

OPTIMASI PERLAKUAN EKSPLAN PADA KULTUR ORGAN VEGETATIF TANAMAN KARET (*HEVEA BRASILIENSIS* MUELL. ARG.) KLON PB 330

Explant Treatment Optimization on Vegetatif Organ Culture of Rubber Clone PB 330 (Hevea brasiliensis Muell. Arg.)

Lestari Admojo¹ dan Nur Eko Prasetyo¹

¹Balai Penelitian Getas, Jl. Pattimura Km 6. Salatiga 50702
Email : tariadmojo@gmail.com

Diterima 1 Agustus 2018 / Direvisi 12 Oktober 2018 / Disetujui 10 Desember 2018

Abstrak

Perkembangan sistem perbanyak klonal melalui teknik kultur jaringan tanaman karet masih terus dikaji. Embrio fase torpedo berhasil diperoleh pada tahun 2012 menggunakan eksplan petiol klon PB 330, namun persentasenya sangat rendah akibat ketidakstabilan kalus friabel yang diperoleh, dan adanya hambatan fase diferensiasi selanjutnya. Hambatan tersebut berupa tingginya tingkat kontaminasi dan intensitas *browning*. Serangkaian penelitian pendahuluan dilakukan dalam upaya optimasi perolehan kalus friabel yang lebih baik. Penelitian tersebut meliputi teknik sterilisasi untuk meminimalkan tingkat kontaminasi, teknik eliminasi *browning*, pemilihan bagian dan fase eksplan dan kombinasi zat pengatur tumbuh dalam media kultur. Rangkaian penelitian tersebut dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada (UGM) dan Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Penelitian Getas, sepanjang Oktober 2013 hingga Oktober 2017. Hasil penelitian menunjukkan bahwa beberapa optimasi perlakuan sumber eksplan berhasil dilakukan. Kontaminasi berhasil ditekan hingga 33% pada kultur petiol dengan perlakuan prasterilisasi perendaman eksplan dalam fungisida Dithane M-45 selama 24 jam, kemudian disterilisasi dengan NaClO 5,25% dan HgCl₂ 0,2%. Penurunan kontaminasi juga didukung dengan penempatan sumber eksplan di luar area pembibitan karet. Intensitas *browning* berhasil ditekan hingga 7,5% dengan merendam eksplan dalam

larutan asam askorbat steril selama 30 menit sebelum tanam. Penurunan intensitas *browning* diperoleh dengan pemilihan fase eksplan yang tepat (pertengahan *flush*) dan minimal pelukaan pada eksplan. Penambahan auksin ganda NAA 0,1 ppm+2,4-D 1 ppm ke dalam media MS modifikasi dan menempatkan sumber eksplan di bawah kondisi ternaung berhasil meningkatkan persentase kalus friabel hingga 60%. Protokol tersebut perlu terus dioptimasi untuk mengetahui respon diferensiasi selanjutnya.

Kata kunci: klon karet, *Hevea brasiliensis*, PB 330, induksi kalus, kultur jaringan

Abstract

Establishment of clonal propagation through tissue culture in rubber plant is still being studied. Torpedo phase of embryo was obtained in 2012 generated from clone PB 330 petiole however the percentage was very low due to an unstable friable callus, high contamination and high percentage of browning. Preexperiments were conducted to optimized treatment for better friable callus, such as sterilization treatment, browning elimination, choice of the explant types and phase, and growth regulator combination on culture medium. These research were conducted at Biotechnology Laboratory, Faculty of Biology, Gadjah Mada University (UGM) and Tissue Culture Laboratory, Getas Research Station since October 2013 until October 2017. Result showed that treatments optimization of explant sources were successfully carried out. Contamination level was suppressed up to 33% in petiole culture with prasterillization

treatment which was soaked the explants in Dithane M-45 for 24 hours and sterilization using 5.25% NaClO and 0.2% HgCl₂. The decrease in contamination was also supported by isolating the plant outside the nursery area. Browning intensity was reduced to 7.5% by soaking explants in a sterile ascorbic acid solution for 30 minutes before planting. Decrease in browning intensity was also supported by the selection of the right explant phase (mid-flush) and minimal exposure to explants. The enrichment used 1 ppm 2,4-D+0.1 ppm NAA in modified MS media and placing explant sources under sheltered conditions enhance the percentage of friabel callus up to 60%. This protocol should be optimized mainly to know the next of differentiation respons.

Keywords: rubber clone, Hevea brasiliensis, PB 330, callus induction, tissue culture

Pendahuluan

Penelitian kultur jaringan pada tanaman karet, terutama untuk tujuan embriogenesis somatik, telah dimulai sejak tahun 1980-an oleh beberapa peneliti, antara lain oleh Chuanqin *et al.* (1980), Chen *et al.* (1982) dan Carron *et al.* (1995). Penelitian-penelitian tersebut yang hampir seluruhnya menggunakan eksplan jaringan generatif seperti biji ataupun anter. Pada saat itu belum diperoleh hasil yang memuaskan (Carron *et al.*, 1995). Penelitian kultur jaringan tanaman karet hingga saat ini juga telah banyak dilakukan baik di Malaysia, Cina, Perancis maupun Ceylon, namun belum ada satupun yang menggunakan sumber eksplan dari jaringan vegetatif tanaman klonal. Berdasarkan penelitian sebelumnya, eksplan yang digunakan berasal dari jaringan generatif seperti anter dan integumen atau kotiledon biji (Blanc *et al.*, 1999); (Cailloux *et al.*, 1996) atau bagian akar kecambah biji hasil kultur *in vitro* (Zhou *et al.*, 2010). Beberapa penelitian embriogenesis somatik menggunakan jaringan vegetatif tanaman berkayu dewasa telah banyak dilakukan dan disimpulkan bahwa jaringan vegetatif tanaman dewasa memungkinkan digunakan sebagai sumber eksplan (Ruaud & Pâques, 1995).

Pengujian penggunaan jaringan vegetatif tanaman klonal karet sebagai eksplan telah dilakukan oleh Balai Penelitian Getas bekerjasama dengan Fakultas Biologi UGM sejak tahun 2011. Hasil penelitian menunjukkan bahwa media MS+2,4-D 5 ppm berhasil menginduksi kalus friabel pada klon PB 330, namun persentase dan berat kalus masih rendah (Admojo *et al.*, 2012). Rendahnya respon tersebut antara lain disebabkan oleh faktor tingginya tingkat kontaminasi eksplan, tingginya intensitas pencoklatan (*browning*) selama fase tanam, faktor pemilihan bagian eksplan, dan faktor kombinasi media yang masih perlu disempurnakan.

