Respon Anatomis Jaringan Xylem dan Floem Akar Bibit Kelapa Sawit Tercekam Kekeringan terhadap Pemupukan Kalsium

Anatomical Response of Xylem and Phloem Vessels of Oil Palm Root on Drought Stress to Calcium Fertilization

Novi Yulanda Sari^{1a}, Eka Tarwaca Susila Putra²

¹Politeknik Pertanian Negeri Payakumbuh, Jl. Raya Tanjung Pati Km. 7 Lima Puluh Kota, 26271

Diterima: 30 - 06 - 2023, Disetujui: 04 - 07 - 2023

ABSTRACT

Drought stress due to global climate change causes physiological damage to oil palm in the form of frond fracture. The level of severe drought stress also has decreased the productifity of oil palm by up to 70%. To increase the resistance of oil palm to drought stress, one effort that can be done is the calcium fertilization. This research aims to determine the effect of Ca doses on modification of the anatomy of the xylem and phloem vessels of oil palm seedlings as a mechanism of plant adaptation to drought stress to minimize the risk of frond fracture. The study was designed using a split plot design with two treatment factors. The first treatment factor was the dose of calcium: 0, 50, 100, dan 150%. The second treatment factor is drought stress levels: field capacity, moderate and severe drought stress. The results showed that severe drought stress reduced the thickness of the phloem diameter of the roots of the oil palm seedlings. Calcium increased the structural strength of root vascular tissues of oil palm seedlings by increasing the phloem diameter of roots at a dose of Ca 100% and increasing the thickness of xylem diameter in seedlings exposed to severe stress at a dose of Ca 50%.

Keywords: phloem, calcium, drought stress, xylem

ABSTRAK

Cekaman kekeringan akibat perubahan iklim global mengakibatkan kerusakan fisiologis pada kelapa sawit berupa patah pelepah. Tingkat cekaman kekeringan yang parah juga berdampak pada penurunan produktifitas kelapa sawit. Untuk meningkatkan ketahanan kelapa sawit terhadap cekaman kekeringan, maka salah satu upaya yang dapat dilakukan yaitu melalui pemberian kalsium. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dosis Ca terhadap modifikasi anatomi jaringan pembuluh xylem dan floem akar bibit kelapa sawit sebagai mekanisme adaptasi tanaman terhadap cekaman kekeringan untuk mengurangi resiko patah pelepah. Penelitian didesain menggunakan rancangan split plot dengan dua faktor perlakuan. Faktor perlakuan pertama yaitu dosis kalsium: 0, 50, 100 dan 150%. Faktor perlakuan kedua yaitu tingkat cekaman kekeringan: kapasitas lapang, moderat dan cekaman berat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa cekaman kekeringan berat menurunkan ketebalan diameter floem akar bibit kelapa sawit. Kalsium dapat meningkatkan kekuatan struktural jaringan pembuluh akar bibit kelapa sawit melalui peningkatan diameter floem akar pada dosis Ca 100% dan peningkatan ketebalan diameter xylem pada bibit yang terekspos cekaman berat pada dosis Ca 50%.

Kata kunci: floem, kalsium, kekeringan, xylem

²Universitas Gadjah Mada, Bulaksumur, Yogyakarta 55281

^aKorespodensi: Novi Yulanda Sari, E-mail: <u>noviyulanda.s@politanipyk.ac.id</u>

PENDAHULUAN

Salah satu faktor lingkungan yang membatasi pertumbuhan dan perkembangan tanaman kelapa sawit adalah cekaman kekeringan (Valliyodan & Nguyen, 2006). Seperti halnya tanaman lain, cekaman kekeringan juga memberikan dampak negatif pada kelapa sawit. Beberapa penelitian terdahulu menunjukkan bahwa disaat fase vegetatif, pertumbuhan pelepah daun kelapa sawit yang terekspos cekaman kekeringan menjadi terhambat dan daun tombak pelepah daun tidak membuka. Pada tingkat cekaman kekeringan berat, tanaman mengalami kerusakan jaringan yang tidak dapat balik berupa daun pucuk dan pelepah yang mudah patah (Caliman & Southworth, 1998). Pada fase generatif, cekaman kekeringan yang parah dapat menurunkan produksi kelapa sawit hingga 70%. Penurunan ini merupakan akibat dari terhambatnya pembentukan bunga, berkurangnya jumlah bunga betina, pembuahan yang gagal, gugurnya bunga dan buah muda, ukuran buah kecil dan tandan buah yang gagal masak.

