

POTENSI PEMANFAATAN TEKNOLOGI KULTUR JARINGAN DALAM PENYIAPAN BAHAN TANAM KARET UNGGUL

Potential Utilization of Tissue Culture Technology in Preparation of Superior Rubber Planting Materials

Fetrina Oktavia

Pusat Penelitian Karet, Jalan Palembang - Pangkalan Balai, Km. 29,
Sembawa, Banyuasin 30953, Sumatera Selatan
E-mail: fetrina_oktavia@yahoo.com

Diterima 1 Juni 2021 / Direvisi 10 Juli 2021 / Disetujui 25 Agustus 2021

Abstrak

Berbagai upaya dan pendekatan untuk menghasilkan bahan tanam karet unggul baru dengan kualitas yang lebih baik perlu terus dilakukan baik secara konvensional maupun modern. Penyediaan bahan tanam unggul secara konvensional melalui teknik okulasi masih merupakan pilihan terbaik yang digunakan saat ini di masyarakat dengan pertimbangan efektifitas dan aspek ekonomi yang lebih baik dibanding metode perbanyak vegetatif lainnya. Namun untuk skala massal, metode tersebut masih menghadapi berbagai kendala seperti keterbatasan batang atas sebagai sumber entres dan biji untuk batang bawah, keterbatasan tenaga okulasi yang terampil, adanya inkompatibilitas batang atas dan batang bawah serta rendahnya juvenilitas sumber mata entres yang digunakan yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan produksi tanaman. Perkembangan teknologi modern melalui kemajuan dibidang bioteknologi kultur jaringan merupakan suatu peluang bagi penyedia bahan tanam karet untuk meningkatkan mutu bahan tanam yang dihasilkan. Permasalahan juvenilitas akibat menurunnya mutu fisiologis entres karet yang telah berumur dan pengaruh batang bawah terhadap pertumbuhan dapat diatasi melalui embriogenesis somatik. Teknologi *microcutting* membantu mengatasi keterbatasan ketersediaan biji sebagai sumber batang bawah. Penggunaan bahan tanam karet asal

kultur jaringan mampu meningkatkan pertumbuhan dan produksi tanaman yang mencapai 30–36%. Melalui kultur jaringan penyediaan klonal bahan tanam karet dapat dilakukan secara massal dan seragam dalam waktu yang cepat serta kualitas bibit yang lebih terjamin.

Kata kunci: embriogenesis somatik, entres, *Hevea brasiliensis*, juvenilitas, klon, okulasi

Abstract

Various efforts and approaches to produce the new superior rubber planting materials with better quality have to be carried out both conventional and modern. The provision of superior planting material by conventional method through grafting techniques is still the best option currently used with considerations of effectiveness and economic aspects that are better than other vegetative propagation methods. However, for a mass scale, this method still has some of problems, such as the limitations of the scion as a source of budwood and seed for the rootstock, limitation of skilled grafting personnel, incompatibility of the scion and rootstock, and the low juvenility of the source of the budwood that can affect growth and production of crop. The development of modern technology advances in tissue culture biotechnology is an opportunity for rubber planting material providers to increase the quality of the planting material produced. Juvenility problems due to the decline of physiological quality of budwood which aged and the effect of rootstock to

growth could be overcome through somatic embryogenesis. Microcutting technology helps overcome the limitation of seed availability as a source for rootstocks. The use of rubber planting material from tissue culture can increase growth and production of plant up to 30–36%. Through tissue culture, the provision of rubber planting material can be done in mass and uniformly in short time and the quality of the planting material is more guaranteed.

Keywords: *somatic embryogenesis, budwood, Hevea brasiliensis, juvenility, clone, grafting*

Pendahuluan

Tanaman karet (*Hevea brasiliensis*) merupakan salah satu spesies utama penghasil karet alam yang termasuk kelompok famili Euphorbiaceae. Program seleksi genetik bahan tanam karet diawali dengan seleksi biji yang dilakukan oleh peneliti Hindia Belanda diperkebunan karet di Jawa dan Sumatera pada abad ke 20 (Simmonds, 1989). Pada kondisi tersebut dihasilkan pertanaman yang sangat beragam baik dari sisi pertumbuhan maupun produksi. Hal ini mendorong upaya pengembangan metode perbanyakan klonal secara vegetatif.