Tanaman karet mempunyai kandungan getah pada hampir seluruh bagian tanaman. Kondisi tersebut diduga berpengaruh pada tingkat kontaminasi *in vitro*, selain kondisi lapangan yang rentan terkontaminasi fungi. Perlakuan pra sterilisasi dengan merendam eksplan di dalam larutan fungisida sebelum sterilisasi dan penanaman pada media, perlu dicoba setelah perlakuan penyemprotan fungisida pada tanaman di lapangan dan rumah kaca belum menunjukkan hasil yang memuaskan. Perlakuan prasterilisasi dan sterilisasi ekplan menggunakan bahan sterilan yang tepat perlu diupayakan untuk menurunkan tingkat kontaminasi setidaknya hanya 15–25 %. Pada kultur tunas muda klon karet RRIC 100 dan RRIC 121, kontaminasi eksplan berhasil ditekan hingga 80% lebih rendah dengan sterilisasi menggunakan 0,2% HgCl₂ dan etanol 70%, dibandingkan dengan perlakuan sterilan tunggal yang hanya mampu menekan sekitar 50% (Seneviratne *et al.*, 1995). Penggunaan HgCl₂ dan NaClO untuk kultur tebu dilaporkan terbukti lebih efektif dibandingkan bahan sterilan lain (Tiwari *et al.*, 2012). Penggunaan NaClO yang dikombinasikan dengan etanol 70%, atau beberapa surfaktan seperti H₂O₂, *calcium hypochlorite*, alkohol, fungisida, antibiotik dan *bromine water* mampu menghasilkan kultur steril pada beberapa tanaman hingga 95% (Kaviani, 2015).

Browning jaringan eksplan merupakan salah satu permasalahan yang sering terjadi pada kultur *in vitro* tanaman karet. *Browning* umumnya disebabkan oleh senyawa fenolik yang biasanya muncul dan terakumulasi ketika eksplan dilukai yang biasanya disebabkan oleh aktivasi enzim *polyphenol oxidase* (PPO). Enzim PPO dan *peroxidase* (POD) diketahui banyak ditemukan pada family *Euphorbiaceae*, *Moraceae*, dan *Anacardiaceae* yang antara lain berhubungan dengan kandungan getah (lateks) yang tinggi (John *et al.*, 2003). Umumnya, pencokelatan merupakan hasil dari interaksi antara aktivitas enzim PPO dan kandungan polifenol. Seperti diketahui, perubahan permeabilitas membran menyebabkan pelepasan enzim dan substrat pada sitosol yang memicu pigmentasi atau pencokelatan (Mellidou *et al.*, 2014). Upaya mengatasi *browning* pada kultur tanaman berkayu 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.

Beberapa faktor diketahui mempengaruhi pembentukan kalus friabel, antara lain sifat genetik sumber eksplan, juvenilitas sumber eksplan, tipe jaringan eksplan yang digunakan dan komponen media (Zhang *et al.*, 2000). Komponen media yang perlu dipertimbangkan adalah komposisi zat pengatur tumbuh yang sering mempengaruhi tipe kalus yang dihasilkan, seperti auksin atau kombinasinya dengan sitokinin (Carrier *et al.*, 1990). Auksin diketahui berperan dalam meningkatkan elastisitas dan permeabilitas sel. Loschiavo *et al.* (1989) menyatakan bahwa auksin dapat menyebabkan DNA lebih termetilasi (hipermetilasi) yang memicu sel melakukan *reprogramming* dari sel-sel yang seharusnya berdiferensiasi. Hal tersebut menyebabkan sel-sel mengalami dediferensiasi (membentuk kalus) yang selanjutnya bisa dipicu untuk melakukan morfogenesis atau embriogenesis (Terzi & Schiavo, 1990). Beberapa peneliti mencoba menggabungkan jenis auksin yang berbeda, namun karena

pengaruh auksin tunggal dapat beragam pada genotip yang berbeda, para peneliti akhirnya cenderung menggunakan satu atau dua kombinasi saja (Blackmon *et al.*, 1981).

Tulisan ini merangkum serangkaian hasil penelitian pendahuluan kultur organ vegetatif klon karet PB 330 dalam rangka untuk mengoptimasi perolehan kalus friabel. Tujuan dari upaya optimasi protokol ini adalah untuk mendapatkan respon kalus friabel dengan persentase jumlah eksplan berkalus yang tinggi, waktu berkalus yang lebih cepat dan berat kalus yang lebih tinggi dengan mengatasi kendala pra-respon seperti kontaminasi dan *browning* saat tanam.

Beberapa Hasil Optimasi Prakondisi Eksplan

A. Sumber Eksplan

Eksplan dari daerah pembibitan diambil dari kebun entres Balai Penelitian Getas, sedangkan eksplan di luar daerah pembibitan (non pembibitan) dengan menempatkan bibit polybag di rumah kaca Fakultas Biologi UGM. Kedua eksplan diambil sekitar bulan Agustus–September 2013. Eksplan yang dicoba berupa midrib (pertulangan daun) dan petiol (tangkai daun). Sebelum dikultur, eksplan diberi perlakuan prasterilisasi dengan direndam di dalam larutan fungisida Dithane M-45 selama 24 jam, dan sterilisasi menggunakan alkohol 70%, NaClO 2,25%, HgCl₂ 0,2%, dan akuades steril. Hasil pengamatan menunjukkan, wilayah pertanaman mempengaruhi tingginya tingkat kontaminasi eksplan, baik untuk eksplan midrib maupun petiol. Tingkat kontaminasi sumber eksplan yang berasal dari kebun pembibitan lebih tinggi dibandingkan dengan sumber eksplan yang telah diisolasi jauh dari lokasi pembibitan (Tabel 1). Perlakuan isolasi sumber eksplan dengan menempatkan pada lokasi yang jauh dari area pembibitan dapat meminimalisir tingkat kontaminasi *in vitro*.

Kontaminasi eksplan merupakan fungsi antara faktor tanaman dan lingkungan yang saling berhubungan. Faktor-faktor tersebut antara lain spesies tanaman, umur tanaman,

Tabel 1. Tingkat kontaminasi berdasarkan lokasi sumber eksplan.

