

UPAYA PERBAIKAN GENETIK DAN PENYEDIAAN BIBIT TANAMAN KARET (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) MELALUI PENDEKATAN BIOTEKNOLOGI

*Effort on Genetic Improvement and Provision of Planting Material of Rubber Tree
(Hevea brasiliensis Muell. Arg.) by Biotechnology Approach*

Muhamad Rizqi Darajat dan Radite Tistama
Balai Penelitian Sungei Putih PO. BOX 1415 Medan 20001
Email: moriz_dj@yahoo.com

Diterima tgl 5 Februari 2014/Direvisi tgl 18 Juni 2014/Disetujui tgl 17 Juli 2014

Abstrak

Beberapa tantangan dalam kegiatan perakitan klon unggul baru tanaman karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) melalui metode persilangan buatan (konvensional) diantaranya adalah membutuhkan waktu yang lama, sifat heterozigositas yang tinggi dan tingkat keberhasilan yang belum optimal. Bioteknologi diharapkan dapat menjadi metode pendukung dalam menjawab tantangan yang terjadi tersebut. Perkembangan teknik *in vitro* dan rekayasa genetika telah memberikan terobosan baru dalam perbanyakan dan perbaikan genetik tanaman karet. Pemanfaatan bioteknologi telah berdampak pada proses perbaikan genetik tanaman karet dalam hal produktivitas, kesehatan tanaman, dan peningkatan toleransi terhadap cekaman. Selain itu penggunaan marka molekuler sangat bermanfaat untuk percepatan seleksi dalam kegiatan pemuliaan tanaman karet. Teknik tersebut juga berguna dalam identifikasi klon dan tetua, analisis keanekaragaman genetik, pengawasan hasil persilangan buatan, penciri klon dan biologi reproduksi. Tulisan ini menjabarkan tentang pendekatan bioteknologi untuk meningkatkan potensi genetik tanaman karet.

Kata kunci: *Hevea brasiliensis*, bioteknologi, kultur jaringan, rekayasa genetika

Abstract

There are some challenges in the use of traditional breeding method for improving genetic of rubber tree (Hevea brasiliensis). They are very slow and time consuming, heterozygous nature, and low capacity in generating fruit set. Biotechnology is expected to be an supporting method for genetic improvement. The development of in vitro technique and genetic engineering have provided a powerful tool giving positive effect for propagation and genetic improvement of Hevea in order to achieve the objective of breeding program. These techniques, together with molecular mechanism knowledge, have an impact on genetic improvement of Hevea in case of productivity, plant health, and enhanced stress tolerance. Molecular marker in Hevea breeding program can effectively avoid time consuming bioassays in early generation screening. In addition, molecular marker can be used for clone and parent identification, genetic diversity analysis, breeding control, clone characterization and biology of reproduction. This article describes various technique for genetic improvement and propagation of Hevea by biotechnology approach.

Keywords: *Hevea brasiliensis*, biotechnology, tissue culture, genetic engineering

Pendahuluan

Karet alam memiliki peranan yang sangat penting bagi perekonomian Indonesia. Sebagai negara penghasil karet alam terbesar

kedua, komoditas ini telah menghasilkan devisa ekspor sebesar US\$ 6,9 milyar pada tahun 2013 (Badan Pusat Statistik, 2014). Nilai ini akan terus meningkat seiring dengan permintaan karet alam dunia yang cenderung naik dari tahun ke tahun. Berdasarkan data Direktorat Jenderal Perkebunan Departemen Pertanian (2012), Indonesia merupakan negara yang memiliki area perkebunan karet terbesar di dunia dengan luas 3,4 juta hektar, namun produksi karet alam Indonesia hanya sebesar 3 juta ton. Nilai tersebut masih kalah saing dengan negara tetangga yaitu Thailand yang dapat memproduksi karet alam sebesar 3,5 juta ton dengan luas area perkebunan berkisar 2,6 juta hektar (*International Rubber Study Group*, 2013).

Beberapa hal yang menyebabkan tidak optimalnya produksi karet di Indonesia adalah pengelolaan lahan yang kurang baik, penggunaan bibit tidak unggul dan tidak seragam, dan pengaruh kondisi lingkungan (Siregar dan Suhendry, 2013; Priyadarshan dan Demange, 2004). Salah satu upaya yang dilakukan untuk meningkatkan produksi karet alam adalah dengan cara memperbaiki mutu genetik dan propagasinya. Upaya tersebut dapat dilakukan secara konvensional maupun secara inkonvensional. Secara konvensional dilakukan dengan persilangan buatan antara dua tetua yang kemudian diseleksi berdasarkan karakter produksi dan ketahanan penyakit. Secara inkonvensional yaitu menggunakan suatu teknologi tertentu dalam merekayasa suatu sifat tertentu sehingga dihasilkan suatu cara atau produk yang lebih baik dari sebelumnya.

Beberapa klon telah dihasilkan melalui persilangan buatan dengan potensi produksi karet kering di atas 2 ton/ha/tahun diantaranya adalah klon IRR 112 dan IRR 118 (Woelan *et al.*, 2005). Tantangan perbaikan genetik melalui teknik konvensional adalah waktu yang cukup lama dari awal persilangan hingga didapatkan klon unggul. Selain itu, persilangan buatan memiliki beberapa kendala yaitu ketidakcocokan bunga jantan dan betina, hasil buah sedikit, masa pematangan buah yang lama, sifat heterozigositas tanaman,

lahan percobaan yang semakin berkurang dan belum tersedianya karakter seleksi awal yang handal (Venkatachalam *et al.*, 2007).

Beberapa permasalahan di lapangan belum dapat teratasi secara optimal melalui persilangan buatan seperti sensitivitas terhadap cekaman abiotik dan gangguan fisiologis yang dapat mengganggu produktivitas tanaman karet (Priyadarshan dan Demange, 2004). Aplikasi bioteknologi diharapkan dapat memberikan gagasan baru dalam mendukung perakitan klon unggul sehingga dapat menjawab permasalahan yang terjadi. Wardojo dan Tahardi (1990) menyatakan bahwa pemanfaatan dan penerapan bioteknologi yang tepat akan sangat menunjang pembangunan perkebunan. Pendekatan bioteknologi sebagai metode pendukung diantaranya bertujuan untuk proses perbanyakan tanaman karet, perbaikan genetik, seleksi klon, peningkatan produksi, dan pengaturan proses pertumbuhan (Venkatachalam *et al.*, 2007).