Penggunaan bibit unggul merupakan salah satu komponen teknologi penting yang akan menentukan keberhasilan budidaya tanaman karet. Upaya menghasilkan bahan tanam karet unggul baru dengan kualitas yang lebih baik perlu dilakukan dengan berbagai pendekatan baik secara konvensional maupun inkonvensional.

Penyediaan bahan tanam unggul secara konvensional dapat dilakukan dengan menggunakan metode perbanyakan vegetatif. Hingga saat ini metode yang dianggap paling efektif untuk perbanyakan bibit karet adalah melalui metode okulasi. Teknik tersebut membutuhkan dua komponen utama yaitu biji sebagai sumber benih batang bawah dan mata entres sebagai batang atas. Dalam penyediaan bibit karet skala massal, metode tersebut masih

menghadapi berbagai kendala utama seperti keterbatasan batang atas sebagai sumber entres dan biji untuk batang bawah, keterbatasan tenaga okulasi yang terampil, adanya inkompatibilitas batang atas dan batang bawah serta rendahnya juvenilitas sumber mata entres yang digunakan yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan produksi tanaman. Hal ini merupakan tantangan bagi produsen bahan tanam karet kedepannya.

Perkembangan kemajuan dibidang bioteknologi kultur jaringan merupakan suatu peluang bagi penyedia bahan tanam karet untuk meningkatkan mutu bahan tanam yang dihasilkan. Melalui kultur jaringan penyediaan bahan tanam karet secara vegetatif dapat dilakukan secara massal dan seragam dalam waktu yang cepat serta kualitas bibit yang lebih terjamin. Dalam artikel ini akan dijelaskan perkembangan teknologi dan potensi pemanfaatan kultur jaringan tanaman karet dalam upaya penyiapan bibit karet unggul secara cepat dan massal.

Perbanyak Vegetatif Bibit Karet

Berbagai metode perbanyakan bahan tanam dapat diaplikasikan pada penyediaan bibit karet, namun yang diharapkan adalah perbanyakan secara vegetatif. Hal ini disebabkan karena tanaman karet memiliki heterozigositas yang tinggi sehingga perbanyakan secara generatif akan menghasilkan tanaman yang sangat beragam. Sedangkan untuk perkebunan karet yang diharapkan adalah tanaman yang seragam secara genetik sehingga diperlukan perbanyakan secara vegetatif. Pemanfaatan teknik okulasi telah sukses digunakan untuk penyiapan bahan tanam karet dalam skala kecil. Namun untuk memenuhi kebutuhan skala besar masih menghadapi kendala, sehingga teknologi kultur jaringan sangat diperlukan.

Secara genetik tidak terdapat perbedaan pada bibit yang diperbanyak secara vegetatif dengan berbagai metode yang berbeda baik melalui okulasi, stek, sambung cangkok, maupun melalui kultur jaringan. Namun pada

perbanyak bibit menggunakan okulasi terdapat pengaruh batang bawah terhadap fisiologis batang atas yang akan menentukan genetik dari bibit yang dihasilkan. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pengaruh tersebut terjadi akibat adanya perbedaan tingkat kompatibilitas antara batang atas dan batang bawah yang dapat mempengaruhi keberhasilan okulasi, pertumbuhan bibit hasil okulasi serta pertumbuhan dan produksi tanaman di lapangan (Goncalves dan Martin 2002; Cardinal *et al.*, 2007 ; Gireesh *et al.*, 2017;

dan Yao *et al.*, 2017). Penggunaan teknik perbanyak bibit karet dengan kultur jaringan dapat mengatasi permasalahan tersebut. Kongsawadworakul *et al.* (2009) menyatakan bahwa bibit asal kultur jaringan memiliki toleransi yang lebih baik terhadap kering alur sadap akibat berkurangnya masalah fisiologis yang terkait dengan inkompatibilitas batang bawah dan batang atas. Tabel 1 menunjukkan perbedaan karakteristik bibit karet asal okulasi dengan asal kultur jaringan.

