salah satu dari kelompok sitokinin sintesis yang banyak digunakan dalam perbanyak beberapa jenis tanaman berkayu. Sitokinin berperan dalam perbanyak pada tahap perkembangan tanaman seperti merangsang pembelahan sel dan ekspansi sel dalam sintesis protein tanaman dan aktifitas beberapa enzim.

Berdasarkan hal di atas dilakukan penelitian perbanyak akasia hibrida melalui kultur *in vitro* yang bertujuan untuk mendapatkan perlakuan terbaik untuk perbanyak tunas dari akasia hibrida (*A. mangium* × *A. auriculiformis*).

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan tempat penelitian

Bahan tanaman yang digunakan diambil dari klon hibrida *A. mangium* × *A. auriculiformis* yang ditempatkan di rumah kaca. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan, Yogyakarta yang dimulai dari bulan April 2016 sampai bulan Desember 2017.

### Bahan dan alat

Potongan batang satu buku dari klon *A. mangium* × *A. auriculiformis* dijadikan sebagai eksplan. Bahan kimia yang digunakan terdiri dari komposisi hara makro dan mikro media dasar Murashige dan Skoog (MS), Woody Plant Medium (WPM) dan Gamborg (B5) yang ditambah dengan vitamin dan agar. Zat pengatur tumbuh yang digunakan adalah *benzyl adenine* (BA). Bahan-bahan lain yang digunakan adalah aquades, alkohol, spiritus.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian terdiri dari alat-alat yang umum

digunakan dalam pembuatan media untuk kegiatan kultur jaringan, peralatan pembantu seperti *aluminium foil*, *cling wrap* dan peralatan yang digunakan pada saat penanaman di dalam *laminar air flow cabinet* (LAFC) seperti pinset dan scalpel.

### Prosedur kerja

Bagian batang yang masih muda dibersihkan dengan menggunakan sabun cair lalu dibilas dengan air bersih. Kemudian direndam dalam larutan fungisida Antracol 0,1% selama 10 menit dan dibilas dengan air sampai bersih. Selanjutnya disterilisasi di dalam *laminar air flow* dengan menggunakan alkohol 70 %, larutan HgCl<sub>2</sub> dan Bayclin masing-masing selama 5, 7 dan 10 menit. Setiap tahapan sterilisasi diikuti dengan pembilasan dengan air steril biasa sebanyak tiga kali. Penelitian terdiri dari dua tahap kegiatan yaitu induksi tunas dan perbanyak tunas.

### Induksi tunas

Bahan tanaman sumber eksplan yang sudah disterilisasi dipotong dengan ukuran 2–3 cm dan terdiri dari 1 buku dan kemudian digunakan sebagai eksplan. Eksplan ditumbuhkan pada medium dasar Murashige dan Skoog (MS) yang ditambah dengan 0,1 mg L<sup>-1</sup> Thyamine-HCl; 0,5 mg L<sup>-1</sup> Nicotinic acid; 0,5 mg L<sup>-1</sup> Pyridoxine; 2,0 mg L<sup>-1</sup> gysin dan 100 mg L<sup>-1</sup> myoinositol. Kemasaman atau pH media dijadikan 5,8 dengan menambahkan 1 N HCl atau 1 N NaOH dan selanjutnya dilakukan sterilisasi medium dengan menggunakan autoklaf dengan suhu 121 °C selama 20 menit. Perlakuan yang diberikan adalah penambahan zat pengatur tumbuh BA dengan konsentrasi 0,3; 0,7 dan 1,0 mg L<sup>-1</sup>. Setiap perlakuan dibuat 10 botol dan setiap botol terdiri dari 1 eksplan. Setiap perlakuan dibuat ulangan sebanyak 3 kali. Pengamatan dilakukan terhadap waktu inisiasi tunas, jumlah tunas dan keadaan visual biakan.

### Perbanyak tunas

Tahap perbanyak tunas dilakukan melalui dua kegiatan berbeda yaitu perbanyak tunas melalui subkultur (SK) berulang (SK1 sampai dengan SK3) dan perbanyak tunas dengan menggunakan media dasar berbeda pada subkultur keempat (SK4).

**Tabel 1.** Waktu induksi dan jumlah tunas

Perlakuan (mg L <sup>-1</sup> )	Induksi Tunas (hari)	Rata-Rata Jumlah Tunas	Visual Biakan
MS + BA 0,3	5,4 <sup>c</sup>	1,0 <sup>a</sup>	Daun hijau, batang sedang, pangkal berkalus
MS + BA 0,7	3,8 <sup>a</sup>	1,2 <sup>a</sup>	Daun hijau, batang sedang, pangkal berkalus
MS + BA 1,0	4,3 <sup>b</sup>	1,0 <sup>a</sup>	Daun hijau, batang sedang, pangkal berkalus

Keterangan:

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada tiap kolom tidak berbeda nyata pada taraf 1 % uji DMR;

MS: Murashige dan Skoog; BA: *benzyl adenine*

### Perbanyak tunas melalui subkultur berulang

Tunas yang dihasilkan pada tahap induksi dipotong-potong dan mempunyai satu buku atau mata tunas selanjutnya dijadikan sebagai eksplan pada tahap perbanyak. Perbanyak tunas dilakukan secara berulang pada media dasar MS dengan perlakuan yang sama yaitu penambahan BA 0,3; 0,7 dan 1,0 mgL<sup>-1</sup>. Masing-masing perlakuan terdapat 10 botol dan masing-masing botol berisi 1 eksplan. Perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah tunas dan penampilan biakan secara visual.

### Perbanyak tunas pada media dasar berbeda

Media dasar yang digunakan pada tahap ini adalah media dasar MS, WPM dan B5 dengan perlakuan penambahan zat pengatur tumbuh BA 0,3; 0,7 dan 1,0 mgL<sup>-1</sup>. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah tunas, tinggi tunas dan penampilan biakan secara visual.