Respon tanaman terhadap cekaman kekeringan dapat berupa perubahan fisiologis, anatomi dan biokimia (Rad & Zandi, 2012). Secara anatomis, respon tersebut dapat berupa pengurangan jumlah dan ukuran sel akibat terhambatnya aktifitas pembelahan dan pembesaran sel, resistensi stomata dan penebalan konsentrasi lilin epikutikula untuk mengurangi transpirasi melalui stomata (Gomes & Prado, 2007). Beberapa varietas tanaman berbatang tinggi seperti kelapa, kelapa sawit dan kurma merespon cekaman kekeringan melalui penurunan ukuran diameter batang pada pagi hari dan diameter kembali normal pada sore hari (Passos & Silva, 1991). Masing-masing genotip tanaman memiliki respon anatomi akar yang berbeda terhadap cekaman kekeringan (Rosawanti *et al.*, 2015)

Meskipun belum ditemukan hasil penelitian mengenai perubahan karakter anatomi akar kelapa sawit yang tereskpos cekaman kekeringan secara rinci, namun berdasarkan hasil penelitian Mardiah (2014) terhadap padi gogo yang terekspos cekaman kekeringan terlihat bahwa terjadi penurunan diameter berkas pengangkut pada akar, batang dan daun padi gogo. Perubahan yang sama juga terjadi pada perakaran tanaman kedelai (Rosawanti *et al.*, 2015), kacang buncis (Peña-Valdivia *et al.*, 2010) dan anggur (Lovisolo, 1998) yang tercekam kekeringan mengalami beberapa perubahan karakter anatomi seperti berkurangnya tebal jaringan korteks, mengecilnya diameter stele dan diameter xylem akar.

Adanya cekaman kekeringan yang disertai oleh defisiensi Ca pada tanaman kelapa sawit terutama pada daerah-daerah bertanah masam dapat memperparah kondisi kelapa sawit. Selain aktifitas pembelahan dan pembesaran sel yang terhambat akibat cekaman kekeringan, tanaman kelapa sawit yang mengalami defisiensi Ca juga mengalami kematian pada bagian meristematik akar dan pucuk akibat terganggunya transport floem, terganggunya stabilitas dinding sel, dan berkurangnya permeabilitas dan integritas dinding sel sehingga terjadi kebocoran ion akibat tekanan lingkungan (Naeem *et al.*, 2013)serta menurunnya ketahanan tanaman terhadap cekaman abiotik (Song *et al.*, 2008). Ca juga berperan sebagai pektat pada lamella tengah untuk menguatkan dinding sel dan jaringan tanaman (Dordas, 2009).

Secara teori, Ca mampu meningkatkan kekuatan jaringan dan menjaga stabilitas dinding sel tanaman. Serapan Ca yang cukup diharapkan mampu meningkatkan ketahanan bibit yang terekspos cekaman kekeringan khususnya melalui perubahan karakter anatomi pembuluh xylem dan floem akar. Namun demikian, penelitian terkait kontribusi Ca untuk meningkatkan ketahanan bibit kelapa sawit terhadap cekaman kekeringan masih cukup terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dampak cekaman kekeringan terhadap perubahan anatomi pembuluh xylem dan floem bibit kelapa sawit dan mengetahui dosis kalsium yang optimal untuk meningkatkan ketahanan bibit kelapa sawit terhadap cekaman kekeringan khususnya dari segi respon anatomis jaringan pembuluh perakaran bibit kelapa sawit.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Dusun Bendosari, Madurejo, Sleman, Yogyakarta pada bulan September 2017 - November 2018. Bahan yang digunakan yaitu kecambah kelapa sawit varietas Avros yang bersumber dari Pusat penelitian Kelapa Sawit (PPKS) Medan. Kecambah ditanam pada polybag yang telah diisi tanah latosol dengan dua tahap pembibitan yaitu pembibitan *prenursery* dan *main nursery*. Pupuk yang digunakan yaitu pupuk Urea, SP-36, KCl, Kieserit dan kalsium sulfat (CaSO₄) *pure analysis* (PA).