Tabel 1. Perbedaan karakteristik bibit karet asal okulasi dengan kultur jaringan

NO	KARAKTERISTIK	OKULASI	KULTUR JARINGAN
1	Waktu yang dibutuhkan	3 – 15 bulan	3 – 8 bulan
2	Tenaga Kerja yang dibutuhkan	Banyak	Sedikit
3	Lahan yang dibutuhkan	Luas	Kecil
4	Ketergantungan terhadap musim	Ya	Tidak
5	Rata -rata tingkat keberhasilan	70%	60%
5	Jumlah tanaman yang dihasilkan	Terbatas	Massal
6	Pengaruh batang bawah	Ada	Tidak ada
7	Juvenilitas bibit	Rendah	Tinggi
8	Variasi somaklonal	Tidak ada	Ada
9	Keragaan bibit yang dihasilkan	Beragam	Seragam

Perkembangan Kemajuan Kultur Jaringan Tanaman Karet

Studi kultur jaringan tanaman karet mulai dilaporkan pada tahun 80-an. Berbagai bagian organ tanaman dilaporkan telah digunakan sebagai sumber eksplan untuk induksi embriogenesis somatik diantaranya adalah anther (Wang *et al.*, 1980; Wan *et al.* 1982;

Tahardi, 1998; Jayasree *et al.*, 2003), dinding integumen dalam (Carron dan Enjarlic, 1985; Montoro *et al.*, 2004), akar (Zhou *et al.*, 2010), kotiledon (Tiandai *et al.*, 2005; Yuwei, 2011; Dickson *et al.*, 2011), ovul (Jayashree *et al.*, 2011), serta nodus, tunas aksilar dan apikal (Mayati dan Jamnah, 2014). Setiap jenis eksplan dilaporkan memberikan respon yang

berbeda, dan diantara semua jenis eksplan tersebut, eksplan anther dan dinding integumen memberikan respon yang lebih baik dalam hal keberhasilan menginduksi kalus embriogenik dan embrio somatik (Mignon dan Werbrouck, 2018). Hal ini kemungkinan disebabkan karena kedua organ yang digunakan sebagai sumber eksplan berasal dari jaringan muda dan secara ontogeni tingkat juvenilitasnya sangat tinggi sehingga dapat meningkatkan kualitas juvenilitas planlet yang dihasilkan (Lardet *et al.*, 2009; Monteuuis *et al.*, 2016). Selanjutnya kedua sumber eksplan tersebut saat ini digunakan pada pengembangan embriogenesis somatik pada berbagai klon karet di berbagai Lembaga penelitian yang melakukan kegiatan kultur jaringan tanaman karet.

Salah satu tantangan dalam perbanyakan bahan tanam melalui kultur jaringan adalah peluang terjadinya perubahan genetik pada planlet yang dihasilkan. Variasi somaklonal tersebut dapat bernilai positif apabila perbanyakan bertujuan untuk mendapatkan tanaman dengan variasi genetik baru. Namun akan bernilai negatif apabila bertujuan untuk perbanyakan tanaman yang seragam, sehingga perlu dilakukan pengujian kestabilan genetik planlet yang dihasilkan. Berbagai studi analisis variasi somaklonal telah dikembangkan menggunakan teknik molekuler seperti RAPD, SSR, AFLP dan RFLP, dan beberapa primer telah berhasil mengidentifikasi genotipe tanaman (Meszaros *et al.*, 2007; Minano *et al.*, 2009; Srichuay & Te-chato, 2014). Evaluasi stabilitas genetik melalui analisis tingkat ploidi dan jumlah kromosom diketahui bahwa tidak terjadi perubahan ploidi dan jumlah kromosom, dimana kalus, embrio, dan planlet karet yang diinduksi dari eksplan anther memiliki ploidi dan jumlah kromosom yang sama ($diploid=2n=36$) dengan pohon induk (Srichuay & Te-chato, 2015; Wang *et al.*, 2017). Variasi genetik lokus EST-SSR ditemukan pada planlet karet, namun persentase variasi masih tergolong rendah, yaitu <2,61%, sehingga tidak berpengaruh