Sumber eksplan	Tingkat Kontaminasi (%)		Waktu kontaminasi (HST)	
	midrib	petiol	midrib	petiol
Daerah pembibitan karet	85 ^a	96,5 ^a	12,5 ^a (7-18)	8,6 ^a (5-18)
Daerah non pembibitan karet	25 ^b	33,0 ^b	20,6 ^b (14-25)	23,5 ^b (12-28)

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi 5% berdasarkan uji DMRT. HST : Hari Setelah Tanam

sumber eksplan, dan kondisi yang mendukung berkembangnya mikroorganisme (Singh *et al.*, 2011). Sumber eksplan akan mudah terserang penyakit bila ditempatkan di sekitar kebun pembibitan sekalipun dengan pemeliharaan yang intensif. Hal ini karena sumber penyakit dimungkinkan tetap bertahan di area tersebut sekalipun tidak menginfeksi. Kondisi tersebut bisa diperparah dengan dukungan faktor lingkungan, seperti faktor suhu, curah hujan dan kelembaban. Mekanisme patogenitas *in vitro* dapat menjelaskan mengapa bakteri, fungi dan ragi yang awalnya tidak menginfeksi di lapangan menjadi patogen ketika jaringan dikultur. Salah satunya adalah kondisi lingkungan dan media tumbuh menyebabkan mikroorganisme yang awalnya bersifat laten menemukan kondisi untuk berkembang menjadi patogen (Leifert *et al.*, 1994).

B. Bagian dan Fase Eksplan

Pengujian bagian dan fase eksplan diambil dari bibit yang ditanam di bawah naungan di area non pembibitan karet. Eksplan diambil

pada fase *flush* tengah pada pagi hari. Media yang digunakan yaitu kombinasi MSmod+2,4-D 1 ppm+NAA 0,1 ppm. Sebelum tanam, eksplan diberi perlakuan eliminasi *browning* dengan direndam kedalam asam askorbat steril selama 30 menit. Hasilnya menunjukkan bahwa eksplan petiol lebih prospektif, karena menghasilkan respon kalus yang lebih baik, yaitu karakteristik kalus lebih banyak yang bersifat *friable* dan rata-rata berat kalus yang lebih baik. Meskipun demikian berat kalus masih perlu ditingkatkan dengan pengujian lanjutan (Tabel 2). Pengujian eksplan petiol selanjutnya dibedakan berdasarkan fase pembentukan daun (*flush*) untuk melihat pengaruhnya. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa fase awal *flush* cenderung lebih tinggi tingkat *browning*-nya dibandingkan fase lain (Tabel 3). Hal ini karena faktor kadar antosianin yang tinggi pada fase awal *flush*, yang ditunjukkan dengan warna daun yang kemerahan (Fang *et al.*, 2016). Antosianin merupakan salah satu senyawa fenolik yang berpotensi menyebabkan *browning* pada kultur *in vitro*. Pada fase akhir *flush*, saat daun sudah

Tabel 2. Pengaruh bagian - bagian daun sebagai sumber eksplan terhadap respon pembentukan kalus.

Bagian eksplan	Respon	Waktu muncul kalus (HST)	Berat kalus (mg)	Karakteristik kalus
Midrib (pertulangan daun)	Kalus	16,8 ^a (13-26)	42,5 ^a	Sebagian besar kompak, sebagian kecil friabel
Lamina (helaian daun)	Jaringan membengkak	-	-	-
Petiol (Tangkai daun)	Kalus	25,0 ^b (22-31)	55,5 ^b	Sebagian besar friabel, sebagian kecil kompak

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi 5% berdasarkan uji DMRT. HST : Hari Setelah Tanam

Tabel 3. Pengaruh fase sumber eksplan terhadap intensitas *browning* dan respon pembentuk kalus.

Fase tunas	Waktu muncul kalus (HST)	Persentase <i>browning</i> (%)	Berat kalus (mg)	Karakteristik kalus
<i>Flush</i> awal (daun kemerahan)	29,8 (24-33)	85 ^b	21,6 ^a	Bening, kompak
<i>Flush</i> tengah (daun kehijauan)	25,0 (22-31)	35 ^a	55,5 ^b	Friabel, kehijauan/ Kekuningan
<i>Flush</i> akhir (daun hijau segar)	Tidak terbentuk kalus	45 ^a	-	-

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi 5% berdasarkan uji DMRT. HST : Hari Setelah Tanam

mulai membuka penuh dan berwarna hijau segar, maka tingkat *browning* menurun. Namun fase ini sama sekali tidak merespon terbentuknya kalus. Fase pertengahan *flush* (daun sudah mulai kehijauan), nyata lebih rendah tingkat *browning* dan lebih respon pembentukan kalus lebih baik. Fase pertengahan *flush* menunjukkan warna tangkai dan daun yang sudah kehijauan yang menunjukkan rendahnya kadar antosianin sehingga menurunkan potensi *browning*, namun daun masih sangat muda sehingga sel-selnya berpotensi cepat merespon induksi hormon dalam media untuk membentuk kalus.

Beberapa faktor yang diketahui mempengaruhi perbedaan respon pembentukan kalus friabel antara lain genetik sumber eksplan, juvenilitas sumber eksplan, tipe dan fase jaringan eksplan yang digunakan dan komponen media (Zhang *et al.*, 2000). Roberts *et al.* (1989) juga menemukan bahwa pada spesies tanaman, jika eksplan diambil dari bagian organ dan tahap perkembangan tanaman yang berbeda akan memberikan respon yang berbeda secara *in vitro*. Tekstur kalus juga bisa dipengaruhi oleh tipe jaringan eksplan yang digunakan untuk inisiasi (Noriega & Söndahl, 1991). Perbedaan respon eksplan tersebut antara lain juga dipengaruhi oleh kondisi hormon endogen eksplan. Level auksin alami di dalam jaringan eksplan

diketahui tergantung pada tanaman asal (*mother plant*) serta bagian tanaman di mana eksplan tersebut diambil (Cassells, 1979).

C. Perlakuan Naungan terhadap Tanaman Sumber Eksplan

Eksplan yang digunakan yaitu petiol daun fase pertengahan *flush* yang diambil dari bibit yang ditanam di lokasi non pembibitan karet. Tanaman ditempatkan di bawah naungan 75% dan tanpa naungan. Fase pertengahan *flush* dipilih berdasarkan pengujian fase pemilihan sumber eksplan (Bagian B), dan pemilihan naungan 75% karena diduga perlakuan naungan pada sumber eksplan dapat mempengaruhi kerja hormon auksin yang diharapkan berpengaruh positif terhadap respon eksplan. Eksplan ditanam pada media MSmod + 2,4-D 1 ppm + NAA 0,1 ppm dengan aplikasi perendaman asam askorbat steril 100 mg/L selama 30 menit sebelum tanam untuk mencegah *browning*. Hasil pengujian menunjukkan, naungan mempengaruhi respon pembentukan kalus, berat kalus, dan intensitas *browning*. Pada sumber eksplan tanpa naungan menunjukkan respon kalus hanya pada bagian pinggir ujung eksplan, dengan intensitas *browning* yang cenderung lebih tinggi dibandingkan sumber eksplan di bawah naungan (Tabel 4).

