

**PERKEMBANGAN PENELITIAN INDUKSI KALUS EMBRIOGENIK
PADA JARINGAN VEGETATIF TANAMAN KARET KLONAL
(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg)**

*Research Development of Embryogenic Callus on Rubber Clone Vegetative Tissue
(Hevea brasiliensis Muell. Arg)*

Lestari Admojo¹, Ari Indrianto² dan Hananto Hadi¹

¹ Balai Penelitian Getas, Pusat Penelitian Karet

²Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada

Email: tariadmojo@balitgetas.co.id

Diterima tgl 28 November 2013/Direvisi tgl 17 Maret 2014/Disetujui tgl 24 Maret 2014

Abstrak

Perbanyak tanaman karet (*Hevea brasiliensis* Muell Arg) saat ini masih menggunakan cara konvensional yaitu okulasi. Kelemahan teknik ini antara lain membutuhkan waktu yang lama, kebutuhan lahan yang luas, musim biji yang terbatas di samping juga diperlukan tenaga kerja yang cukup banyak. Permasalahan tersebut mengharuskan penelitian diarahkan pada perbanyak bibit dengan tehnik yang lebih efisien dalam skala massal. Teknik kultur jaringan melalui embriogenesis somatik (EGS) membuka peluang tersebut. Induksi kalus embriogenik merupakan langkah awal untuk keberhasilan teknik EGS secara tidak langsung. Tulisan ini merangkum hasil penelitian induksi kalus embriogenik pada jaringan vegetatif tanaman karet klonal yang dimulai pada tahun 2008 hingga 2012. Hasil pengujian terhadap 6 klon karet (PB 260, PB 330, IRR 111, IRR 39, GT 1 dan IRR 112) menunjukkan bahwa klon IRR 112 dan PB 330 merespon pembentukan kalus embriogenik, dan membentuk fase embrio dari globular (IRR 112) hingga jantung dan torpedo (PB 330). Hasil pengujian jaringan vegetatif yang digunakan sebagai eksplan (helai daun, tangkai, ketiak tangkai, mata tunas) menunjukkan bahwa jaringan tangkai dan ketiak tangkai merespon terbentuknya kalus

embriogenik. Kombinasi media dasar MS+2,4 D 5 ppm memberikan respon induksi kalus friabel terbaik dan MS+NAA 0,1 ppm+BAP 2 ppm memberikan respon kalus embriogenik terbaik, namun frekuensinya masih rendah. Tingkat *browning* masih tinggi yang menjadi faktor pembatas perkembangan kalus. Kalus yang bersifat embriogenik diharapkan berpotensi untuk diinduksi menjadi planlet melalui teknik embriogenesis somatik.

Kata kunci: embriogenesis somatik, *Hevea brasiliensis*, kalus embriogenik, klon karet.

Abstract

Preparation of planting material of rubber (Hevea brasiliensis Muell Arg) until now still uses conventional propagation by budding. The weaknesses of conventional propagation technique are the need of longer time, greater land use and workers and limited seed seasons. This problems needed to be alleviated by using alternative technique of propagation, i.e micropropagation technique known as tissue culture. The technique can prepare rubber planting material rapidly and potentially can produce great number of planting materials. One of promising tissue culture technique is somatic embryogenesis. Induction of embryogenic callus is the first step to pass indirect somatic embryogenesis technique. This review discusses induction of embryo somatic on rubber clone vegetative tissue,

encompassing the work in the period of 2008 until 2012. From this research it showed that from among rubber clones (PB 260, PB 330, IRR 111, IRR 39, GT 1 and IRR 112) tested, IRR 112 and PB 330 gave a good response from globular phase (IRR 112) to heart shape and torpedo phase (PB 330). Among the vegetative tissue (leaf, stem, sub stem, bud stem) used as explants it was shown that stem and sub stem responded to embryogenic callus. The media combination of MS+2,4-D 5 ppm produced better response on friable callus induction and MS+NAA 0,1 ppm+BAP 2 ppm has better responded to embryogenic callus, but the frequency is still low. The browning intensity still high and it is the limiting factor for explants growth. The embryogenic callus can potentially be developed further to plantlet by induction in appropriate media.