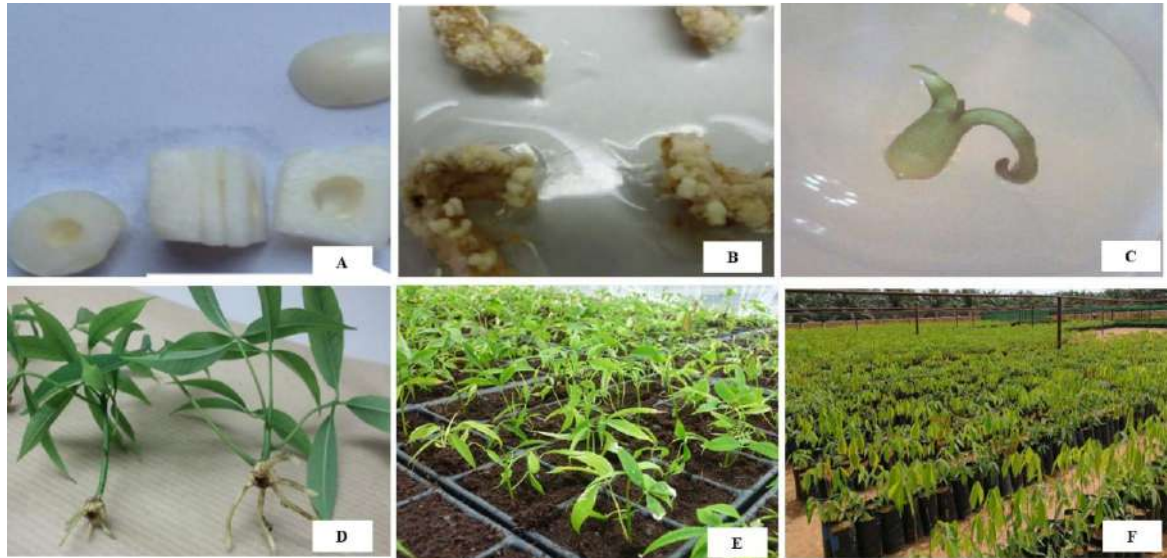
terhadap fenotipe (Srichuay & Te-chato, 2015; Huang *et al.*, 2017).

Berbagai teknik *in vitro* yang sudah dikembangkan untuk perbanyakan bahan tanam karet melalui kultur jaringan adalah metode embriogenesis somatik (ES) dan organogenesis melalui induksi tunas aksilar melalui *microcutting*. Melalui pendekatan metode ES permasalahan yang terkait dengan penyediaan entres bermutu dan inkompatibilitas dalam okulasi dapat diatasi. Mignon dan Werbrouck (2018) menyatakan bahwa embriogenesis somatik merupakan teknologi kunci untuk penyiapan bahan tanam karet dimasa depan. Bahan tanam yang dihasilkan dari ES disebut juga dengan *self-rooting juvenile clones* karena memiliki perakaran sendiri sehingga terbebas dari inkompatibilitas dengan batang bawah serta memiliki tingkat juvenilitas yang tinggi sehingga memiliki pertumbuhan dan produksi yang lebih baik. Berdasarkan analisis transkriptom gen-gen yang terlibat dalam mekanisme produksi lateks melalui sekuensing metode Illumina terlihat bahwa terdapat peningkatan ekspresi gen-gen regenerasi dan durasi aliran lateks antara pada tanaman asal ES dibandingkan dengan tanaman yang diperbanyak secara okulasi (Li *et al.*, 2016).

Secara umum perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan dilakukan hanya melalui metode embriogenesis somatik atau organogenesis tergantung jenis tanamannya. Namun pada tanaman karet, perbanyakan melalui kultur jaringan menggunakan penggabungan kedua metode tersebut. Hal ini dilakukan karena tingkat keberhasilan induksi embrio pada eksplan tanaman karet baik secara langsung (*direct*) maupun tidak langsung melalui pengkalusan (*indirect*) masih mengalami keterbatasan dalam hal jumlah embrio yang dihasilkan. Hal ini menjadikan embrio yang terbentuk, dijadikan sebagai eksplan lanjutan untuk menginduksi tunas aksilar melalui proses organogenesis. Metode tersebut dilaporkan sudah sukses digunakan dalam produksi bibit karet kultur jaringan

secara massal (Masson dan Monteuis, 2016; Maene *et al.*, 2020). Gambar 1 menunjukkan skema tahapan penyiapan bibit karet secara

kultur jaringan mulai dari penyiapan eksplan sampai bibit ditanam dilapangan.



Gambar 1. Skema tahapan penyiapan bibit karet asal kultur jaringan yang terdiri dari penyiapan ekplan (A), induksi kalus embriogenik (B) dan embrio somatik (*indirect somatic embryogenesis*) (C), perbanyak planlet melalui *microcutting* (D), aklimatisasi di rumah kaca (E) serta persiapan di pembibitan (F) (Maene *et al.*, 2020)