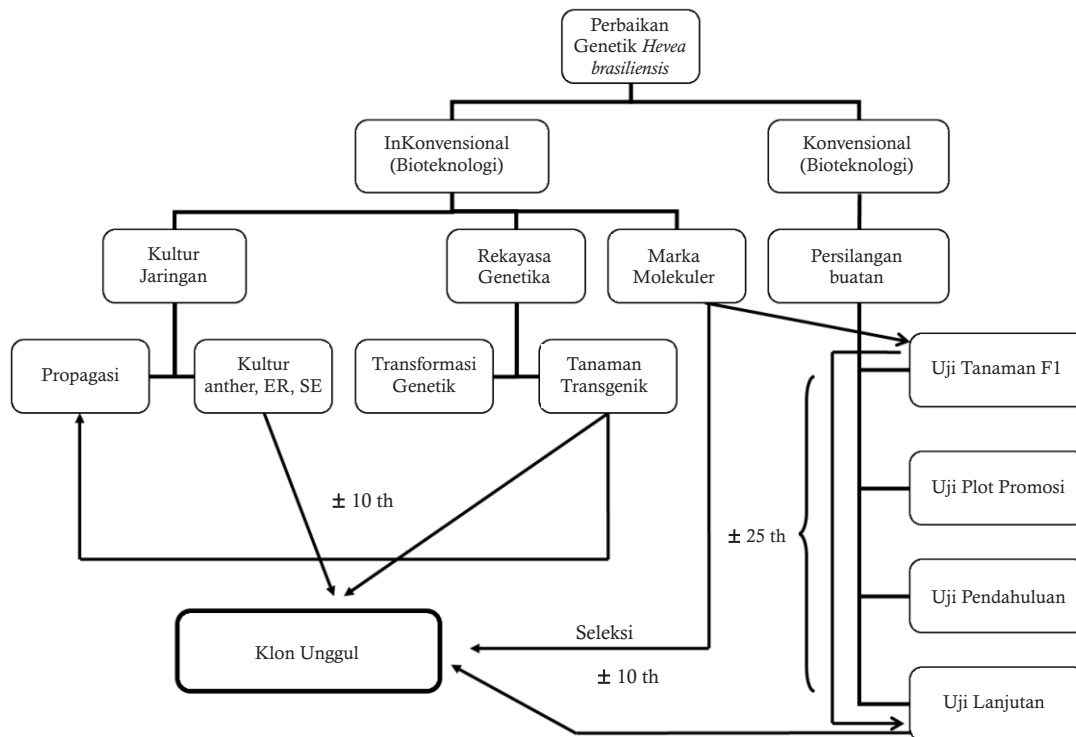
Tulisan ini bertujuan untuk menjabarkan pendekatan bioteknologi dan perannya dalam meningkatkan potensi genetik dan perbanyakan tanaman karet. Secara skematik peran bioteknologi dalam menghasilkan klon unggul baru dijelaskan pada Gambar 1.

Teknologi Kultur Secara *In Vitro*

Sampai saat ini perbanyakan tanaman karet unggul hasil persilangan masih dilakukan secara vegetatif yaitu melalui teknik okulasi. Cara ini memiliki beberapa kelemahan yaitu memerlukan lahan yang luas, keterbatasan biji untuk batang bawah, waktu yang lama dan tingkat juvenilitas yang rendah. Salah satu cara yang saat ini sedang dikembangkan adalah perbanyakan klon unggul dengan teknologi *in vitro* melalui kultur jaringan. Tabel 1 menyajikan perbandingan beberapa karakteristik teknik okulasi dengan teknik kultur jaringan dalam proses perbanyakan bibit tanaman karet.

Teknologi kultur jaringan telah banyak digunakan dalam proses perbanyakan secara massal pada berbagai tanaman unggul

Upaya perbaikan genetik dan penyediaan bibit tanaman karet (*hevea brasiliensis* muell. arg.) melalui pendekatan bioteknologi



Gambar 1. Diagram hubungan antara perbaikan genetik secara konvensional dan inkonvensional.

Tabel 1. Perbandingan karakteristik perbanyakan bibit karet melalui teknik okulasi dan kultur jaringan.

No	Karakteristik	Okulasi	Kultur Jaringan
1	Waktu yang diperlukan	3 bulan – 1,5 tahun	1 – 1,5 tahun
2	Tenaga kerja yang dibutuhkan	Banyak	Sedikit
3	Lahan yang digunakan	Luas	Kecil
4	Rata-rata tingkat keberhasilan	80%	60%
5	Jumlah tanaman yang dihasilkan	Massal	Massal
6	Pengaruh batang bawah	Ada	Tidak ada
7	Kualitas bibit	Tidak Juvenil	Relatif Juvenil

Sumber: Oktavia (2011), Carron *et al.* (1995a), dan Carron *et al.* (1995b).

(Bhojwani dan Razdan, 1996). Peningkatan permintaan terhadap bibit unggul tanaman karet membuat teknik kultur jaringan menjadi alternatif cara perbanyakan tanaman karet. Cara ini diharapkan dapat menyediakan bibit tanaman karet unggul dalam waktu cepat dan jumlah yang besar. Selama ini penyediaan bahan tanam unggul belum dapat mencukupi kebutuhan peremajaan perkebunan karet (Boerhendly *et al.*, 2009). Selain itu, teknologi *in vitro* dapat juga digunakan dalam

mendukung proses peningkatan mutu genetik tanaman karet melalui teknik kultur serbuk sari, kultur protoplas, dan transformasi genetik.

Kultur jaringan pada tanaman karet pertama kali dilakukan di Perancis yang menggunakan kalus untuk mempelajari sistem pembuluh lateks. Chua (1966) melakukan penelitian mengenai peran konsentrasi osmotik, karbohidrat, dan nilai pH dalam induksi pertumbuhan kalus. Selanjutnya

penelitian pertumbuhan, anatomi, dan potensi morfogenetik dari eksplan kalus dan suspensi sel telah berhasil diamati oleh Wilson dan Street (1975). Paranjothy dan Gandhimathi (1976) telah melakukan perbanyakan tanaman karet dengan menumbuhkan kalus dari berbagai eksplan.

Hingga saat ini teknik kultur jaringan tanaman karet masih terus dikembangkan lebih lanjut dengan berbagai cara yaitu embriogenesis somatik, kultur tunas (mikropropagasi), organogenesis langsung, kultur anther (serbuk sari), dan kultur protoplas. Berbagai cara tersebut dimanfaatkan sebagai alternatif perbanyakan bahan tanaman (Somatic Embryo genesis/SE, *microcutting*, dan organogenesis) ataupun pendukung peningkatan mutu genetik tanaman karet (kultur anther dan kultur protoplas).

1. Embriogenesis Somatik

Embriogenesis somatik atau SE merupakan teknologi perbanyakan tanaman melalui proses pembentukan embrio bersumber dari sel somatik (sel tubuh) tanpa melalui fusi gamet (Arnold *et al.*, 2002). Oktavia (2011) menyatakan bahwa teknologi SE memiliki prospek yang baik dalam perbanyakan klonal bahan tanam karet unggul secara massal dan seragam serta menjamin tanaman memiliki tingkat juvenilitas yang tinggi. Selain itu teknologi SE memiliki potensi meningkatkan pertumbuhan dan produksi berkisar 20 % - 30 % dan ber-peluang dapat mengeliminasi beberapa penyakit penting pada tanaman karet (Oktavia, 2011).

Somatic embryogenesis pada tanaman karet pertama kali dilakukan di China dan Malaysia dengan menggunakan anther sebagai sumber eksplan. Paranjothy (1974) telah berhasil membentuk embrio somatik bersumber dari kalus yang berasal dari anther dan selanjutnya embrio berhasil diinduksi menjadi tunas (Paranjothy dan Ghandimathi, 1975). Eksplan yang digunakan pada teknik SE selain anther dapat berasal dari jaringan integumen, *stamen*, anther muda, kelopak muda, daun, dan akar (Venkatachalam *et al.*, 2007). Lebih lanjut, Huang *et al.* (2005) telah berhasil mendapatkan

embrio somatik dan tunas menggunakan eksplan kotiledon. Terdapat perbedaan karakter antara kalus yang berasal dari eksplan kotiledon biji muda dan kotiledon biji tua (Pasaribu dan Woelan, 2011). Kotiledon biji muda membentuk kalus dengan struktur lebih remah sedangkan kalus dari biji tua berstruktur kompak. Hal ini diduga karena perbedaan umur jaringan eksplan yang digunakan.

Walaupun teknologi SE telah berhasil digunakan, namun masih memiliki kendala dalam induksi embrio maupun sistem regenerasinya. Oktavia (2011) menyatakan bahwa salah satu faktor yang menjadi kendala adalah kandungan senyawa fenolik yang tinggi dan kandungan lateks pada jaringan tanaman sehingga dapat menghambat terjadinya proses embriogenesis. Kendala ini dapat diatasi dengan cara penambahan arang aktif ke dalam media sehingga senyawa fenolik yang dikeluarkan jaringan eksplan dapat diserap media.