Keywords: *embryogenic callus, embryogenesis somatic, Hevea brasiliensis, rubber clone*

Pendahuluan

Perbanyak tanaman karet (*Hevea brasiliensis* Muell Arg) saat ini masih menerapkan teknik konvensional yaitu okulasi. Kelemahan teknik ini antara lain membutuhkan waktu yang lama, sekitar 18 bulan sejak pengecambahan hingga bibit siap dipindah tanam (*transplanting*) ke lapangan. Kelemahan lain adalah musim biji yang terbatas, dibutuhkan lahan yang luas dan tenaga yang cukup banyak. Hal tersebut sering menjadi kendala untuk memproduksi bibit secara konvensional dalam skala massal. Teknik kultur jaringan melalui embriogenesis somatik (EGS) memberi peluang untuk perbanyak bibit karet secara massal dalam waktu cepat dan efisien.

Embriogenesis somatik adalah pembentukan embrio dari sel-sel aseksual (sel-sel somatik) membentuk struktur yang menyerupai embrio zigotik. Pada proses EGS terjadi pembentukan struktur bipolar yang mengandung meristem tunas dan akar, tanpa melalui penggabungan gamet seperti halnya embrio zigotik (Jimenez, 2001). Pembentukan embrio somatik dapat secara langsung maupun tidak langsung. Embriogenesis

somatik langsung adalah pembentukan embrio somatik atau jaringan embriogenik secara langsung dari eksplan tanpa melalui fase pembentukan kalus. Sebaliknya, pada embriogenesis somatik tidak langsung proses pembentukan embrio somatik didahului melalui fase kalus. Induksi kalus embriogenik merupakan langkah awal untuk perbanyak tanaman melalui teknik ES secara tidak langsung.

Penelitian EGS pada tanaman karet telah dimulai sejak tahun 1980-an oleh beberapa peneliti, antara lain oleh Wang *et al.* (1980), Wan *et al.* (1982), serta Carron dan Enjalric (1985) 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. Beberapa penelitian EGS menggunakan jaringan vegetatif tanaman berkayu dewasa telah banyak dilakukan. Disimpulkan bahwa jaringan vegetatif tanaman dewasa memungkinkan sebagai sumber eksplan (Ruaud and Paques, 1995).

Tulisan ini merangkum hasil penelitian induksi kalus embriogenik yang dilakukan di Balai Penelitian Getas sejak tahun 2008 hingga 2012. Hasil tersebut termasuk klon yang prospektif untuk dijadikan sebagai sumber ekspansi dari beberapa yang diuji (PB 260, PB 330, IRR 111, IRR 39, GT 1 dan IRR 112), jaringan vegetatif tanaman karet klonal yang responsif untuk induksi kalus (tangkai daun, anak tangkai daun, mata tunas, lamina, tunas pucuk) dan pengaruh kombinasi media dasar yang digunakan (MS, DKW dan WPM) serta respon kalus yang diperoleh (friabel, kompak dan embriogenik pada fase tertentu).

Prospek Kalus Embriogenik Untuk Perbanyak Bibit Secara *In Vitro*

Salah satu jalur yang ditempuh untuk meregenerasikan tanaman dengan teknik kultur jaringan adalah dengan embriogenesis somatik. Langkah awal proses induksi

embriogenesis somatik adalah pemilihan eksplan yang akan digunakan. Berdasarkan penelitian sebelumnya, eksplan yang digunakan pada tanaman karet kebanyakan berasal dari jaringan generatif seperti anter dan iner integumen atau kotiledon biji (Blanc *et al*, 1999; Cailloux *et al*, 1996), atau bagian akar kecambah hasil kultur *in vitro* (Quan *et al*, 2010). Pada percobaan yang dilakukan di Balai Penelitian Getas, eksplan yang digunakan berasal dari bagian jaringan vegetatif (lamina, tangkai daun, anak tangkai daun, mata tunas, tunas pucuk) tanaman hasil okulasi (tanaman klonal), sehingga keunggulan genetik bibit yang dihasilkan lebih terjamin.