Tabel 4. Pengaruh naungan terhadap respon pembentukan kalus.

Pemeliharaan	Waktu muncul kalus (HST)	Bagian eksplan berkalus	Intensitas <i>Browning</i> (%)	Berat kalus (mg)
Dengan naungan	23,5 (12-28)	ujung dan tengah	15	55,5 ^a
Tanpa naungan	22,6 (15-29)	ujung salah satu sisi atau kedua sisi	65	30,3 ^b

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi 5% berdasarkan uji DMRT. HST : Hari Setelah Tanam.

Naungan dapat berperan dalam memaksimalkan kerja hormon auksin. Naungan mempengaruhi rasio fitokrom *far red light* (FR) dan *far light* (F). Perubahan rasio tersebut mendorong aktivasi respon auksin transport, yang menyebabkan terjadinya respon morfogenesis sebagai akibat respon perauksin (Vandenbussche *et al.*, 2003). Hormon auksin pada tanaman antara lain berperan dalam menginduksi pembelahan sel, yang dapat berperan meningkatkan biomassa kalus. Naungan juga mempengaruhi aktivitas senyawa fenolik yang memungkinkan menghambat oksidasi penyebab *browning*. Pada tanaman *Hamamelis* dan *Garrya*, oksidasi senyawa fenolik tidak dapat dicegah hanya dengan mengkultur eksplan dalam kondisi gelap (tanpa cahaya) selama fase inisiasi *in vitro*, namun juga sejak awal dengan mengurangi intensitas cahaya (naungan) saat tanaman sumber eksplan berada di lapangan (Marks & Simpson, 1990).

Beberapa Hasil Optimasi Teknis Perlakuan Eksplan

A. Prasterilisasi dan Sterilisasi Eksplan

Percobaan prasterilisasi dan sterilisasi eksplan telah dilakukan oleh Admojo & Indrianto (2016) yaitu melakukan pengujian eksplan petiol dan midrib fase *flush* bagian tengah yang diambil dari tanaman sumber eksplan di area non pembibitan karet yang dinaungi. Bahan yang digunakan untuk prasterilisasi yaitu fungisida Dithane M-45 konsentrasi 10 g/L. Perlakuan yang diterapkan

dalam upaya optimasi prasterilisasi yaitu dengan perendaman fungisida selama 24 jam, perendaman fungisida selama <24 jam dan tanpa perendaman fungisida sama sekali (Tabel 5). Selanjutnya, setiap perlakuan tersebut diikuti dengan perendaman dalam alkohol 70% selama 3 menit diulang 3 kali dengan dibilas akuades steril. Sterilisasi tersebut diulang sebanyak 3 kali. Adapun perlakuan yang diterapkan untuk optimasi sterilisasi yaitu sterilisasi dengan perendaman eksplan dalam HgCl₂ 0,2% dan NaClO 5,25% selama 3 menit, perendaman eksplan dalam HgCl₂ 0,2% selama 3 menit, perendaman eksplan dalam NaClO 5,25% selama 3 menit dan tanpa perendaman kedua bahan tersebut. Selanjutnya, setiap perlakuan tersebut diikuti dengan perendaman dalam alkohol 70% selama 3 menit diulang 3 kali dengan dibilas akuades steril.

Hasil dari optimasi tersebut disajikan dalam Tabel 5 diatas. Berdasarkan data tersebut diketahui bahwa kontaminasi pada eksplan petiol bisa ditekan hingga 33% dengan mengkombinasikan perlakuan prasterilisasi dan sterilisasi. Perlakuan prasterilisasi dengan merendam eksplan dalam larutan fungisida Dithane M-45 selama 24 jam dan perlakuan sterilisasi dengan merendam eksplan dalam NaClO 5,25% dan HgCl₂ 0,2% selama tiga menit. Pada eksplan midrib, efektif dilakukan dengan prasterilisasi yaitu merendam eksplan dalam larutan fungisida Dithane M-45 selama 30 atau 60 menit dan perlakuan sterilisasi dengan merendam eksplan dalam alkohol 70% dan NaClO 5,25% selama 3 menit. Perlakuan tersebut mampu menekan tingkat kontaminasi yang hanya mencapai 21,33% dan 21,67%.

Tabel 5. Pengaruh perlakuan prasterilisasi dan sterilisasi kultur petiol terhadap tingkat kontaminasi (Admojo & Indrianto, 2016).

Perlakuan	Tingkat kontaminasi (%)
Perlakuan prasterilisasi :	
Prasterilisasi dengan direndam fungisida 24 jam	55
Prasterilisasi/perendaman fungisida <24 jam	90
Tanpa perlakuan prasterilisasi	100
Perlakuan sterilisasi :	
Sterilisasi dengan HgCl ₂ 0,2% dan NaClO 5,25% selama 3 menit	65
Sterilisasi dengan HgCl ₂ 0,2% saja selama 3 menit	80
Sterilisasi dengan NaClO 5,25% saja selama 3 menit	95
Sterilisasi tanpa HgCl ₂ dan NaClO	100
Perlakuan prasterilisasi dan sterilisasi	
Prasterilisasi direndam fungisida 24 jam dan Sterilisasi dengan HgCl ₂ 0,2% dan NaClO 5,25% selama 3 menit	33

Kedua hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan prasterilisasi dan sterilisasi yang tepat dapat mengurangi tingkat kontaminasi eksplan secara signifikan. Pada tanaman *Aquilaria malaccensis*, perlakuan NaClO 5,25% saja hingga pada konsentrasi tinggi (50% NaClO) secara tunggal tidak cukup untuk mengontrol kontaminasi fungi dan bakteri pada eksplan. Penggunaan bahan sterilan HgCl₂ bersama fungisida pada praperlakuan, menghasilkan efisiensi sterilisasi yang lebih baik yaitu pada kisaran 83–90% untuk eksplan daun, nodal dan biji tanaman *A. malaccensis* yang diambil dari lapangan dan dikultur selama 40 hari (Daud *et al.*, 2012).