Kendala Dalam Penyiapan Bibit Karet Melalui Kultur Jaringan

Perbanyak massal bibit karet secara kultur jaringan masih menghadapi berbagai kendala baik terkait dengan proses penyiapan planlet di laboratorium maupun aklimatisasi di rumah kaca dan lapangan. Keberhasilan induksi embryogenesis somatik sangat ditentukan oleh berbagai faktor seperti jenis eksplan dan klon yang digunakan, jenis dan komposisi media serta kondisi lingkungan kultur. Keberhasilan proses embryogenesis somatik masih terbatas pada klon-klon tertentu seperti PB 260, RRIM 600, PB 330, BPM 24, dan IRCA 109. Permasalahan yang sering muncul adalah terjadinya *browning* pada eksplan, kalus dan embrio yang terbentuk, abnormalitas pada embrio yang dihasilkan (pertumbuhan embrio tidak ideal) serta perbedaan respon setiap klon pada media dan metode yang digunakan. Hal ini sangat terkait

dengan perbedaan genetik dari masing-masing klon yang akan mempengaruhi fisiologi dan aktivitas metabolisme dari klon tersebut. Permasalahan perbedaan respon klon mengakibatkan kultur jaringan baru dapat diterapkan pada klon-klon tertentu dan tidak semua klon dapat diperbanyak secara kultur jaringan sehingga diperlukan pengembangan metode lebih lanjut pada klon-klon tersebut. Hal ini mengakibatkan kemajuan kultur jaringan tanaman karet tidak semaju pada tanaman lainnya.

Permasalahan utama lainnya adalah terkait proses aklimatisasi yang merupakan tahapan kritis penentu keberhasilan perbanyak bibit karet secara kultur jaringan. Optimasi kondisi lingkungan dengan cara pengaturan kondisi suhu, kelembapan, dan intensitas cahaya merupakan hal utama yang perlu dilakukan agar kemampuan bertahan hidup planlet saat dipindah dari lingkungan *in vitro* ke lingkungan

in vivo dapat dipertahankan. Tabel 2 menunjukkan kondisi optimum rumah kaca

pada saat aklimatisasi planlet tanaman karet (Lavanya *et al.*, 2009; Oktavia *et al.*, 2020).

Tabel 2. Kondisi iklim optimal untuk aklimatisasi tanaman karet di rumah kaca

No	Parameter	Kondisi Optimal
1	Suhu	28–30 °C
2	Kelembapan	> 90%
3	Intensitas cahaya	4000 – 12000 lux

Sumber: Lavanya *et al.*, 2009; Oktavia *et al.*, 2020

Kondisi aklimatisasi ini sangat penting bagi tahapan aklimatisasi tanaman karet untuk daerah tropis seperti di Indonesia. Penelitian menunjukkan bahwa kemampuan bertahan hidup planlet karet saat aklimatisasi di rumah kaca pada kondisi iklim yang sudah diatur pada kelembapan berkisar 73,3%–83,8% (Sumaryono *et al.*, 2012; Sinta *et al.*, 2013; Oktavia *et al.*, 2020). Namun pada kondisi subtropis, keberhasilan aklimatisasi planlet karet mencapai 90%, lebih tinggi dibanding pada iklim tropis (Le Conte dan Carron, 1988). Hal ini diduga karena pengaturan kondisi agroklimat lingkungan tumbuh (rumah kaca) seperti tingkat kelembapan dan suhu yang lebih baik dan sesuai dengan planlet karet serta minimnya serangan penyakit, baik penyakit gugur daun maupun penyakit akar dan batang pada daerah subtropis.

Kendala lain yang sering dialami adalah pada saat tanaman harus dipindah ke lapangan. Kondisi perubahan iklim dan lingkungan dapat menjadi ancaman bagi pertumbuhan planlet. Pada kondisi iklim tropis seperti di Indonesia kondisi suhu dan kelembapan yang tinggi berpotensi meningkatkan terjadinya serangan penyakit gugur daun (*Pestalotiopsis*, *Corynespora*, *Colletotrichum*, dan *Oidium*), mati pucuk, kanker batang, serta jamur akar putih. Potensi serangan penyakit tersebut sangat tinggi, karena adanya penyebaran spora patogen yang terjadi melalui udara, air, dan media tanah yang digunakan. Hal ini menuntut perlunya perhatian yang intensif pada pemeliharaan dan perlindungan tanaman. Gambar 2 menunjukkan kondisi aklimatisasi planlet karet di rumah kaca dan pembibitan (*nursery*).