Fase induksi kalus dianggap berhasil apabila kalus yang diperoleh bersifat embriogenik dicirikan oleh sel yang berukuran kecil, sitoplasma padat, inti besar, vakuola kecil-kecil dan mengandung butir pati. Embrio somatik dapat dihasilkan dalam jumlah besar dari kultur kalus, namun untuk tujuan perbanyakkan skala besar, jumlahnya kadang-kadang dapat ditingkatkan melalui inisiasi sel embriogenik dari kultur suspensi yang berasal dari kalus primer (Wiendi *et al*, 1991). Potensi terbesar multiplikasi klon adalah melalui embriogenesis somatik dimana 1 sel dapat menghasilkan 1 embrio untuk menjadi tanaman lengkap.

Selain media, jenis eksplan juga sangat berpengaruh dalam keberhasilan proses embriogenesis. Bagian tanaman yang masih memiliki sifat meristematis sangat baik digunakan sebagai eksplan dalam proses embriogenesis somatik. Menurut Zhang *et al*. (2000), keberhasilan embriogenesis melalui kultur *in vitro* dipengaruhi beberapa faktor, yaitu : a) genotip tanaman donor, b) kondisi fisiologis tanaman donor, c) jenis media dan kondisi fisik media, d) lingkungan kultur, dan e) zat pengatur tumbuh (ZPT).

Penggunaan eksplan yang bersifat meristematis umumnya memberikan keberhasilan pembentukan embrio somatik yang lebih tinggi (Vesco and Guerra, 2001). Eksplan dari biji (embrio zigotik) yang dikedambahkan secara *in vitro* ideal karena hampir semua bagian dari kecambah *in vitro*

sel-selnya masih bersifat meristematis. Eksplan ini mengandung sel-sel embriogenik (*proembryogenic determined cells*) yang potensial untuk berkembang menjadi embrio dan tanaman lebih banyak. Kelemahannya adalah kualitas tanaman yang dihasilkan sulit diprediksi karena keragaman genetik.

Penggunaan eksplan jaringan vegetatif yang berasal dari tanaman induk hasil okulasi (klonal) menjamin kualitas tanaman lebih baik, karena tanaman regenerasi yang dihasilkan identik dengan induknya. Penggunaan eksplan ini mengharuskan adanya proses pra sterilisasi secara optimal melalui '*preconditioning-culture*'. Proses ini diharapkan mengurangi kemungkinan timbulnya kontaminasi yang sewaktu-waktu muncul pada kultur *in vitro*. Pada proses dediferensiasi akan terbentuk kalus. Kalus yang terbentuk akan dilanjutkan ke tahap berikutnya, yaitu proses diferensiasi, diawali dengan terinduksinya sel-sel kalus menjadi bersifat embriogenik. Kalus yang bersifat embriogenik tersebut akan mudah terinduksi menjadi embrio, dan akhirnya menjadi planlet yang sempurna, bila digunakan pada media yang tepat.

Perkembangan Hasil Penelitian

1. Respon Beberapa Klon Karet

Identifikasi sumber eksplan jaringan vegetatif yang potensial untuk induksi kalus embriogenik diawali dengan pengujian terhadap 6 klon karet, yaitu PB 260, PB 330, IRR 111, IRR 39, GT 1 dan IRR 112. Eksplan tersebut diambil dari kebun entres bagian pucuk fase sekitar 1 minggu setelah *flush*. Respon dari keenam klon tersebut disajikan dalam Tabel 1.

Pengujian terhadap 6 klon karet yang digunakan sebagai sumber eksplan memberikan respon yang berbeda. Klon PB 260, PB 330 dan IRR 39 menunjukkan respon pembentukan kalus yang lebih banyak, baik dari sisi massa kalus maupun frekuensi terbentuknya kalus. Berdasarkan karakter kalus yang diperoleh, hanya klon IRR 112 dan PB 330 yang menunjukkan karakter kalus

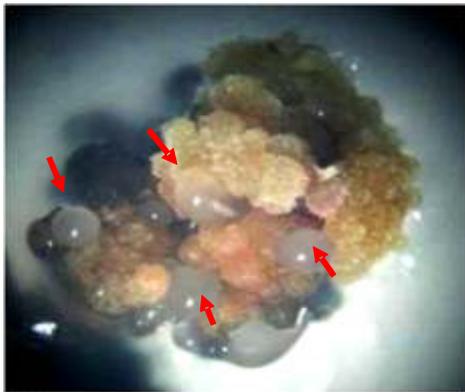
Tabel 1. Perbedaan respon pembentukan kalus pada beberapa klon karet.

