

PENCEGAHAN BROWNING FASE INISIASI KALUS PADA KULTUR MIDRIB DAUN KLON KARET (*HEVEA BRASILIENSIS* MUELL. ARG) PB 330

*Browning Prevention on Callus Initiation Phase on Leaf Midrib of PB 330
Rubber Clone Culture (Hevea brasiliensis Muell. Arg)*

Lestari ADMOJO^{1*)} dan Ari INDRIANTO²⁾

^{1*)}Balai Penelitian Getas, Pusat Penelitian Karet
Jl. Pattimura KM 6 Salatiga Jawa Tengah
Email: tariadmojo@balitgetas.co.id

²⁾Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada
Jl. Teknika Selatan, Sekip Utara, Yogyakarta

Diterima : 6 Januari 2016 / Direvisi : 30 Mei 2016 / Disetujui : 24 Juni 2016

Abstract

Tissue culture is one of new efforts to improve of rubber Hevea brasiliensis Muell. Arg clonal propagation. Nevertheless, one of the major problems is lethal browning on callus initiation. Browning caused by some phenolic compound which accumulated during wounding. This experiment was conducted to investigate the effect of antioxidant ascorbic acid, activated charcoal+sucrose, repeated culture, in combination under the dark and light culture incubations in controlling lethal browning in in-vitro culture of rubber clone PB 330 using midrib leaf explant. Explant was planted on callus initiation medium MS+2,4-D 5 ppm using 10 bottles as replication, were planted in each bottle. The observation covered the early time of browning initiation, intensity of browning, and number of explants browning up to 35 Day After Culture (DAC). Data were analyzed by Analysis of Variance of Factorial Design and significant different among treatment were compared by Duncan Multiple Range Test. The results of the current study revealed that the best treatment was soaked on 100 mg/L ascorbic acid soluble sterile treatment by 30 minutes before planted on medium and culture placed under dark condition, showed browning intensity of explants was significantly controlled down to 7.5% and also number of browning explants reduced up to 30%.

Keywords: Rubber clone; Hevea brasiliensis; PB 330; browning; ascorbic acid

Abstrak

Perbaikan teknik perbanyakan dan mutu bibit klonal karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) dapat dilakukan melalui teknik kultur jaringan. Kendala teknik tersebut diantaranya masih tingginya intensitas *browning* pada tahap inisiasi kalus. *Browning* umumnya disebabkan oleh senyawa fenolik yang biasanya muncul dan terakumulasi ketika eksplan dilukai. Penelitian ini bertujuan mengetahui metode eliminasi *browning* yang efektif diantara perlakuan perendaman eksplan dalam asam askorbat, arang aktif+sukrosa, subkultur berulang yang diinkubasi dalam ruang gelap dan terang. Bahan eksplan yang digunakan adalah eksplan midrib daun klon karet PB 330 yang ditanam pada media induksi kalus MS+2,4-D 5 ppm. Masing-masing menggunakan 10 botol sebagai ulangan dan ditanam sebanyak 2 eksplan per botol. Pengamatan meliputi waktu awal *browning*, waktu rata-rata eksplan mengalami *browning*, intensitas *browning* dan jumlah eksplan *browning* hingga 35 hari setelah tanam (HST). Data dari 10 eksplan untuk masing-masing perlakuan selanjutnya dianalisis dengan analisis ragam dari Rancangan Faktorial dan uji lanjut dengan *Duncan Multiple Range Test* untuk data yang berbeda nyata. Hasil percobaan menunjukkan bahwa perendaman eksplan dalam 100 mg/L asam askorbat steril selama 30 menit, yang diinkubasi dalam ruang gelap efektif menurunkan intensitas *browning* hingga 7,5% dengan jumlah

eksplan yang mengalami *browning* dapat ditekan hingga 30%.