2. Kultur Tunas (*Microcutting*)

Perbanyakan tanaman karet melalui teknik okulasi memiliki beberapa kendala. Salah satunya adalah terjadi kasus inkompabilitas antara jaringan *rootstock-scion*. Tistama dan Hamim (2007) menyatakan bahwa dampak dari kasus ketidakserasian jaringan ini dapat mempengaruhi pertumbuhan, produktivitas tanaman dan bahkan menimbulkan kematian. Tujuan utama kultur tunas adalah menyediakan bahan tanam klon utuh dalam waktu yang cepat dan jumlah yang banyak. Perbanyakan tanaman karet secara *in vitro* telah berhasil dilakukan menggunakan berbagai macam eksplan dari tanaman asal *seedling* (Seneviratne, 1991; Carron *et al.*, 2007).

Kultur tunas pertama kali dilakukan oleh Paranjothy dan Gandhimathi (1976) menggunakan tunas yang berasal dari biji yang ditumbuhkan secara *in vitro*. Planlet berakar berhasil ditumbuhkan menggunakan media MS cair, namun belum berhasil pada media semi padat. Seneviratne *et al.* (1998) menyatakan bahwa eksplan tunas yang berasal dari *seedling* memiliki nilai keberhasilan tumbuh lebih baik secara *in vitro* dibandingkan

eksplan yang berasal dari klon tanaman karet dewasa. Selain itu, letak dan jarak tunas dari perakaran tanaman juga mempengaruhi pertumbuhan secara *in vitro*.

Kultur tunas menggunakan eksplan yang berasal dari tanaman dewasa (klon) memiliki beberapa hambatan. Kendala utamanya adalah eksplan tidak berhasil membentuk sistem perakaran yang baik yang dibutuhkan tanaman agar dapat berdiri kokoh. Seneviratne (1991) melaporkan bahwa penggunaan eksplan asal tanaman dewasa menghasilkan pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang tidak memuaskan. Hal ini disebabkan oleh tingkat juvenilitas yang rendah pada eksplan asal tanaman dewasa (Nurhaimi-Haris *et al.*, 2009a). Selain itu, tingkat kontaminasi yang tinggi menjadi hambatan lain dalam teknik *in vitro* menggunakan eksplan tunas asal tanaman dewasa. Beberapa metode sterilisasi yang efektif telah dikembangkan untuk menghasilkan eksplan steril (Seneviratne, 1991; Nurhaimi-Haris *et al.*, 2009b).

3. Organogenesis

Organogenesis merupakan metode perbanyakan tanaman dengan cara menginduksi eksplan secara langsung untuk menghasilkan tunas atau organ tanaman lainnya (Aitken-Christie *et al.*, 1995). Secara umum metode organogenesis digunakan untuk perbanyakan komersial pada komoditas hortikultura, pertanian, florikultura, dan perkebunan (Debergh dan Zimmerman, 1991). Pada tanaman karet metode ini telah digunakan sejak awal tahun 1970-an, namun sampai saat ini perkembangan metode ini belum optimal dan memiliki nilai keberhasilan yang rendah dalam perbanyakan tanaman karet. Mendanha *et al.* (1998) telah melaporkan mikropropagasi *Hevea brasiliensis* menggunakan sumber eksplan daun dan tunas aksilar melalui metode organogenesis. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa eksplan daun hanya mampu menghasilkan kalus dan belum berhasil meregenerasikan tunas ataupun organ sedangkan eksplan tunas aksilar dapat membentuk tunas.

4. Kultur Anther dan Serbuk Sari

Sifat heterozigositas tanaman karet yang tinggi menjadi salah satu tantangan dalam proses persilangan buatan karena menghasilkan keturunan yang beranekaragam. Secara genetika agar dihasilkan keturunan dengan sifat yang seragam dibutuhkan tetua dengan genotipe homozigot (galur murni). Pada tanaman tahunan, termasuk tanaman karet, untuk menghasilkan galur murni membutuhkan banyak generasi dan waktu yang lama. Kultur anther atau serbuk sari dapat digunakan untuk menghasilkan tanaman karet haploid atau haploid ganda sehingga didapatkan tetua galur murni. Selain itu kultur anther atau serbuk sari dapat juga berfungsi untuk pemetaan gen, transformasi genetik, dan pembentukan variasi klon baru. Ulasan mengenai pembentukan tanaman haploid melalui kultur anther dan serbuk sari telah dilaporkan pada tanaman berkayu (termasuk tanaman karet) (Andersen, 2005; Srivastava dan Chaturvedi, 2008) dan tanaman karet (Chen, 1990).

Penelitian kultur anther untuk mendapatkan tanaman haploid pertama kali dilakukan tahun 1972 di Srilanka. Selanjutnya planlet tanaman karet telah berhasil diperoleh berasal dari eksplan anther, namun belum mendapatkan kondisi kultur yang optimal (Chen *et al.*, 1978). Chen *et al.* (1982) telah berhasil mendapatkan planlet anther dengan meningkatkan jumlah embrio somatik yang terbentuk dengan mengoptimalkan perbandingan kandungan ammonium nitrat dan kalium nitrat dalam media dediferensiasi. Selain itu, media tanam dengan kandungan 2,4-D dan NAA diperlukan untuk mengoptimalkan proses diferensiasi embrio serbuk sari (Chen *et al.*, 1982).

Proses pembentukan tanaman haploid atau haploid ganda secara umum menggunakan anther sebagai sumber eksplan, dan belum banyak laporan menggunakan eksplan serbuksari secara langsung. Jayashree *et al.* (2005) telah mempelajari berbagai macam perlakuan untuk menginduksi serbuk sari menjadi kalus, dan mendapatkan hasil bahwa pra perlakuan anther menggunakan larutan

mannitol 0,3 M pada suhu 33 °C dapat meningkatkan pembelahan sel serbuk sari. Selain itu media induksi kalus bentuk cair tanpa aerasi dapat juga meningkatkan pembentukan serbuk sari multiseluler, dan media dasar N6 yang mengandung 2,4-D (2,0 mg/l) dan KIN (1,0 mg/l) dapat menginduksi pembentukan kalus. Hasil penelitian tersebut diharapkan dapat menjadi solusi dalam meregenerasikan tanaman karet haploid ganda di masa depan.

5. Kultur protoplas

Kultur protoplas merupakan biakan sel atau jaringan tanaman yang telah dihilangkan dinding selnya. Kultur ini selanjutnya dapat digunakan untuk meningkatkan kualitas genetik tanaman melalui metode hibridisasi somatik dan rekayasa genetika. Teknik protoplas diharapkan dapat memperluas keragaman genetik dan meningkatkan kualitas tanaman karet. Kultur protoplas pada tanaman karet telah diterapkan sejak tahun 1979 dengan melakukan isolasi, kultur dan fusi protoplas yang berasal dari daun *Hevea brasiliensis* dan *H. pauciflora*. Keberhasilan teknik tersebut masih sangat terbatas dan memiliki beberapa kendala. Nurhaimi-Haris *et al.* (1993) telah berhasil mengisolasi protoplas yang berasal dari kalus anter yang disuspensikan menggunakan campuran 1 % hemiselulase, 2 % selulase, 1 % maserase, dan 8 % manitol. Selanjutnya Sushamakumari *et al.* (2000) telah melaporkan keberhasilan dalam meregenerasikan tanaman yang berasal dari protoplas melalui embriogenesis somatik.