Klon	Bagian eksplan yang merespon	Kalus	Karakteristik kalus	Sifat kalus	Waktu mulai respon (MST)
PB 260	Tangkai dan anak tangkai	++++	Hijau kilap (glossy/bening)	NE	1
IRR 111	-	-	-	-	-
IRR 39	Anak tangkai	++++	Hijau kilap dan agak kecoklatan	NE	1
GT 1	Tangkai	+	Hijau kilap	NE	1
IRR 112	Tangkai dan anak tangkai	++	Hijau kekuningan, bergerombol dan remah (sebagian fase globular)	E	5
PB 330	Tangkai dan anak tangkai	++++	Hijau kekuningan, bergerombol dan remah (sebagian fase globular, jantung dan torpedo)	E	4

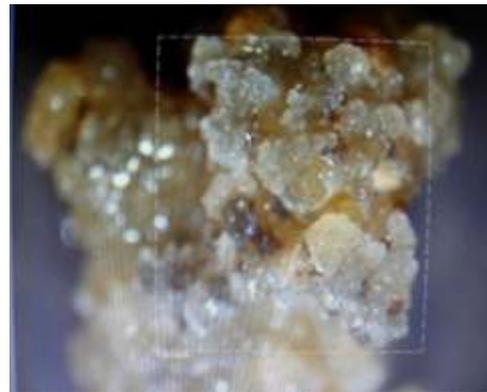
Keterangan : +++++: sangat banyak, ++: sedang, +: sedikit, -: tidak terbentuk, NE : Non Embriogenik, E : Embriogenik, MST : Minggu setelah tanam.

embriogenik. Munculnya kalus embriogenik ditandai dengan warna kalus yang bening kehijauan/kuning hijau, mengkilap, sangat friabel (remah) dan bila diamati dibawah mikroskop terlihat sitoplasma sangat padat. Fase embrio yang terbentuk meliputi fase

globular, fase jantung dan fase torpedo (Gambar 1-3). Kalus yang bersifat embriogenik diharapkan berpotensi untuk diinduksi menjadi planlet pada media yang sesuai melalui teknik embriogenesis somatik.



Gambar 1. Kalus globular (panah merah) dari tangkai daun klon PB 330.



Gambar 2. Kalus bening kekuningan dan tekstur remah dari klon IRR 112.



Gambar 3. Fase embrio pada kalus embriogenik yang terinduksi pada klon PB 330 (A : embrio fase jantung, B : embrio fase torpedo)

2. Respon Jaringan Eksplan yang Digunakan

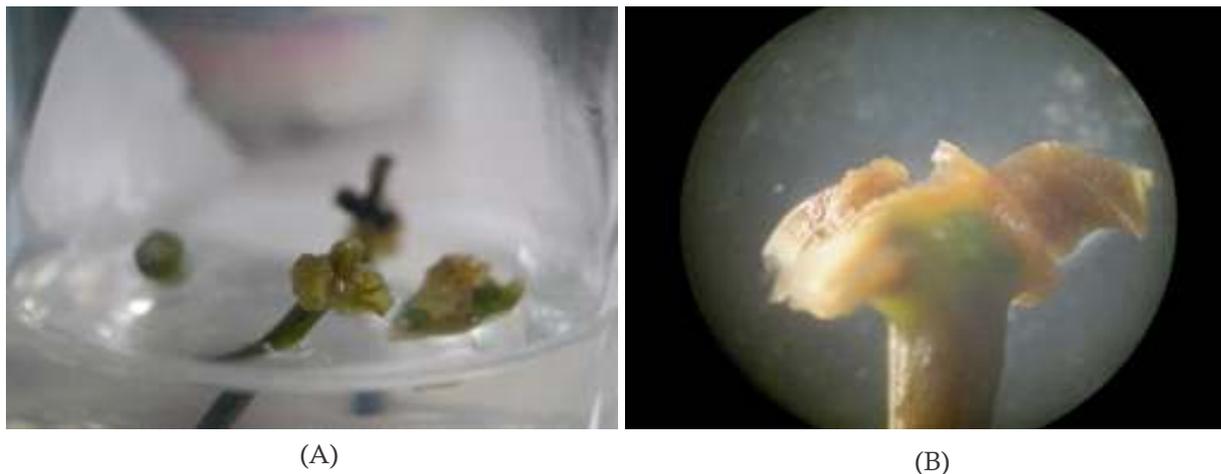
Diantara jaringan vegetatif yang digunakan, hanya jaringan daun yang tidak merespon pembentukan kalus. Massa kalus yang cukup banyak terinduksi pada jaringan tangkai daun dan antara tangkai-anak tangkai daun, dengan karakteristik kalus yang bersifat potensial embriogenik (Tabel 2). Kalus yang disubkultur belum memberikan respon pada beberapa media.