Gambar 2. Kondisi planlet karet di rumah kaca (a) dan pembibitan (b) (Maene *et al.*, 2020)

Performa Bibit Karet Asal Kultur Jaringan di Pembibitan dan Lapangan

Secara prinsip performa bibit karet asal kultur jaringan sama dengan performa bibit asal stek atau biji (*seedling*), yaitu tanaman tumbuh lurus dan memiliki perakaran sendiri (*self rooted-plant*). Hal ini berbeda dengan bibit karet asal okulasi yang memiliki persambungan batang atas dengan batang bawah seperti yang terlihat pada Gambar 3.

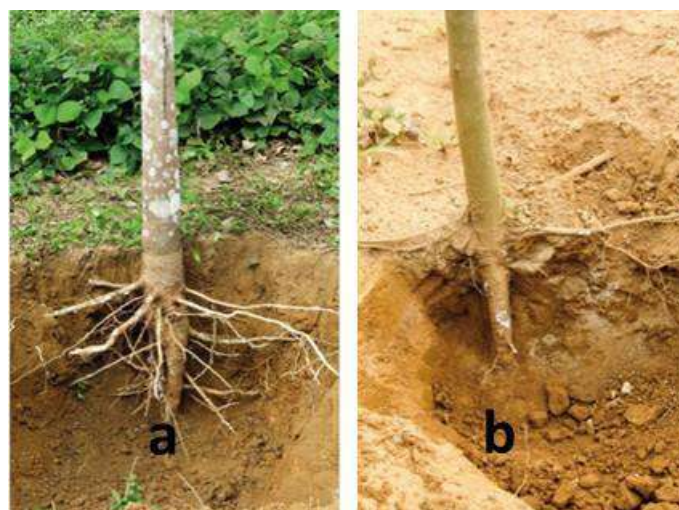
Apabila diperhatikan dari sistem perakaran, perkembangan perakaran bibit asal

kultur cukup bagus baik pada saat selesai tahapan aklimatisasi maupun pada saat bibit siap ditanam di lapangan. Diharapkan dengan sistem perakaran yang kuat tanaman dapat menyerap nutrisi dengan lebih baik sehingga pertumbuhan dan produksi dapat meningkat.

Berdasarkan penelitian di lapangan terlihat bahwa sistem perakaran tanaman asal bibit kultur jaringan berkembang dengan baik, mengikuti pertumbuhan sistem perakaran tanaman asal bibit okulasi (Gambar 4). Namun demikian masih terdapat kelemahan



Gambar 3. Perbandingan performa bibit karet asal kultur jaringan (a) dan asal okulasi (b) di Pusat Penelitian Karet, Sembawa



Gambar 4. Perbandingan performa sistem perakaran tanaman karet asal *microcutting* (a) dan okulasi (b) di lapangan (Masson dan Monteuis, 2017)

terutama terkait dengan perkembangan akar tunggang yang tidak sempurna (akar tunggang semu), sehingga beresiko ditanam pada daerah berangin. Penggunaan bahan tanam karet asal kultur jaringan mampu meningkatkan pertumbuhan dan produksi tanaman yang mencapai 30 – 36% (Maene *et al.*, 2020; Mayati *et al.*, 2018; 2021). Namun terkait dengan permasalahan serangan penyakit jamur akar putih pada tanaman karet,

belum terlihat perbedaan ketahanan bahan tanam asal kultur jaringan dengan okulasi. Berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa perbanyak bibit karet unggul melalui kultur jaringan baik sebagai tanaman utuh dengan sistem perakaran sendiri (*self rooted-plant*) maupun sebagai sumber batang bawah (*rootstock*) memiliki prospek yang baik di masa depan.



Gambar 5. Performa pertumbuhan (A) dan produksi (B) klon karet RRIM 2025 asal embryogenesis somatik umur 14 tahun di lapangan (Mayati *et al.*, 2018)

Kesimpulan

1. Teknologi kultur jaringan baik melalui *somatic embryogenesis* (SE) maupun *microcutting* memiliki prospek yang bagus dalam penyiapan bahan tanam karet unggul secara cepat, seragam, dan massal.
2. Bibit karet asal SE memiliki pertumbuhan dan produksi 30%–36% lebih tinggi dibanding tanaman asal okulasi karena tidak adanya pengaruh kompatibilitas dari batang bawah yang dapat menghambat pertumbuhan dan menurunkan produksi.
3. Terdapat beberapa kendala yang masih dihadapi dalam menghasilkan bibit karet asal kultur jaringan yaitu respon klon yang berbeda terhadap setiap media sehingga induksi kalus dan embryogenesis hanya

berhasil pada klon tertentu dan jumlah embrio yang masih terbatas dihasilkan, tingkat keberhasilan aklimatisasi yang masih terbatas serta tidak berkembangannya akar tunggang dengan baik (akar tunggang semu).