Rekayasa Genetika

Sampai saat ini beberapa sasaran kegiatan pemuliaan belum tercapai secara optimal melalui persilangan buatan sehingga dibutuhkan teknik baru untuk mencapainya. Selain membutuhkan waktu yang lama, kendala persilangan buatan adalah sifat yang dibentuk tidak spesifik dan terjadi secara acak. Rekayasa genetika dapat menjadi sebuah alat untuk mempercepat proses pembentukan klon unggul baru pada tanaman karet secara spesifik. Rekayasa genetika adalah suatu

teknologi yang digunakan dalam memanipulasi sifat (DNA/gen) untuk tujuan tertentu pada makhluk hidup (Nichol, 2008). Tersedianya teknik *in vitro* (kultur jaringan) memungkinkan teknik rekayasa genetika dapat digunakan untuk menghasilkan tanaman karet transgenik dengan memiliki sifat yang diinginkan.

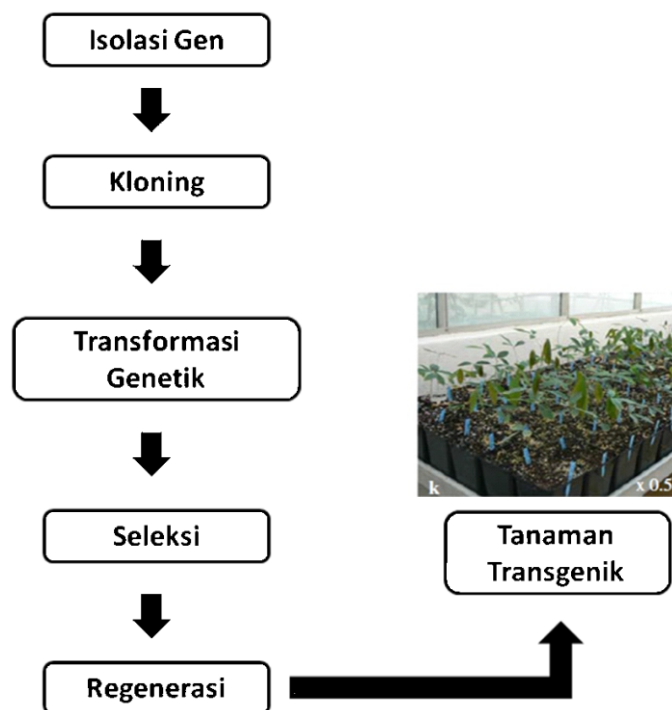
Beberapa sifat unggul yang dapat dikembangkan dalam perakitan klon unggul diantaranya adalah resisten terhadap penyakit, toleran terhadap kering alur sadap (KAS), produksi lateks tinggi, produksi protein rekombinan dan peningkatan kualitas kayu (Venkatachalam *et al.*, 2007). Teknik rekayasa genetika pada tanaman karet semakin lebih mudah dilakukan dengan telah berhasil disusunnya konsep genom (Rahman *et al.*, 2013) dan pustaka cDNA dari lateks (Han *et al.*, 2000; Chotigeat *et al.*, 2010). Hasil penelitian tersebut menunjukkan jumlah gen diperkirakan sebesar 68.955 gen, dan 12,7 % dari jumlah gen tersebut merupakan gen unik pada *Hevea*. Gen-gen tersebut berhubungan dengan biosintesis partikel karet, pembentukan kayu, resistensi penyakit dan proses alergenitas (Rahman *et al.*, 2013). Perkembangan penelitian menggunakan teknik rekayasa genetika pada tanaman karet masih terbilang baru dibandingkan dengan tanaman lain karena memiliki banyak faktor pembatas.

Perkembangan penelitian eksplorasi gen telah berdampak pada proses perbaikan genetik tanaman karet dalam hal produktivitas, ketahanan tanaman, dan peningkatan toleransi terhadap cekaman. Selama ini kegiatan pemuliaan masih menghadapi tingkat keberhasilan yang belum memuaskan karena kurangnya pengetahuan tentang interaksi genetik dan jalur biokimia yang terlibat dalam respon tanaman terhadap berbagai cekaman lingkungan (Saha dan Priyadarshan, 2012). Penelitian mengenai kandungan genetik tanaman karet telah dilakukan sejak tahun 1990 dengan melakukan kloning dan karakterisasi dari gen-gen yang berperan dalam biosintesis lateks, cekaman biotik dan abiotik, penyakit kering alur sadap

(KAS), dan pengaruh etilen pada produksi lateks. Ulasan tentang kandungan genetik tanaman karet telah dijelaskan secara lengkap oleh Venkatachalam *et al.* (2007) dan Saha dan Priyadarshan (2012).

Terdapat dua metode yang digunakan secara luas pada proses transfer gen ke dalam tumbuhan yaitu transfer gen secara langsung melalui suatu alat khusus (*biolistic gun*) dan melalui bantuan bakteri *Agrobacterium tumefaciens*. Metode kedua lebih banyak digunakan karena memiliki keuntungan dapat menghasilkan tanaman karet transgenik yang stabil dalam jumlah besar (Arokiaraj, 2007). Transformasi genetik pada tanaman karet pertama kali dipelopori oleh Arokiaraj dan Wan (1991) menggunakan *A. tumefaciens* untuk mempelajari transfer gen ke dalam tanaman karet. Selanjutnya Arokiaraj *et al.* (1994) berhasil mendapatkan tanaman transgenik menggunakan metode biolistik. Proses tahapan rekayasa genetika disajikan pada Gambar 3.

Tantangan utama dalam transformasi genetik pada tanaman karet adalah menyediakan sistem transformasi yang efisien pada setiap klon. Blanc *et al.* (2006) telah melaporkan prosedur transformasi yang efisien menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* yang menghasilkan 372 planlet transgenik. Beberapa cara yang digunakan dalam meningkatkan efisiensi transformasi yaitu menggunakan CaCl_2 pada media *maintenance medium* (MM) (Montoro *et al.*, 2000), menggunakan kalsium nitrat pada media prakultur dan asetosiringon pada media infeksi (Sobha *et al.*, 2012), dan menggunakan silver nitrat pada media infeksi, ko-kultivasi dan seleksi (Kala *et al.*, 2013). Beberapa gen telah berhasil dipindahkan ke dalam tanaman karet melalui transformasi menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* diantaranya adalah gen penanda dan seleksi (Venkatachalam *et al.*, 2006; Leclercq *et al.*, 2010; Sobha *et al.*, 2012), ketahanan terhadap cekaman (Venkatachalam *et al.*, 2006; Jayashree *et al.*, 2011; Sobha *et al.*, 2012) dan gen protein manusia dan hewan (Arokiaraj *et al.*, 2002; Yeang *et al.*, 2002).



Gambar 3. Diagram tahapan proses rekayasa genetika pada *H. brasiliensis* (Leclercq *et al.*, 2010).

Marka Molekuler

Salah satu kendala program perakitan genotipe unggul baru pada tanaman karet adalah membutuhkan waktu yang cukup lama yaitu antara 25-30 tahun. Oleh karena itu diperlukan suatu cara yang tepat dan akurat untuk menentukan kualitas klon karet baru secara dini. Penggunaan parameter seleksi marka molekuler diharapkan dapat menjawab tantangan tersebut. Marka molekuler telah dikenal sejak tahun 1950-an menggunakan marka iso-enzim, namun marka molekuler berbasis DNA baru dikenal pada awal tahun 1980-an. Pada tanaman karet penggunaan marka molekuler iso-enzim telah dimulai pada tahun 1980-an dengan tujuan identifikasi kultivar, analisis keanekaragaman genetik, pengawasan hasil persilangan buatan, dan biologi reproduksi (Chevallier, 1988).

Teknik marka molekuler yang tersedia selama tiga dekade terakhir dikelompokkan ke dalam tiga kategori berdasarkan waktu kemunculannya yaitu generasi pertama, generasi kedua dan generasi ketiga. Generasi pertama meliputi *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) dan *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), generasi kedua meliputi *Simple Sequence Repeats* (SSR) atau mikrosatelit dan *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), dan generasi ketiga meliputi *Expressed Sequence Tags* (EST) dan *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) (Gupta *et al.*, 2001). Seluruh teknik marka molekuler tersebut telah diaplikasikan pada tanaman karet untuk mendukung program pemuliaan dalam pembentukan klon karet unggul.

1. Marka RAPD

Teknik RAPD merupakan marka molekuler yang didasarkan pada aplikasi PCR dengan menggunakan primer tunggal (10 pb) untuk mengamplifikasi sekuen DNA. Salah satu masalah serius yang terjadi pada perkebunan karet adalah kerusakan tanaman oleh angin. Hal ini dapat diatasi dengan menggabungkan karakter kerdil dan produksi lateks tinggi sehingga menghasilkan tanaman kerdil dengan produksi tinggi. Venkatachalam

et al., (2004) telah mengidentifikasi karakter kerdil pada tanaman karet menggunakan marka RAPD. Marka RAPD juga telah digunakan untuk mengetahui keanekaragaman genetik dan struktur plasma nutfah koleksi IRRDB 1981 (Lam *et al.*, 2009). Penelitian tersebut menyimpulkan bahwa koleksi plasma nutfah IRRDB 1981 di Vietnam memiliki keragaman genetik yang tinggi dan perbedaan *interdistrict* yang rendah. Oktavia *et al.*, (2011a) telah menganalisis jarak genetik beberapa klon tanaman karet menggunakan marka RAPD. Amplifikasi DNA genom dari 45 klon menghasilkan 2.408 fragmen DNA yang berukuran 250-3.000 bp dengan kisaran matriks kesamaan genetik cukup luas (59,18%-94,23%).

2. Marka RFLP

Marka RFLP merupakan salah satu jenis analisis molekuler yang didasarkan pada pemotongan situs DNA dengan menggunakan enzim restriksi sehingga menghasilkan fragmen-fragmen DNA dengan berbagai ukuran. Perbedaan ukuran fragmen tersebut disebabkan adanya perbedaan jumlah dan distribusi situs restriksi yang terdapat pada DNA sehingga mempengaruhi aktivitas enzim tersebut. Besse *et al.* (1994) telah mengidentifikasi keragaman genetik dari 92 tipe liar (Amazonian) dan 73 klon Wickham. Hasil penelitian tersebut mendapatkan 124 variasi fragmen restriksi menggunakan kombinasi 31 probe dan hanya 10 fragmen yang spesifik untuk individu tunggal.

3. Marka AFLP

Teknik AFLP didasarkan pada amplifikasi selektif menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) terhadap sekumpulan DNA genomik yang sebelumnya dipotong dengan enzim restriksi dan diligasikan dengan adapter berupa oligonukleotida utas ganda. Lespinasse *et al.* (2000) telah berhasil memperoleh peta genetik *Hevea* berdasarkan keturunan F1 dari persilangan antara PB 260 dan RO 38 menggunakan beberapa teknik marka molekuler termasuk marka AFLP. Toruan-Mathius *et al.* (2002) telah mengidentifikasi kesamaan genetik antar

beberapa klon karet yang tergolong tahan dan rentan terhadap penyakit gugur daun *Corynespora* (PGDC) menggunakan marka AFLP serta mempelajari efektivitas marka tersebut. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa marka AFLP lebih efektif dan diskriminatif berdasarkan nilai marka indeks dan kesamaan genetik dibandingkan dengan marka RAPD.

4. Marka SSR (Mikrosatelit)

Marka SSR merupakan suatu marka molekular yang akan mendeteksi rangkaian pola nukleotida (DNA), biasanya antara dua sampai enam pasang basa N, yang berulang secara berurutan. Marka ini sering digunakan untuk mempelajari pautan (*linkage*), menguji kemurnian galur, pemetaan, analisis populasi, sistem perkawinan dan struktur populasi. Beberapa keunggulan teknik SSR diantaranya adalah keberadaannya berlimpah, bersifat kodominan, polimorfik tinggi, jumlah lokus yang banyak, dan tidak memerlukan waktu lama. Souza *et al.* (2009) telah mendapatkan 27 lokus mikrosatelit polimorfik yang diisolasi dan dikarakterisasi dari pustaka genom dengan sekuen GA-CA berlimpah. Lokus yang teridentifikasi tersebut dapat menjadi alat untuk mempelajari genetik populasi, keragaman genetik dan aliran gen diantara spesies *Hevea*.

5. Marka *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP)

Single Nucleotide Polymorphism merupakan variasi DNA atau gen yang berasal dari perubahan satu atau dua basa pada sekuen DNA atau gen. Perubahan satu nukleotida pada DNA atau gen dapat terjadi melalui mutasi titik/gen yang meliputi mutasi transisi, tranversi, insersi dan delesi. Penelitian menggunakan marka SNP untuk identifikasi keragaman pada tanaman karet masih sangat sedikit dilakukan. Pootakham *et al.* (2011) telah menggunakan marka SNP untuk mengidentifikasi keragaman pada *H. brasiliensis*. Penelitian tersebut telah mengidentifikasi 5883 SNP bialel dalam 9,2 Mb sekuen. Variasi nukleotida terjadi karena mutasi transisi (56,3%), mutasi tranversi (33,7%), dan mutasi insersi/delesi (10%).

Perkembangan Penelitian Bioteknologi *H. Brasiliensis* di Indonesia

Walaupun Indonesia memiliki areal perkebunan karet terluas di dunia namun produksi karet alam Indonesia masih berada di peringkat kedua setelah Thailand. Sutrisno (2006) menyatakan bahwa bioteknologi diharapkan dapat berperan dalam mewujudkan tujuan peningkatan dan stabilitas produksi, peningkatan mutu dan nilai tambah produk pertanian (termasuk juga perkebunan). Sampai saat ini perkembangan penelitian bioteknologi pada tanaman karet di Indonesia berkaitan dengan propagasi melalui teknik SE dan *microcutting* serta studi identifikasi keragaman (Tabel 2). Sementara itu negara penghasil karet alam lainnya seperti Malaysia dan Thailand telah melakukan penelitian bidang rekayasa genetika untuk mendapatkan klon unggul tanaman karet. Bahkan Srilanka telah memulai penelitian mengenai kultur anther (serbuk sari) sejak tahun 1973 untuk menghasilkan tanaman haploid atau haploid ganda (Satchuthananthabale, 1973).

Bioteknologi pada tanaman karet di Indonesia telah dilakukan sejak pertengahan tahun 1980-an oleh Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia (BPBPI) dan Balai Penelitian Sungei Putih (BPSP). Penelitian diawali dengan studi keragaman populasi *H. brasiliensis* menggunakan sidik protein dan perbanyakan tanaman karet menggunakan teknik stek mikro. Selanjutnya Pusat Penelitian Perkebunan Sungei Putih (1990) melaporkan keberhasilan beberapa program bioteknologi yaitu kultur embrio *in vitro*, induksi tunas ganda dan sidik protein pada tanaman karet. Tahardi (1998a) telah mendapatkan tanaman karet berasal dari perbanyakan menggunakan teknik *somatic embryogenesis*, namun tingkat keberhasilannya masih rendah yaitu di bawah 10%. Jika dibandingkan dengan komoditas perkebunan lainnya bioteknologi pada tanaman karet masih berjalan belum optimal (Tabel 3). Teknik bioteknologi pada tanaman karet baru sebatas diaplikasikan untuk perbanyakan tanaman (somatik embrio dan *microcutting*)

Tabel 2. Perkembangan penelitian bioteknologi *Hevea brasiliensis* di beberapa Negara.

Negara	Perkembangan penelitian					
	SE	<i>Microcutting</i>	Identifikasi	Kultur anther	Eksplorasi gen	Rekayasa genetika
Indonesia	→					
Malaysia	→					
Thailand	→					
Srilanka	→					

Sumber: Pasaribu dan Woelan (2011). Woelan *et al.* (2007), Tahaedi JS (1998), Arokiaraj (2007), Nurhaimi-Haris *et al.* (2009b), Protakham *et al.* (2011), Satchuthananthable (1973), Seneviratne (1991).

Tabel 3. Perkembangan penelitian bioteknologi pada tanaman karet.

Tanaman	Aspek Penelitian	Institusi*	Perkembangan penelitian
Karet	Propagasi massal	BPBPI	Tanaman berasal dari embrio somatik (Tahardi, 1998a)
		BPBPI& PPK	Tanaman batang bawah berasal dari stek pucuk (Nurhaimi-Haris <i>et al.</i> , 2009b)
	Identifikasi sifat	PPK	Analisis kekerabatan (Aidi-Daslin <i>et al.</i> , 2007), pengelompokan tetua (Tistama <i>et al.</i> , 2008), dan identifikasi klon karet anjuran (Oktavia <i>et al.</i> , 2009).

Keterangan: * BPBPI : Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia.
PPK : Pusat Penelitian Karet.

dan identifikasi sifat (marka molekuler). Sedangkan, tanaman transgenik melalui teknik rekayasa genetika telah dihasilkan pada komoditas perkebunan lainnya seperti kelapa sawit (Purwoko, 2012), tebu (Susiyanti *et al.*, 2007), kopi (Siswanto *et al.*, 2003), dan teh (Siswanto *et al.*, 1999).

Penelitian mengenai identifikasi keragaman genetik menggunakan marka RAPD pada tanaman karet telah berhasil dilakukan untuk menganalisis kekerabatan hasil persilangan (Aidi-Daslin *et al.*, 2007; Woelan, 2007), pengelompokan tetua (Oktavia *et al.*, 2007; Tistama *et al.*, 2008), dan

identifikasi klon karet anjuran (Oktavia *et al.*, 2009). Hasil penelitian tersebut sangat berguna dalam proses seleksi klon hasil persilangan ataupun seleksi tetua yang akan digunakan dalam persilangan sehingga didapatkan klon unggul baru dengan waktu relatif lebih cepat. Sementara itu penelitian mengenai *microcutting* belum banyak dilaporkan. Nurhaimi-Haris *et al.* (2009b) melaporkan bahwa teknik *microcutting* memiliki keberhasilan tahap *primary culture* sebesar 60 %, laju multiplikasi per siklus subkultur 1,2 – 1,5 kali, dan keberhasilan tahap aklimatisasi berkisar 20 % – 60 %. Sampai saat ini masih terus dikembangkan metode yang efisien untuk melengkapi teknik *microcutting* agar didapatkan tingkat keberhasilan yang tinggi.

Penelitian bioteknologi pada tanaman karet memerlukan suatu keseriusan dalam hal pembinaan dan pengembangan baik dari segi SDM maupun sarana/prasarana. Tidak dapat dipungkiri penyediaan sarana/prasarana penelitian yang memadai sangat dibutuhkan untuk mendukung kemajuan bioteknologi. Selain itu sumber dana yang besar dan berkesinambungan perlu diperhatikan agar keberlangsungan penelitian dapat terlaksana. Hal yang tidak kalah penting dari itu semua adalah kerjasama yang erat tidak hanya antar peneliti namun juga antara lembaga penelitian negara maupun swasta serta universitas baik di dalam maupun di luar negeri.

Kesimpulan

Bioteknologi dapat menjadi sebuah sarana yang handal untuk perbaikan mutu genetik dan perbanyakkan bibit *H. brasiliensis* dalam menunjang kemajuan program pemuliaan tanaman karet. Beberapa teknik yang dapat digunakan adalah teknologi kultur jaringan, rekayasa genetika, dan marka molekuler. Selain itu, bioteknologi dapat mempersingkat waktu dalam menghasilkan klon unggul baru tanaman karet melalui teknik marka molekuler dan rekayasa genetika. Kultur jaringan mampu memecahkan permasalahan berkaitan dengan perbanyakkan klon unggul tanaman karet

melalui teknik embriogenesis somatik, kultur tunas, dan organogenesis. Marka molekuler dapat berfungsi untuk analisis kekerabatan, pengelompokkan tetua persilangan, dan identifikasi sifat unggul tanaman karet hasil persilangan. Teknik rekayasa genetika sangat potensial sebagai alat dalam pembentukan klon unggul baru yang memiliki sifat-sifat spesifik dengan waktu yang lebih singkat.

Daftar Pustaka

- Aidi-Daslin, Sayurandi, dan S. Woelan. 2007. Analisis kekerabatan genetik populasi F1 hasil persilangan tetua tanaman karet penghasil lateks dan kayu berdasarkan teknik RAPD. *J. Penelitian Karet* 25(2): 1-9.
- Aitken-Christie J, T. Kozai, and S. Takayama. 1995. Automation in plant tissue culture: general introduction and overview. In: Automation and environmental control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publisher.
- Andersen S. B. 2005. Haploids in the improvement of woody species. In: C.E. Palmer, W. A. Keller, and K. J. Kasha (eds). *Biotechnology in Agricultural and Forestry*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. 243-257.
- Arnold S. V., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok, and L. Filonova. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 233-249.
- Arokiaraj, P. and A. R. Wan. 1991. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Hevea* cells derived from *in vitro* and *in vivo* seedling cultures. *J. Nat. Rub. Res.* 6: 55-61.
- Arokiaraj, P., H. Jones, K. F. Cheong, S. Coomber, and B. V. Charlwood. 1994. Gene insertion into *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell Reports* 13: 425-430.
- Arokiaraj, P., F. Ruker, E. Obermayr, A. R. Shamsul Bahri, J. Hafsa, D. C. Carter, and H. Y. Yeang. 2002. Expression of human serum albumin in transgenic *Hevea brasiliensis*. *J. Nat. Rub. Res.* 5: 157-166.5.

- Arokiaraj, P. 2007. Rubber. *In*: E. C. Pua and M. R. Davey (eds). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 60 *Transgenic Crops V*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. 371-386.
- Badan Pusat Statistik. 2014. *Statistika Karet Indonesia 2013*. Badan Pusat Statistik, Jakarta.
- Besse, P., M. Seguin, P. Lebrun, M. H. Chevallier, D. Nicolas, and C. Lanaud. 1994. Genetic diversity among wild and cultivated populations of *Hevea brasiliensis* assessed by nuclear RFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 199-207.
- Bhojwani, S. S. and M. K. Razdan. 1996. *Plant tissue culture: theory and practice*, a Revised Edition. Elsevier Science.
- Blanc, G., C. Baptiste, G. Oliver, F. Martin, and P. Montoro. 2006. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic calli and regeneration of *Hevea brasiliensis* Mull Arg. *Plants Plant Cell Rep.* 24: 724-733.
- Boerhendhy, I., C. Nancy, dan K. Amypalupy. 2009. Strategi pengembangan bahan tanam klon karet unggul. Dalam *Prosiding Lokakarya Nasional Pemuliaan Karet*. Pusat Penelitian Karet.
- Carron, M. P., Nurhaimi-Haris, L. Lardet, V. Caussanel, J. Keli, B. G. Dea, A. Leconte, Sumarmadji, and P. Montoro. 2007. *Hevea* rootstock clones development. Building up new varietal type: a multi-faceted challenge. *Proc. of IRCE Conference*, Bali, June 2007.
- Chevallier, M. H. 1988. Genetic variability of *Hevea brasiliensis* germplasm using isozyme markers. *J. Nat. Rub. Res.* 3: 42-53.
- Chen, F., C. Chen, C. S. Wang, H. Hsu, Y. Ho, and U. T. Li. 1978. Obtaining pollen plants of *Hevea brasiliensis* Muell Arg. *Proc. Symp. Plant Tissue Culture*, Peking, China: 11-22.
- Chen, Z., C. Qian, M. Qin, X. Xu, and Y. Xiao. 1982. Recent advances in anther culture of *Hevea brasiliensis* (Muell. Arg). *Theoretical and Applied Genetics* 62: 103-138.
- Chen, Z. 1990. Rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.): in vitro production of haploids. In YPS Bajaj (eds), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 12 *Haploids in Crop Improvement I*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. p. 215-236.
- Chotigeat, W., S. Duangchu, and A. Phongdara. 2010. cDNA library from the latex of *Hevea brasiliensis*. *Songklanakarin J. Sci. Technol* 32 (6): 555-559.
- Chua, S. E. 1966. Studies on tissue culture of *Hevea brasiliensis*: role of osmotic concentration, carbohydrate and pH value in induction of callus growth in plumule tissue from *Hevea* seedling. *Journal of Rubber Research Institute of Malaya* 19 (5): 272-276.
- Debergh, P. and R. H. Zimmerman. 1991. *Micropropagation: technology and application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 484.
- Direktorat Jendral Perkebunan. 2012. *Statistik perkebunan Indonesia: tanaman karet*. Jakarta, Sekretariat Ditjenbun, Jakarta.
- Gupta, P. K., J. K. Roy, and M. Prasad. 2001. Single nucleotide polymorphism for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Curr. Sci.* 80: 524-535.
- Han, K., D. O. Shin, J. Yang, I. J. Kim, S. K. Oh, and K. S. Chow. 2000. Genes expressed in the latex of *Hevea brasiliensis*. *Tree Physiology* 20 (8): 503-510.
- Huang Tiandai, Li Weiguo, Huang Huasun, and Lizhe. 2005. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledone explants of *Hevea brasiliensis*. In *International Natural Rubber Conference*, Rubber Research Institute of India : 79.
- Internatioal Rubber Study Group. 2013. *Rubber Statistical Bulletin January – March 2013*. IRSG, Singapore.

- Jayashree, R., K. Rekha, S. Sushamakumari, and A. Thulaseedharan. 2005. Establishment of callus cultures from isolated microspores of *Hevea brasiliensis*. National Symposium on Biotechnological Interventions for Improvement of Horticultural Crops, Trissu: 176-178.
- Jayashree, R., S. Sobha, K. Rekha, R. Supriya, M. Vineetha, S. Sushamakumari, R. G. Kala, P. K. Jayasree, A. Thulaseedharan, K. Annamalainathan, D. B. Nair, S. Sreelatha, R. Krishnakumar, and J. Jacob. 2011. Over-expression of MnSOD and related drought tolerant traits in MnSOD Transgenic *Hevea brasiliensis*. Natural Rubber Research 24 (1): 18-27.
- Kala, R. G., V. Abraham, S. Sobha, P. K. Jayasree, A. M. Suni, and A. Thulaseedharan. 2013. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and somatic embryogenesis from leaf callus of *Hevea brasiliensis*: effect of silver nitrate. in: a sabu and a augustine (eds), prospects in bioscience: addressing the issues. Springer, India.
- Lam, L. V., T. Thanh, V. T. Q. Chi, and L. M. Tuy. 2009. Genetic diversity of *Hevea* IRRDB'81 collection assessed by RAPD markers. Mol Biotechnol 42: 292–298.
- Leclercq, J., L. Lardet, F. Martin, T. Chapuset, G. Oliver, and P. Montoro. 2010. The green fluorescent protein as an efficient selection marker for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg). Plant Cell Rep 29: 513-522.
- Lespinasse, D., M. Rodier-Goud, L. Grivet, A. Leconte, H. Legnat'e, and M. Seguin. 2000. A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite and isozyme markers. Theor Appl Genet 100: 127–138.
- Mendanha, A. B. L., R. A. A. Torres, and A. B. Freire. 1998. Micropropagation of rubber trees (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). Genet. Mol. Biol 21 (3): 1415.
- Montoro, P., N. Tcinscree, W. Rattana, P. Kongsawadworakul, and N. Michaux-Ferriere. 2000. Effect of exogenous calcium on *Agrobacterium tumefaciens* mediated gene transfer in *Hevea brasiliensis* (rubber tree) friable calli. Plant Cell Reports 19: 851-855.
- Nichol, D. S. T. 2008. An introduction to genetic engineering. Cambridge University Press, New York.
- Nurhaimi-Haris, A. Darussamin, and W. A. Dodd. 1993. Isolation of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) protoplasts from callus and cell suspensions. Menara Perkebunan 61(2), 25-31.
- Nurhaimi-Haris, Sumaryono, dan M. P. Carron. 2009a. Pengaruh bahan pra-sterilan, tutup tabung kultur, dan musim terhadap tingkat kontaminasi eksplan pada kultur *microcutting* karet. Menara Perkebunan 77(2): 89-99.
- Nurhaimi-Haris, Sumaryono, Siswanto, Sumarmadji, D. P. Kasi, dan M. P. Carron. 2009b. Teknologi *microcutting* untuk perbanyak bahan tanam karet. Lokakarya Nasional Pemuliaan Tanaman Karet. Pusat Penelitian Karet.
- Oktavia, F., M. Lasminingsih, S. Ismawanto, dan Kuswanhadi. 2007. Analisis genetik klon-klon tanaman karet (*Hevea brasiliensis*) menggunakan penanda RAPD. J. Penelitian Karet 25(1): 1-12.
- Oktavia, F., M. Lasminingsih, dan Kuswanhadi. 2009. Identifikasi klon karet anjuran dengan teknik RAPD. J. Penelitian Karet 27(1): 21-31.
- Oktavia, F. 2011. Prospek penggunaan teknologi *somatic embryogenesis* dalam penyediaan bibit karet secara massal. *Warta perkaretan* 30 (1): 1-9.
- Oktavia, F., M. Lasminingsih, dan Kuswanhadi. 2011a. Genetic relationship of Wickham and IRRDB 1981 rubber population based on RAPD markers Analysis. HAYATI Journal of Biosciences 18 (1): 27-32.

- Oktavia, F., M. Lasminingsih, and Kuswanhadi. 2011b. Selection of parent trees for Rubber (*Hevea brasiliensis*) breeding based on RAPD analysis. *Nusantara Bioscience* 3 (3): 124-129.
- Paranjothy, K. 1974. Induced root and embryoid differentiation in *Hevea brasiliensis* in culture. Third International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Univ. Leicester Abstract No. 67.
- Paranjothy, K. and H. Ghandimathi. 1975. Morphogenesis in callus cultures of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Proceedings of Plant Tissue. Culture Symposium, Kuala Lumpur.
- Paranjothy, K. and H. Gandimathi. 1976. Tissue and organ culture of *Hevea*. Proceedings of International. Rubber Conference, Kuala Lumpur.
- Pasaribu, S. A. dan S. Woelan. 2011. Induksi kalus dari eksplan kotiledon pada pembentukan embrio somatic tanaman karet. *Warta perkebunan* 30 (2): 80-87.
- Pootakham, W., J. Chanprasert, N. Jomchai, D. Sangsrakru, T. Yoocha, K. Therawattanasuk, and S. Tangphatsornruang. 2011. Single nucleotide polymorphism marker development in the rubber tree, *Hevea brasiliensis* (*Euphorbiaceae*). *American Journal of Botany*: 337-338.
- Pusat Penelitian Perkebunan Sungei Putih. 1990. Laporan Tahunan 1990. Pusat Penelitian Perkebunan Sungei Putih.
- Purwoko, D. 2012. Rekayasa genetika tanaman kelapa sawit. [www.biotek.bppt.go.id.](http://www.biotek.bppt.go.id/), diakses pada 24 November 2013.
- Priyadarshan, P. M. and A. Clément-Demange. 2004. Breeding *Hevea* rubber: formal and molecular genetics. *Advances in Genetics* 52: 51-115.
- Rahman, A. Y. A, A. O. Usharraj, B. B. Misra, G. P. Thottathil, K. Jayasekaran, Y. Feng, S. Hou, S. Y. Ong, F. L. Ng, L. S. Lee, H. S. Tan, M. K. L. M. Sakaff, B. S. The B. F. Khoo, S. S. Badai, N. A. Aziz, A. Yuryev, B. Knudsen, A. Dionne-Laporte, N. P. Mchunu, Q. Yu, B. J. Langston, T. A. K. Freitas, A. G. Young, R. Chen, L. Wang, N. Najimudin, J. A. Saito, and M. Alam. 2013. Draft genome sequence of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *BMC Genomics*: 14, 75.
- Saha, T. and P. M. Priyadarshan. 2012. Genomics of *Hevea* Rubber. In: RJ Schnell & PM Priyadarshan (eds), *Genomics of Tree Crops*. Springer Science+Business Media, India.
- Satchuthananthabale. 1973. *Hevea* tissue culture. *J Rubb Res Inst Sri Lanka (Ceylon)* 50: 91-97.
- Seneviratne, P. 1991. Micropropagation of juvenile and mature *Hevea brasiliensis*. PhD. Thesis, University of Bath, UK.
- Seneviratne, P., S. S. Gammanaliyanage, and G. A. S. Wijesekara. 1998. The effect of the origin of the explant on *in vitro* growth of axillary buds of *Hevea brasiliensis*. *Tropical Agricultural Research and Extension* 1 (2): 98-102.
- Siregar dan Suhendry. 2013. Budidaya dan teknologi karet. Penebar Swadaya.
- Siswanto, F. Oktavia, A. Budiani, Sudarsono, Priyono, dan S. Mawardi. 2003. Transformasi kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan gen kitinase melalui *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. *Menara perkebunan* 71 (2): 51-63.
- Siswanto, D. Santoso, and T. Chaidamsari. 1999. Transient GUS expression and callus development of cocoa, coffee and tea following *Agrobacterium*-mediated transformation. *Menara perkebunan* 67 (2): 8-16.

- Sobha, S., S. Sushamakumari, K. Rekha, R. Jayashree, R. G. Kala, R. Supriya, and A. Thulaseedharan. 2012. Factor promoting *Agrobacterium* mediated genetic transformation efficiency in *Hevea brasiliensis*. *Rubber Science* 25 (2): 173-182.
- Souza, L. M., C. C. Mantello, M. O. Santos, P. S. Goncalves, and A. P. Souza. 2009. Microsatellites from rubber tree (*Hevea brasiliensis*) for genetic diversity analysis and cross-amplification in six *Hevea* wild species. *Conserv Genet Resour* 1: 75-79.
- Srivastava, P. and R. Chaturvedi. 2008. In vitro androgenesis in tree species: an update and prospect for further research. *Biotechnology Advances* 26: 482-491.
- Sushamakumari, S., M. P. Asokan, P. Anthony, K. C. Lowe, J. P. Power, M. R. Davey. 2000. Plant regeneration from embryogenic cell suspension-derived protoplasts of rubber. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 61: 81-85.
- Susiyanti, G. A. Wattimena, M. Surahman, A. Purwito, dan D. A. Santosa. 2007. Transformasi tanaman tebu (*cv.* PSJT 94-41) dengan gen fitase menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* GV 2260 (*pBinPI-IIEC*). *Bul Agron* 35 (3): 205-211.
- Sutrisno. 2006. Peran bioteknologi dalam pembangunan pertanian di Indonesia. Dalam Seminar Aplikasi Isotop dan Radiasi.
- Tahardi, J. S. 1998a. Plant regeneration in *Hevea brasiliensis* via somatic embryogenesis. *Menara Perkebunan* 66 (1): 1-8.
- Tistama, R. dan Hamim. 2007. Inkompabilitas jaringan *Rootstock-Scion*: kasus pada tanaman karet (*Hevea brasiliensis*). *Warta Perkebunan* 26 (2): 1-9.
- Tistama, R., Sayurandi, Aidi-Daslin, dan S. Woelan. 2008. Pengelompokan tetua tanaman karet (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) berdasarkan penanda RAPD. *J Penel Karet* 26(1): 10-19.
- Toruan-Mathius, N., Z. Lalu, Soedarsono, dan H. Aswidinnoor. 2002. Keragaman genetik klon-klon karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) yang resisten dan rentan terhadap *Corynespora asiicola* berdasarkan penanda RAPD dan AFLP. *Menara Perkebunan* 70 (2): 35-49.
- Venkatachalam, P., P. Priya, C. K. Saraswathyamma, A. Thulaseedharan. 2004. Identification, cloning and sequence analysis of a dwarf genome specific RAPD marker in rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Cell Rep* 23: 237-332.
- Venkatachalam, P., R. Jayashree, K. Rekha, S. Sushmakumari, S. Sobha, P. Jayashree, R. G. Kala, and A. Thulaseedharan. 2006. Rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). In: Wang K (ed) *Methods in molecular biology (Vol 344): Agrobacterium protocols (Vol 2)*, Humana Press Inc., NJ, pp 153-164.
- Venkatachalam, P., P. K. Jayasree, S. Sushmakumari, R. Jayashree, K. Rekha, S. Sobha, P. Priya, R. G. Kala, and A. Thulaseedharan. 2007. Current perspectives on application of biotechnology to assist the genetic improvement of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.): an overview. *functional plant science and Biotechnology*. Global Science Books.
- Wardojo dan Tahardi. 1990. Pemanfaatan bioteknologi untuk menunjang pembangunan perkebunan. Dalam Seminar Bioteknologi Perkebunan dan Lokakarya Biopolimer untuk Industri.
- Wilson, H. M. and H. E. Stree. 1975. The growth, anatomy and morphogenetic potential of callus and cell suspension cultures of *Hevea brasiliensis*. *Annals of Botany* 39: 671-682.
- Woelan, S., Aidi-Daslin, I. Suhendry, M. Lasminingsih. 2005. Evaluasi keragaan klon karet IRR Seri 100 dan 200 dalam Prosiding Lokakarya Nasional Pemuliaan Tanaman Karet. Pusat Penelitian Karet.

Woelan, S., R. Tistama, dan Aidi-Daslin. 2007. Determinasi keragaman genetik hasil persilangan antar populasi berdasarkan karakteristik morfologi dan teknik RAPD. *J. Pen. Karet* 25 (1): 13-26.

Yeang, H. Y., P. Arokiaraj, H. Jaafar, S. A. M Arif, S. Rajamanikam, J. L. Chan, J. Sharib, R. Leelavathy, S. Hamzah, and C. P. E. Van Der Logt. 2002. Expression of a functional recombinant antibody fragment in the latex of transgenic *Hevea brasiliensis*. *J. Rub. Res.* 5 (4): 215-225.