

ULASAN

Masalah Pencoklatan pada Kultur Jaringan

Sri Hutami

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

ABSTRACT

Browning Problems in Tissue Culture. Sri Hutami. Several tropical plant species contain high concentrations of phenolic compounds, which become oxidised when their cells are wounded or when the plant parts become senescences. In tissue culture, the phenolic compounds usually leach into the medium from the cut surfaces of explants. The phenolic compounds caused the culture medium turns to dark brown in colour due to oxidation. This is detrimental to the culture, because it causes the isolated tissue fails to grow. The browning of tissue culture and the medium can often be prevented by one of the several different approaches, such as by removing the phenolic compounds produced, modifying the redox potential, inactivating phenolase enzymes, reducing phenolase activity and substrate availability, as well as pre-treatments by soaking and preconditioning on a basal medium.

Key words: Browning, phenolic compounds, tissue culture.

PENDAHULUAN

Pada kultur jaringan eksplan seringkali berubah menjadi coklat (*browning*) atau hitam (*blackening*) se-saat setelah isolasi yang selanjutnya dapat menghambat pertumbuhan dan akhirnya menyebabkan kematian jaringan. Pencoklatan sangat umum terjadi pada spesies tanaman berkayu, terutama bila eksplan diambil dari pohon dewasa. Penghambatan pertumbuhan biasanya sangat kuat pada beberapa spesies yang umumnya mengandung senyawa tanin atau hidroksifenol dengan konsentrasi tinggi. Pencoklatan pada jaringan muda lebih sedikit dibandingkan dengan jaringan yang tua (George dan Sherrington 1984). Tang dan Newton (2004) juga melaporkan bahwa pencoklatan jaringan sangat menurunkan regenerasi secara *in vitro* dari kultur kalus pada beberapa tanaman berkayu, khususnya regenerasi tanaman melalui jalur organogenesis. Meskipun sebagian besar kultur kalus berubah menjadi coklat, ada sebagian kecil tidak mencoklat selama proses regenerasi *in vitro* pada *Virginia pine* (*Pinus virginiana* Mill.). Kultur kalus dari tunas pucuk *Scots pine* (*Pinus silvestris* L.) juga ditandai dengan pencoklatan secara cepat dan ketidakmampuan beregenerasi (Laukkanen *et al.* 1999). *Oxydative*

browning merupakan salah satu penyebab mengapa *Protea cynarioides* tidak diperbanyak melalui teknik kultur jaringan (Wu dan Toit 2004). Azghandi *et al.* (2002) melaporkan bahwa pencoklatan pada eksplan kalus tua pistachio dan kultur media di sekitar kalus menjadi masalah pada fase inisiasi dan proliferasi.

PENYEBAB TERJADINYA PENCOKLATAN

Beberapa macam tanaman khususnya tanaman tropika mempunyai kandungan senyawa fenol yang tinggi yang teroksidasi ketika sel dilukai atau terjadi senesens (George dan Sherrington 1984). Akibatnya jaringan yang diisolasi menjadi coklat atau kehitaman dan gagal tumbuh. Pencoklatan jaringan terjadi karena aktivitas enzim oksidase yang mengandung tembaga seperti polifenol oksidase dan tirosinase (Lerch 1981) yang dilepaskan atau disintesis dan tersedia pada kondisi oksidatif ketika jaringan dilukai.