Sterilisasi pada eksplan petiol membutuhkan bahan sterilan lebih banyak (HgCl₂ dan NaClO) serta durasi waktu prasterilisasi yang lama (direndam fungisida selama 24 jam) dibandingkan pada eksplan midrib. Hal tersebut diduga berkaitan dengan kandungan getah pada petiol yang lebih banyak. Banyaknya kandungan getah menyimpan potensi kandungan mikroba yang lebih banyak. Enjalric *et al.* (1988) *cit.* Seneviratne *et al.* (1995), menyatakan bahwa terdapat sejumlah besar bakteri dan fungi yang

berasosiasi dengan jaringan tanaman, yaitu sekitar 20 jenis berbeda yang menyebabkan sekitar 73% infeksi penyakit pada tanaman karet, terutama pada bagian batang yang bergetah. Mekanisme HgCl₂ dalam mencegah aktivitas mikroba yaitu dengan menurunkan aktivitas protein akibat mekanisme pengikatan grup thiol (-SH). Merkuri dapat menonaktifkan sejumlah enzim dengan memblok sisi fungsional yang berikatan dengan grup -SH yang merupakan bagian katalitik enzim. Merkuri menginduksi peningkatan akumulasi dari *reactive oxygen species* (ROS) pada sel, meningkatkan peroksidasi lipid, degradasi protein, dan menyebabkan kematian sel (Rao & Patel, 2013). Efektivitas NaClO berhubungan dengan tingginya pH larutan yang mengganggu integritas membran sitoplasma sel bakteri melalui mekanisme hambatan enzim yang bersifat ireversibel, merubah mekanisme biosintesis pada metabolisme sel dan merusak struktur fosfolipid. Inaktivasi enzim dapat teramati pada reaksi klorin dengan grup amino (NH₂-) dan oksidasi yang bersifat ireversibel pada grup sulfidril (SH) pada enzim bakteri (Estrela *et al.*, 2003).

B. Eliminasi *Browning*

Eksplan yang digunakan yaitu midrib yang diambil dari daun fase *flush* bagian tengah dari bibit yang ditempatkan di area non pembibitan karet, dengan kondisi di bawah naungan. Hasil pengujian Admojo & Indrianto (2016) menunjukkan bahwa *browning* berhasil ditekan hingga 30% dengan intensitas *browning* sebesar 7,5% (Tabel 6). Eksplan direndam di dalam asam askorbat steril 100 mg/L selama 30 menit sebelum tanam, dan kultur diinkubasi dalam ruang gelap hingga terbentuk kalus. Perendaman eksplan dalam asam askorbat tidak hanya memapar eksplan pada senyawa reduksi tetapi juga pada pH rendah. Pada pH di bawah 4, aktivitas enzim PPO menurun karena reduksi dari Cu^{2+} menjadi *mononuclear copper* (Cu^+) pada sisi aktifnya, atau kehilangan rantai *copper* pada sisi aktifnya, atau berhubungan dengan reduksi senyawa quinon menjadi difenol (Arpita *et al.*, 2010). Aktivitas PPO tanaman karet terjadi pada rentang pH 4-

10, dengan aktivitas optimal terjadi pada pH 6.0 (Muhamad *et al.*, 2012). Enzim PPO dilaporkan terdapat pada fraksi lutoid dan partikel *Frey-Wyssling* yang terdapat pada pembuluh lateks, bahkan pada lutoid ditemukan hingga 5–34 kali lebih tinggi dibandingkan pada partikel *Frey-Wyssling* (John *et al.*, 2003). Enzim PPO diketahui terdapat pada daun, biji dan suspensi sel dari tanaman karet *Hevea brasiliensis*, dimana *catechol* ditemukan paling banyak sebagai spesifik substratnya (Muhamad *et al.*, 2012).

C. Perlakuan Auksin

Dari 24 kombinasi media, hanya 5 kombinasi media yang berhasil memicu terbentuknya kalus dari eksplan midrib (Tabel 7). Media yang menginduksi kalus adalah media yang diperkaya dengan auksin jenis 2,4-D atau kombinasinya dengan NAA, sedangkan jenis auksin lain seperti 3,4-D, picloram dan dicamba tidak memicu respon

Tabel 6. Pengaruh beberapa perlakuan terhadap intensitas *browning* (Admojo & Indrianto, 2016).

Perlakuan	Jumlah eksplan	Waktu awal <i>browning</i> (HST)	Persentase Intensitas <i>browning</i> (%)	Persentase Jumlah eksplan <i>Browning</i> (%)	Waktu >50% eksplan <i>browning</i> (HST)
Kontrol terang	20	3	95,0 ^a ±10,5	100	7
Kontrol gelap	20	5	90,0 ^a ±10,4	100	7
Rendam asam askorbat - terang	20	12	45,0 ^b ±27,6	70	35
Rendam asam askorbat - gelap	20	17	7,5 ^c ±2,6	30	-
Rendam (sukrosa+arang aktif)-terang	20	15	52,5 ^b ±36,1	70	22
Rendam (sukrosa+arang aktif)-gelap	20	19	45,0 ^b ±31,4	60	33
Subkultur berulang 3x - terang	20	3 ^{*)}	90,0 ^a ±17,4	100	13 ^{*)}
Subkultur berulang 3x - gelap	20	6 ^{*)}	52,5 ^b ±30,5	70	29 ^{*)}
Subkultur berulang+rendam asam askorbat-gelap	20	4 ^{*)}	10 ^c ±3,3	30	-
Subkultur berulang+rendam (sukrosa+arang aktif)-gelap	20	5 ^{*)}	45 ^b ±22,2	70	19 ^{*)}

Keterangan: ^{*)}: Hari setelah subkultur pertama. HST (Hari Setelah Tanam). Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi 5% berdasarkan uji DMRT

Tabel 7. Pengaruh perlakuan jenis auksin terhadap respon pembentukan kalus pada eksplan midrib.