Berdasarkan hasil pengamatan, tidak seluruh eksplan memberikan respon sama

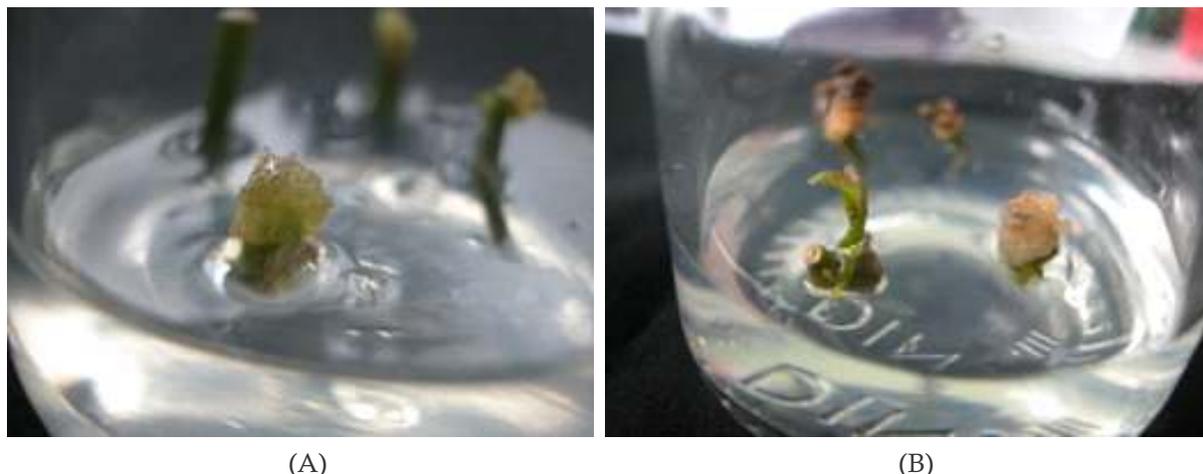
walaupun ditanam pada media yang sama. Hal ini diduga karena faktor pengambilan eksplan, seperti perbedaan posisi pengambilan eksplan (pangkal ataupun ujung tangkai), posisi payung daun, ataupun faktor fisiologi entres sebagai sumber eksplan. Menurut Jimenez (2005), jaringan atau bagian organ tertentu tanaman dalam genotipe yang sama juga dapat berbeda kemampuan embriogenesisnya. Penampakan respon eksplan pada beberapa jaringan tanaman yang digunakan bisa dilihat pada Gambar 4 dan 5.

Tabel 2. Perbedaan respon pembentukan kalus pada beberapa jaringan eksplan.