Substrat untuk enzim ini ada bermacam-macam pada jaringan yang berbeda, yang umum adalah tirosin atau o-hidroksifenol seperti asam klorogenik. Enzim dan substrat dalam keadaan normal akan ter-tahan dalam ruang berbeda di dalam sel dan akan keluar bersama-sama pada saat sel dilukai atau hampir mati. Fenol mempunyai fungsi alami penting dalam mengatur oksidasi IAA. Apabila fenol yang terlarut dalam air digunakan pada eksplan jambu biji maka pertumbuhan tunas dan kalus akan terpacu (kemungkinan melalui sinergisme dengan auksin), dan akan menjadi racun apabila konsentrasinya meningkat (Cassman *et al.* 1978). Toksisitas fenol kemungkinan disebabkan oleh ikatan reversibel antara hidrogen dan protein. Penghambatan pertumbuhan yang tidak dapat diperbaiki terjadi ketika fenol teroksidasi menjadi senyawa aktif quinon yang tinggi yang kemudian memutar, memolimerase dan/atau mengoksidasi protein menjadi senyawa melanat yang makin meningkat.

Juma *et al.* (1994) meneliti kultur jaringan tanaman kopi dan menemukan bahwa tingkat oksidasi fenol tergantung pada sumber potongan ruas batang sebagai eksplan dan spesies tanaman. Kopi robusta cenderung lebih bermasalah dengan pencoklatan dibandingkan dengan kopi arabica. Ozyigit *et al.* (2007) melaporkan bahwa terbentuknya senyawa fenol di-

pengaruhi oleh struktur kimianya, spesies tanaman, proses biologi (organogenesis atau somatik embriogenesis), dan tahap perkembangannya. Metabolisme fenol mempengaruhi sistem kultur jaringan secara positif dengan metabolisme auksin (kecepatan pembelahan sel dan sintesis dinding sel serta senyawa-senyawa lain yang berhubungan), tetapi oksidasi fenol yang berubah menjadi quinon dan senyawa lain (polimerasinya) yang sangat beracun menyebabkan pencoklatan medium dan kematian eksplan. Harm *et al.* (1983) mengemukakan bahwa betasianin dilepaskan ketika jaringan bit dilukai di dalam kultur. Substrat ini akan cepat teroksidasi dan menjadi zat penghambat secara sempurna.

Menurut Huang *et al.* (2002) pencoklatan yang sering menyebabkan kematian awal dari tunas bambu yang ditanam secara *in vitro* berkorelasi langsung dengan aktivitas polifenol oksidase (PPO). Selama di dalam kultur, aktivitas PPO paralel dengan pencoklatan eksplan. Vaughn dan Duke (1984) menyimpulkan bahwa:

1. PPO adalah suatu enzim plastida (*plastidic enzym*) yang belum jelas, tetapi tidak aktif sampai terganggu dalam plastida tersebut.
2. Dalam jaringan hijau yang sehat, PPO ada dalam bentuk laten pada membran tilakoid dan tidak terlibat dalam sintesis senyawa fenolic. Dalam leukoplas, protoplas, atau amiloplas, PPO sering kali dalam bentuk laten dalam *rudimentary thylakoid*.
3. PPO secara normal berfungsi sebagai suatu oksidasi fenol yang secara *in vivo* hanya terjadi pada senesens atau sel yang rusak.
4. Dalam fungsi kloroplas, PPO kemungkinan terlibat dalam beberapa aspek kimia oksigen, yaitu sebagai mediator dalam *pseudocyclic photophosphorylation*.

Tang dan Newton (2004) membandingkan kalus yang mengalami pencoklatan dan yang tidak pada *Virginia pine*. Peningkatan lipid peroksida dan polifenol oksidase serta penurunan enzim anti oksidan askorbat peroksidase (APOX), glutathion reduktase (GR), dan superoksida dismutase (SOD) diamati pada kedua macam kalus tersebut. Ternyata aktivitas enzim anti oksidan menurun secara cepat sesaat setelah pengkulturan dimulai, khususnya pada 3-4 minggu periode kultur. Konsentrasi asam amino yang mudah larut berbeda. Putresin menurun 63,8-71,5% pada jaringan yang mengalami pencoklatan. Spermidin menurun 47-65,6%, dan spermin menurun 62,3-74,5%. Disimpulkan bahwa pencoklatan jaringan berhubungan dengan akumulasi polifenol oksidase dan penurunan putresin, spermidin, dan spermin yang menghambat pertumbuhan kalus, diferensiasi tunas dan perakaran.