Penelitian dirancang menggunakan rancangan split plot dengan dua faktor perlakuan dan tiga kali ulangan. Faktor perlakuan pertama yaitu tingkat cekaman kekeringan: kapasitas lapang (FTSW 1.00), cekaman kekeringan moderat (FTSW 0.35) dan cekaman kekeringan berat (FTSW 0.15). Faktor perlakuan kedua yaitu dosis Ca: 0%, 50%, 100%, dan 150%.

Penentuan tingkat cekaman kekeringan dan dosis Ca didasarkan pada hasil penelitian pendahuluan menggunakan bibit kelapa sawit umur 4 bulan. Metode *Fraction of Transpirable Soil Water* (FTSW) merupakan metode yang digunakan untuk menghitung besarnya kehilangan air pada tanaman melalui transpirasi (Ray & Sinclair, 1998). Nilai FTSW 1.00 mengacu kondisi tanaman pada kapasitas lapang dan FTSW mendekati 0.0 menunjukkan kondisi tanaman pada titik layu permanen.

Perlakuan cekaman kekeringan dimulai dengan menyiram semua bibit hingga jenuh air dan dibiarkan hingga air berhenti menetes dari polybag. Polybag ditimbang sebagai berat awal (bobot kapasitas lapang). Masing-masing polybag dibungkus menggunakan kantong plastik putih dan dibiarkan hingga bobotnya mencapai bobot titik layu permanen (TLP) yang ditandai dengan menurunnya berat polybag secara stabil selama tiga hari. Bobot target masing-masing polybag dihitung dengan menggunakan rumus (SMARTRI, 2014):

Bobot FTSW
$$1,00 = 1,00$$
 (BKL-BTLP) + BTLP
Bobot FTSW $0,35 = 0,35$ (BKL-BTLP) + BTLP
Bobot FTSW $0,15 = 0,15$ (BKL-BTLP) + BTLP

Besarnya laju kehilangan air pada setiap tanaman akibat evapotranspirasi pada hari tertentu (ke-i) dapat dihitung menggunakan rumus:

Penetapan dosis kalsium mengacu pada kebutuhan Ca bibit pada penelitian pendahuluan yaitu sebesar 0.08 g per tanaman dengan efisiensi serapan hara sebesar 60,76% dari total Ca yang diberikan (Ramadhaini et al., 2014). Kalsium diberikan pada saat bibit berumur 4 bulan dan dua bulan sebelum perlakuan cekaman kekeringan dimulai. Cekaman kekeringan diberikan selama ± 25 hari dimana 14 hari digunakan untuk mencapai bobot target masing-masing polybag sesuai dengan tingkat cekaman kekeringannya dan 11 hari untuk mempertahankan kondisi bibit pada masing-masing perlakuan.

Bagian akar yang dijadikan sebagai preparat adalah akar primer. Akar disayat secara melintang menggunakan *sliding microtome* dengan ketebalan 20-30 µm. Preparat dibuat dengan metode semi permanen. Preparat yang telah dibuat diamati dibawah mikroskop binokuler menggunakan perbesaran 10x dan 40x. Hasil pengamatan didokumentasikan dengan Optilab. Selanjutnya diameter xylem dan floem masing-masing kombinasi perlakuan dihitung dengan aplikasi Image ruster 2.

Data hasil penelitian selanjutnya dianalisis menggunakan Analisis Varian (ANOVA) dengan perangkat lunak SAS pada tingkat kepercayaan 5%, dan jika terdapat beda nyata maka dilakukan uji lanjut DMRT.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keberlansungan pertumbuhan dan perkembangan bibit kelapa sawit terekspos cekaman kekeringan sangat dipengaruhi oleh kemampuan akar dalam menyerap air dan unsur hara. Penyerapan air dan unsur hara dari dalam tanah untuk diangkut ke daun dilakukan oleh pembuluh xylem dan pendistribusian asimilat hasil fotosintesis ke seluruh bagian tanaman dilakukan oleh pembuluh floem (Kusumaningrum, 2017).