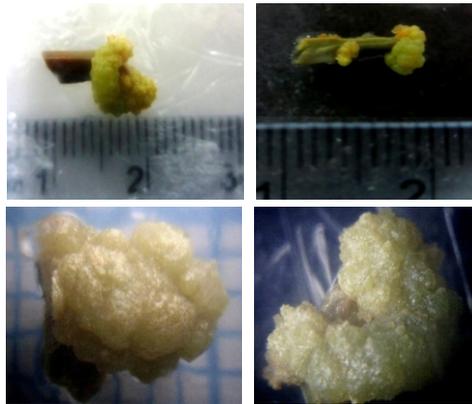
Perlakuan			Respon			
Media	Konsentrasi auksin (ppm)	Kalus (terbentuk/tidak)	Jumlah eksplan berkalus (%)	Rata-rata waktu berkalus (HST)	Karakteristik kalus	Rata-rata berat kalus (mg)
MS0	-	Tidak	-	-	-	-
MS+2,4-D	1	Tidak	-	-	-	-
	3	Tidak	-	-	-	-
	5	Terbentuk	25	24,2 ^b	Friabel	24,6 ^{cb}
MS+3,4-D	1	Tidak	-	-	-	-
	3	Tidak	-	-	-	-
	5	Tidak	-	-	-	-
MS+Picloram	1	Tidak	-	-	-	-
	3	Tidak	-	-	-	-
	5	Tidak	-	-	-	-
MS+Dicamba	1	Terbentuk	15	18,4 ^a	Kompak	-
	3	Tidak	-	-	-	-
	5	Tidak	-	-	-	-
MSmod	-	Tidak	-	-	-	-
Msmod+2,4D + NAA 0,1ppm	1	Terbentuk	50	16,8 ^a	Friabel	42,5 ^a
	3	Terbentuk	20	24,8 ^b	Friabel	13,8 ^{cd}
	5	Terbentuk	40	17,6 ^a	Friabel, kompak	27,3 ^b
Msmod+3,4D +NAA 0,1ppm	1	Tidak	-	-	-	-
	3	Tidak	-	-	-	-
	5	Tidak	-	-	-	-
MSmod+Pic+NAA 0,1 ppm	1	Tidak	-	-	-	-
	3	Tidak	-	-	-	-
	5	Tidak	-	-	-	-
MSmod+Dic+NAA 0,1 ppm	1	Tidak	-	-	-	-
	3	Tidak	-	-	-	-
	5	Tidak	-	-	-	-
Rata-rata			30	20,36		22,52

Keterangan: HST (Hari Setelah Tanam). Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi 5% berdasarkan uji DMRT. MSmod adalah MS yang dimodifikasi dengan penambahan Ca(NO₃)₂ 1.200 mg/L, L-cystein 50 mg/L dan Casein hydrolysate 1 mg/L.

kalus. Hasil pengujian tersebut membuktikan bahwa perlakuan jenis auksin yang berbeda (2,4-D, 3,4-D, picloram dan dicamba) memberikan pengaruh yang berbeda terhadap respon kalus. Penampilan respon eksplan terhadap perlakuan auksin tunggal (2,4-D) dan kombinasi dua auksin (auksin ganda 2,4-D+NAA) disajikan pada Gambar 1 dan 2.

Perlakuan jenis auksin yang berbeda dapat memberikan pengaruh yang sangat berbeda, sekalipun pada konsentrasi yang sama, apalagi

aksi auksin mempengaruhi genomik. Respon auksin dapat dibedakan tingkat genomik atau non genomik. Pada tingkat genomik, kontrol auksin melalui berbagai ekspresi gen, sedangkan non genomik auksin beraksi meregulasi biologi dan fisiologi sel secara langsung tanpa melalui proses transkripsi (Tromas *et al.*, 2010). Respon *cell-* dan *tissue-specific* sangat ditentukan melalui variasi spasial pada perangkat sinyaling auksin yang secara khusus menyebabkan perubahan



Gambar 1. Kalus eksplan petiol PB 330 pada media MS + auksin tunggal.



Gambar 2. Kalus eksplan petiol PB 330 pada media MS + auksin ganda.

ekspresi gen (Lokerse & Weijers, 2009; Kieffer *et al.*, 2010). Perlakuan bermacam variasi auksin menunjukkan adanya ratusan gen yang merespon dengan di *up-* atau *down-regulated* (Okushima *et al.*, 2005). Perbedaan respon juga bisa dipengaruhi oleh respon reseptor auksin, misalnya SCFAFB5 berperan sebagai reseptor Picloram (Walsh *et al.*, 2006), sedangkan TIR1 dibutuhkan untuk pengenalan auksin 2,4-D dimana mengandung *binding pocket* yang dapat mengikat 2,4-D (Parry *et al.*, 2009).

Hasil senada juga diperoleh eksplan petiol yang ditumbuhkan pada media dengan kombinasi auksin 2,4-D dan NAA menunjukkan respon pembentukan kalus yang lebih baik (Tabel 8). Venkatachalam *et al.* (2007) menyatakan bahwa media MS yang dimodifikasi dengan penambahan *casein*

hydrolysate, kalsium nitrat dan *L-cystein*, dengan menambahkan 2,4-D dan NAA mampu meningkatkan pembentukan kalus friabel pada eksplan daun tanaman karet. Auksin sintetik 2,4-D dan NAA mudah sekali diubah setelah memasuki jaringan tanaman, untuk membentuk konjugat terutama dengan glukosil ester (Klemš *et al.*, 1998). Sinergisme peran dari 2,4-D dan NAA juga ditemukan oleh Nikolaeva *et al.* (2009) pada tanaman *Camellia chinensis*, yang menghasilkan pertumbuhan kalus lebih cepat dan lebih baik pada kombinasi 2,4-D 3.0 mg/l dan NAA 1.0 mg/l dalam media MS. NAA terbukti berperan dalam meningkatkan biomassa kalus, jaringan atau organ tanaman, dibandingkan perlakuan IAA dan IBA (Dąbski & Parzymies, 2007).

Tabel 8. Pengaruh perlakuan jenis auksin terhadap respon pembentukan kalus pada eksplan petiol.

Media	Konsentrasi 2,4-D (ppm)	Total eksplan	Persentase eksplan berkalus (%)	Waktu mulai berkalus (HST)	Karakteristik kalus	Rata-rata berat kalus (mg)
MSmod	-	20	-	-	-	-
	1	20	20	21	Friabel, kompak	13,5 ^b ± 3,2
MSmod	3	20	40	23	Friabel, kompak	11,7 ^b ± 5,3
	5	20	50	18	Friabel	47,0 ^a ± 10,2
MSmod +	1	20	60	25	Friabel	55,5 ^a ± 8,9
	3	20	35	20	Friabel	35,6 ^{bc} ± 6,1
NAA 0,1 ppm	5	20	30	27	Friabel	48,9 ^a ± 6,4
Rata-rata			39,2	22		35,37

Keterangan: HST (Hari Setelah Tanam). Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi 5% berdasarkan uji DMRT. MSmod adalah MS yang dimodifikasi dengan penambahan Ca(NO₃)₂ 1.200 mg/L, L-cystein 50 mg/L dan *Casein hydrolysate* 1 mg/L.