Newton *et al.* (2004a) menyimpulkan bahwa penambahan poliamin dapat menanggulangi pencoklatan jaringan menjadi kultur kalus normal melalui penurunan kerusakan oksidatif dan peningkatan regenerasi tanaman dengan beraksi sebagai zat pengatur tumbuh. Anderson dan Levinsh (2002) juga melaporkan bahwa penurunan aktivitas peroksidase dan polifenol oksidase berhubungan dengan peningkatan kemampuan jaringan untuk mulai tumbuh secara *in vitro*.

Tabiyeh *et al.* (2006) mengemukakan bahwa pencoklatan dalam kultur jaringan disebabkan karena meningkatnya produksi senyawa fenolat yang diikuti oksidasi oleh aktivitas enzim oksidase (PPO) dan polimerasinya. Fenilalanin amonia liase (PAL) adalah salah satu enzim dalam fenilpropanoid yang sangat berpengaruh terhadap terjadinya pencoklatan. Salah satu penyebab utama pencoklatan dalam kultur *in vitro* adalah luka karena pemotongan pada jaringan. Luka tersebut memacu stres dan menyebabkan peningkatan aktivitas PAL yang diikuti oleh produksi fenilpropanoid dan menyebabkan pencoklatan.

Menurut Ahmad *et al.* (1995) waktu yang dibutuhkan untuk pencoklatan *Pistacia vera* dipengaruhi oleh konsentrasi dan kombinasi zat pengatur tumbuh dalam media induksi. Induksi kalus dalam media yang mengandung NAA (2 atau 5 mg/l) atau NAA (5 mg/l) + kinetin (2,5 mg/l) dapat mempertahankan kalus tetap putih kehijauan selama 10-13 minggu.

Tahtamouni *et al.* (2001) mempelajari pertumbuhan dan sifat pir liar (*Pyrus syriaca* Boiss.) dengan preservasi *in vitro* dalam MS dengan osmotikum. Tunas mikro (0,1 cm) pada titik tumbuh disimpan dalam media yang mengandung 3, 6, 9, atau 12% baik sukrosa, sorbitol atau manitol. Pertumbuhan sangat terhambat dengan bertambahnya konsentrasi osmotikum. Terjadi tahapan kerusakan fisiologis (pencoklatan ujung tunas, pangkal tunas, dan pengguguran daun) dengan adanya peningkatan osmotikum dan seperti periode preservasi diperpanjang. Di antara perlakuan yang dicoba untuk osmotikum, sukrosa pada konsentrasi rendah paling baik untuk mengurangi kerusakan fisiologis dan untuk tumbuh kembali.

PENANGGULANGAN PENCOKLATAN

Penanggulangan pencoklatan pada jaringan khususnya pada eksplan yang baru diisolasi dan pada media tumbuh digunakan, menurut George dan Sherrington (1984) seringkali dilakukan dengan menggunakan salah satu cara dari beberapa pendekatan, yaitu:

1. Menghilangkan senyawa fenol.
2. Modifikasi potensial redoks.
3. Penghambatan aktivasi enzim fenol oksidase.
4. Penurunan aktivitas fenolase dan ketersediaan substrat.