### Analisa data

Data yang diperoleh dianalisa dengan analisis sidik ragam (ANOVA) dengan menggunakan program SPSS dan apabila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan DMRT pada tingkat 1 %.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Induksi tunas

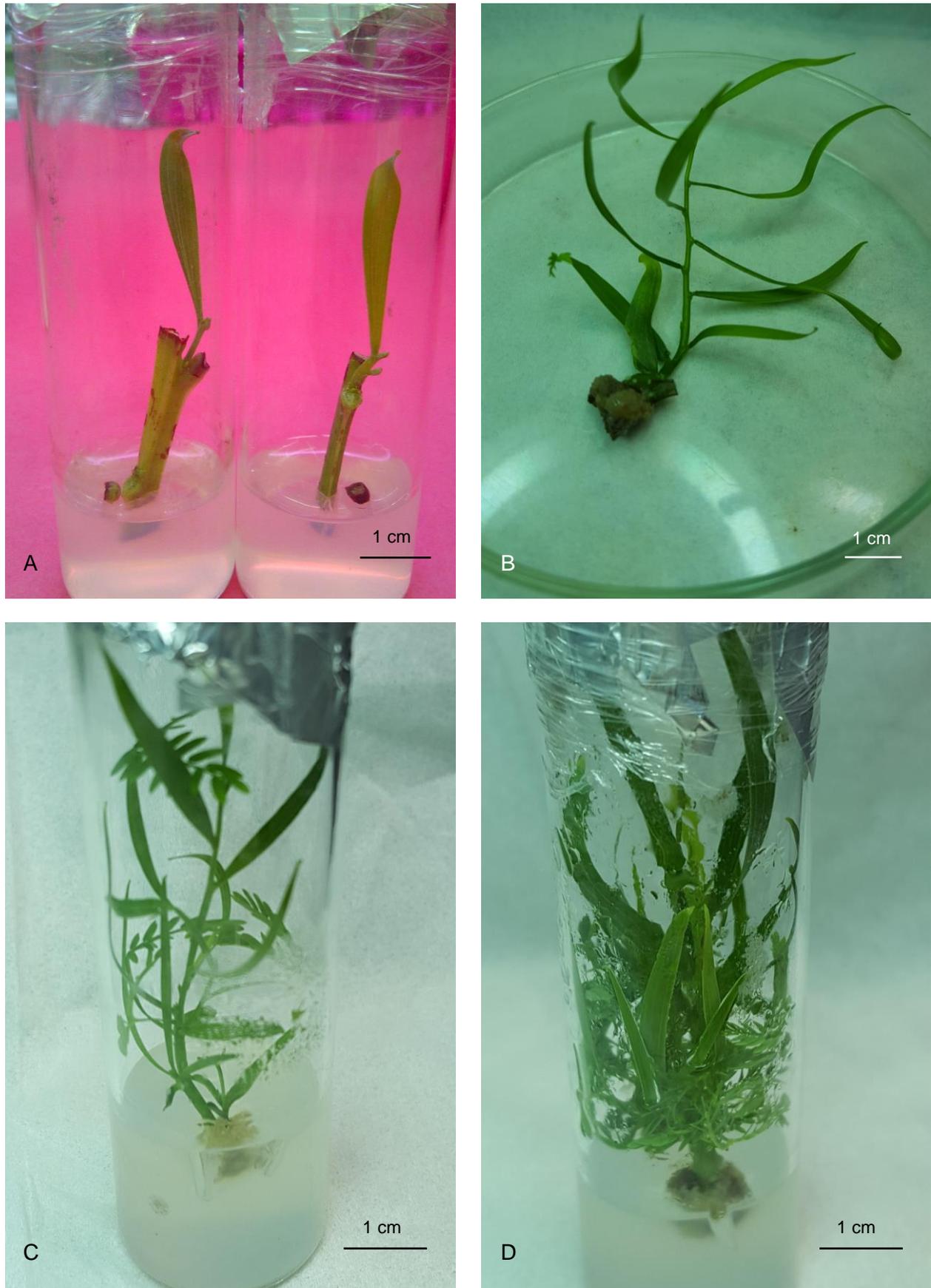
Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada tahap induksi semua eksplan batang satu buku dari anakan klon hibrid *A. mangium* × *A. auriculiformis* yang ditumbuhkan pada perlakuan BA 0,3–1,0 mg L<sup>-1</sup> dapat menghasilkan tunas. Stevens dan Pijut, (2018) menyatakan bahwa sitokinin eksogen dibutuhkan untuk pertumbuhan tunas dan konsentrasinya berpengaruh terhadap jumlah tunas yang dihasilkan. Eksplan potongan

batang satu buku memberikan respon yang sangat baik dalam pembentukan tunas baru (true-to-type). Umumnya untuk merangsang induksi dan perbanyak tunas digunakan zat pengatur tumbuh dari golongan sitokinin. Akeng et al. (2014) menyatakan bahwa BA merupakan zat pengatur tumbuh yang berfungsi dalam mengontrol pembentukan tunas melalui aktifitas enzimatis diantaranya mengontrol pembelahan sel. Selanjutnya Chang et al. (2015) menyatakan bahwa BA merupakan faktor penting dalam pemecahan dormansi tunas.

Kegiatan ini menghasilkan kecepatan induksi tunas mulai pada hari ke-dua sampai hari ke-sembilan setelah dikulturkan dengan rata-rata antara 3,8 sampai dengan 5,4 hari setelah inokulasi. Dari tiga konsentrasi BA yang digunakan, menunjukkan hanya pada 0,7 mg L<sup>-1</sup> merupakan perlakuan yang memberikan respon paling cepat dibandingkan dengan dua perlakuan lainnya. Nakasha et al. (2016) menyatakan bahwa pada konsentrasi rendah BA dapat merangsang induksi dan diferensiasi tunas. Induksi tunas dari perlakuan ini terjadi pada rata-rata 3,8 hari setelah dikulturkan (Tabel 1) dan berbeda nyata dengan perlakuan yang lain.

Eksplan yang ditumbuhkan pada semua perlakuan dapat membentuk tunas mencapai 100 %. Hal ini diduga disebabkan karena penggunaan BA dengan konsentrasi antara 0,3 dan 1,0 mg L<sup>-1</sup> merupakan kisaran yang baik untuk induksi tunas akasia hibrida. Sedangkan Akeng et al. (2014) melaporkan bahwa inisiasi tunas pada jenis *A. mangium* diperoleh dengan menggunakan zat pengatur tumbuh BA pada kisaran yang tinggi yaitu antara 0,0–20,0 mg L<sup>-1</sup>.