Daftar Pustaka

- Cardinal, A.B.B., Goncalves, P.S., & Martins, A.L.M. (2002). Stock-scion interactions on growth and rubber yield of *Hevea brasiliensis*. *Scientia Agricola*, 64(3): 235-240.
- Carron, M.P., & Enjarlic, F. (1985). Somatic embryogenesis from inner integument of the seed of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. *CR. Academia Science*, 300: 653-658.

- Dickson, I., Okere, A., Elizabeth, J., Mary, O., Olatunde, F., & Abiodun, S. (2011). In-vitro culture of *Hevea brasiliensis* (rubber tree) Embryo. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 3(9): 185-189.
- Gireesh, T., Mercykutty, V.C., & Mydin, K.K. (2017). Intraclonal Variability in Growth and Yield of *Hevea brasiliensis*: Role of Age of Source Bush Nurseries. Paper presented at the International Rubber Conference. Ivory Coast.
- Goncalves, P.S. & Martins, A.L.M. (2002). Combining ability effect of clonal rootstocks and scions in rubber trees (*Hevea*). *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2(3): 445-452.
- Jayasree, P.K., Asohan, M.P., Sobha, S., Ammal, S., Rekha, K., Kala, R.G., Jayasree, R., & Thulasepdharan, A. (2003). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature anthers of *Hevea brassiliensis* (Muell.) ArgX. <http://www.ias.ac.in/currsci/may10/articles22.htm>.
- Jayashree, R., Rekha, K., Sushamakumari, S., Sobha, S., & Thulaseedharan, A. (2011). Unfertilized ovule - a potential explant for somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. Paper presented at the IRRDB Inter Rubber Conf. 15 – 16 December 2011. Chiang Mai, Thailand.
- Kongsawadworakul, P., Viboonjun, U., Romruensukharom, P., Chantuma, P., Ruderman, S. & Chrestin, H. (2009). The leaf, inner bark and latex cyanide potential of *Hevea brasiliensis*: evidence for involvement of cyanogenic glucosides in rubber yield. *Phytochemistry*, 70(6): 730–739. 10.1016/j.phytochem. 2009.03.020.
- Lardet, L., Dessailly, F., Carron, M.P., Rio, M., Ferrière, N., & Montoro, P. (2009). Secondary somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.): An alternative process for long-term somatic embryogenesis. *Journal of Rubber Research*, 12(4): 215-227.
- Lavanya, M., Venkateshwarlu, B., & Devi, B.P. (2009). Acclimatization of neem microshoots adaptable to semi-sterile conditions. *Indian Journal of Biotechnology*, 8: 218–222.
- Leconte. A., & Carron, M.P. (1988). Acclimatization of microcuttings from rubber (*Hevea brasiliensis*): Problem and perspective. In J.L. Jacob & J.C. Prevot (eds). *Compte-Rendu du Colloque Exploitation-Physiologie et Amelioration de Hevea*. Colloque Hevea IRRDB. IRCA/CIRAD. Paris. 2 Novembre 1988. p 499–503.
- Li, H.L., Guo, D., Zhu, J.H., Wang, Y., Chen, X.T., & Peng, S.Q. (2016). Comparative Transcriptome Analysis of Latex Reveals Molecular Mechanisms Underlying Increased Rubber Yield in *Hevea brasiliensis* Self-Rooting Juvenile Clones. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1204-1204. doi: 10.3389/fpls.2016.01204.
- Maene, L., Tojal, C., Vandenbussche, F., & Ruth, J. (2020). *Hevea* Tissue Culture Plant Material: Advancement and Benefits. Paper presented at the Global Rubber Conference, Bangkok, 12–13 November 2020.
- Mayati, N.C.H., & Jamnah, A.R. (2014). Induction of shoots and roots from vegetative tissue culture *Hevea brasiliensis* RRIM 2000. *Journal of Tropical Plant Physiology*, 6:1-9.
- Mayati, N.C.H., & Ahmad, A.R. (2018). Preliminary results of latex yield profile and growth performance of tissue culture derived *Hevea brasiliensis* trees. *Journal of tropical plant physiology*, 10(1): 46-55.
- Mayati, N.C.H., Izilawati, M., & Hadafi, A.S.I. (2021). Growth rates of tissue culture *Hevea brasiliensis* (rubber) trees. *Trans. Malaysian Soc. Plant Physiology*, 28: 67-70.
- Meszaros, K., Karsai, I., Kuti, C., Banyai, J., Lang, L., & Bedo, Z. (2007). Efficiency of different marker systems for genotype fingerprinting and for genetic diversity studies in barley (*Hordeum vulgare* L.). *South African Journal of Botany*, 73: 43-48.