Menghilangkan Senyawa Fenol

Fenol sering dikonotasikan sebagai zat penghambat yang harus dihilangkan dari kultur *in vitro*. Berbagai metode untuk menghindari pembentukan fenol telah dilakukan, dan yang paling umum adalah dengan mentransfer eksplan ke media baru. Tetapi peningkatan jumlah subkultur seringkali menyebabkan akumulasi mutasi sel-sel dan menyebabkan hilangnya sel yang efektif untuk membentuk embriogenesis. Penambahan arang aktif ke dalam media kultur seringkali dapat menghindari pembentukan inhibitor fenolat (Hutami 2006). Arang aktif menghilangkan pewarnaan dengan menyerap dan mengoksidasi fenol dan menginaktifkan peroksidase. Arang aktif mengurangi pencoklatan pada eksplan palem dan kultur media (Tisserat 1979), sehingga memacu eksplan untuk tumbuh secara organogenesis. Arang aktif juga mengontrol pencoklatan media dan menstimulasi pertumbuhan tunas *Strelitzia regnae* dan *Anemone aronaria* (Mensuali-Sodi *et al.* 1993). Aliyu dan Mashood (2005) melaporkan bahwa pencoklatan pada eksplan jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) disebabkan karena adanya senyawa metabolit sekunder yang dapat dikurangi dengan mentransfer eksplan beberapa kali (subkultur), penambahan arang aktif, dan perlakuan gelap.

Para ahli biokimia menemukan bahwa ekstraksi enzim dari tanaman aktif sering dihambat oleh adanya polifenol atau tanin. Dalam hal ini berbagai senyawa (khususnya protein, amida, dan poliamida) ditambahkan agar bereaksi dengan fenol dan menyimpan kembali aktivitas enzim. Kafein adalah salah satu amida yang telah berhasil digunakan (Goldstain dan Swain 1965 dalam George dan Sherrington 1984). Poliamida yang paling umum digunakan untuk tujuan ini adalah polivinilpirolidon (PVP) (Loomis dan Battail 1966). Untuk isolasi enzim, PVP biasanya digunakan bersama-sama dengan senyawa reduksi seperti β -merkaptotanol. Fenol diabsorpsi PVP melalui ikatan hidrogen, untuk melindungi oksidasinya. Batt dan Dhar (2004) melaporkan bahwa PVP 0,5% sangat efektif untuk menghilangkan senyawa fenolat dan persentase eksplan yang hidup maksimum dapat dicapai pada micro-propagasi pohon betina *Myrica esculenta*. Newton *et al.* (2004b) juga melaporkan bahwa penambahan anti oksidan akan mengurangi dan menghambat pencoklatan melalui penurunan akumulasi peroksidase. Penambahan polivinilpolipirolidon (PPVP) dan 1,4-ditio-

DL-treitol (DTT) terbukti meningkatkan pembentukan kalus, diferensiasi dan pertumbuhan tunas, serta pertumbuhan akar *Virginia pine* melalui penghambatan pencoklatan jaringan selama inisiasi kultur dan subkultur tunas selanjutnya. Dibandingkan dengan kontrol, pemberian 5 g/l PVPP dan 2 g/l DDT menyebabkan frekuensi pembentukan kalus meningkat 15%, pertumbuhan tunas meningkat 26%, dan perakaran meningkat 19%.

Modifikasi Potensial Redoks

Kecenderungan senyawa menjadi teroksidasi atau tereduksi tergantung pada oksidasi-reduksi (redoks) potensial dari suatu larutan. Senyawa reduksi yang redoks potensialnya rendah seperti asam askorbat sangat efektif untuk menghindari pencoklatan dari isolasi jaringan tanaman atau ekstrak tanaman dan sering diasumsikan bahwa hal tersebut menghambat oksidasi fenol (George dan Sherrington 1984).

Oksigen yang tidak larut meningkatkan redoks potensial larutan dan menyebabkan oksidasi lebih cepat. Reduksi sementara dengan mengisolasi eksplan segar pada oksigen dapat membantu menghindari terjadinya pencoklatan.

Penghambatan Aktivasi Enzim Fenol Oksidase

Senyawa penkhelet/pengikat selain mempunyai kemampuan mengikat unsur/senyawa lain juga dapat mengganggu aktivitas enzim peroksida. Weinstein *et al.* 1951 dalam George dan Sherrington 1984) menemukan bahwa EDTA dapat menghambat aktivitas polifenol oksidase pada daun bunga matahari yang dikulturkan secara *in vitro*, dan disimpulkan bahwa senyawa khelat menghilangkan metal esensial untuk aktivitas enzim oksidase. NaFeEDTA dan EDTA keduanya dapat menghilangkan penghitaman pada tunas pucuk *Carex* dan Simth (1968) menyatakan bahwa hal tersebut terjadi karena pengikatan tembaga yang dibutuhkan dalam pembentukan enzim fenolase, ketika dia menemukan bahwa agen pengikat/penkhelet dapat melindungi pencoklatan dari isolat segar tunas pucuk dari *Carex flacca*. Beberapa reaksi oksidatif juga dikatalisir secara biokimia oleh ion-ion seperti Cu^{++} , Co^{++} , dan Zn^{++} .

Penurunan Aktivitas Fenolase dan Ketersediaan Substrat

Tingkat oksidasi fenol dapat dikurangi dengan pengurangan aktivitas enzim spesifik atau pengurangan substrat untuk oksidasi.

Aktivitas oksidasi polifenol tertinggi pada pH 6,5 dan menurun pada pH lebih rendah (Ichihashi dan

Kako 1977 dalam George dan Sherrington 1984). Perendaman eksplan pada campuran asam askorbat dan asam sitrat tidak hanya mengekspose eksplan pada senyawa reduksi tetapi juga pada pH rendah. Huang *et al.* (2002) melaporkan bahwa aktivitas PPO sejajar dengan pencoklatan eksplan pada bambu. Pencoklatan tertinggi diperoleh dari medium dengan pH 8, di mana pH tersebut konsisten dengan pH optimum enzim pada bambu. Stabilitas PPO tertinggi pada bambu pada pH 10.

Aktivitas enzim, biosintesis, dan oksidasi fenol akan meningkat dengan adanya cahaya (Creasy 1968). Pencoklatan jaringan kemungkinan akan berkurang atau dapat dihindari apabila biakan baru disimpan di ruang gelap sampai 14 hari sebelum ditransfer ke ruangan dengan intensitas cahaya rendah (500-1000 lux). Pencoklatan dari isolasi potongan batang *Phalaenopsis* telah berhasil ditanggulangi dengan mengkulturkan eksplan selama 2 minggu pertama dalam ruang gelap dengan suhu 26°C. Setelah itu kultur dipindah ke ruang terang dengan suhu 22°C (Pieper dan Zimmer 1976).

Wu dan Toit (2004) melaporkan bahwa penguangan *oxydative browning* terbaik adalah dengan mengaduk eksplan selama 1 jam dalam larutan anti oksidan yang mengandung asam askorbat 100 mg/l dan asam sitrat 1500 mg/l sebelum ditanam dalam medium. Kombinasi perlakuan tersebut dengan fotoperiodisitas 16 jam, mampu menghasilkan pertumbuhan tunas hingga 100%.

Penanggulangan yang Sering Dilakukan dalam Praktek dengan Pra-perlakuan

Dari uraian di atas telah diterangkan beberapa cara untuk menghindari pencoklatan dalam kultur *in vitro*, tetapi sayangnya tidak satupun dari cara tersebut efektif untuk semua spesies tanaman, dan untuk beberapa tanaman masih merupakan masalah. Seringkali kombinasi dari beberapa cara tersebut perlu dilakukan. Ada beberapa cara yang sering digunakan sebagai pra-perlakuan terhadap eksplan antara lain (1) perendaman atau pencelupan dan (2) pra-kondisi pada media dasar.

Perendaman atau pencelupan

Pada beberapa spesies, pra-perlakuan dapat membantu menghindari pencoklatan seperti pencucian dengan air mengalir pada biji walnut selama 24 jam untuk menghilangkan fenol sebelum disterilisasi dan dikecambahkan secara *in vitro* (Rodriguez 1982). Eksplan juga dapat direndam dalam air steril selama 2-3 jam setelah isolasi sebelum dikulturkan.

Pada beberapa spesies tanaman berkayu, perendaman eksplan dari bagian masak fisiologis pohon tersebut di dalam air, atau pra-kultur ke dalam media tanpa suplemen selama beberapa hari tidak hanya efektif untuk menghindari atau menghilangkan kerusakan karena fenolat, tetapi juga menghilangkan beberapa faktor penghambat pertumbuhan meskipun tanpa adanya pencoklatan. Bonga (1977) melaporkan bahwa tunas dorman dari pohon *Abies balsamea* masak (tanpa daun) yang direndam dalam air atau dalam larutan yang mengandung asam kafeat selama 15 menit sampai 24 jam sebelum dikulturkan, akan membentuk tunas adventif. Perlakuan tunas dengan asam malonat 0,1% selama 15 menit setelah perendaman akan meningkatkan respon tersebut. Tabiyeh *et al.* (2006) melaporkan bahwa perlakuan glutation (GSH) diberikan dengan pencelupan dasar potongan tunas pucuk dari aksis embrio *Pistachia vera* L. ke dalam larutan GSH 0,1 mM sebelum dikulturkan pada media MS yang mengandung BAP, dapat mengurangi secara total senyawa fenolat penyebab pencoklatan dan meningkatkan pertumbuhan. Tao *et al.* (2007) melaporkan bahwa pra-perlakuan pencelupan eksplan *Platanus occidentalis* L. dalam anti oksidan dan absorben pada saat yang sama dapat menghilangkan beberapa efek samping. Pra-perlakuan dengan vitamin C 10 g/l dapat mengurangi kontaminasi dan pencoklatan secara efektif. Suatu penelitian membuktikan bahwa faktor optimal dan level perlakuan BA 0,5 mg/l, arang aktif 2,0 g/l, dan PVP 1,5 g/l mengakibatkan pencoklatan hanya 16,5%, dan secara umum disimpulkan bahwa waktu pengambilan eksplan, bagian tanaman yang digunakan, dan pra-perlakuan eksplan adalah faktor utama yang mempengaruhi kontaminasi dan pencoklatan pada fase inisiasi kultur jaringan *P. occidentalis* L.

Pra-kondisi pada media dasar

Eksplan dari beberapa spesies dapat terhindar dari pencoklatan apabila pada awalnya dikulturkan dalam media tanpa zat pengatur tumbuh. George dan Sherrington (1984) menemukan bahwa ruas batang kedelai dapat berkembang menjadi masa kalus yang friabel (yang menghambat pertumbuhan tunas secara langsung) apabila segera dikulturkan pada media yang mengandung auksin dan sitokinin. Hal tersebut diperkirakan karena tingginya konsentrasi auksin indogenous. Potongan jaringan mula-mula dikulturkan dalam media dasar selama beberapa hari sebelum ditransfer ke dalam media dengan IBA 0,005 mg/l dan BAP 1,1 mg/l. Jumlah tunas yang terbentuk meningkat dengan meningkatnya waktu pra-perlakuan sampai 20-25 hari. Apabila diperpanjang lagi jumlah tunas akan menurun. Nhut *et al.* (2006) melaporkan hasil penelitiannya pada

easter lily (*Lilium longiflorum*) bahwa pembentukan kalus embriogenik diperoleh dari kalus friabel yang dikulturkan baik pada media padat/cair dengan volume yang berbeda mengandung α -naphthaleneacetic acid (NAA) 1,0 mg/l dan thidiazuron (TDZ) 0,2 mg/l. Jumlah embrio somatik yang berasal dari kalus embriogenik pada media cair, khususnya pada volume 20 ml (170) lebih besar dari media padat (28) dan tahap perkembangan bentuk embrio somatik terlihat jelas di bawah mikroskop (globular, hati, dan bentuk kotiledon). Sebagian kalus yang terendam dalam media cair mengalami pencoklatan/nekrosis karena hilangnya respirasi sementara kalus yang muncul di permukaan cairan mengalami embriogenesis. Kemudian embrio somatik yang masak ditransfer ke media tanpa hormon (1/2 MS), maka sekitar 78% dari total embrio berkembang menjadi planlet dengan *radicle* dan *plumule* yang normal. Setelah 1 bulan planlet diaklimatisasi dengan keberhasilan tumbuh 98%.