Tunas yang dihasilkan pada tahap induksi berjumlah antara 1 sampai 2 tunas per eksplan yang dikulturkan. Rata-rata tunas yang paling banyak diperoleh adalah dari



**Gambar 1.** Pertumbuhan tunas pada perlakuan penambahan BA pada umur 3 minggu (A), 6 minggu (B), 8 minggu (C), dan 16 minggu (D)

**Tabel 2.** Jumlah tunas dari perlakuan BA pada tahap subkultur berulang

Perlakuan (mg L <sup>-1</sup> )	Jumlah Tunas Pada Tahap		
	SK 1	SK 2	SK 3
MS + BA 0,3	2,07 <sup>c</sup>	3,13 <sup>c</sup>	2,87 <sup>c</sup>
MS + BA 0,7	2,60 <sup>a</sup>	5,00 <sup>a</sup>	7,70 <sup>a</sup>
MS + BA 1,0	2,40 <sup>b</sup>	4,30 <sup>b</sup>	7,00 <sup>b</sup>

Keterangan:

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada tiap kolom tidak berbeda nyata pada taraf 1 % uji DMR;  
MS: Murashige dan Skoog; SK: subkultur; BA: *benzyl adenine*

perlakuan BA 0,7 mg L<sup>-1</sup> yaitu sebanyak 1,2 tunas (Tabel 1). Tunas yang dihasilkan memperlihatkan penampilan yang baik dengan batang berukuran sedang dan kuat. Pada tahap induksi dihasilkan tunas dengan daun telapak, lebar, tebal dan berwarna hijau kekuningan (Gambar 1a) dan dalam pertumbuhannya secara perlahan berubah menjadi hijau (Gambar 1b - d).

Penambahan zat pengatur tumbuh ke dalam medium tumbuh merupakan salah satu faktor keberhasilan dalam kultur *in vitro*. Penambahan zat pengatur tumbuh eksogen akan meningkatkan kandungan hormon endogen pada sel dan jaringan sehingga menjadi faktor pencetus ("*trigerring factor*") dalam proses pertumbuhan dan perkembangan jaringan yang dikulturkan. Menurut Nursetiadi et al. (2016), zat pengatur tumbuh BA yang ada di dalam media tumbuh mempunyai pengaruh dan merangsang jaringan meristem dari eksplan untuk tumbuh dan berkembang membentuk tunas.

Penggunaan BA 0,7 mg L<sup>-1</sup> merupakan perlakuan yang paling baik dari ketiga perlakuan yang diujikan untuk induksi tunas. Hasil yang hampir sama dengan penelitian Markovic et al. (2013) pada tanaman *D. deltoideus* L. juga menunjukkan bahwa tunas paling banyak dihasilkan dari perlakuan BA dengan konsentrasi rendah. Hal senada dilaporkan oleh Cui et al. (2019) bahwa penggunaan sitokinin konsentrasi rendah merangsang tingkat perbanyakan optimum pada tanaman *Davidia involucrata*. Sedangkan pada tanaman *Ficus carica* cv. Japanese BTM 6, Ling et al. (2018) melaporkan bahwa jumlah tunas pada tahap induksi paling banyak dihasilkan dari perlakuan BA dengan konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 2,0 mg L<sup>-1</sup>. Tunas yang dihasilkan dari perlakuan BA 0,7 mg/l memperlihatkan laju pertumbuhan yang lebih cepat

dibandingkan dengan dua perlakuan lainnya. Selain itu tunas yang diperoleh mempunyai ruas yang lebih panjang dan secara visual biakan memperlihatkan penampilan yang lebih baik. Sedangkan dari penelitian Akeng et al. (2014) menyatakan bahwa penggunaan BA dengan konsentrasi yang relatif tinggi (1,0 mg L<sup>-1</sup>) efektif untuk merangsang tunas aksilar *A. carssicarpa*. Selanjutnya Lodha et al. (2015) melaporkan bahwa penggunaan BA dengan konsentrasi yang lebih tinggi (3,0 mg L<sup>-1</sup>) merupakan perlakuan terbaik untuk induksi tunas pada tanaman *Cadaba fruticosa* (L.).