Diameter Jaringan Xylem

Hasil analisis pada Tabel 1 menunjukkan bahwa terdapat interaksi antara perlakuan cekaman kekeringan dengan dosis Ca dalam mempengaruhi ukuran diameter pembuluh xylem akar bibit kelapa sawit. Pada bibit yang tidak tercekam kekeringan, peningkatan dosis Ca hingga 150% dapat meningkatkan diameter xylem akar secara signifikan. Namun, pengaruh berbeda ditunjukkan oleh bibit kelapa sawit yang terekspos cekaman kekeringan moderat dan berat. Pada saat bibit terekspos cekaman moderat, peningkatan dosis Ca 50% cenderung menurunkan ukuran diameter xylem secara nyata dibandingkan dengan bibit yang diberi perlakuan Ca 0%. Sedangkan pada bibit yang tercekam kekeringan berat, peningkatan dosis Ca hingga 50% mampu meningkatkan diameter xylem secara nyata dibandingkan dengan dosis Ca lainnya. Apabila konsentrasi Ca yang diberikan lebih dinaikkan menjadi 150%, diameter xylem akar cenderung mengalami penurunan bahkan menjadi lebih kecil daripada tanaman yang mendapat perlakuan Ca 0%.

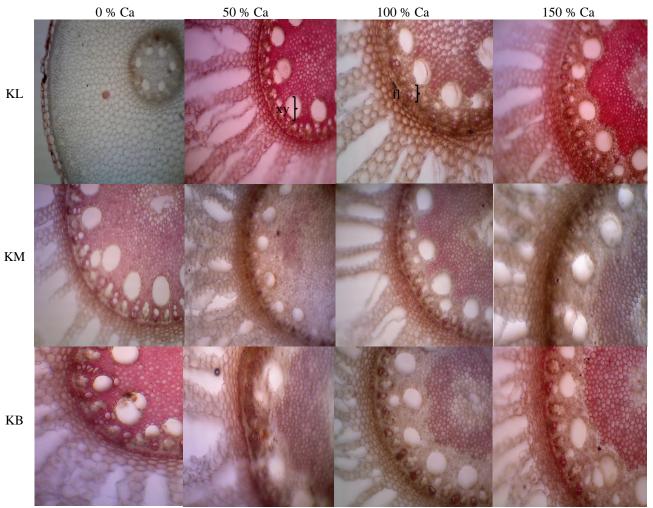
Tabel 1. Pengaruh cekaman kekeringan dan dosis kalsium terhadap diameter jaringan xylem akar bibit kelapa sawit

Perlakuan	Diameter sel xylem (μm)				
	Ca 0 %	Ca 50%	Ca 100%	Ca 150%	Rerata
Kapasitas lapang	43.23 ^g	72.10 ^{bcd}	80.93 ^{ab}	82.73 ^a	69.43
Moderat	76.47 ^{abc}	62.67 ^{de}	47.30^{fg}	54.67 ^{ef}	58.98
Berat	62.97 ^{de}	72.43 ^{bc}	67.90^{cd}	56.90 ^d	64.55
Rerata	64.09	68.18	63.69	62.35	(+)
Koofisien keragaman (%)					
Kekeringan	12.05				
Kalsium	8.24				

Keterangan: Angka pada kolom dan baris yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT taraf 5%; tanda (+): ada interaksi antar faktor yang diuji.

Berkurangnya suplai air ke daerah perakaran tanaman akibat terbatasnya kadar lengas tanah dan rendahnya potensial air tanah dibandingkan potensial air pada tubuh tanaman dapat menghambat proses penyerapan air oleh pembuluh xylem akar. Menurunnya diameter xylem akar merupakan mekanisme pertahanan tanaman untuk menjaga fungsi xylem pada kondisi tercekam kekeringan sehingga penyerapan air menjadi lebih optimal. Terjadinya lignifikasi atau penebalan pada dinding sel menyebabkan diameter berkas pengangkut menjadi lebih sempit. Lignin berperan dalam meningkatkan kekuatan jaringan, meningkatkan ketebalan dinding sel dan membuat struktur sel menjadi lebih rapi sangat membantu sel dan jaringan akar untuk mengurangi kehilangan air melalui kavitasi dan embolisme melalui xylem (Twumasi, 2015).

Embolisme merupakan peristiwa terperangkapnya gelembung-gelembung gas berupa uap air sehingga membatasi aliran air yang melewatinya dan menurunkan kapasitas tanaman dalam mengangkut air menuju daun. Embolisme terjadi pada saat transpirasi tinggi atau pada kondisi tanah yang kering (Rosawanti *et al.*, 2015). Menurut (Blackman, 2018), penurunan diameter pembuluh xylem pada akar yang tereskspos cekaman kekeringan merupakan upaya tanaman untuk menghindari terjadinya *collapse* pada dinding sel dan kavitasi xylem serta meningkatkan *water flow resistance* tanaman.