Pembentukan polifenol dari potongan eksplan segar dapat dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh. Kandungan kinetin yang tinggi sangat diperlukan untuk pertumbuhan tunas pucuk *Pelargonium*, tetapi media agar menjadi berwarna gelap apabila konsentrasi kinetin yang ditambahkan lebih dari 1 mg/l. Persentase hidup eksplan meningkat dengan pengkulturkan pada minggu pertama dalam media dasar tanpa zat pengatur tumbuh dan selanjutnya ditambah sitokinin atau auksin (Debergh dan Maene 1977).

KESIMPULAN

Perubahan warna menjadi coklat (pencoklatan) dalam kultur jaringan terjadi karena akumulasi polifenol oksidase yang dilepas atau disintesis jaringan dalam kondisi teroksidasi ketika sel dilukai. Jaringan yang diisolasi menjadi berwarna coklat dan atau kehitaman serta gagal tumbuh. Pencoklatan pada kultur jaringan dapat dihindari dengan beberapa cara, antara lain menghilangkan produksi senyawa fenol, modifikasi potensial redoks, penghambatan aktivasi enzim fenol oksidase, penurunan aktivitas fenolase, dan ketersediaan substrat. Penanggulangan perubahan ini dalam praktek seringkali dilakukan melalui pra-perlakuan terhadap eksplan, antara lain dengan cara merendam dan pra-kondisi pada media dasar.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad Z., A. Hussain, N. Zaidi, Z. Iqbal, and F.H. Shah. 1995. A study of relationship between growth regulators and browning in *Pistacia vera* Calli. Plant Tiss. Cult. 5(2):125-129.
- Aliyu and O. Mashood. 2005. Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale* L.) breeding: An appraisal. African J. Biotechnol. 4(13):1485-1489.
- Andersone, U. and G. Levinsh. 2002. Changes of morphogenic competence in mature *Pinus sylvestris* L. buds *in vitro*. Annals of Botany 90:293-298.
- Azghandi, A.V., T.A. Viliers, A.M. Ghorbani, and A. Tajabadi. 2002. The Microscopy of tissue decoloration and browning problem in pistashio callus cultures. ISHS Acta Hort. 591. http://www.actahort.org/members/showpdf?booknr=591_58.
- Bhatt, I.D. and U. Dhar. 2004. Factor controlling micro-propagation of *Myrica esculenta* buch.-ham. Ex. D. Don: A high value wild edible of Kumun Himalaya. African J. Biotechnol. 3(10):534-540.
- Bonga, J.M. 1977. Organogenesis in *in vitro* cultures of embryonic shoot of *Albies balsamea* (balsam fir). In Vitro 13:41-48.
- Cassman, K.G., M.O. Mapes, and R.M. Bullock. 1978. Synergistic effects of guava (*Psidium guajava* L.) 'B-30' stem exudate with auxin. Plant Propagator 24:10-15.
- Creasy, L.L. 1968. The increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in strawberry leaf disks and its correlation with flavonoid synthesis. Phytochem 7:441-446.
- Debergh, P. and L. Maene. 1977. Rapid clonal propagation of pathogen-free *Pelargonium* plants strating from shoot tips and apical meristems. Acta Hort. 78:449-454.
- George, E.F. and P.D. Sherrington 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Hand Book and Directory of Comercial Laboratories. Eastern Press, Reading, Berks. England. p. 9-449.
- Harms, C.T., I. Baktir, and J.J. Oertli. 1983. Clonal propagation *in vitro* of red beet (*Beta vulgaris* ssp.) by multiple adventitious shoot formation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2:93-102.
- Huang, L.C., Y.L. Lee, B.L. Huang, C.I. Kuo, and J.F. Shaw. 2002. High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 38(4):358-365.
- Hutami, S. 2006. Penggunaan arang aktif dalam kultur *in vitro*. Berita Biologi 8(1):83-89.
- Juma, C., J.M. Magambo, and H. Monteith. 1994. Tissue cultur for coffee: The case of Uganda. Biotechnol. Dev. Mon. 20:19-20.
- Laukkanen, H., H. Haggman, S.K. Soppela, and A. Hohtola. 1999. Tissue browning of *in vitro* cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. Physiol. Plant. 106(3):337-343.
- Lerch K. 1981. Tyrosinase kinetics: A semi-quantitative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates. In Sigel, H. (Ed.). Metal Ions in Biology System. 13 Marcel Dekker Inc., New York, Basel. p. 143-186.