Kata kunci: Klon karet; *Hevea brasiliensis*; PB 330; *browning*; asam askorbat

PENDAHULUAN

Salah satu upaya perbaikan mutu bibit klonal karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) yang dapat dilakukan adalah melalui teknik kultur jaringan. Teknik tersebut membuka peluang untuk mengatasi beberapa persoalan mutu bibit yang diperbanyak secara konvensional. Persoalan tersebut antara lain menurunnya juvenilitas bibit dan inkompatibilitas yang mungkin terjadi antara batang atas dan batang bawah. Sejauh ini, masih terdapat beberapa kendala dalam teknik kultur jaringan yang perlu diatasi. Salah satu kendala yang dihadapi adalah sulitnya meregenerasi kalus dari eksplan tanaman klonal karena masih tingginya tingkat *browning* pada fase induksi kalus. *Browning* (pencoklatan) pada jaringan merupakan salah satu permasalahan yang sering terjadi pada kultur tanaman berkayu. *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 ROS (*Reactive Oxygen Species*), peroksidasi pada membran lipid, dan kehilangan integritas membran sel yang dapat memicu over akumulasi dari senyawa fenolik dan menyebabkan terjadinya *browning* (Ru, Lai, Xu, & Li, 2013). PPO dan *peroxidase* (POD) diketahui banyak ditemukan pada family *Euphorbiaceae*, *Moraceae*, dan *Anacardiaceae* yang antara lain berhubungan dengan kandungan getah (lateks) yang tinggi (John, Bhat, & Prasada Rao, 2003). Umumnya, pencoklatan 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 pencoklatan (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. Pada beberapa kasus, satu jenis perlakuan pencegahan *browning* seringkali tidak cukup efektif sehingga kadang kala kombinasi perlakuan perlu dilakukan. 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 & 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 + arang aktif 200 mg/L yang ditambahkan pada media signifikan mengurangi nekrosis dan *browning* (Esmail *et al.*, 2014). Pada tanaman pisang spesies *grand naine* yang bergetah, *browning* mampu ditekan dengan penambahan asam askorbat dengan kombinasi asam sitrat, arang aktif, *cysteine*, dan sari jahe yang diberikan pada saat pra perlakuan (Morfeine, 2013).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui metode paling efektif dalam mencegah *browning* fase induksi kalus pada kultur midrib (bagian pertulangan) daun klon karet PB 330.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, sejak Juni hingga November 2014. Bahan dan metode yang digunakan dalam penelitian meliputi:

1. Bahan tanam dan sumber eksplan

Bahan tanam menggunakan bibit *polibag* klon karet PB 330 pada stadia 1-2 payung daun. Bagian daun diambil dari

tunas pada usia sekitar 5-8 hari setelah *flush*. Daun yang diambil adalah yang telah berwarna hijau segar (tidak lagi berwarna coklat seperti fase awal *flush*) dan sehat. Bibit klon karet PB 330 diperoleh dari Balai Penelitian Getas, Salatiga, Jawa Tengah.

2. Penyiapan eksplan

Daun yang telah diambil sebagai sumber eksplan selanjutnya disiapkan di Laboratorium. Pra sterilisasi dilakukan dengan pencucian daun dalam detergen cair di bawah air mengalir. Setelah bersih, daun dipotong sekitar 3-5 cm dan diletakkan di dalam erlenmeyer kemudian disterilisasi di dalam *Laminar Air Flow*. Daun disterilisasi dengan merendam dalam alkohol 70%, digojog 2-3 menit, kemudian dibilas dengan akuades steril 2 kali. Selanjutnya daun direndam dalam Clorox 2,25%, dikocok selama 2-3 menit dan dibilas dengan akuades steril 3 kali. Sebelum ditanam, daun dipotong di bagian tepi (hingga tersisa bagian midrib atau pertulangannya daunnya) sepanjang 1 x 1,5 cm.

3. Perlakuan pencegahan *browning*

Pada perlakuan perendaman eksplan, eksplan direndam dalam asam askorbat 100 mg/L steril dan arang aktif 2 g/L+sukrosa 8 g/L steril dan digoyang perlahan selama 30 menit, setelah itu langsung ditanam dalam media. Larutan asam askorbat disterilkan dengan milipore filter 0,2 μ dan larutan sukrosa+arang aktif di dalam autoklaf sebelum digunakan. Setelah eksplan ditanam dalam media, selanjutnya diinkubasi pada kondisi gelap dan di bawah penyiangan. Perlakuan subkultur berulang dengan memindah tanam eksplan baik eksplan dengan perlakuan perendaman

asam askorbat atau arang aktif+sukrosa maupun tanpa perlakuan perendaman setiap 7 hari sebanyak 2 kali pindah tanam dalam media yang sama. Asam askorbat dan arang aktif diperoleh dari Merck Jerman. Matriks kombinasi perlakuan disajikan dalam Tabel 1.