- Minano, H. S., Gonzalez-Benito, M. E., & Martin, C. (2009). Molecular characterization and analysis of somaclonal variation in chrysanthemum cultivars using RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 122: 238–243.
- Montoro, P., Teinseree, N., Rattana, W., Kongsawadworakul, P., & Michaux-Ferriere, N. (2004). Effect of exogenous calcium on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer in *Hevea brasiliensis* (rubber tree) friable calli. *Plant Cell Report*, 13(8): 851–855.
- Monteuuis, O. (2016). Micropropagation and production of forest trees. In: *Vegetative propagation of forest trees. Part 1: Development and trends in vegetative propagation of forest trees*, Eds Y. S. Park, J. M. Bonga, H. K. Moon, NIFOS, Korea, 32–55.
- Mosson, A. & Monteuuis, O. (2017). Rubber tree clonal plantations: grafted vs self-rooted plant material. *Bois Et Forêts Des Tropiques*, 332(2): 57–68
- Mignon, E., & Werbrouck, S. (2018). *Somatic Embryogenesis as Key Technology for Shaping the Rubber Tree of the Future*. *Frontiers Plant Science*, 9(1804): 1–9. doi: 10.3389/fpls.2018.01804
- Oktavia, F., Stevanus, C.T., & Dessaily, F. (2020). Optimasi kondisi suhu dan kelembapan serta pengaruh media tanam terhadap keberhasilan aklimatisasi tanaman karet asal embriogenesis somatik. *Jurnal Penelitian Karet*, 38(1): 1–15.
- Sinta, M.M., Nurhaimi-Haris, & Sumaryono. (2013). Pengaruh periode pra-kondisi dan penutupan sungkup terhadap daya hidup planlet karet. *Menara Perkebunan*, 81(1): 16–22.
- Sumaryono, Sinta, M.M., & Nurhaimi-Haris. (2012). Daya hidup planlet karet asal *in vitro microcutting* pada berbagai periode penutupan sungkup plastik dan komposisi media tumbuh. *Menara Perkebunan*, 80(1): 25–31.
- Srichuay, W., & Te-chato, S. (2014). Analysis of somaclonal variation from In Vitro-derived plantlets of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Princess of Naradhiwas University Journal* 6: 117–124
- Tahardi, J.S. (1998). Plant regeneration in *Hevea brasiliensis* via somatic embryogenesis. *Menara Perkebunan*, 66(1): 1–8.
- Tiandai, H., L. Weiguo, H. Huasun, & Zhe. (2005). Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon explants of *Hevea brasiliensis*. Paper presented at International Natural Rubber Conference, India.
- Wan, A.R., Gandhimathi, H., Rohani, O., & Paranjothy K. (1982). Recent development in tissue culture of *Hevea*. COSTED. Singapore.
- Wang, Z., Zeng, X., Chen, C., Wu, H., Li, Q., & Fan, G. (1980). Induction of rubber plantlets from anther of *Hevea brasiliensis* in vitro. *China Journal Tropical Crops*, 1: 25–26.
- Huang, T.D., Huang, H.S. & Wang, T.D. (2017). Origin of Secondary Somatic Embryos and Genetic Stability of the Regenerated Plants in *Hevea brasiliensis*. *Journal of Rubber Research*, 20 : 101–116 <https://doi.org/10.1007/BF03449145>
- Yuwei, H. (2011). Propagation and Plantation of self-rooting juvenile clones in China. Paper presented at Breeding Seminar, 12-14 September 2011. Koh Samui, Thailand.
- Zhou, Q.N., Jiang, Z.H., Huang, T.D., Li, W.G., Sun, A.H., Dai, X.M., & Li, Z. (2010). Plant regeneration via somatic embryogenesis from root explants of *Hevea brasiliensis*. *African Journal of Biotechnology*, 9 (4 8) : 8 1 6 8 - 8 1 7 3 . D O I : 10.5897/AJB10.969.