Jaringan Eksplan	Respon
Daun	Rata-rata dalam 1 minggu setelah tanam mengalami <i>browning</i> dan mati
Mata tunas	Hanya muncul sedikit kalus, non embriogenik
Anak tangkai	Rata-rata membentuk kalus pada bagian tengah atau ketiaknya dalam 1-3 minggu setelah tanam, sebagian bersifat embriogenik
Tangkai daun	Rata-rata membentuk kalus yang sebagian bersifat embriogenik baik pada bagian tengah maupun ujung pada 4-5 minggu setelah tanam
Tunas apikal	Hanya sedikit membentuk kalus, non embriogenik dan rata-rata mengalami <i>browning</i> pada 2-3 minggu setelah tanam



Gambar 4. Kalus pada jaringan antara tangkai-anak tangkai (A). Kalus rata-rata muncul dari ketiak tangkai, bukan bekas potongan (B).



Gambar 5. Kalus dari jaringan tangkai daun (A). Kalus dari tunas apikal (B).

3. Pengaruh Kombinasi Media Dasar + Zat Pengatur Tumbuh

Penelitian kombinasi media menggunakan media dasar MS (Murashige dan Skoog), DKW (Driver-Kuniyuki Walnut) dan WPM (*Woody Plant Medium*) dengan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) auksin dan sitokinin. Auksin yang digunakan untuk induksi kalus adalah 2,4-D dan NAA pada rentang konsentrasi antara 5-10 μM (1-7 ppm), sedangkan kombinasi auksin dan sitokinin menggunakan NAA dan BAP pada rentang konsentrasi sama. Formula terbaik didasarkan atas terjadinya inisiasi kalus, karakteristik kalus dan sifat kalus.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi media dasar MS+ZPT memberikan respon eksplan yang lebih banyak dan lebih baik dibandingkan kombinasi media dasar DKW+ZPT dan WPM+ZPT (Tabel 3). Penampilan respon kalus terlihat pada Gambar 6.

Penambahan ZPT tertentu sering berperan dalam induksi EGS. Zat pengatur tumbuh yang sering digunakan adalah auksin dan sitokinin. Auksin merupakan salah satu ZPT yang paling sering digunakan dalam induksi ES (Cooke *et al*, 1993 *cit* Jimenez, 2005). Hal ini diduga karena pengaruh gradien auksin selama fase induksi, yang merupakan fase

penting untuk inisiasi bilateral selama embriogenesis jaringan somatik dan zigotik, baik pada tanaman monokotil maupun dikotil (Schiafone and Cooke, 1987 *cit* Jimenez, 2005). Pada sebagian besar spesies yang menggunakan ZPT untuk induksi EGS, auksin dan sitokinin merupakan faktor kunci yang berperan dalam respon embriogenik. Hal tersebut disebabkan karena kombinasi auksin dan sitokinin sangat berperan pada regulasi siklus sel dan pembelahan sel (Gaj, 2004). Juga dinyatakan bahwa lebih 80% dari protokol yang dipelajari, ES diinduksi dengan adanya auksin tunggal atau auksin yang dikombinasikan dengan sitokinin (Gaj, 2004).

Gaj (2004) selanjutnya menyatakan bahwa lebih 65% penelitian EGS terbaru menggunakan kombinasi auksin dan sitokinin atau kombinasi auksin dan zat pengatur tumbuh lainnya. *Naphtalene Acetic Acid* (NAA), adalah jenis auksin terbanyak kedua yang sering digunakan untuk menginduksi somatik embriogenesis setelah 2,4-D (Raemakers *et al*, 1995 *cit* Jimenez, 2005). Hal senada dilaporkan antara lain oleh Cuenca *et al*, Pinto *et al*, Hernandez *et al*, Toribio *et al*, *cit*. Jimenez (2005), dimana auksin seringkali digunakan secara tunggal atau dikombinasikan dengan sitokinin, terutama pada beberapa tanaman berkayu. Pada induksi EGS yang tidak

Tabel 3. Perbedaan respon kalus yang terbentuk pada beberapa kombinasi media dasar + ZPT.