4. Kondisi kultur dan media tanam

Kultur selanjutnya ditempatkan pada dua kondisi yaitu ruang gelap dan terang. Ruang terang dengan menempatkan kultur di bawah penyiangan lampu TL 1000 lux, suhu 25°C dan kelembaban 60-70%. Media tanam menggunakan media MS (Murashige & Skoog) dengan penambahan auksin 2,4-D 5 ppm (*2,4-Diclorophenoxy acetic acid*). pH medium sekitar 5,7-5,8 sebelum diautoklaf pada suhu 121°C pada tekanan 1 atm. Auksin diperoleh dari Merck Jerman.

5. Rancangan percobaan dan pengamatan

Percobaan disusun dengan Rancangan Faktorial dengan 10 botol sebagai ulangan, tiap botol ditanam sebanyak 2 eksplan. Pengamatan dilakukan terhadap waktu mulai terjadinya *browning*, jumlah eksplan yang mengalami *browning*, intensitas *browning* dan waktu terjadinya lebih dari 50% total eksplan mengalami *browning* yang diamati hingga 35 HST (hari setelah tanam). Intensitas *browning* diukur berdasarkan kategori dalam Tabel 2. Perlakuan subkultur berulang diamati setelah subkultur pertama atau 7 HST. Data intensitas *browning* dianalisis dengan analisis ragam dari Rancangan Faktorial dan uji lanjut dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) untuk data yang berbeda nyata pada taraf nyata 5% menggunakan *software* SAS 9.1.

Tabel 1. Kombinasi perlakuan pencegahan *browning* fase induksi kalus
Table 1. Combination of *browning* treatments on callus induction phase

Perlakuan <i>Treatment</i>	Kondisi inkubasi <i>Incubation</i>	
	Terang <i>Light</i>	Gelap <i>Dark</i>
Tanpa perlakuan (kontrol)	B1	B2
Rendam asam askorbat	B3	B4
Rendam sukrosa+arang aktif	B5	B6
Subkultur berulang	B7	B8
Subkultur berulang+ rendam asam askorbat	-	B9
Subkultur berulang+rendam (sukrosa+arang aktif)	-	B10

Tabel 2. Penilaian intensitas *browning*
 Table 2. Scoring of *browning* intensity

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

HASIL DAN PEMBAHASAN

Secara umum seluruh perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan kontrol, baik kontrol terang maupun kontrol gelap. Hasil pengamatan yang dilakukan hingga 35 hari setelah tanam (HST) disajikan dalam Tabel 3. Waktu awal kemunculan *browning* paling lama terjadi pada perlakuan perendaman eksplan dalam media sukrosa+arang aktif yang diinkubasi di ruang gelap dan perendaman eksplan dalam asam askorbat yang diinkubasi di

ruang gelap, yaitu berturut-turut pada 19 dan 17 HST, nilai ini lebih baik dibanding kontrol gelap dan kontrol terang. Waktu >50% eksplan mengalami *browning* menunjukkan perlakuan subkultur berulang yang diinkubasi di ruang terang menunjukkan waktu yang lebih cepat, yaitu 13 HST dan nilai ini masih lebih baik dibanding dengan kontrol gelap dan kontrol terang yang masing-masing terjadi pada 7 HST. Perlakuan perendaman eksplan dalam asam askorbat yang diinkubasi di ruang gelap dan kombinasinya dengan subkultur

Tabel 3. Pengaruh beberapa perlakuan terhadap terjadinya *browning*
 Table 3. Effect of each treatment on *browning* of explants.