Gambar 5. Keragaan jaringan pembuluh xylem (xy) dan floem (fl) akar bibit kelapa sawit setelah terekspos cekaman kekeringan dan aplikasi Ca. Gambar diambil pada pembesaran 10x. KL = Kapasitas lapang, KM = Cekaman kekeringan moderat, dan KB = cekaman kekeringan berat

Diameter Jaringan Floem

Pada variable diameter jaringan floem, tidak terlihat adanya interaksi antara cekaman kekeringan dan dosis Ca dalam mempengaruhi diameter floem akar (Tabel 2). Secara umum, diameter floem cenderung menunjukkan penurunan seiring dengan semakin terbatasnya kadar lengas tanah. Penurunan diameter floem secara signifikan terlihat pada saat bibit tercekam kekeringan berat. Berbeda dengan pengaruh cekaman kekeringan, peningkatan dosis Ca cenderung meningkatkan diameter floem akar. Pemberian dosis Ca 100% mampu meningkatkan ukuran diameter floem secara signifikan dan peningkatan ini tidak berbeda nyata dengan diameter floem pada perlakuan dosis Ca 150%. Peningkatan diameter floem ini merupakan upaya tanaman untuk mempermudah proses transport asimilat dari daun ke organ tanaman lainnya sehingga tanaman kelapa sawit lebih tahan terhadap cekaman kekeringan.

Tabel 2. Pengaruh cekaman kekeringan dan dosis kalsium terhadap diameter floem akar bibit kelapa sawit

Perlakuan	Diameter floem (μm)	
Kekeringan		
Kapasitas lapang	9.23ª	
Moderat	8.55^{a}	
Berat	7.77^{b}	
Kalsium		
0%	$7.49^{ m q}$	
50%	$7.86^{ m q}$	
100%	9.01^{p}	
150%	9.70^{p}	
Interaksi	(-)	
Koofisien keragaman (%)		
Kekeringan	15.44	
Kalsium	10.23	

Keterangan: Angka pada kolom dan baris yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT taraf 5%; tanda (-): tidak ada interaksi antar faktor yang diuji.

Menyempitnya diameter pembuluh xylem dan floem pada bibit kelapa sawit terekspos cekaman kekeringan bertujuan untuk menghindari terjadinya kavitasi dan meningkatkan penyerapan air dan nutrisi oleh tanaman. Berdasarkan hasil penelitian (Ghafoor *et al.*, 2019), penyempitan diameter pembuluh xylem dan floem juga terlihat pada tanaman *Avena sativa* yang tercekam kekeringan. Penyempitan ini bertujuan untuk menghindari terjadinya kavitasi pada jaringan pembuluh yang mengakibatkan menurunnya konduktansi hidraulik sehingga tanaman menjadi dehidrasi dan mati. Penurunan diameter xylem dan floem pada tanaman tercekam kekeringan juga bertujuan untuk meningkatkan efektifitas penyerapan air dan nutrisi oleh akar.

Peningkatan diameter floem dengan adanya pemberian Ca erat kaitannya dengan peran Ca dalam menjaga integritas dinding sel dan mencegah kebocoral sel. Dengan demikian, kemampuan tanaman untuk menjaga potensial air jaringan tetap tinggi dan tanaman mampu menekan kehilangan air melalui pemeliharaan turgor sel dengan meningkatkan kedalaman sistem perakaran (Fukai & Copper, 1995). Selain itu, dengan adanya penambahan Ca diharapkan tanaman yang terekspos cekaaman kekeringan mampu meningkatkan elastisitas dinding sel dan menjaga turgor sel pada saat potensial jaringan rendah.

KESIMPULAN

Cekaman kekeringan pada tingkat cekaman berat menurunkan ketebalan diameter floem akar bibit kelapa sawit. Pemberian dosis Ca pada bibit kelapa sawit terekspos cekaman kekeringan mampu memperkuat kekompakan sel dan meningkatkan kekuatan struktural jaringan pembuluh akar bibit kelapa sawit melalui peningkatan diameter floem akar pada dosis Ca 100% dan peningkatan ketebalan diameter xylem pada bibit yang terekspos cekaman berat pada dosis Ca 50%.