Respon	WPM + ZPT	DKW + ZPT	MS + ZPT
Klon yang membentuk kalus	PB 260, IRR 39, GT 1	PB 260, IRR 39, IRR 112	PB 260, PB 330, IRR 39, GT 1, IRR 112
Jumlah eksplan yang membentuk kalus (dari 60 eksplan)	10	32	48
Sifat kalus	NE	NE dan sebagian E	NE dan sebagian E
Karakteristik kalus	Hijau kilap (glossy/bening)	Hijau kilap, hijau kekuningan, hijau kecoklatan,	Hijau kilap, hijau kekuningan, hijau kecoklatan, bergerombol, remah
Waktu terbentuknya kalus	1 – 3 MST	1 – 4 MST	1 – 5 MST

Keterangan : NE : Non Embriogenik, E : Embriogenik, MST : Minggu Setelah Tanam, ZPT : kombinasi 2,4-D/NAA dan BAP



Gambar 6. Kalus yang terinduksi pada jaringan antara tangkai-anak tangkai daun klon IRR 112 pada 3 Bulan Setelah Tanam (BST) dalam media MS + ZPT (A). Kalus yang terinduksi pada jaringan tangkai daun klon IRR 112 pada 3 Bulan Setelah Tanam (BST) dalam media DKW + ZPT (B).

langsung, efek dari sitokinin terutama pada proliferasi sel secara massal sebelum dediferensiasi embrio (Lakshmanan and Taji 2000). Reamakers *et al.* (1995) telah mereview bahwa diantara sitokinin yang digunakan

untuk induksi EGS yang sering digunakan adalah BAP (57%), diikuti Kinetin (37%), Zeatin (3%) dan Thidiazuron (3%) (Jimenez, 2005).

4. Kendala yang Dihadapi

Tingkat *browning* atau pencoklatan eksplan yang tinggi menjadi faktor pembatas pada penelitian induksi kalus embriogenik di Balai Penelitian Getas (Gambar 7). Tamin (1987) menyatakan masalah yang sering dihadapi pada kultur tanaman berkayu meliputi bahan tanaman sumber eksplan, proses sterilisasi, *browning*, mengeluarkan zat atau eksudat tertentu, kebutuhan nutrisi, kehilangan potensial morfogenetik, dan jaringan mengalami vitrifikasi. *Browning* tersebut diduga menjadi salah satu faktor rendahnya frekuensi pembentukan kalus embriogenik. Tang dan Newton (2004) juga melaporkan bahwa pencoklatan jaringan sangat menurunkan regenerasi secara *in vitro* dari kultur kalus pada beberapa tanaman berkayu. Tabiyeh *et al.* (2006) menyatakan bahwa pencoklatan eksplan disebabkan 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. 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 (Hutami, 2008).



A



B

Gambar 7. Eksplan tangkai (A) dan tunas pucuk (B) yang mengalami browning, selanjutnya diikuti kematian eksplan.

Kesimpulan

Kalus embriogenik berhasil diperoleh pada eksplan tangkai daun dan anak tangkai daun dari klon IRR 112 dan PB 330. Embrio yang terbentuk menunjukkan fase globular (IRR 112) dan globular, jantung dan torpedo (PB 330). Kalus embriogenik tersebut berpotensi untuk diinduksi membentuk planlet pada media yang sesuai.

Induksi kalus friabel terbaik diperoleh pada perlakuan media MS+2,4-D 5 ppm dan induksi kalus embriogenik terbaik berhasil diperoleh pada media MS+NAA 0,1 ppm +BAP 2 ppm. Tingkat *browning* masih tinggi yang menjadi faktor pembatas perkembangan kalus.

Pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan pada sumber eksplan terejuvenasi untuk melihat pengaruh juvenilitas tanaman klonal terhadap respon eksplan secara *in vitro*. Eliminasi tingkat *browning* dapat dilakukan dengan subkultur berulang, perendaman dalam arang aktif + sukrosa, penambahan *polyamine* dan penempatan kultur dalam ruang gelap.