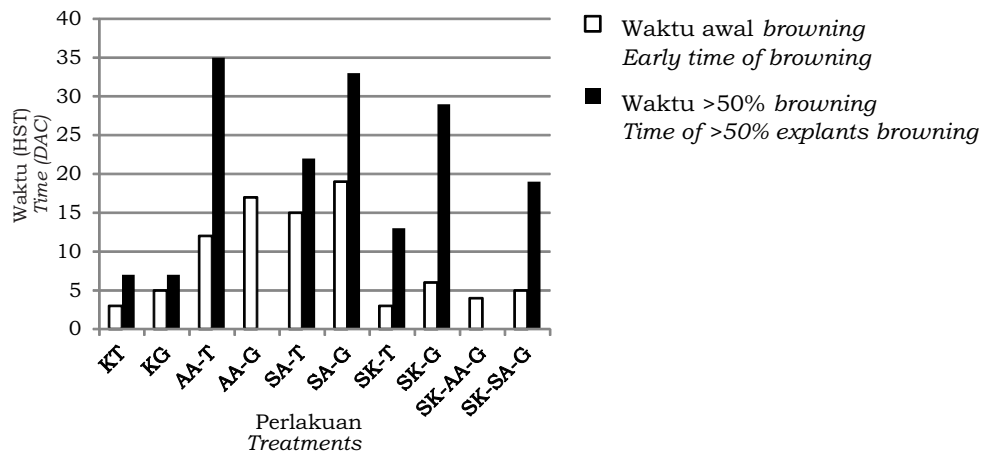
Kode Code	Perlakuan Treatments	Jumlah eksplan Number of explants	Waktu awal <i>browning</i> (HST) Early time of <i>browning</i> (DAC)	Persentase intensitas <i>browning</i> Percentage of <i>browning</i> intensity (%)	Jumlah eksplan <i>browning</i> Number of <i>browning</i> explants	Persentase jumlah eksplan <i>browning</i> Percentage of <i>browning</i> explants (%)	Waktu >50% eksplan <i>browning</i> (HST) Time of >50% explants <i>browning</i>
KT	Kontrol terang	20	3	95,0 ^a ±10,5	20	100	7
KG	Kontrol gelap	20	5	90,0 ^a ±10,4	20	100	7
AA-T	Rendam asam askorbat - terang	20	12	45,0 ^b ±27,6	14	70	35
AA-G	Rendam asam askorbat - gelap	20	17	7,5 ^c ±2,6	6	30	-
SA-T	Rendam (sukrosa+ arang aktif) - terang	20	15	52,5 ^b ±36,1	14	70	22
SA-G	Rendam (sukrosa+ arang aktif) - gelap	20	19	45,0 ^b ±31,4	12	60	33
SK-T	Subkultur berulang 3x - terang	20	3 ⁾	90,0 ^a ±17,4	20	100	13 ⁾
SK-G	Subkultur berulang 3x - gelap	20	6 ⁾	52,5 ^b ±30,5	14	70	29 ⁾
SK-AA-G	Subkultur berulang + rendam asam askorbat-gelap	20	4 ⁾	10 ^c ±3,3	6	30	-
SK-SA-G	Subkultur berulang + rendam (sukrosa + arang aktif)-gelap	20	5 ⁾	45 ^b ±22,2	14	70	19 ⁾

berulang menunjukkan tidak terjadi *browning* hingga 50% dari total jumlah eksplan. Hasil tersebut menegaskan bahwa perlakuan perendaman dalam larutan antioksidan dan penempatan eksplan dalam ruang gelap mampu memperlambat waktu kemunculan *browning*. Rata-rata intensitas *browning* terendah dicapai pada perlakuan perendaman eksplan dalam asam askorbat yang diinkubasi di ruang gelap dan kombinasinya dengan perlakuan subkultur berulang, yaitu berturut-turut sebanyak 7,5% dan 10% dan nilai ini nyata lebih rendah daripada perlakuan lainnya. Jumlah total eksplan yang mengalami *browning* juga lebih rendah pada perlakuan perendaman eksplan dalam asam askorbat yang diinkubasi di ruang gelap atau dengan kombinasi subkultur berulang yaitu sebanyak 30%. Hasil percobaan ini juga menunjukkan bahwa hampir seluruh eksplan yang diperlakukan tanpa asam askorbat mengalami *browning* lebih cepat dengan intensitas yang lebih tinggi.

Gambar 1 menunjukkan perbedaan waktu awal munculnya *browning* dengan waktu >50% eksplan mengalami *browning*

diantara seluruh perlakuan. Waktu awal kemunculan *browning* paling lama terjadi pada perlakuan perendaman eksplan dalam sukrosa+arang aktif yang diinkubasi di ruang gelap (SA-G) yaitu pada 19 HST, nilai ini tidak jauh berbeda dengan perlakuan perendaman eksplan dalam asam askorbat yang diinkubasi di ruang gelap (AA-G) yaitu pada 17 HST. Kedua perlakuan tersebut menunjukkan waktu awal *browning* yang lebih lama dibandingkan dengan kontrol gelap dan kontrol terang, yaitu berturut-turut pada 3 dan 5 HST. Waktu >50% eksplan mengalami *browning* tidak terjadi pada perlakuan perendaman eksplan dalam asam askorbat yang diinkubasi di ruang gelap (AA-G) dan kombinasinya dengan subkultur berulang (SK-AA-G), karena eksplan yang mengalami *browning* kurang dari 50%.