#### Perbanyakan tunas melalui subkultur berulang

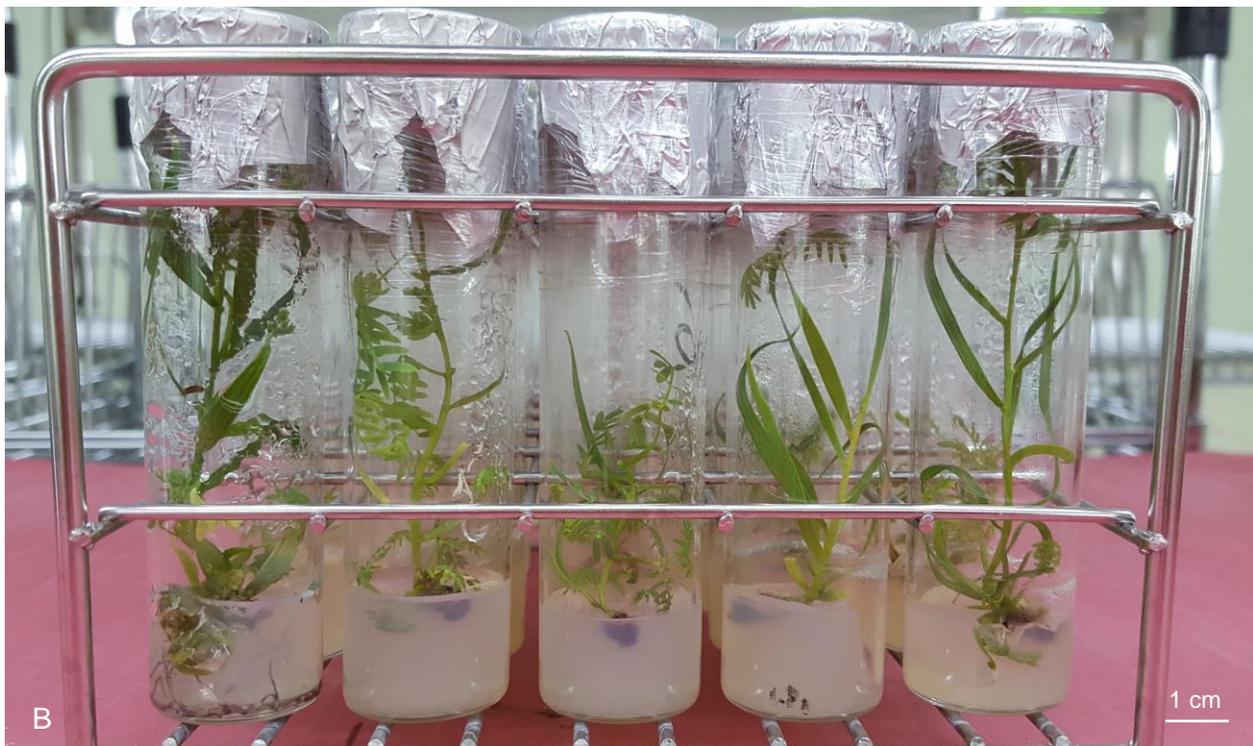
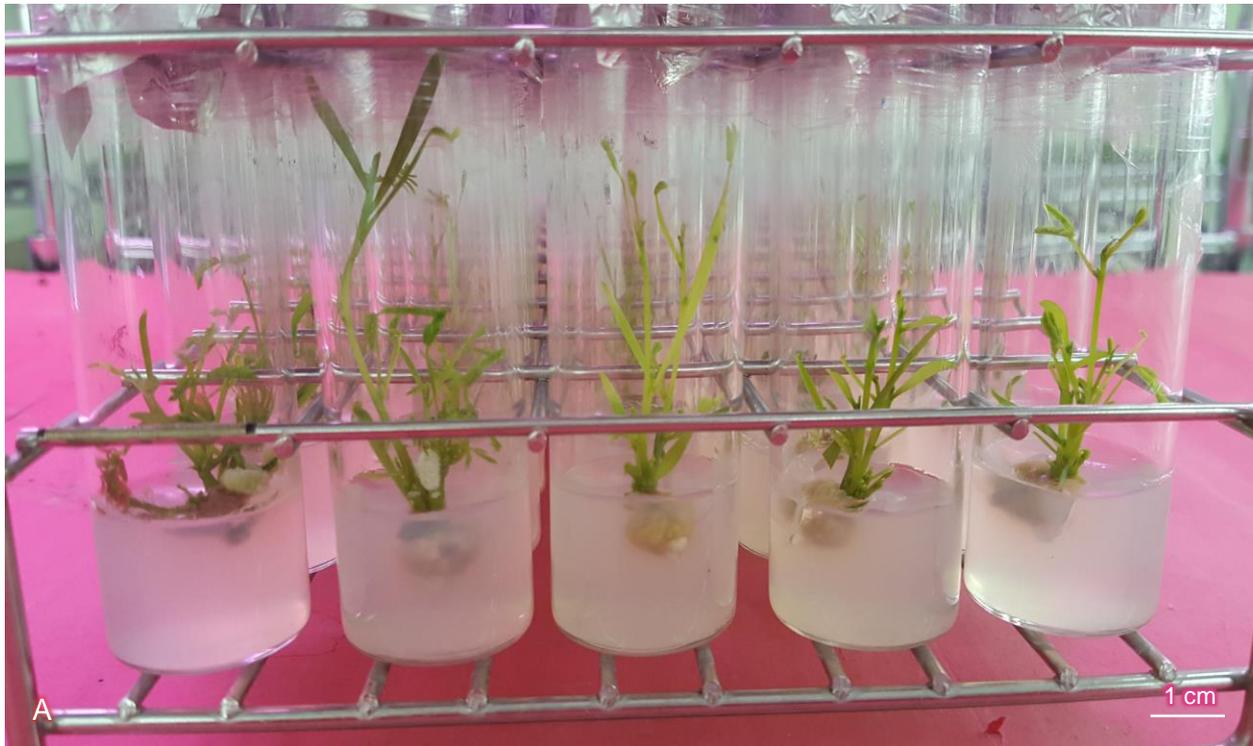
Biakan tunas steril yang diperoleh pada tahap induksi masih dalam jumlah yang terbatas pada tahap percobaan ini. Hal ini disebabkan karena terbatasnya jumlah tanaman yang digunakan sebagai sumber eksplan sehingga dilakukan upaya perbanyakan melalui tahap subkultur berulang yang bertujuan untuk mendapatkan jumlah tunas yang cukup. Subkultur biakan dilakukan dengan menggunakan perlakuan yang sama dengan masa kultur selama 14 minggu.

Tabel 2 memperlihatkan rata-rata jumlah tunas yang diperoleh pada kegiatan perbanyakan melalui tahap subkultur berulang. Peningkatan konsentrasi BA dari 0,3 menjadi 0,7 mg L<sup>-1</sup> sejalan dengan peningkatan jumlah tunas yang dihasilkan pada masing-masing tahap subkultur yang dilakukan. Siddique et al. (2015) melaporkan bahwa peningkatan konsentrasi sitokinin dari 0,5–5,0 µM pada media tumbuh dapat meningkatkan jumlah tunas dan juga meningkatkan tinggi tunas yang dihasilkan pada tanaman *Casia angustifolia*. Hasil yang berbeda dengan penelitian Shen et al. (2010) dari eksplan tunas juvenil asal

cabang tanaman *Casuarina cunninghamiana* Miq berumur lebih dari 40 tahun menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi BA dari 0 sampai 16  $\mu\text{M}$  tidak dapat menghasilkan tunas.

Tingkat perbanyakan tunas pada tahap subkultur pertama masih rendah kemudian

meningkat pada tahap subkultur selanjutnya (Tabel 2, Gambar 2). Dari tiga konsentrasi BA yang diuji, memperlihatkan bahwa perlakuan BA 0,7  $\text{mg L}^{-1}$  merupakan perlakuan terbaik untuk perbanyakan tunas. Perlakuan ini memberikan rata-rata jumlah tunas paling banyak pada semua tahap subkultur (SK1–



**Gambar 2.** Tunas hasil subkultur kedua (A) dan subkultur ketiga (B) pada umur 14 minggu

**Tabel 3.** Jumlah tunas pada subkultur keempat dari media berbeda

Perlakuan (mg L <sup>-1</sup> )	Rata-Rata Jumlah Tunas	Penampilan Visual Biakan
MS + BA 0,7	12,60 <sup>a</sup>	Batang kuat, sedang, daun hijau, pangkal berkalus
WPM + BA 0,7	4,46 <sup>b</sup>	Batang kuat, sedang, daun hijau, pangkal berkalus
B5 + BA 0,7	2,20 <sup>c</sup>	Batang kuat, sedang, daun hijau, pangkal berkalus

**Keterangan:**

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada tiap kolom tidak berbeda nyata pada taraf 1% uji DMR; MS: Murashige dan Skoog; WPM: Woody Plant Medium; B5: Gamborg's; BA: *benzyl adenine*

SK3) yang diteliti. Rata-rata jumlah tunas yang diperoleh dari masing-masing tahap subkultur adalah berturut-turut sebanyak 2,60; 5,00 dan 7,7 tunas. Rata-rata jumlah tunas yang paling banyak diperoleh pada tahap subkultur ketiga (7,7 tunas) berbeda nyata dengan perlakuan yang lain. Hal ini menunjukkan bahwa semakin sering dilakukan subkultur diikuti oleh peningkatan rata-rata jumlah tunas yang dihasilkan. Penelitian perbanyakkan *Ficus carica* yang diteliti oleh Mustafa dan Taha (2012) mendukung data kami bahwa jumlah tunas paling banyak dihasilkan pada tahap subkultur ketiga. Hal ini berbeda dengan penelitian Vujovic et al. (2012) yang melaporkan bahwa tingkat multiplikasi tunas menurun tajam pada subkultur kedua dan ketiga dan terlebih lagi pada subkultur kelima.