D. Minimal Pelukaan Eksplan

Eksplan yang digunakan adalah petiol fase *flush* pertengahan dari sumber eksplan non area pembibitan, kondisi di bawah naungan, dan diberi perlakuan eliminasi *browning* menggunakan asam askorbat 100 g/L steril sebelum tanam. Media menggunakan kombinasi MSmod+2,4-D 1 ppm+NAA 0,1 ppm. Hasil pengujian menunjukkan bahwa pelukaan dengan menyayat pada bagian eksplan, atau pemotongan bagian pinggir eksplan sebelum subkultur meningkatkan peluang terjadinya *browning* secara signifikan (Tabel 9). *Browning* umumnya disebabkan oleh senyawa fenolik yang biasanya muncul dan terakumulasi ketika eksplan dilukai, yang biasanya disebabkan oleh aktivasi dari enzim

polyphenol oxidase (PPO). Pelukaan organ dapat menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan metabolisme dari *reactive oxygen species* (ROS), peroksidasi pada membran lipid, dan kehilangan integritas membran sel yang dapat memicu over akumulasi dari senyawa fenolik dan menyebabkan terjadinya *browning* (Ru *et al.*, 2013).

Kesimpulan dan Saran

Beberapa optimasi protokol mulai dari pemilihan sumber eksplan, isolasi tanaman, prasterilisasi dan kombinasi media berhasil meningkatkan pembentukan kalus dari kultur organ vegetatif klon karet PB 330. Kontaminasi pada kultur petiol berhasil ditekan dengan perlakuan prasterilisasi yaitu

Tabel 9. Pengaruh pelukaan eksplan terhadap intensitas *browning*.

Perlakuan	Intensitas <i>browning</i> (%)
Tanam tanpa sayatan	7,5 ^a
Tanam dengan sayatan	87,5 ^b
Subkultur dengan dipotong	85,5 ^b

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi 5% berdasarkan uji DMRT

perendaman eksplan ke dalam fungisida, kemudian disterilisasi menggunakan NaClO dan HgCl₂. Penurunan tingkat kontaminasi juga didukung dengan mengisolasi sumber eksplan di luar area pembibitan karet. Cara menurunkan *browning* yaitu dengan perendaman eksplan ke dalam larutan asam askorbat, pemilihan fase eksplan yang tepat dan meminimalkan pelukaan pada eksplan. Pengkayaan dengan auksin ganda NAA 0,1 ppm+2,4-D 1 ppm ke dalam media MS modifikasi dan penaungan sumber eksplan meningkatkan persentase kalus friabel. Protokol tersebut perlu terus dioptimasi terutama untuk melihat respon dari diferensiasi kalus lebih lanjut.

Daftar Pustaka

- Admojo, L., & 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. doi:10.22302/ppk.jpk.v34i1.220.
- Admojo, L., Indriyanto, A., Komalasari, R. D., Hadi, H., & Prasetyo, N. E. (2012, 19-20 September 2012). *Induksi kalus embriogenik eksplan jaringan vegetatif tanaman karet klonal*. Tulisan disajikan pada Lokakarya Konferensi Nasional Karet 2012, Yogyakarta.
- Arpita, S., Subroto, D., Pinaki, B., & Bidyut, B. (2010). Inhibition of polyphenol oxidase in banana, apple and mushroom by using different antibrowning agents under different conditions. *International Journal of Chemical Sciences*, 8(5), 5550-5558.
- Blackmon, W. J., Reynolds, B. D., & Postek, C. E. (1981). Production of somatic embryos from callused cantaloupe hypocotyls explants. *Horticultural Science*, 16(3), 451-451.
- Blanc, G., Michaux-Ferrière, N., Teisson, C., Lardet, L., & Carron, M. P. (1999). Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59(2), 103-112.
- Cailloux, F., Julien-Guerrier, J., Linossier, L., & Coudret, A. (1996). Long-term somatic embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. *Plant science*, 120(2), 185-196.
- Carrier, D.-J., Cosentino, G., Neufeld, R., Rho, D., Weber, M., & Archambault, J. (1990). Nutritional and hormonal requirements of *Ginkgo biloba* embryo-derived callus and suspension cell culture. *Plant Cell Reports*, 8(11), 635-638. doi:10.1007/BF00269981.
- Carron, M. P., Etienne, H., Michaux-Ferrière, N., & Montoro, P. (1995). Somatic Embryogenesis in Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.). In Y. P. S. Bajaj (Ed.), *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I*. Heidelberg, Germany: Springer Berlin Heidelberg.
- Cassells, A. C. (1979). The Effect of 2, 3,5 Triiodobenzoic Acid on Caulogenesis in Callus Cultures of Tomato and *Pelargonium*. *Physiologia Plantarum*, 46(2), 159-164. doi:10.1111/j.1399-3054.1979.tb06550.x.
- Chen, Z., Qian, C., Qin, M., Xu, X., & Xiao, Y. (1982). Recent advances in anther culture of *Hevea brasiliensis* (Muell.-Arg.). *Theoretical and Applied Genetics*, 62(2), 103-108. doi:10.1007/bf00293340.
- Chuanqin, W. Z. Z. X. C., Gaojun, W. H. L. Q. F., & Wenjuan, L. (1980). Induction of rubber plantlets from anther of *hevea brasiliensis* muell. Arg. In vitro. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 1, 002.
- Dbski, M., & Parzymies, M. (2007). The effect of auxins: IAA, IBA and NAA on rooting of *Hebe buchananii* (Hook) and *Hebe canterburienensis* (J B Armstr.) 'Prostrata' in vitro. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 6(1), 9-14.
- Daud, N. H., Jayaraman, S., & Mohamed, R. (2012). Methods Paper: An improved surface sterilization technique for introducing leaf, nodal and seed explants of *Aquilaria malaccensis* from field sources into tissue culture. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 20(2), 55-58.