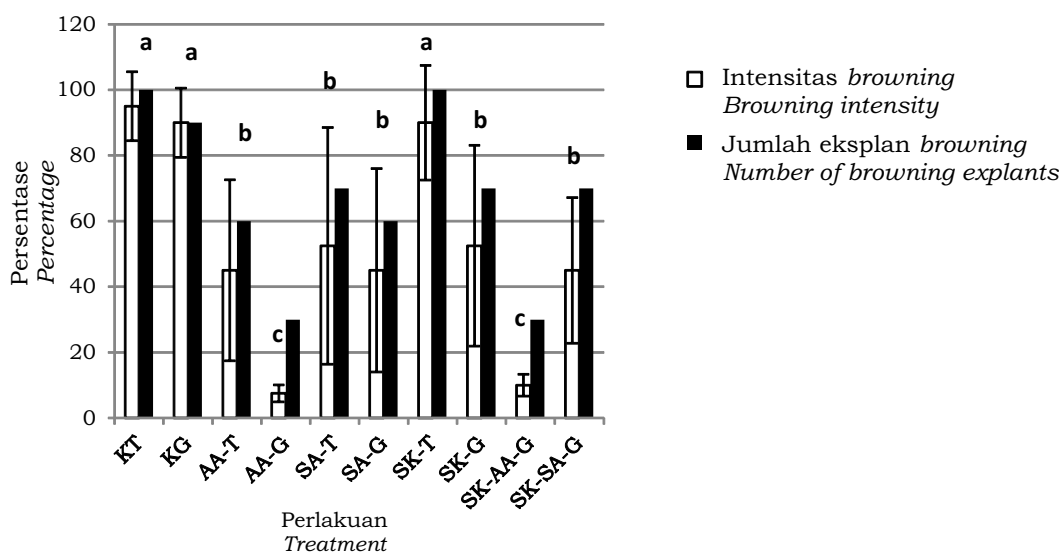
Gambar 2 menunjukkan perbedaan persentase intensitas *browning* dan jumlah eksplan yang mengalami *browning* diantara seluruh perlakuan. Pada perlakuan yang mengalami intensitas *browning* tinggi, juga diikuti tingginya jumlah eksplan yang mengalami *browning*. Intensitas *browning*



Keterangan (Remarks) : HST: Hari Setelah Tanam (DAC: Day After Culture), KT: Kontrol Terang (Control of Light treatment), KG: Kontrol Gelap (Control of Dark treatment), AA-T: Asam Askorbat-Terang (Ascorbic Acid-Light treatment), AA-G: Asam Askorbat-Gelap (Ascorbic Acid-Dark treatment), SA-T: Sukrosa+Arang aktif-Terang (Sucrose+Activated charcoal-light treatment), SA-G: Sukrosa+Arang aktif-Gelap (Sucrose+Activated charcoal-dark treatment), SK-T: Subkultur berulang-Terang (Repeated subculture-Light condition), SK-G: Subkultur berulang-Gelap (Repeated subculture-Dark condition), SK-AA-G: Subkultur berulang-Asam Askorbat-Gelap (Repeated subculture-Ascorbic acid-Dark condition), SK-SA-G: Subkultur berulang-Sukrosa+Arang aktif-Gelap (Repeated subculture-Sucrose+Activated charcoal-Dark condition).

Gambar 1. Perbedaan antar perlakuan pada waktu awal *browning* dan waktu >50% eksplan mengalami *browning*

Figure 1. Differences among treatments on early time of *browning* and time of >50% explants *browning*



Keterangan (Remarks) : HST: Hari Setelah Tanam (DAC: Day After Culture), KT: Kontrol Terang (Control of Light treatment), KG: Kontrol Gelap (Control of Dark treatment), AA-T: Asam Askorbat-Terang (Ascorbic Acid-Light treatment), AA-G: Asam Askorbat-Gelap (Ascorbic Acid-Dark treatment), SA-T: Sukrosa+Arang aktif-Terang (Sucrose+Activated charcoal-light treatment), SA-G: Sukrosa+Arang aktif-Gelap (Sucrose+Activated charcoal-dark treatment), SK-T: Subkultur berulang-Terang (Repeated subculture-Light condition), SK-G: Subkultur berulang-Gelap (Repeated subculture-Dark condition), SK-AA-G: Subkultur berulang-Asam Askorbat-Gelap (Repeated subculture-Ascorbic acid-Dark condition), SK-SA-G: Subkultur berulang-Sukrosa+Arang aktif-Gelap (Repeated subculture-Sucrose+Activated charcoal-Dark condition). Data yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf nyata 5% (data followed by the same letter are not significantly different at $P=0,05$).