Daftar Pustaka

- Blanc, G., N. Michaux-Ferriere, C. Teisson, L. Lardet, and M. P. Carron. 1999. Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59. pp. 103-112.
- Cailloux, F., J. J. Guerrier, L. Linossier and A. Coudret. 1996. Long-term somatic embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. *Plant Science* 120. pp. 185-196.
- Carron, M. P., and F. Enjalric. 1985. Somatic embryogenesis from inner integument of the seed of *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. *CR Acad. Sci. Paris*. 300: 653-658
- Carron, M. P., H. Etienne, N. Michaux-Ferriere, and P. Montoro. 1995. Somatic embryogenesis in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.) p. 353-369 In Y. P. S. Bajaj (ed). *Biotechnology in Agriculture and Forestry 30 Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I*. Springer Verlag, Germany. 472 p.
- Cooke, T. J., R. H. Racusen, and J. D. Cohen. 1993. The role of auxin in plant embryogenesis. *Plant Cell* 5: 1494-1495.
- Cuenca, B., M. C. San-José, M. T. Martínez, A. Ballester, and A. M. Vieitez. 1999. Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L. *Plant. Cell. Rep.* 18: 538-543.
- Gaj, M. D. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*. 43 : 27-47.
- Hernández, I., C. Celestino, and M. Toribio. 2003. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis. I. Factors affecting the induction in leaves from mature cork oak trees. *Plant. Cell. Rep.* 21: 759-764.
- Hutami, S. 2008. Ulasan: masalah pencoklatan pada kultur jaringan. *Jurnal AgroBiogen* 4(2):83-88
- Jimenez, V. M., E. Guevara, J. Herrera and F. Bangerth. 2001. Endogenous hormone levels in habituated nucellar *Citrus* callus during the initial stages of regeneration. *Plant Cell Report*. 20: 92-100.
- Jimenez, V. M. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. (review paper). *Plant Growth Regulation* 47 : 91-110.
- Lakshmanan P. and A. Taji. 2000. Somatic embryogenesis in leguminous plants. *Plant Biology*. 2: 136-148

- Pinto, G., C. Santos, L. Neves, and C. Araújo. 2002. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant. Cell. Rep.* 21: 208-213.
- Quan, N. Z., Z. H. Jiang, T. D. Huang, W. G. Li, A. H. Sun, X. M. Dai and Z. Li. 2010. Plant regeneration via somatic embryogenesis from root eksplants of *Hevea brasiliensis*. *African Journal of Biotechnology*. 9(49): 8168-8173.
- Raemakers, C. J. J. M., E. Jacobsen, and R. G. F. Visser. 1995. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica* 81: 93-107
- Ruaud, J. N. and M. Paques. 1995. Somatic embryogenesis and rejuvenation of trees. p.99-118 In Jain, S. M., P. K. Gupta, and R. J. Newton (eds). *Somatic embryogenesis in woody plants Vol. 1*. Kluwer Academic Publishers, London. 460 p.
- Schiavone, F. M. and T. J. Cooke. 1987. Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors. *Cell Differ.* 21: 53-62.
- 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 p.
- Tamin, M. B. M. 1987. Micropropagation : The problems with woody species In *Cell and Tissue Culture in Field Crop Improvement (Proceed. of Seminar)*. Tsukuba, Japan on October 4-9th 1987.
- 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.
- Toribio, M., C. Fernández, C. Celestino, M. T. Martínez, M. C. San-José, and A. M. Vieitez. 2004. Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. *Plant. Cell. Tiss. Org. Cult.* 76: 283-287.
- Vesco, L. L. D. and M. P. Gurerra. 2001. The effectiveness of nitrogen sources in feijoa somatic embryogenesis. *Plant Cell and Organ Culture* 64:19-35.
- Wan, A. R., W. Y. Ghandimathi, H. Rohani, and K. Paranjothy. 1982. Recent development in tissue culture of *Hevea*. In Rao, A. N (ed). *Tissue Culture of Economically Important Plant*. COSTED and ANBS, Singapore. pp 152-158
- Wang, Z., X. Zeng, C. Chen, H. Wu, Q Li, G. Fan, and W. Lu. 1980. Induction of rubber planlets from anther of *Hevea brasiliensis* Mull. Arg in vitro. *Chin. J. Trop. Crops.* 1: 25-26
- Wiendi, N. M. A., G.A. Wattimena dan L.V. Gunawan. 1991. *Bioteknologi Tanaman I*. PAU IPB. 507 p.
- Zhang, B., F. Liu, and C. Yao. 2000. Plant regeneration via somatic embryogenesis in cotton. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 60: 89-94
- Zhe, L. 2006. *Tissue culture in Hevea brasiliensis in Training on Rubber Breeding in China 2006* by Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences.