

**PERKEMBANGAN KULTUR *IN VITRO*  
PADA TANAMAN KARET (*Hevea brasiliensis*, Müell. Arg.)  
MELALUI EMBRIOGENESIS SOMATIK DI CIRAD PERANCIS**

*Development of In vitro Culture of Rubber (*Hevea brasiliensis*, Müell. Arg.) by Somatic Embryogenesis in CIRAD France*

Ari Fina Bintarti

Balai Penelitian Sembawa, Jl. Raya Palembang-Betung, Km. 29

PO Box: 1127, Palembang 30001, Indonesia

E-mail: arifinabintarti@gmail.com

Diterima tanggal 8 Desember 2014/Direvisi tanggal 11 Maret 2015/Disetujui tanggal 18 Maret 2015

**Abstrak**

Embriogenesis somatik menjadi alternatif perbanyakkan klonal pada tanaman karet untuk mendapatkan bahan tanam dengan sistem perakaran sendiri dan identik dengan induknya. Penelitian mengenai embriogenesis somatik pada tanaman karet sudah banyak dilakukan oleh lembaga penelitian di dunia, salah satunya adalah lembaga penelitian swasta CIRAD Perancis. Berbagai penelitian dalam upaya pengembangan metode embriogenesis somatik tanaman karet telah diteliti mulai tahun 1970-an, meliputi Embriogenesis Somatik Primer, Embriogenesis Somatik Jangka Panjang atau, dan Embriogenesis Somatik Sekunder. Selain itu, tim peneliti di CIRAD juga telah berhasil mengembangkan teknologi kriopreservasi atau penyimpanan jangka panjang di dalam nitrogen cair yang dikaitkan dengan Embriogenesis Somatik Sekunder untuk menyeleksi dan menetapkan galur-galur kalus yang mempunyai kapasitas embriogenik dan regenerasi tinggi. Walaupun begitu, teknik embriogenesis somatik belum bisa diaplikasikan secara luas untuk perbanyakkan tanaman karet secara massal, karena beberapa kendala. Lebih jauh, teknik embriogenesis somatik dan kriopreservasi dapat mendukung program pemuliaan tanaman untuk menciptakan tanaman karet transgenik dengan sifat-sifat agronomis unggul seperti

toleran terhadap stress abiotik dan produksi lateks tinggi.

Kata kunci: *Hevea brasiliensis*, embriogenesis somatik, CIRAD, kriopreservasi

**Abstract**

*Somatic embryogenesis become an alternative method for clonal micropropagation of rubber tree to produce self-rooted and true-to-type planting materials. Study on somatic embryogenesis of rubber tree has been conducted by a lot of research teams over the world, one of them is a private research institute in France CIRAD. Various of study in order to develop the efficiency of somatic embryogenesis method in rubber tree had been conducted from 1970s including Primary Somatic Embryogenesis, long-term or Maintained Somatic Embryogenesis, and Secondary Somatic Embryogenesis. Beside, the research team of CIRAD was successfully developing the cryopreservation technique in order to long-term preserve of high embryogenic callus lines in ultralow-temperature of liquid nitrogen. This technique was collaborated with secondary somatic embryogenesis as an efficient strategy to select and establish of high embryogenic callus lines. However, micropropagation by somatic embryogenesis has not been able to be applied as a mass propagation method of rubber tree because of some limitations. Furthermore, both somatic embryogenesis and cryopreservation technique is a technology package*

*to support plant breeding program to produce transgenic planting materials that provide agronomically beneficial properties by introducing of genes of interest such as abiotic stress tolerance and high-latex productivity.*

*Keywords: Hevea brasiliensis, somatic embryogenesis, CIRAD, cryopreservation*

## **Pendahuluan**

Perbanyakan tanaman karet (*Hevea brasiliensis*, Müell. Arg.) melalui okulasi mempunyai beberapa kekurangan. Tanaman hasil okulasi mempunyai batang bawah dari biji sehingga memiliki heterogenitas intraklonal yang tinggi. Selain itu, inkompatibilitas antara batang atas dan batang bawah juga dapat menurunkan kejaguran dan produktivitas tanaman. Oleh karena itu, perbanyakan mikro melalui kultur *in vitro*, seperti embriogenesis somatik (ES) menjadi alternatif untuk mendapatkan bahan tanam klonal dengan yang identik dengan induknya.

Embriogenesis somatik pada tanaman karet telah berhasil dilakukan oleh beberapa lembaga penelitian di dunia dengan menggunakan berbagai jenis eksplan diantaranya anter, integumen biji muda, kotiledon, dan fragmen dari embrio somatik primer. Kultur *in vitro* anter pertama kali dilakukan oleh peneliti dari Rubber Research Institute of Ceylon (sekarang Sri Lanka) dari klon RRIC 52 dan KH 440 untuk menghasilkan tanaman haploid, namun tidak terjadi diferensiasi sel (Satchuthananthavale dan Irugalbandara, 1972). Kultur anter yang dilakukan oleh Wang *et al.* (1980) dari Rubber Research Institute of Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (CATAS) menggunakan klon Haiken 1, Haiken 2, dan SCATC 88-13 berhasil menghasilkan 137 planlet normal. Tim peneliti di International Centre on Agriculture Research for Development (CIRAD) menggunakan eksplan integumen biji muda dan fragmen embrio somatik primer untuk proses embriogenesis somatik (Carron *et al.*, 1989; Lardet *et al.*, 2009).

Merupakan suatu lembaga penelitian di Montpellier, Perancis dan anggota dari International Rubber Research and Development Board (IRRDB). Tim peneliti Cell Biology of the Response to Abiotic and Biotic Stress in Perennial Species (BURST) di CIRAD merupakan tim penelitian khusus yang mempelajari tanaman karet. Tim ini telah berhasil melakukan perbanyakan klonal tanaman karet melalui embriogenesis somatik.

Penelitian embriogenesis somatik tanaman karet di CIRAD meliputi, Embriogenesis Somatik Primer (ESP), Embriogenesis Somatik Jangka Panjang (ESJP) atau Maintained Somatic Embryogenesis, dan Embriogenesis Somatik Sekunder (ESS). Mereka juga mempelajari berbagai faktor yang dapat mempengaruhi embriogenesis somatik pada tanaman karet seperti zat pengatur tumbuh, sumber karbon, dan berbagai jenis mineral yang digunakan untuk media kultur. Berbagai percobaan lapangan terhadap tanaman hasil embriogenesis somatik juga telah mereka lakukan di berbagai negara seperti di Nigeria, Thailand, dan Pantai Gading. Saat ini tim BURST telah menggunakan teknik ESS untuk mendukung program pemuliaan melalui rekayasa genetika. Gen-gen tertentu ditransformasikan pada kalus-kalus embriogenik yang dihasilkan dari ESS untuk menghasilkan tanaman karet transgenik yang resisten terhadap cekaman biotik dan abiotik. Penelitian mengenai tanaman karet transgenik ini tidak lepas dari teknik ESS yang telah berhasil mereka kuasai dengan baik.

Tulisan ini membahas perkembangan metode perbanyakan mikro tanaman karet melalui embriogenesis somatik di CIRAD mulai dari penelitian awal embriogenesis somatik.

## **Embriogenesis Somatik Primer**

Penelitian ESP pada tanaman karet di Perancis pertama kali dilakukan oleh The Institute de Recherche sur le Caoutchouc pada tahun 1979 dengan menghasilkan kalus yang mempunyai kapasitas embriogenik yang

berasal dari eksplan integumen biji muda (Carron *et al.*, 1989). Penelitian ESP menggunakan eksplan integumen juga dilakukan oleh Carron *et al.* (1995), penelitian terdiri dari lima tahapan utama, dimana setiap tahapan memerlukan waktu 25 hari. Tahapan tersebut meliputi inisiasi kalus, induksi embrio, pengembangan embrio, maturasi embrio, dan regenerasi embrio menjadi planlet.

#### 1. Inisiasi kalus

Kalus diinisiasi dari eksplan integumen biji muda yang berumur 8 sampai dengan 10 minggu setelah penyerbukan. Integumen digunakan sebagai sumber eksplan karena jaringan tersebut paling responsif terhadap kultur *in vitro* (Montoro, komunikasi pribadi), secara genetik identik dengan tanaman induk, tersusun oleh banyak sel parenkim, dan terovaskularisasi (Carron *et al.*, 1995). Lardet *et al.* (2008) juga mengatakan bahwa eksplan yang mempunyai kompetensi embriogenesis somatik tinggi pada umumnya berasal dari organ reproduktif seperti anter, integumen biji, dan embrio zigotik. Media kultur untuk inisiasi kalus adalah MH (*Medium for Hevea*) yang dikembangkan oleh Carron *et al.* (1989). Media ini diperkaya dengan 30  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , 234 mM sukrosa, serta masing-masing 4.44  $\mu\text{M}$  3.4-D dan Kinetin (Carron *et al.*, 1995; Montoro *et al.*, 2012a). Kalus akan terinisiasi dari proliferasi sel-sel perivaskuler di sekitar area sayatan integumen (Carron *et al.*, 1995).

#### 2. Induksi embrio

Tahap kedua adalah induksi embrio yang merupakan tahapan yang sangat aktif. Kalus dikulturkan pada media dasar yang sama dengan penambahan 1.35  $\mu\text{M}$  3.4-D dan BAP, 50  $\mu\text{M}$  spermidin, dan 5 nM Asam Absisat (ABA).

#### 3. Pengembangan embrio

Tahap ketiga adalah pengembangan embrio dimana kalus dikulturkan pada media yang sama dengan penambahan 1.8  $\mu\text{M}$  3.4-D, 0.9  $\mu\text{M}$  Benzil Amino Purin (BAP) sebagai pengganti Kinetin serta tanpa penambahan  $\text{AgNO}_3$ .

#### 4. Maturasi embrio

Proembrio yang dihasilkan kemudian dikulturkan pada media maturasi yaitu media MS (*Murashige & Skoog*) yang mengandung 30% makroelemen dan 200% mikroelemen, vitamin MH, 351 mM sukrosa, 500  $\text{mgL}^{-1}$  arang aktif, dan 1  $\mu\text{M}$  ABA.

#### 5. Regenerasi embrio

Embrio yang telah siap kemudian diisolasi dan dipindahkan pada media perkecambahan yang sama dengan media dasar maturasi dengan penambahan 146 mM sukrosa dan 8.7  $\mu\text{M}$   $\text{GA}_3$  (Carron *et al.*, 1995; Montoro *et al.*, 2012a).

Embriogenesis somatik primer telah berhasil dikembangkan untuk klon PB 260, dan selanjutnya diaplikasikan pada klon PR 107, RRIM 600, PB 235, RRIM 703, IRCA 109, PB 254, dan PB 310 di laboratorium CIRAD (Tabel 1). Percobaan lapangan tanaman hasil ESP telah dilakukan di Pantai Gading, Nigeria, dan Thailand (yang bekerja sama dengan CIRAD). Hasil percobaan tersebut menunjukkan bahwa tanaman *in vitro* hasil ESP klon PB 254, BPM 24, dan PR 107 mempunyai laju pertumbuhan masing-masing 140, 123, dan 103 % terhadap tanaman hasil okulasi. Produksi karet tanaman *in vitro* hasil ESP klon PB 260 dan BPM 24 pada tahun ke-5 sampai dengan ke-7 masing-masing sebesar 141 dan 137 % terhadap tanaman hasil okulasi (Montoro *et al.*, 2012a).

Tanaman *in vitro* hasil ESP mempunyai karakteristik juvenil yaitu tajuk mengerucut dan kejaguran yang baik. Oleh karena itu, ESP dapat dikombinasikan dengan *microcutting* untuk perbanyak tanaman karet yang efektif dan efisien (Montoro *et al.*, 2012a). Teknik ESP belum bisa diaplikasikan sebagai metode perbanyak massal tanaman karet karena terbatasnya jumlah tanaman yang dihasilkan per eksplan dan kurangnya ketersediaan sumber eksplan. Selain itu, kemampuan eksplan untuk menginisiasi kalus embriogenik sangat tergantung pada genotipe tanaman induk dengan frekuensi kurang dari 1 % per eksplan (Lardet *et al.*, 2009). Biaya tenaga kerja yang tinggi untuk produksi tanaman *in vitro*

juga menjadi kendala untuk aplikasi teknologi embriogenesis somatik ke masyarakat (Montoro *et al.*, 2012b).

### Embriogenesis Somatik Jangka Panjang

Embriogenesis somatik jangka panjang (ESJP) atau *Maintained Somatic Embryogenesis* dilakukan dengan cara mengontrol siklus multiplikasi dan regenerasi kalus remah melalui subkultur rutin selama beberapa bulan. Teknik ini dilakukan untuk mengatasi rendahnya laju regenerasi embrio menjadi planlet pada ESP. Teknik ESJP dikembangkan oleh Cailloux *et al.* (1996) dengan menggunakan media semi padat, karena kultur dalam media cair menyebabkan kalus kelebihan air dan menurunkan kejaguran tanaman *in vitro* yang dihasilkan. Beberapa peneliti mempelajari karakteristik kalus dan pengaruh komposisi media terhadap embriogenesis somatik tanaman karet dengan menggunakan teknik ESJP. Montoro *et al.* (1993) mempelajari pengaruh komposisi spesifik media terhadap keremahan kalus dan proses embriogenesis somatik beberapa klon karet. Berdasarkan penelitian tersebut diketahui bahwa peningkatan konsentrasi kalsium 9 sampai dengan 12 mM dan sukrosa 351 mM akan meningkatkan keremahan dan kapasitas embriogenik kalus. Penurunan konsentrasi auksin dan sitokinin juga meningkatkan keremahan kalus, namun menurunkan kapasitas embriogeniknya. Selain itu, penelitian tersebut menunjukkan bahwa kalus remah dan embriogenik terbentuk pada klon RRIM 600 dan PR 107, sedangkan kalus kompak terbentuk pada klon PB 260, PB 235, dan GT 1.

Montoro *et al.* (2012a) menyatakan bahwa kalus remah dan embriogenik sangat penting untuk induksi embrio. Pernyataan tersebut mendukung penelitian yang dilakukan oleh Montoro *et al.* (1993) tentang perbedaan kapasitas embriogenik antara kalus kompak dan remah berdasarkan uji histologi. Pada kalus kompak, daerah meristem terpusat pada bagian perifer, sedangkan bagian tengah kalus tersusun oleh sel-sel parenkim yang

jenuh dengan polifenol. Struktur seperti itu akan memicu pencokelatan sel secara perlahan hingga keseluruhan kalus akan terdegenerasi, sedangkan kalus remah mempunyai kapasitas embriogenik yang lebih baik karena sel-selnya terpisah satu sama lain, sehingga pencokelatan pada salah satu sel tidak mempengaruhi sel yang lain. Oleh karena itu, kalus remah merupakan material yang sangat sesuai untuk embriogenesis somatik jangka panjang menggunakan media semi-padat maupun cair. Blanc *et al.* (1999) mempelajari pengaruh beberapa sumber karbohidrat berbeda (sukrosa, maltosa, glukosa, dan fruktosa) terhadap induksi embriogenesis somatik. Maltosa terbukti paling efektif meningkatkan produksi embriogenesis somatik klon PB 260. Di antara beberapa penelitian yang dilakukan, teknik ESJP telah diaplikasikan pada enam klon tanaman karet, yaitu PB 260, PR 107, GT 1, RRIM 600 (CIRAD), RII 105 (RRII), dan Reyan 88-13 (CATAS) (Tabel 1) (Montoro *et al.*, 2012a).

Kelemahan teknik ESJP adalah proliferasi kalus remah melalui kultur jangka panjang mengakibatkan hilangnya kompetensi regenerasi kalus (Blanc *et al.*, 2006) dan meningkatkan resiko variasi somaklonal (Lardet *et al.*, 2007). Hasil percobaan lapangan tanaman hasil ESJP klon PB 260 pada tahun 1995-2002 menunjukkan bahwa pertumbuhan tanaman *in vitro* lebih rendah dibandingkan tanaman hasil okulasi. Tanaman *in vitro* tersebut menunjukkan struktur kanopi, percabangan, bentuk, dan warna daun yang abnormal serta rentan terhadap infeksi penyakit (Carron *et al.*, 2009). Berbagai abnormalitas tersebut menyebabkan kejaguran menurun dan lilit batang tanaman hanya 5089 %, lebih kecil jika dibandingkan tanaman hasil okulasi (Montoro *et al.*, 2012a). Oleh sebab itu, teknik ESJP tidak sesuai untuk metode perbanyakan tanaman karet skala besar. Penelitian selanjutnya terus dilakukan untuk mendapatkan kalus remah dan embriogenik dengan mempersingkat dan mengontrol waktu proliferasi dan multiplikasi kalus menggunakan teknik kriopreservasi.

Tabel 1. Daftar klon tanaman karet (*H. brasiliensis*) yang berhasil diperbanyak secara *in vitro* melalui ESP, ESJP, dan ESS di CIRAD, Perancis.

Teknik yang digunakan	Klon	Sumber eksplan	Referensi
ESP	PB 260, PR 107, RRIM 600, PB 235	Integumen dalam	Carron <i>et al.</i> (1995)
ESP	RRIM 703, IRCA 109, PB 254, BPM 24, PB 310	Integumen dalam	Tidak diterbitkan
ESJP	PB 260, PR 107, GT 1	Integumen dalam	Montoro <i>et al.</i> (1994)
ESJP	PB 260	Integumen dalam	Carron <i>et al.</i> (1998) Lardet <i>et al.</i> (2007)
ESJP	RRIM 600	Fragmen embrio somatik primer	Tidak diterbitkan
ESS	PB 260, PB 217, RRIM 703	Fragmen embrio somatik primer	Lardet <i>et al.</i> (2009)

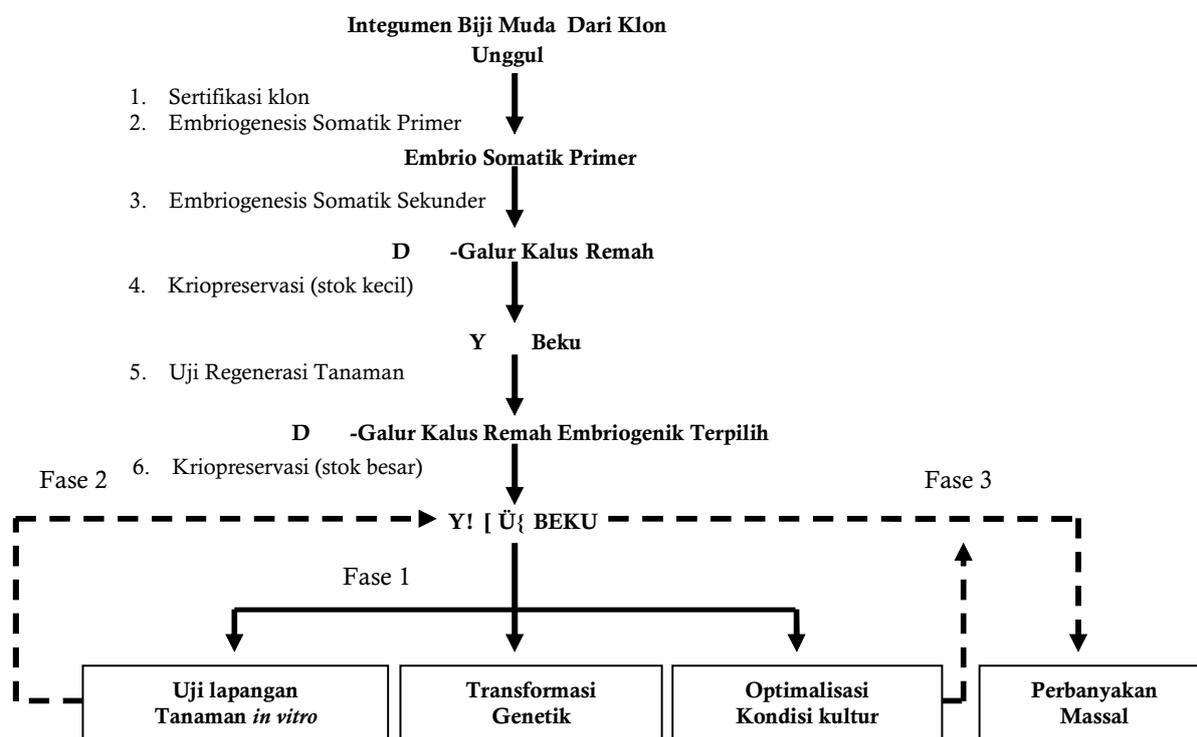
Sumber: Montoro *et al.*, 2012a.

### Embriogenesis Somatik Sekunder

Embriogenesis somatik sekunder (ESS) pada tanaman karet pertama kali dilakukan di CIRAD oleh Lardet *et al.* (2009). Embriogenesis somatik sekunder di CIRAD terdiri dari empat tahap utama meliputi produksi embrio somatik primer melalui ESP, inisiasi kalus remah dari fragmen embrio, kriopreservasi dan perbanyakkan kalus remah, dan regenerasi embrio menjadi planlet menggunakan sistem RITA (*Recipient for Automated Temporary Immersion*). Embriogenesis somatik sekunder pada tanaman karet yang dilakukan oleh Lardet *et al.* (2009) mengkonfirmasi bahwa embrio sekunder terbentuk setelah inisiasi kalus sehingga disebut ESS tidak langsung (*Indirect Secondary Somatic Embryogenesis*). Pada ESS, kalus remah embriogenik akan terbentuk 23 bulan setelah kultur, lebih cepat daripada ESP yang memerlukan waktu 612 bulan setelah kultur dan ESJP yang membutuhkan waktu 1018 bulan setelah kultur dengan frekuensi terbentuk eksplan kurang dari 1% (Lardet *et al.*, 2009; Montoro *et al.*, 2012a). Oleh karena itu teknik ESS berpotensi untuk diaplikasikan sebagai metode perbanyakkan mikro tanaman karet secara massal karena dapat mengurangi waktu kultur sehingga mengurangi resiko variasi somaklonal.

Embriogenesis somatik jangka panjang menggunakan eksplan integumen atau anter untuk mendapatkan kalus remah embriogenik, sedangkan ESS menggunakan fragmen embrio somatik primer sebagai sumber eksplannya. Hal ini berdasarkan asumsi bahwa ESP mampu menghasilkan tanaman *in vitro* dengan kualitas yang baik sehingga embrio yang dihasilkan dari ESP dapat menjadi sumber eksplan yang baik pula (Montoro *et al.*, 2012a). Lardet *et al.* (2009) telah berhasil melakukan ESS pada klon PB 260, PB 217, dan RRIM 703. Selain itu ESS juga telah diaplikasikan pada klon IRCA 109 dan RRIM 600 (Tabel 1) (Montoro *et al.*, 2012a).

Teknik ESS merupakan penyempurnaan dari ESJP yang bertujuan untuk mengurangi resiko variasi somaklonal dan hilangnya kompetensi regenerasi kalus dengan mengurangi waktu subkultur dan proliferasi kalus. Hal ini dapat diatasi dengan menyimpan kalus untuk jangka panjang di dalam nitrogen cair. Kumpulan kalus yang berasal dari eksplan integumen klon tertentu dipisahkan dan diberi kode sebagai penanda galur, kemudian dilakukan seleksi. Tim BURST di CIRAD menggabungkan teknik kriopreservasi dalam proses ESS untuk menyeleksi dan menetapkan galur-galur kalus remah dengan kapasitas regenerasi yang tinggi (Gambar 1). Kalus remah embriogenik yang telah berproliferasi



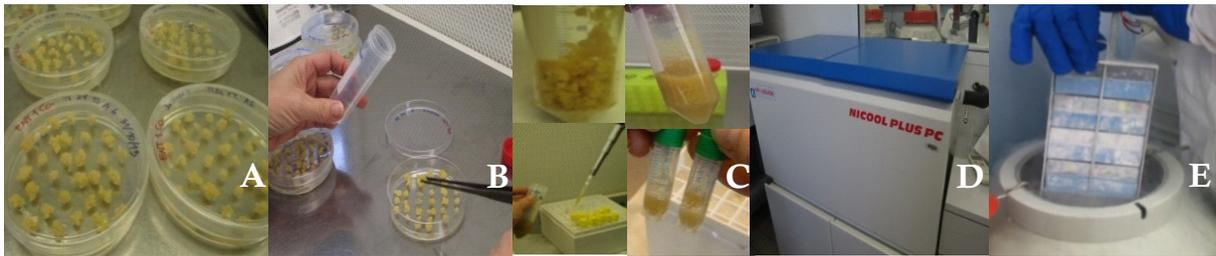
Gambar 1. Strategi seleksi dan penetapan galur-galur kalus remah dengan kapasitas embriogenik tinggi pada tanaman karet (*H. brasiliensis*) di CIRAD menggunakan ESP, ESS, dan kriopreservasi (Sumber: Montoro *et al.*, 2012a).

dengan baik dikriopreservasi, kemudian dibuat stok untuk penyimpanan dan pengujian. Pengujian yang dilakukan meliputi regenerasi, aklimatisasi, dan karakterisasi kesesuaian klonal. Setiap galur terpilih kemudian diperbanyak dan dikriopreservasi kembali sebagai stok kerja. Kalus-kalus tersebut kemudian digunakan untuk percobaan lapangan serta digunakan sebagai material transformasi genetik untuk membuat tanaman karet transgenik.

Teknik kriopreservasi kalus tanaman karet di CIRAD pada awalnya dilakukan oleh Engelman *et al.* (1997), kemudian disempurnakan oleh Lardet *et al.* (2007). Teknik ini meliputi dua tahapan, yaitu perlakuan krioprotektif dan pembekuan. Krioprotektif bertujuan untuk melindungi sel-sel kalus dari perlakuan pembekuan tiba-tiba. Pada perlakuan krioprotektif, kalus remah embriogenik dimasukkan ke dalam media cair yang mengandung sukrosa tinggi yaitu media

ENT1Ca1 yang ditambah dengan sukrosa 1 M (1 ml g<sup>-1</sup> kalus). Selanjutnya ditambah dengan *Dimethylsulphoxide* (DMSO) secara bertahap setiap 6 menit hingga mencapai konsentrasi akhir 10 %. Kalus kemudian dimasukkan ke dalam tabung krio sebanyak 1 ml per tabung. Tahap selanjutnya adalah pembekuan, dimana tabung krio dimasukkan ke dalam 80 C *deep freezer* dan dibekukan sampai 40 C. Setelah mencapai suhu tersebut, tabung-tabung krio berisi kalus beku segera disimpan dalam nitrogen cair (Gambar 2).

Kriopreservasi merupakan teknologi penyimpanan plasma nutfah dalam jangka waktu lama dengan ruang dan perawatan minimal. Secara teori, sel tanaman akan tetap stabil untuk jangka waktu yang tak terbatas karena temperatur *ultralow* nitrogen cair sangat efisien untuk menghentikan proses metabolisme sel (Mikula *et al.*, 2011). Dalam kultur *in vitro* tanaman karet, kriopreservasi dapat menghambat proliferasi jaringan



Gambar 2. Proses kriopreservasi kalus remah embriogenik (galur TS24T2 A.6 dan A.10) di CIRAD: subkultur kalus pada media ENT1Ca1 (A), seleksi kalus untuk kriopreservasi (B), perlakuan krioprotektif (C), pembekuan (D), dan penyimpanan pada nitrogen cair (E).

sehingga mengurangi resiko variasi somaklonal dan hilangnya kompetensi kalus untuk menginduksi embrio (Piyatrakul *et al.*, 2012; Lardet *et al.*, 2007). Meskipun demikian, berbagai perlakuan kriopreservasi dan pelelehan (*thawing*) dapat menginduksi stres sel dan mengakibatkan perubahan morfogenik atau genetik kalus. Untuk mengatasi masalah tersebut, Lardet *et al.* (2007) meneliti tentang pengaruh konsentrasi  $\text{CaCl}_2$  eksogenus terhadap pemulihan kalus paska kriopreservasi. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa penurunan konsentrasi  $\text{CaCl}_2$  dari 9 mM menjadi 1 mM pada media pre kultur dapat meningkatkan pemulihan kalus dan kemampuan regenerasi embrio pasca kriopreservasi. Peneliti tersebut juga memperlihatkan bahwa tidak ada perubahan kapasitas morfogenetik sebelum dan sesudah kriopreservasi pada 14 galur dari 39 galur kalus klon PB 260 yang diuji.

### Regenerasi Tanaman

Berdasarkan kapasitas embriogenik dan kemampuan regenerasinya, Charbit *et al.* (2004) dan Lardet *et al.* (2007) membagi galur kalus remah ke dalam tiga kelompok, yaitu galur kalus embriogenik teregenerasi (*embryogenic regenerating line*), embriogenik tidak teregenerasi (*embryogenic non-regenerating line*), dan non-embriogenik (*non-embryogenic line*). Kalus embriogenik teregenerasi adalah kalus yang dapat terinduksi menjadi kalus embrionik serta dapat diregenerasikan menjadi planlet. Kalus embriogenik tidak

teregenerasi adalah kalus yang dapat diinduksi menjadi kalus embrionik tetapi tidak bisa teregenerasi menjadi planlet. Kalus non-embriogenik adalah kalus yang tidak bisa menginduksi embrio. Kalus embriogenik teregenerasi mempunyai warna kuning yang lebih cerah, kalus embriogenik tidak teregenerasi berwarna kuning keruh dengan sedikit pencokelatan, sedangkan kalus non-embriogenik mempunyai struktur yang basah, berair, dan warna yang lebih putih (Gambar 3A, B, dan C).

Perkembangan embrio pada ESS dilakukan menggunakan sistem RITA yang dikembangkan oleh CIRAD. Sistem ini diadopsi dari *Temporary Immersion System* (TIS) yaitu sistem pengaturan aliran media secara otomatis untuk mencegah terendamnya kultur kalus di dalam media secara terus menerus sekaligus memberikan aerasi dan pencampuran nutrisi yang cukup. Sistem ini didesain untuk perbanyakan massal tanaman melalui embriogenesis somatik (Pérez *et al.*, 2013) dan banyak digunakan untuk optimalisasi kultur embrio serta meningkatkan kuantitas dan kualitas embrio somatik pada tanaman karet (*H. brasiliensis*) (Lardet *et al.*, 2009). Etienne dan Berthouly (2002) mengatakan bahwa waktu perendaman pada media saat perkembangan embrio merupakan parameter yang sangat penting untuk mencegah kelebihan air pada kalus. Selain itu, sistem RITA juga memperbaiki kualitas bahan tanam yang dihasilkan melalui peningkatan kejaguran tunas dan frekuensi embrio normal. Penggunaan sistem RITA akan mengurangi



Gambar 3. Berbagai galur kalus remah di CIRAD pada media EXP untuk induksi embrio: galur kalus embriogenik teregenerasi (A), embriogenik tidak teregenerasi (B), dan non-embriogenik (C) (Sumber: Piyatrakul *et al.*, 2012).

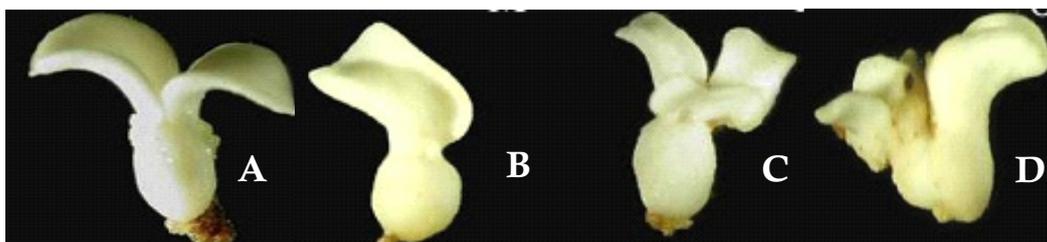
biaya produksi termasuk efisiensi kerja, efisiensi tempat kultur, dan hasil kultur yang lebih baik.

Perkembangan kalus remah embriogenik di dalam sistem RITA diawali dengan proses pencokelatan diikuti oleh pembentukan dan maturasi embrio. Embrio dewasa akan terbentuk setelah delapan minggu inkubasi. Piyatrakul *et al.* (2012) membagi embrio berdasarkan morfologi dan mengelompokkannya menjadi tiga kelas. Kelas 1 merupakan embrio normal dengan kualitas baik yang dicirikan dengan adanya satu badan embrionik dan dua kotiledon yang berkembang sempurna (simetri bilateral) (Gambar 4.A). Embrio kelas 2 mempunyai satu badan embrionik dengan satu atau dua kotiledon yang asimetris (Gambar 4.B & 4.C). Kedua kelas embrio ini bisa digunakan untuk regenerasi planlet. Sedangkan embrio kelas 3 merupakan embrio abnormal yang mempunyai struktur anomali, cenderung bulat dengan dua atau tidak ada badan embrionik dan embrio dari kelas ini tidak memenuhi kualitas untuk regenerasi planlet (Gambar 4.D).

Embrio normal akan beregenerasi menjadi planlet yang berkualitas baik dan begitu pula

sebaliknya. Planlet dari embrio normal mempunyai sistem perakaran, batang, dan daun yang berkembang sempurna dalam waktu satu bulan (Gambar 5). Hasil penelitian Piyatrakul *et al.* (2012) menunjukkan bahwa galur kalus embriogenik tidak teregenerasi CI04106 hanya menghasilkan 19.5 embrio somatik per gram kalus, sedangkan galur kalus embriogenik teregenerasi CI07060 mampu menghasilkan 590 embrio somatik per gram kalus. Persentase embrio abnormal dari kedua galur kalus tersebut masing-masing 93.54 % dan 82.71 %. Dari 102 embrio normal yang dihasilkan dari galur kalus CI07060, sebanyak 53 embrio berkembang menjadi planlet.

Secara teori, teknik ESS dan kriopreservasi bisa digunakan untuk memperbanyak klon-klon yang responsif terhadap ESP untuk menghasilkan bahan tanam dengan kualitas yang baik dan stabil dalam jangka panjang. CIRAD telah berhasil menghasilkan galur kalus teregenerasi CI07060 dari klon PB 260 yang digunakan sebagai galur kontrol dan merupakan cikal bakal galur-galur kalus transgenik untuk menciptakan tanaman karet transgenik. Lebih dari 3000 planlet telah dihasilkan dari galur kalus ini dan digunakan untuk berbagai penelitian lanjutan (Lardet *et*



Gambar 4. Berbagai tipe embrio somatik yang berkembang di dalam sistem RITA. (Sumber: Piyatrakul *et al.*, 2012)



Gambar 5. Embrio dari galur kalus embriogenik teregenerasi CI07060 yang berkembang menjadi planlet pada media perkecambahan (A) dan planlet dengan sistem perakaran, batang, dan daun yang berkembang sempurna (B).

*al.*, 2007; Montoro *et al.*, 2012a). Kelemahan ESS adalah kesuksesan teknik ini sangat bergantung pada jenis klon dan kapasitas embrio serta sifat tanaman yang diregenerasikan beragam. Selain itu, percobaan lapang skala luas untuk tanaman *in vitro* hasil ESS masih harus dilakukan untuk dapat menetapkan ESS sebagai metode perbanyak tanaman karet secara massal.

### Kesimpulan

Embriogenesis somatik merupakan metode perbanyak mikro yang sangat penting untuk mendapatkan tanaman karet yang identik dengan tanaman induk dan mempunyai sistem perakaran sendiri. Tim BURST CIRAD yang terus konsisten dan memiliki komitmen kuat dalam mengembangkan penelitian perbanyak klonal tanaman karet.

Teknik embriogenesis somatik belum dapat diaplikasikan secara luas untuk perbanyak tanaman karet secara massal karena berbagai keterbatasan. Namun demikian teknik embriogenesis somatik sangatlah penting dalam program pemuliaan tanaman karena merupakan alat efisien untuk menciptakan tanaman karet transgenik dengan sifat-sifat unggul seperti toleransi terhadap stress abiotik dan produksi lateks tinggi.

### Daftar Pustaka

- Blanc, G., N. Michaux-Ferrière, 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 Organ Cult* 59:103-112.
- 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* Müell Arg. plants. *Plant Cell Rep* 24(12):724-733.
- Cailloux, F., J. Julien-Guerrier, L. Linossier, and A. Coudret. 1996. Long-term somatic embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. *Plant Sci* 120:185-196.
- Carron, M. P, F. Enjalric, L. Lardet, and A. Deschamps. 1989. Rubber (*Hevea brasiliensis* Müell.Arg.). In: YPS Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol.5. Trees II. Springer, Berlin, Heidelberg New York, pp 222-245.
- Carron, M. P, H. Etienne, N. Michaux-Ferrière, and P. Montoro. 1995. Somatic embryogenesis in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müell.-Arg.). In: YPS Bajaj (ed.), *Somatic embryogenesis and synthetic seed*. 1, vol.30. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer, Berlin, Germany, pp 353-369.

- Carron, M. P, L. Lardet, F. Granet, J. Julien, K. Teerawatanasuk, J. Keli, B. G. Dea, A. Leconte, and P. Montoro. 2009. Field trials network emphasizes the improvement of growth and yield through micropropagation in rubber tree (*Hevea brasiliensis*. Müll. ARG.). *Acta Hort.* 812:485-492.
- Charbit, E., T. Legavre, L. Lardet, E. Bourgeois, N. Michaux-Ferrière, and M. P. Carron. 2004. Identification of differentially expressed cDNA sequences and histological characteristics of *Hevea brasiliensis* calli in relation to their embryogenic and regenerative capacities. *Plant Cell Rep* 22:539-548.
- Engelmann, F., M. Lartaud, N. Chabrilange, M. P. Carron, and H. Etienne. 1997. Cryopreservation of embryogenic calluses of two commercial clones of *Hevea brasiliensis*. *Cryo Let* 18: 107-116.
- Etienne, H. and M. Berthouly. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 69:215–231.
- Lardet, L., F. Martin, F. Dessailly, M. P. Carron, and P. Montoro. 2007. Effect of exogenous calcium on post-thaw growth recovery and subsequent plant regeneration of cryopreserved embryogenic calli of *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). *Plant Cell Rep* 26(5): 559-569.
- Lardet, L., F. Dessailly, M. P. Carron, P. Montoro, and O. Monteuis. 2008. Influences of aging and cloning methods on the capacity for somatic embryogenesis of a mature *Hevea brasiliensis* genotype. *Tree Physiol* 29:291-298.
- Lardet, L., F. Dessailly, M. P. Carron, M. A. Rio, N. Michaux-Ferrière, and P. Montoro. 2009. Secondary somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.): an alternative process for long-term somatic embryogenesis. *J Rubber Res* 12(4):215–228.
- Mikula, A., K. Tomiczak, and J. J. Rybczyński. 2011. Cryopreservation enhances embryogenic capacity of *Gentiana cruciata* (L.) suspension culture and maintains (epi) genetic uniformity of regenerants. *Plant Cell Rep* 30: 565-574.
- Montoro, P., H. Etienne, N. Michaux-Ferrière, and M. P. Carron. 1993. Callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 33(3): 331-338.
- Montoro, P., M. P. Carron, L. Lardet, A. Clément-Demange, and J. Leclercq. 2010. Biotechnologies in rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *AsPac J Mol Biol Biotechnol* 18(1): 81-83.
- Montoro, P., M. P. Carron, F. Granet, L. Lardet, and J. Leclercq. 2012a. Development of new varietal types based on rejuvenation by somatic embryogenesis and propagation by conventional budding or microcutting in *Hevea brasiliensis*. *Acta Hort* 961:547.
- Montoro, P., M. P. Carron, F. Granet, L. Lardet, and J. Leclercq. 2012b. Development of new varietal types based on rejuvenation by somatic embryogenesis and propagation by conventional budding or microcutting in *Hevea brasiliensis*. CIBA workshop 22-24 October 2012.
- Pérez, M., M. A. Bueno, M. Escalona, P. Toorop, R. Rodríguez, and M. J. Cañal. 2013. Temporary immersion systems (RITA) for the improvement of cork oak somatic embryogenic culture proliferation and somatic embryo production. *Trees* DOI 10.1007/s00468-013-0876-y.
- Piyatrakul, P., R. A. Putranto, F. Martin, M. Rio, F. Dessailly, J. Leclercq, J. F. Dufayard, L. Lardet, and P. Montoro. 2012. Some ethylene biosynthesis and AP2/ERF genes reveal a specific pattern of expression during somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *BMC Plant Biol* 12:244.
- Satchuthananthavale, R. And Z. E. Irugalbandara. 1972. Propagation of callus from *Hevea* anthers. *Q J Rubb Res Ins Ceylon* 49:65-68.
- Wang, Z., C. Zeng, C. Chen, H. Wu, Q. Li, G. Fan, and W. Lu. (1980). Induction of rubber plantlets from anther of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. *Chinese J Tropic Crops* 1:25-26.