- Estrela, C., Ribeiro, R. G., Estrela, C. R., Pécora, J. D., & Sousa-Neto, M. D. (2003). Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Brazilian Dental Journal*, 14(1), 58-62.
- Fang, Y., Mei, H., Zhou, B., Xiao, X., Yang, M., Huang, Y., . . . Tang, C. (2016). De novo transcriptome analysis reveals distinct defense mechanisms by young and mature leaves of *Hevea brasiliensis* (Para Rubber Tree). *Scientific reports*, 6(33151), 1-10. doi: 10.1038/srep33151.
- John, K. S., Bhat, S., & Rao, U. P. (2003). Biochemical characterization of sap (latex) of a few Indian mango varieties. *Phytochemistry*, 62(1), 13-19. doi:10.1016/S0031-9422(02)00441-7.
- Kaviani, B. (2015). Some Useful Information about Micropropagation. *Journal of Ornamental & Horticultural Plants*, 5(1), 29-40.
- Kieffer, M., Neve, J., & Kepinski, S. (2010). Defining auxin response contexts in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(1), 12-20.
- Klemš, M., Truksa, M., Macháccaron, I., Eder, J., & Procházka, S. (1998). Uptake, transport and metabolism of 14C-2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (14C-2, 4-d) in cucumber (*Cucumis sativus* L.) explants. *Plant growth regulation*, 26(3), 195-202. doi:10.1023/A:1006159021969.
- Leifert, C., Morris, C. E., & Waites, W. M. (1994). Ecology of Microbial Saprophytes and Pathogens in Tissue Culture and Field-Grown Plants: Reasons for Contamination Problems In Vitro. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(2), 139-183. doi:10.1080/07352689409701912.
- Lokerse, A. S., & Weijers, D. (2009). Auxin enters the matrix—assembly of response machineries for specific outputs. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(5), 520-526.
- Loschiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuti-Ronchi, V., Marazziti, D., . . . Terzi, M. (1989). DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theoretical and Applied Genetics*, 77(3), 325-331. doi:10.1007/BF00305823.
- Marks, T., & Simpson, S. E. (1990). Reduced phenolic oxidation at culture initiation in vitro following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. *Journal of Horticultural Science*, 65(2), 103-111. doi:10.1080/00221589.1990.11516036.
- Mellidou, I., Buts, K., Hatoum, D., Ho, Q. T., Johnston, J. W., Watkins, C. B., . . . Nicolai, B. M. (2014). Transcriptomic events associated with internal browning of apple during postharvest storage. *BMC. Plant Biology*, 14(1), 328-345.
- Muhamad, N., Chirapongsatonkul, N., & Churngchow, N. (2012). Defense-related polyphenol oxidase from *Hevea brasiliensis* cell suspension: Purification and characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(1), 177-189. doi:10.1007/s12010-012-9690-z.
- Nikolaeva, T., Zagorskina, N., & Zaprometov, M. (2009). Production of phenolic compounds in callus cultures of tea plant under the effect of 2, 4-D and NAA. *Russian Journal of Plant Physiology*, 56(1), 45-49. doi:10.1134/S1021443709010075.
- Noriega, C., & Söndahl, M. R. (1991). Somatic embryogenesis in hybrid tea roses. *Nature Biotechnology*, 9(10), 991-993. doi:10.1038/nbt1091-991.
- Okushima, Y., Overvoorde, P. J., Arima, K., Alonso, J. M., Chan, A., Chang, C., . . . Theologis, A. (2005). Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *The Plant Cell*, 17(2), 444-463.

- Parry, G., Calderon-Villalobos, L. I., Prigge, M., Peret, B., Dharmasiri, S., Itoh, H., . . . Estelle, M. (2009). Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(52), 22540–22545.
- Rao, M., & Patel, T. (2013). Protective effect of curcumin on mercuric chloride induced oxidative stress in rats. *Indian Journal of Applied Research*, 3(11), 541-543.
- Roberts, D., Flinn, B., Webb, D., Webster, F., & Sutton, B. (1989). Characterization of immature embryos of interior spruce by SDS-PAGE and microscopy in relation to their competence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 8(5), 285-288. doi:10.1007/BF00274131.
- Ru, Z., Lai, Y., Xu, C., & Li, L. (2013). Polyphenol oxidase (PPO) in early stage of browning of Phalaenopsis leaf explants. *Journal of Agricultural Science*, 5(9), 57-64.
- Ruaud, J., & Pâques, M. (1995). Somatic embryogenesis and rejuvenation of trees. In S. Jain, P. Gupta, & R. Newton (Eds.), *Somatic Embryogenesis In Woody Plants* (Vol. 1, pp. 99-118). Dordrecht, Netherland: Kluwer Academic Publisher.
- Seneviratne, P., Flegmann, A., & Wijesekera, G. (1995). The problem of surface sterilization of shoot materials of *Hevea*. *Jl Rubber Research Institute of Sri Lanka*, 75(1), 51-60.
- Singh, V., Tyagi, A., Chauhan, P., Kumari, P., & Kaushal, S. (2011). Identification and prevention of bacterial contamination on explant used in plant tissue culture labs. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(4), 160-163.
- Terzi, M., & Schiavo, F. L. (1990). Developmental mutants in carrot. In H. I. J. Nijkamp, I. H. W. Van Der Plas, & J. Van Aartrijk (Eds.), *1990 Progress in Plant Cellular and Molecular Biology* (pp. 391-397). Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Tiwari, A., Tripathi, S., Lal, M., & Mishra, S. (2012). Screening of some chemical disinfectants for media sterilization during in vitro micropropagation of sugarcane. *Sugar Tech*, 14(4), 364-369. doi:10.1007/s12355-012-0178-5.
- Tromas, A., Paponov, I., & Perrot-Rechenmann, C. (2010). Auxin binding protein 1: Functional and evolutionary aspects. *Trends In Plant Science*, 15(8), 436-446.
- Vandenbussche, F., Vriezen, W. H., Smalle, J., Laarhoven, L. J., Harren, F. J., & Van Der Straeten, D. (2003). Ethylene and auxin control the Arabidopsis response to decreased light intensity. *Plant Physiology*, 133(2), 517-527.
- Venkatachalam, P., Jayasree, P. K., Sushmakumari, S., Jayashree, R., Rekha, K., Sobha, S., . . . Thulaseedharan, A. (2007). Current perspectives on application of biotechnology to assist the genetic improvement of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.): An Overview. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 1(1), 1-17.
- Walsh, T. A., Neal, R., Merlo, A. O., Honma, M., Hicks, G. R., Wolff, K., . . . Davies, J. P. (2006). Mutations in an auxin receptor homolog *afb5* and in *sgt1b* confer resistance to synthetic picolinate auxins and not to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid or indole-3-acetic acid in arabidopsis. *Plant Physiology*, 142(2), 542-552.
- Zhang, B.-H., Liu, F., & Yao, C.-B. (2000). Plant regeneration via somatic embryogenesis in cotton. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60(2), 89-94.
- Zhou, Q.-N., Jiang, Z.-H., Huang, T.-D., Li, W.-G., Sun, A.-H., Dai, X.-M., & Li, Z. (2010). Plant regeneration via somatic embryogenesis from root explants of *Hevea brasiliensis*. *African Journal of Biotechnology*, 9(48), 8168-8173.