DAFTAR PUSTAKA

Blackman, C. J. (2018). Leaf turgor loss as a predictor of plant drought response strategies. In *Tree Physiology* (Vol. 38, Issue 5, pp. 655–657). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/treephys/tpy047

- Caliman, J. P., & Southworth, A. (1998). Effect of Drought and Haze on the Performance of Oil Palm.
- Dordas, C. (2009). Foliar application of calcium and magnesium improves growth, yield, and essential oil yield of oregano (Origanum vulgare ssp. hirtum). *Industrial Crops and Products*, 29(2–3), 599–608. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.11.004
- Fukai S, Cooper M. 1995. Development of drought resistant cultivars using physio-morphological traits in rice. Field Crops Res. 40:67–86.
- Ghafoor, R., Akram, N. A., Rashid, M., Ashraf, M., Iqbal, M., & Lixin, Z. (2019). Exogenously applied proline induced changes in key anatomical features and physio-biochemical attributes in water stressed oat (Avena sativa L.) plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25(5), 1121–1135. https://doi.org/10.1007/s12298-019-00683-3
- Gomes, F. P., & Prado, C. H. B. A. (2007). Ecophysiology of coconut palm under water stress. In *Brazilian Journal of Plant Physiology* (Vol. 19, Issue 4, pp. 377–391). https://doi.org/10.1590/S1677-04202007000400008
- Mardiah, S. 2014. Pengaruh kekeringan dan pupuk organik terhadap anatomis dan pertumbuhan tanaman padi gogo (Oriza sativa L. 'Situ Bagendit') pada tanah berkapur. Tesis, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Nugroho, L Hartanto. 2017. Struktur dan Produk Jaringan Sekretori Tumbuhan. Yogyakarta: UGM Press.
- Rad, A. H. S., & Zandi, P. (2012). The effect of drought stress on qualitative and quantitative traits of spring rapeseed (Brassica napus L.) cultivars. *Zemdirbyste* = *Agriculture*, 99(1), 47–54. https://www.researchgate.net/publication/235346491
- Kusumaningrum, R. (2017). Peranan Xilem dan Floem dalam Pertumbuhan dan Perkembangan Tumbuhan. Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi Dan Biologi Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Yogyakarta 2017, 123.
- Lovisolo, C. (1998). Effects of water stress on vessel size and xylem hydraulic conductivity in Vitis vinifera L. *Journal of Experimental Botany*, 49(321), 693–700. https://doi.org/10.1093/jexbot/49.321.693
- Naeem, M., Khan, M. N., Khan, M. M. A., & Moinuddin, M. (2013). Adverse effects of abiotic stresses on medicinal and aromatic plants and their alleviation by calcium. In *Plant Acclimation to Environmental Stress* (pp. 101–146). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5001-6_5
- Peña-Valdivia, C. B., Sánchez-Urdaneta, A. B., Rangel, J. M., Muñoz, J. J., García-Nava, R., & Velázquez, R. C. (2010). Anatomical root variations in response to water deficit: Wild and domesticated common bean (Phaseolus vulgaris L.). *Biological Research*, *43*(4), 417–427. https://doi.org/10.4067/S0716-97602010000400006
- Rosawanti, P., Ghulamahdi, M., & Khumaida, N. (2015). Rosawanti Respon anatomi dan fisiologi akar kedelai terhadap cekaman kekeringan. *Agron. Indonesia*, 43(3), 186–192.
- SMARTRI. 2014. SOP of Experimental Nursery.
- Song, W. Y., Zhang, Z. Bin, Shao, H. B., Guo, X. L., Cao, H. X., Zhao, H. Bin, Fu, Z. Y., & Hu, X. J. (2008). Relationship between calcium decoding elements and plant abiotic-stress resistance. In *International Journal of Biological Sciences* (Vol. 4, Issue 2, pp. 116–125). Ivyspring International Publisher. https://doi.org/10.7150/ijbs.4.116

- Twumasi, P. (2015). Effects of water stress during growth of xylem anatomy, xylem functioning and vase life in three Zinnia elegans cultivars. *Acta Horticulturae*. https://www.researchgate.net/publication/265266076
- Valliyodan, B., & Nguyen, H. T. (2006). Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 9, Issue 2, pp. 189–195). https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.01.019