Peningkatan konsentrasi BA dari 0,7 mg L<sup>-1</sup> menjadi 1,0 mg L<sup>-1</sup> cenderung menurunkan jumlah rata-rata tunas yang dihasilkan, baik pada subkultur pertama, kedua maupun ke-tiga. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi BA optimum yang dibutuhkan untuk perbanyakkan tunas dari akasia hibrida ini adalah BA 0,7 mg L<sup>-1</sup>. Nursetiadi et al. (2016) melaporkan bahwa tingkat multiplikasi tunas pada beberapa tanaman akan menurun dengan peningkatan konsentrasi sitokinin pada medium. Hasil kultur jaringan tanaman *Dianthus deltoideus* oleh Markovic et al. (2013) menyatakan bahwa jumlah tunas yang paling banyak dihasilkan dari perlakuan BAP dengan konsentrasi yang lebih rendah dari 1,0 mg L<sup>-1</sup> dan tidak tumbuh pada media dengan adanya peningkatan konsentrasi BAP. Selanjutnya Mehta et al. (2012) melaporkan bahwa jumlah tunas paling banyak dari tanaman *Bacopa monnieri* diperoleh pada perlakuan kombinasi BA 1,0 mg L<sup>-1</sup> dan kinetin 0,5 mg L<sup>-1</sup>. Menurut Akeng et al.

(2014), aktifitas BA yang terjadi pada inti sel atau pada membran sitoplasma dapat menjadi toksik pada konsentrasi tertentu sehingga jumlah tunas yang dihasilkan menurun. Sedangkan pada tanaman agave, peningkatan konsentrasi BA dari 0,5 mg L<sup>-1</sup> sampai 1,5 mg L<sup>-1</sup> tidak meningkatkan jumlah tunas (Ridhawati et al. 2017).

**Perbanyakkan tunas pada media dasar berbeda**

Subkultur tunas sebagai upaya perbanyakkan tunas akasia hibrid juga dilakukan dengan menggunakan media dasar yang berbeda. Menurut Cui et al. (2019) medium dasar merupakan salah satu faktor penting dalam kultur jaringan. Kegiatan ini dilakukan pada tahap subkultur tunas yang keempat (SK4). Tiga jenis media dasar yang digunakan adalah media dasar MS, WPM dan B5. Masing-masing media dasar mempunyai komposisi hara yang berbeda terutama pada kandungan hara makro (Reed et al. 2013). Sedangkan zat pengatur tumbuh yang digunakan adalah konsentrasi terbaik dari tahap kegiatan sebelumnya yaitu BA 0,7 mg L<sup>-1</sup>. Menurut Cui et al. (2019) penggunaan sitokinin pada konsentrasi rendah merangsang tingkat perbanyakkan yang optimal. Di dalam Mustafa dan Taha (2012) dinyatakan bahwa BA merupakan ZPT yang paling baik untuk perbanyakkan tunas melalui tahapan subkultur berulang pada *Ficus carica*.

Penggunaan tiga jenis media dasar memberikan pengaruh yang nyata terhadap perbanyakkan tunas akasia hibrida. Rata-rata jumlah tunas yang dihasilkan adalah antara 2,20–12,60 tunas (Tabel 3). Penggunaan media dasar MS yang ditambah dengan BA 0,7 mg L<sup>-1</sup> merupakan perlakuan yang terbaik untuk perbanyakkan tunas. Hasil ini sejalan dengan penelitian Ismail et al. (2016) dan Nowakowska (2019) yang menyatakan bahwa dari 3 jenis media

**Tabel 4.** Tinggi tunas pada subkultur ke 4 dari perlakuan BA dengan konsentrasi berbeda

Perlakuan (mg L <sup>-1</sup> )	Rata-Rata Jumlah Tunas	Penampilan Visual Biakan
MS + BA 0,3	2,65 <sup>c</sup>	Daun hijau, batang kuat, ruas sedang
MS + BA 0,7	4,92 <sup>a</sup>	Daun hijau, batang kuat, ruas panjang
MS + BA 1,0	3,53 <sup>b</sup>	Daun hijau, batang pendek, ruas pendek

**Keterangan:**

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada tiap kolom tidak berbeda nyata pada taraf 1% uji DMR; MS: Murashige dan Skoog; BA: *benzyl adenine*

dasar yang digunakan (MS, WPM dan B5) penggunaan media dasar MS merupakan media terbaik untuk perbanyak *A. auriculiformis* dan *Daphne mezereum* L. 'Alba'. Rata-rata jumlah tunas yang dihasilkan dari perlakuan ini adalah sebanyak 12,60 tunas dan berbeda nyata dengan perlakuan yang lain. Hal ini diduga disebabkan karena media dasar MS mempunyai kandungan hara makro yang lebih tinggi dibanding media dasar WPM dan media dasar B5 terutama kandungan NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> dan KNO<sub>3</sub>. Hara makro memainkan peranan penting sebagai katalis dalam perbaikan tingkat regenerasi tanaman. Menurut Mehaboob et al. (2019) dan Wada et al. (2015), keberhasilan perbanyak dipengaruhi oleh komposisi kimia medium kultur dan optimasi mineral nutrisi. Hal yang berbeda dilaporkan Poothong et al. (2018) pada tanaman stevia bahwa jumlah tunas paling banyak diperoleh dari perlakuan media tumbuh dengan hara makro rendah dan hara mikro yang tinggi. Sedangkan penggunaan media dasar B5 dihasilkan tunas dengan jumlah paling sedikit yaitu 2,20 tunas. Di dalam Gantait et al. (2018) dilaporkan bahwa media dasar B5 jarang digunakan dalam perbanyak tunas.

**Tinggi tunas**

Tabel 4 memperlihatkan rata-rata tinggi tunas yang dihasilkan pada perlakuan BA 0,3–1,0 mg L<sup>-1</sup>. Dari perlakuan yang digunakan diperoleh tunas dengan tinggi rata-rata antara 3,26–6,97 cm. Peningkatan konsentrasi BA dari 0,3 mg L<sup>-1</sup> menjadi 0,7 mg L<sup>-1</sup> sejalan dengan peningkatan tinggi tunas yang diperoleh namun peningkatan konsentrasi BA dari 0,7 mg L<sup>-1</sup> menjadi 1,0 mg L<sup>-1</sup> ternyata menghasilkan tunas yang lebih pendek, lebih besar dan lebih kuat. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi BA yang digunakan sangat berpengaruh terhadap

pemanjangan tunas akasia hibrida. Berbeda dari penelitian Hagos dan Gebremdhin, (2015) pada tanaman karorima (*Aframomum corrorima* (Braun) P.C.M. Jansen) menunjukkan bahwa tunas paling tinggi diperoleh dari perlakuan media tanpa zat pengatur tumbuh. Selain itu diduga jaringan akasia hibrida mempunyai kandungan sitokinin endogen yang optimal untuk pertumbuhan dan pemanjangan tunas sehingga penambahan BA dengan konsentrasi 1,0 mg L<sup>-1</sup> menyebabkan laju pertumbuhan tunas menjadi terhambat. Hal ini berbeda dengan hasil penelitian Mehta et al. (2012) pada kultur jaringan tanaman *Bacopa monnieri* yang menunjukkan bahwa tunas paling tinggi diperoleh dari perlakuan penggunaan kombinasi BA 0,5 mg L<sup>-1</sup> dengan kinetin 2,0 mg L<sup>-1</sup>.

Perlakuan BA 0,7 mg L<sup>-1</sup> merupakan perlakuan terbaik untuk parameter tinggi tunas yang diamati. Rata-rata tinggi tunas dari perlakuan ini adalah 6,97 cm dan berbeda nyata dengan perlakuan yang lain. Hasil ini berbeda dengan penelitian Djumat (2014) yang melaporkan bahwa tunas paling tinggi dari eksplan tunas terminal maupun dari eksplan tunas aksilar jabon merah dihasilkan dari perlakuan BA 1,0 mg L<sup>-1</sup>. Selanjutnya (Siddique et al. 2015) melaporkan bahwa laju pertumbuhan tunas paling cepat pada tanaman *Casia angustifolia* diperoleh pada perlakuan kombinasi 5,0 μM BA + 0,5 μM IAA. Demikian juga Vujovic et al. (2012) melaporkan bahwa subkultur biakan dapat menambah panjang tunas setelah 30 atau 45 hari masa inkubasi. Lebih lanjut Santoso (2012) menyatakan bahwa tunas hasil kultur jaringan tanaman kina paling tinggi diperoleh dari penggunaan media dasar MS yang ditambah dengan BA dengan konsentrasi yang lebih tinggi (3,0 mg L<sup>-1</sup>).

Pada penelitian ini belum dilakukan kegiatan tahap perakaran tetapi akar dapat tumbuh secara spontan pada perlakuan perbanyakan yang mengandung BA (Gambar 3). Dari tiga perlakuan konsentrasi BA yang digunakan menunjukkan terdapat satu perlakuan yang menghasilkan sejumlah akar

berukuran kecil dengan bulu-bulu akar yaitu pada perlakuan BA  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Persentase biakan yang menghasilkan akar dari perlakuan BA  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  tersebut mencapai 50 % (Gambar 3a) yang diperoleh dalam waktu tujuh belas minggu. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan auksin



**Gambar 2.** Tunas hasil subkultur kedua (A) dan subkultur ketiga (B) pada umur 14 minggu

endogen dari eksplan yang digunakan relatif lebih tinggi dibanding sitokinin yang ditambahkan sehingga dapat membentuk akar. Selain itu juga diduga disebabkan oleh sumber eksplan yang digunakan mempunyai kandungan auksin endogen yang berbeda. Akar yang diperoleh pada penelitian ini berukuran kecil dan mempunyai bulu-bulu akar yang banyak. Bulu-bulu akar yang banyak lebih menguntungkan pada saat aklimatisasi plantlet karena bidang serapan hara dan nutrisi dari media akan semakin luas sehingga hara dan nutrisi yang terserap akan semakin banyak.

### Penampilan visual biakan

Pengamatan biakan secara visual memperlihatkan bahwa biakan yang dihasilkan pada penelitian ini mempunyai penampilan yang baik dan normal. Selain itu pada bagian pangkal tunas yang dihasilkan terdapat kalus. Penambahan ZPT BA ke dalam media tumbuh akan mempengaruhi kandungan hormon endogen dari jaringan tanaman yang dikultur sehingga terjadi diferensiasi sel. Perubahan kandungan ZPT tersebut dapat mempengaruhi keseimbangan *In vitro* kandungan auksin dan sitokinin dalam jaringan. Diduga akasia hibrida mempunyai kandungan hormon auksin endogen yang relatif lebih tinggi dibandingkan kandungan sitokinin sehingga terbentuk kalus. Menurut Reed et al. (2013b) pertumbuhan kalus pada perbanyak tunas merupakan respon pertumbuhan yang tidak dimengerti. Pada beberapa penelitian menunjukkan indikasi hubungan antara mineral nutrisi dan produksi kalus bila kalus adalah hasil yang diinginkan.

Kalus yang terbentuk bervariasi dan mempunyai tekstur kompak sampai remah (*friable*). Kalus kompak berwarna putih dan kecoklatan sedangkan kalus remah berwarna kekuningan (kuning muda). Kalus yang terbentuk pada bagian pangkal pada umumnya dapat mempengaruhi translokasi nutrisi dari media kultur ke dalam jaringan yang ditumbuhkan, sehingga dapat mempengaruhi pertumbuhan biakan dan oleh karena itu perlu dilakukan pemotongan bagian kalus tersebut pada saat dilakukan subkultur. Hasil ini berbeda dengan penelitian Siddique et al. (2015) yang menunjukkan bahwa tidak ada pembentukan kalus pada pangkal tunas yang dihasilkan pada media dengan penambahan 0,5–10  $\mu\text{M}$  BA, thidiazuron atau kinetin.

## KESIMPULAN

Penambahan BA 0,7 mg L<sup>-1</sup> pada modifikasi media MS merupakan perlakuan paling baik untuk perbanyak tunas akasia hibrida dimana induksi tunas paling cepat terjadi rata-rata pada 3,8 hari setelah ditanam. Rata-rata jumlah tunas paling banyak pada perlakuan ini diperoleh pada tahap SK4 yaitu sebanyak 12,60 tunas. Tunas yang dihasilkan memperlihatkan penampilan visual yang baik, berwarna hijau dengan batang yang kuat. Pada perlakuan BA dengan konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 1,0 mg L<sup>-1</sup> dapat dihasilkan plantlet dengan akar berukuran kecil dan panjang serta bulu-bulu akar halus dan banyak.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada semua teknisi di laboratorium kultur jaringan atas bantuannya dalam pelaksanaan sampai selesainya penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aimin AAS, Abdullah MZ, Muhammad N, Ratnam W (2014) Early growth performance of full-sib *Acacia auriculiformis* × *Acacia mangium* F1 hybrid progenies at three different sites. In AIP Conf Proc 1614:769–771. doi: 10.1063/1.4895299
- Akeng G, Muniandi SK, Shukor NAA (2014) regeneration of *Acacia crassicaarpa* A. Cunn ex Benth through organogenesis from juvenile sources. J Food Agric Environ 12:375–382. doi: 10.1234/4.2014.5415
- Arab MM, Yadollahi A, Shojaeiyan A, Shokri S, Ghojah SM (2014) Effects of nutrient media, different cytokinin types and their concentrations on *in vitro* multiplication of G × N15 (hybrid of almond × peach) vegetative rootstock. J Genet Eng Biotechnol 12:81–87. doi: 10.1016/j.jgeb.2014.10.001
- Javed AM, Deivaseeno D, Ratnam W (2017) Characterization of natural provenances of *Acacia mangium* Willd. and *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. in Malaysia based on phenotypic traits. J For Sci 63:562–576. doi: 10.17221/82/2016-JFS

- Babaei N, Abdullah NAP, Saleh G, Abdullah TL (2014) An efficient *in vitro* plantlet regeneration from shoot tip cultures of *Curculigo latifolia*, a medicinal plant. *Sci World J* 2014:1–9. doi: 10.1155/2014/275028
- Banerjee P (2013) Rapid *in vitro* propagation of *Acacia auriculiformis* on solid and liquid media: Role of organic additive, antioxidant and plant growth regulators. *Cibtech J Bio-Protoc* 2:39–49
- Chang S, Wu C, Chen F, Tsay J, CheShoot induction from axillary shoot tip explants of fig (*Ficus carica*) n J, Ho C (2015) Micropropagation through axillary bud culture and cultivation of *Davidia involucrata* Bail . *Taiwan J For Sci* 30:15–29
- Cui Y, Deng Y, Zheng K, Hu X, Zhu M, Deng X, Xi R (2019) An efficient micropropagation protocol for an endangered ornamental tree species (*Magnolia sirindhorniae* Noot. & Chalermglin) and assessment of genetic uniformity through DNA markers. *Sci Rep* 9:1–10. doi: 10.1038/s41598-019-46050-w
- Le DK, Ha HT (2017) Research and development of acacia hybrids for commercial planting in Vietnam. *Life Sci* 59:36–42
- La Djumat J (2014) Multiplikasi *in vitro* Samama (*Anthocephalus macrophyllus* (Robx). Havil) melalui tunas pucuk dan tunas aksilar. *Bimafika* 5:607–613
- Gantait S, Kundu S, Das PK (2018) Acacia : An exclusive survey on in vitro propagation. *J Saudi Soc Agric Sci* 17:163–177. doi: 10.1016/j.jssas.2016.03.004
- Hagos R, Gebremdhin H (2015) Effects of cytokinin types and their concentration on *in vitro* shoot induction and multiplication of korarima. *Int J Genet Mol Biol* 7:8–14. doi: 10.5897/IJGMB2015.0108
- Hassan SAM, Zayed NS (2018) Review article factor controlling micropropagation of fruit trees: A review. *Sci Int* 6:1–10. doi: 10.17311/sciintl.2018.1.10
- Hendrati RL, Nurrohmah SH (2018) Quality of genetically-improved *Acacia auriculiformis* for renewable short-rotation wood-energy. *J Manaj Hutan Tropika* 24:136–143. doi: 10.7226/jtfm.24.3.136
- Ismail H, Muniandi SK, Yusoff AM, Hassan NH, Shukor NAA (2016) *In vitro* micropropagation of *Acacia auriculiformis* from selected juvenile sources. *Dendrobiol* 75:157–165. doi: 10.12657/denbio.075.015
- Ismail H, Noraini AS, Aziah MY, Hassan NH, Zainudin F, Abdullah N, Rahman SSA (2012) *In vitro* shoot induction of *Acacia auriculiformis* from juvenile and mature sources. *J Biotechnol Pharm Res* 3:88–93
- Kha LD, Harwood CE, Kien N, Baltunis BS, Thinh HH (2012) Growth and wood basic density of acacia hybrid clones at three locations in Vietnam. *New For* 43:13–29. doi: 10.1007/s11056-011-9263-y
- Koszeghi S, Bereczki C, Balog A, Benedek K (2014) Comparing the effects of benzyladenine and meta-topolin on sweet basil (*Ocimum basilicum*) micropropagation. *Not Scientia Biol* 6:422–427. doi: 10.1583/nsb649464
- Ling WT, Liew FC, Lim WY, Subramaniam S, Chew BL (2018) cv. Japanese BTM 6. *Tropical Life Sci Res* 29:165–174. doi: 10.21315/tlsr2018.29.2.11
- Lodha D, Patel AK, Shekhawat NS (2015) A high-frequency *in vitro* multiplication, micromorphological studies and *ex vitro* rooting of *Cadaba fruticosa* (L.) Druce (Bahuguni): A multipurpose endangered medicinal shrub. *Physiol Mol Biol Plants* 21:407–415. doi: 10.1007/s12298-015-0310-6
- Markovic M, Popovic M, Vilotic D (2013) Micropropagation of *Dianthus deltoideus* L. through shoot tip and nodal cuttings culture. *Arch Biol Sci Belgrade* 65:17–22. doi: 10.2298/ABS1301017M
- Mehaboob VM, Faizal K, Raja P, Aslam A, Shajahan A (2019) Effect of nitrogen sources and 2,4-D treatment on indirect regeneration of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) using leaf base explants. *J Plant Biotechnol* 46:17–21. doi: 10.5010/JPB.2019.46.1.017
- Mehta J, Ansari R, Syedy M, Khan S, Sharma S, Gupta N, Rathore R, Vaishnav K (2012) An effective method for high frequency multiple shoots regeneration and callus induction of *Bacopa monnieri* (L.) Pennel.: An important medicinal plant. *Asian J Plant Sci Res* 2:620–626
- Mustafa N, Taha RA (2012) Influence of plant