- Loomis, W.D. and J. Battail. 1966.** Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzym. *Phytochem.* 5:423-438.
- Mensuali-Sodi, A., M. Panizza, G. Serra, and F. Tognoni. 1993.** Involvement of activated charcoal in the modulation of abiotic and biotic ethylene levels in tissue-cultures. *Sci. Hort.* 54:49-57.
- Newton, R.J., W. Tang, and L.C.V. Outhavong. 2004a.** Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. *Physiol. Plant.* 122(3):386-395.
- Newton, R.J., W. Tang, L.C. Harris, and V. Outhavong. 2004b.** Antioxidants enhance *in vitro* plant regeneration by inhibiting the accumulation of peroxidase in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Cell Rep.* 22(12):871-877.
- Nhut, D.T., N.T.M. Hanh, P.Q. Tuan, L.T.M. Nguyet, N.T.H. Tram, N.C. Chinh, N.H. Nguyen, and D.N. Vinh. 2006.** Liquid culture as a positive condition to induce and enhance quality and quantity of somatic embryogenesis of *Lilium longiflorum*. *Sci. Hort.* 110(1):93-97.
- Ozyigit, I.I., M.V. Kahraman, and O. Ercan. 2007.** Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African J. Biotechnol.* 6(1):003-008.
- Pieper, W. and K. Zimmer. 1976.** Clonal propagation of Phalaenopsis *in vitro*. *Acta. Hort.* 64:21-23.
- Rodriguez, R. 1982.** Callus initiation and root formation from *in vitro* culture of walnut cotyledons. *Sci. Hort.* 17(20):195-196.
- Smith, D.L. 1968.** The growth of shoot apices and inflorescences of *Carex flacca* Schreb. in aseptical culture. *Annals of Botany* 32:361-370.
- Tabiyeh, D.T., F. Bernard, and H. Shacker. 2006.** Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in *Pistacia vera* shoot tips culture. *ISHS Acta Hort.* 726.
- Tahtamouni, R.W., R.A. Shibli, and M.M. Ajlouni. 2001.** Growth responses and physiological disorders in wild pear (*Pyrus syriaca* Boiss.) during slow-growth *in vitro* preservation on osmostressing media. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 11(1):15-23.
- Tang, W. and R.J. Newton. 2004.** Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Sci.* 167(3):621-628.
- Tao, F.J., Z.Y. Zang, J. Zhou, N. Yao, and D.M. Wang. 2007.** Contamination and browning in tissue culture of *Platanus occidentalis* L. forestry studies in China. Beijing Forestry University, co-published with Springer-Verlag GmbH 9(4):279-282.
- Tisserat, B. 1979.** Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 30:1275-1283.
- Vaughn, K. and S.O. Duke. 1984.** Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.* 60(1):106-112.
- Wu, H.C. and E.S Du Toit. 2004.** Reducing oxidative browning during *in vitro* establishment of *Protea cynaroides*. *Sci. Hort.* 100(1-4):355-358.
-