Gambar 2. Perbedaan intensitas *browning* dan jumlah eksplan yang mengalami *browning* diantara seluruh perlakuan.

Figure 2. Differences among treatments on browning intensity and number of browning explants

terendah dicapai pada perlakuan perendaman eksplan dalam asam askorbat yang diinkubasi di ruang gelap (AA-G) yaitu sebanyak 7,5% dengan jumlah eksplan yang mengalami *browning* hanya 30%. Hasil tersebut tidak berbeda nyata dengan perlakuan subkultur berulang+perendaman eksplan dalam asam askorbat yang diinkubasi di ruang gelap (SK-AA-G) yaitu 10% dengan nilai jumlah eksplan yang mengalami *browning* sama yaitu sebanyak 30%. Data tersebut menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan kontrol terang dan kontrol gelap.

Hasil pengamatan 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%. Hasil tersebut menegaskan bahwa perendaman

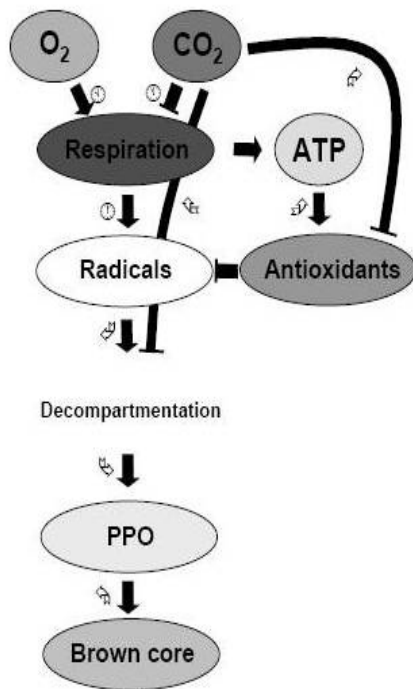
eksplan dalam asam askorbat terbukti cukup efektif menanggulangi *browning* fase induksi kalus pada kultur midrib daun klon karet PB 330. Perendaman eksplan asam askorbat tidak hanya mengekspose eksplan pada senyawa reduksi tetapi juga pada pH rendah. Pada pH di bawah 4, diketahui aktivitas enzim PPO (*Polyphenol Oxidase*) 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, Subroto, Pinaki, & Bidyut, 2010). Pada tanaman karet, aktivitas PPO terjadi pada rentang pH 4-10, dengan aktivitas optimal terjadi pada pH 6 (Muhamad, Chirapongsatonkul, & Churngchow, 2012). 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* (Sakdapipanich & Rojruthai, 2012). Seperti

diketahui, pembuluh lateks ada di seluruh bagian tanaman karet, termasuk pada bagian midrib daun yang digunakan sebagai eksplan. (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). Diantara inhibitor PPO yang diuji pada tanaman rambutan (*Nephelium lappaceum* L.), inhibitor yang efektif untuk *catechol* sebagai substratnya adalah asam askorbat (Haque, Al-Jassabi, Saad, & Satyakeerthy, 2014).

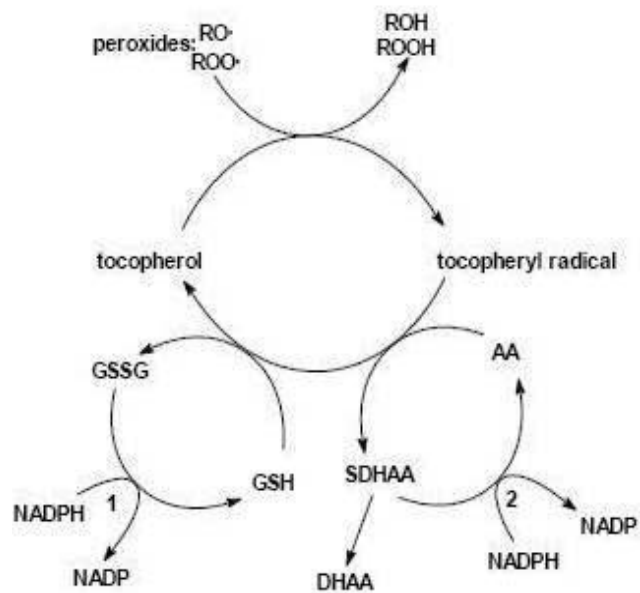
Mekanisme pencegahan *browning* dapat dilihat pada Gambar 3. Seperti diketahui, oksigen dibutuhkan dalam aktivitas respirasi. Aktivitas respirasi dapat

mengakibatkan munculnya radikal oksigen bebas, yang dapat memicu dekompartemenisasi (pecahnya vakuola dan plastida di dalam sel) yang menyebabkan aktifnya enzim PPO yang akhirnya menyebabkan pencoklatan jaringan (*browning*). Senyawa antioksidan berperan dalam menangkap radikal oksigen sehingga mampu mencegah dekompartemenisasi yang bisa mengaktifkan enzim PPO (Veltman & Peppelenbos, 2003). Asam askorbat berperan dalam merubah radikal *tocopheryl* menjadi *semi-dehydroascorbic acid*, sehingga tidak berperan dalam membentuk senyawa hidrogen peroksida yang bersifat toksik (Gambar 4).

Pada kultivar tanaman pir, penambahan 100 mg/L asam askorbat



Gambar 3. Mekanisme pencegahan *browning* oleh senyawa antioksidan
 Figure 3. *Browning prevention mechanism by antioxidant compound*
 Sumber (Source): Veltman & Peppelenbos, 2003



Gambar 4. Interaksi antara AA (Asam Askorbat) dan GSH (bentuk reduksi dari *glutathione*) dalam mengubah senyawa radikal *tocopheryl*.
 Figure 4. *Interaction between AA (Ascorbic Acid) and GSH (glutathione reduction form) on changing of radical tocopheryl.*

Tabel 4. Skor intensitas *browning* dari terendah hingga tertinggi
 Table 4. Score of *browning* intensity from lowest to highest level

Skor Score	Eksplan <i>browning</i> <i>Browning explant</i>	Keterangan <i>Remarks</i>
0-0,24		<i>Browning</i> tidak terjadi pada seluruh bagian eksplan, atau hanya sedikit di bagian tertentu saja, seperti bagian salah satu sisi daun, atau bagian kecil dari tangkai daun yang meliputi kurang dari seperempat bagian eksplan.
0,25-0,49		<i>Browning</i> terjadi pada sekitar seperempat hingga kurang dari setengah bagian eksplan, seperti sebagian kedua sisi daun, dan sebagian kecil dari tangkai daun.
0,50-0,74		<i>Browning</i> terjadi pada setengah hingga lebih dari setengah bagian eksplan, namun kurang dari tiga perempat bagian eksplan, seperti sebagian besar kedua sisi daun dan sebagian kecil dari tangkai daun.
0,75-0,99		<i>Browning</i> terjadi pada tiga perempat atau lebih dari tiga perempat bagian eksplan, namun kurang dari seluruh bagian eksplan, seperti hampir keseluruhan kedua sisi daun dan sebagian besar dari tangkai daun, atau sebaliknya.
1,00		<i>Browning</i> terjadi pada seluruh bagian eksplan, seperti kedua sisi daun dan tangkai daun.

selama 15 menit sebelum sterilisasi terbukti dapat mengurangi intensitas *browning* (Jartoodeh, Davarynejad, Tehranifar, Kaveh, & Bisheh, 2013). Eliminasi *browning* pada eksplan tanaman *B. huillensis* menggunakan bagian nodal, juga efektif digunakan 200 mg/L asam askorbat (Ndakidemi, Mneney, & Ndakidemi, 2014). Pada tanaman leci (*Litchi chinensis* sonn.) pencelupan eksplan dalam asam askorbat setelah pelukaan, sangat efektif mengurangi intensitas *browning*, sedangkan penambahan arang aktif tidak berpengaruh. Hal tersebut diduga karena arang aktif lebih berpengaruh terhadap penyerapan nutrisi media dibandingkan penyerapan polifenol pada eksplan (Pankaj, Pandey, & Roy, 2014). Senada dengan hasil review yang dilakukan oleh Ionita (2013) pada beberapa tanaman, urutan inhibitor yang paling efektif untuk menghambat aktivitas PPO yaitu : asam askorbat, asam sitrat, *L-cysteine* dan sodium metabisulfit. Hasil penelitian pada tanaman selada (*Lactuca sativa* L. cv 'Iceberg'), 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).

Skoring intensitas *browning* disajikan dalam Tabel 4. Pada beberapa kasus, sekalipun eksplan mengalami *browning* pada awal waktu, namun tidak menghambat kemunculan kalus, dan ketika *browning* semakin meningkat kalus tidak mampu berkembang lebih lanjut yang akhirnya turut mengalami *browning*.

KESIMPULAN DAN SARAN

Pencegahan *browning* fase induksi kalus pada kultur midrib daun klon PB 330 berhasil dilakukan hingga 30% dengan intensitas *browning* hanya 7,5% pada perlakuan perendaman asam askorbat steril 100 mg/L selama 30 menit sebelum tanam dan kultur diinkubasi dalam ruang gelap hingga terbentuk kalus. Kalus friabel yang telah terbentuk disarankan segera disubkultur pada medium diferensiasi kalus

untuk mencegah terjadinya *browning* susulan akibat terlalu lama berada dalam medium yang sama.

DAFTAR PUSTAKA

- 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. *Int. J. Chem. Sci.*, 8(5), S550-S558. Diakses tanggal 7 Juni 2016 dari www.sadgurupublications.com/ContentPaper/2010/62_Format.pdf
- Corduk, N., & 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. Diakses tanggal 6 Juni 2016 dari www.researchgate.net/publication/259378783
- 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. Diakses tanggal 7 Juni 2016 dari www.curreweb.com/mejar/mejar/2014/608-622.pdf
- Haque, A. M. T. E., Al-Jassabi, S., Saad, A., & Satyakeerthy. (2014). Biochemical studies on the characters of polyphenol oxidase from rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) Peel. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 21(4), 623-627. doi:10.5829/idosi.mejsr.2014.21.04.82430
- Ionita, E. (2013). Plant polyphenol oxidases: isolation and characterization. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 13, 1-10. Diakses tanggal 6 Juni 2016 dari <http://www.bioaliment.ugal.ro/ejournal.html>.

- Jartoodeh, S. V., Davarynejad, Gh. H., Tehranifar, A., Kaveh, H., & Bisheh, H. A. (2013). Reducing browning problem in micropropagation of three pear cultivars; Sebri, Shekari and Natanz. *Curr. Opin. Agric.* 2(1), 25–27. Diakses tanggal 6 Juni 2016 dari <https://www.researchgate.net/publication/259530975>
- John, K. S., Bhat, S. G., & Prasada Rao, U. J. S. (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
- Landi, M., Fambrini, M., Basile, A., Salvini, M., Guidi, L., & Pugliesi, C. (2015). Over expression 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. doi:10.1007/s11240-015-0819-y
- Mellidou, I., Buts, K., Hatoum, D., Ho, Q. T., Johnston, J. W., Watkins, C. B., Schaffer, R. J., Gapper, N. E., Giovannoni, J. J., Rudell, D. R., Hertog, M. L. A. T. M., & Nicolai, B. M. (2014). Transcriptomic events associated with internal browning of apple during postharvest storage. *BMC Plant Biology*, 14, 328 (17p). doi:10.1186/s12870-014-0328-x
- Morfeine, E. A. (2013). Effect of anti-browning on initiation phase of *Musa* species grand naine *in vitro*. *Journal of Forest Products & Industries*, 2(2), 45-47. Diakses tanggal 7 Juni 2016 dari researchpub.org/journal/jfpi/number/vol2-no2/vol2-no2-7.pdf
- Muhamad, N., Chirapongsatonkul, N., & Churngchow, N. (2012). Defense-related polyphenol oxidase from *Hevea brasiliensis* cell suspension: purification and characterization. *Journal Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(1), 177-189. doi: 10.1007/s12010-012-9690-z
- Ndakidemi, C. F., Mneney, E., & 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. doi: 10.4236/ajps.2014.51024
- Pankaj, K., Pandey, S. K., & Roy, K. A. (2014). Ascorbic and citric acids in combination resolve the problems encountered in micro-propagation of litchi from shoot tips. *Journal of Cell and Tissue Research*, 14(1), 4159-4164. Diakses tanggal 6 Juni 2016 dari www.tcrjournals.com/tr_pastabstract.php?vid=35
- Sakdapipanich, J. T., & Rojruthai, P. (2012). Molecular structure of natural rubber and its characteristics based on recent evidence. In R. Sammour. *Biotechnology, molecular studies and novel applications for improved quality of human life.* (p.213-238). Rijeka Croatia: Intech.
- 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. doi:10.5539/jas.v5n9p57
- Veltman, R. H., & Peppelenbos, H. W. (2003). A proposed mechanism behind the development of internal browning in pears (*Pyrus Communis* cv. Conference). *Acta Hort*, 600, 247-255. doi: 10.17660/ActaHortic.2003.600.32