- growth regulators and subculturing on *in vitro* multiplication of some fig (*Ficus carica*) cultivars. *J Appl Sci Res* 8:4038–4044
- Naik PM, Godbole M, Nagella P, Murthy HN (2017) Influence of different media, medium strength and carbon sources on adventitious shoot cultures and production of bacoside A in *Bacopa monnieri* (L.). *Ceylon J Sci* 46:97–104. doi: 10.4038/cjs.v46i4.7472
- Nakasha JJ, Sinniah UR, Kemat N, Swamy MK (2016) Induction, subculture cycle, and regeneration of callus in safed musli (*Chlorophytum borivillianum*) using different types of phytohormones. *Pharmacogn Mag* 12:5460–5464. doi: 10.4103/0973-1296.191457
- Nambiar ES, Harwood CE, Kien ND (2014) *Acacia* plantations in Vietnam: Research and knowledge application to secure a sustainable future. *South For: J For Sci* 77:1–10. doi: 10.2989/20702620.2014.999301
- Nowakowska K, Pacholczak A, Tepper W (2019) The effect of selected growth regulators and culture media on regeneration of *Daphne mezereum* L. 'Alba'. *Rend Lincei Sci Fis Nat* 30:197–205. doi: 10.1007/s12210-019-00777-w
- Nursetiadi EKA, Yuniastuti E, Putri RBA (2016) Pengaruh macam media dan konsentrasi BAP terhadap multiplikasi tanaman manggis (*Garcinia mangostana*) secara *in vitro*. *Bioteknologi* 13:63–72. doi: 10.13057/biotek/c130203
- Poothong S, Khen T, Chumphukam O (2018) *In vitro* mineral nutrition for improving growth and multiplication of stevia. *Agric Nat Resour* 52:477–483. doi: 10.1016/j.anres.2018.11.007
- Poothong S, Reed BM (2014) Modeling the effects of mineral nutrition for improving growth and development of micropropagated red raspberries. *Sci Hortic* 165:132–141. doi: 10.1016/j.scienta.2013.10.040
- Praptoyo H (2015) Studi kualitas kayu akasia hibrida (*Acacia hybrid*) hasil persilangan *Acacia mangium* dengan *Acacia auriculiformis* dari aspek sifat anatomi dan fisika kayu. In: Hermiati E, Dwianto W, Fatriasari W, Yanto DHY, Anita SH, Kurniawan YD, Zulfitri A, Astari L, Zulfiana D, Pramasari DA, Nurhamiyah Y, Oktaviani M, Sumarno A (eds) Prosiding Seminar Nasional XVIII Masyarakat Peneliti Kayu Indonesia (MAPEKI), Bandung, pp 11–18
- Reed BM, Wada S, Denoma J, Niedz RP (2013a) Improving *in vitro* mineral nutrition for diverse pear germplasm. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 49:343–355. doi: 10.1007/s11627-013-9504-1
- Reed BM, Wada S, Denoma J, Niedz RP (2013b) Mineral nutrition influences physiological responses of pear *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 49:699–709. doi: 10.1007/s11627-013-9556-2
- Ridhawati A, Anggraeni TDA, Purwati RD (2017) Pengaruh komposisi media terhadap induksi tunas dan akar lima genotipe tanaman agave pada kultur *in vitro*. *Buletin Tanam Tembakau Serat Minyak Industri* 9:1–9. doi: 10.21082/btism.v9n1.2017.1-9
- Samake G, Folega F, Senou H, Wang H, Sciences B, Forestry, B (2011) *In vitro* regeneration of *Acacia nilotica* (L.) Willd. ex Del from nodes on B5 medium. *J Agric Biotechnol Sustain Dev* 3:85–89. doi: 10.5897/AJB11.515
- Samake G, Traore BM, Senou H, Wang H (2011) *In vitro* regeneration of *Acacia nilotica* from nodes on MS medium. *Afr J Biotechnol* 10:11493–11501. doi: 10.5897/AJB11.516
- Santoso J (2012) The effect of benzyl amino purin (BAP) and indole butyric acid (IBA) concentrations on the growth of shoot and root of *Chincona ledgeriana* Moens *in vitro* propagation. *J Penelit Teh Kina* 15:40–49
- Sein CC, Mitlöhner R (2011) *Acacia* hybrid: Ecology and silviculture in Vietnam. Center for International Forestry Research (CIFOR), Bogor. doi: 10.17528/cifor.003693
- Shen X, Castle WS, Gmitter JFG (2010) *In vitro* shoot proliferation and root induction of shoot tip explants from mature male plants of *Casuarina cunninghamiana* Miq. *Hort Sci* 45:797–800. doi: 10.21273/HORTSCI.45.5.797
- Shahinozzaman M, Abul M, Azad K, Amin MN (2012) *In vitro* clonal propagation of a fast growing legume tree - *Acacia mangium* Willd. employing cotyledonary node explants. *Not Scientia Biol* 4:79–85. doi: 10.15835/nsb427553
- Siddique I, Bukhari NAW, Perveen K, Siddiqui

- I (2015) Influence of plant growth regulators on *in vitro* shoot multiplication and plantlet formation in *Cassia angustifolia* Vahl. Braz Arch Biol Technol 58:686–691. doi: 10.1590/S1516-89132015050290
- Stevens ME, Pijut PM (2018) Rapid *in vitro* shoot multiplication of the recalcitrant species *Juglans nigra* L. In Vitro Cell Dev Biol Plant 54:309–317. doi: 10.1007/s11627-018-9892-3
- Sunarti S (2018) Review : Peran biodiversitas dalam pemuliaan tanaman kehutanan: Studi kasus pada pengembangan varietas baru hibrid Acacia (*Acacia mangium* × *Acacia auriculiformis*). Pros Semin Nas Masy Biodivers Indones 4: 28–34. doi: 10.13057/psnmbi/m040104
- Sunarti S, Nai'em M, Hardiyanto EB, Indrioko S (2013) Breeding strategy of Acacia hybrid (*Acacia mangium* × *A. auriculiformis*) to increase forest plantation productivity in Indonesia. J Manaj Hutan Tropika 19:128–137. doi: 10.7226/jtfm.19.2.128
- Thambiraj J, Paulsamy S (2012) Rapid *in vitro* multiplication of the ethnomedicinal shrub, *Acacia caesia* (L.) Willd (Mimosaceae) from leaf explants. Asian Pac J Tropical Biomed 2:S618–S622. doi: 10.1016/S2221-1691(12) 60284-6
- Vujovic T, Ružić D, Cerović R (2012) *In vitro* shoot multiplication as influenced by repeated subculturing of shoots of contemporary fruit rootstocks. Hort Sci 39:101–107. doi: 10.17221/208/2011HortSci
- Wada S, Niedz RP, Reed BM (2015) Determining nitrate and ammonium requirements for optimal *in vitro* response of diverse pear species. In Vitro Cell Dev Biol Plant:19–27. doi: 10.1007/s11627-015-9662-4