

**TRANSFORMASI *Agrobacterium rhizogenese* DAN INDUKSI AKAR RAMBUT  
PADA TANAMAN KAKAO (*Theobroma cacao*) UNTUK PRODUKSI SENYAWA  
ANTIOKSIDAN SECARA INVITRO**

**Sumaryati Syukur<sup>1</sup> dan Zozy Aneloi N<sup>2</sup> dan Femilya Putri<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorium biokimia/bioteknologi Jurusan Kimia FMIPA Unand Padang

<sup>2</sup>Laboratorium fisiologi tumbuhan Jurusan Biologi FMIPA Unand Padang

**ABSTRACT**

Transformation of Ri T-DNA Plasmid *Agrobacterium rhizogenese* to varieties *Theobroma cacao* variety TSH which is growing in west Sumatra and induction of hairy roots in order to produce bioflavonoid antioxidant compounds such as, catechin, polyfenol, or monomer and oligomer flavones was successfully obtained. Three species of *A.rhizogenese* (A4,LBA 9457 and ATTCC 15834) originally from LIPI was used to transform Ri T-DNA plasmid in MS medium via cacao embryo culture. The aim of this paper is to determine the affectivity and ability of the three species of bacterial above to produce hairy roots in cacao invitro culture. The statistical methods RAL was uses with 4 time treatments and 6 time repeated experiments. As treatment was bacterial inoculation and without inoculation as a control. The transformation result shows 2 of 3 of bacterial species have ability to induce hairy roots of.T cacao embryos counting by percentages of explants with producing hairy roots 16.66% for A4, 83.33% for LBA 9547 spesies.qualitative test of polyfenol from hairy roots transformants give (+4) as compared to non transform only (+1). Cathechin compound was determined by spectrophotometer as much as 0.1% for non transform and 0.87 % for hairy roots transformants by LBA 9547. Conformation of plasmid Ri T-DNA hairy roots from two transformants was analysis by PCR methods. The two primers rol B1 (5<sup>2</sup>ATGGATCCCAAATTGCTTCCCCACGA3<sup>2</sup>) dan rol B<sup>2</sup> (5<sup>3</sup> TTAGG CTTTCATTCGGGTTTACTGCAGC 3<sup>3</sup>) was used. For TR-DNA the primes used is TRI (5<sup>3</sup> GGAAATTGTGGCGTTGTTGTGGAC 3<sup>3</sup>) and TR2 (5<sup>7</sup> AATCGTTCAGAGAGCGTCCGA AGTT 3<sup>7</sup>) . PCR analysis of DNA electrophoresis founded the band of TL region at 780 bp and TR at 1600 bp using DNA Ladder as DNA standard.

**Keywords :** transformation *A.rhizogenese*, PCR, *Theobroma cacao*, kultur embrio, kultur akar rambut, metabolit sekunder, cathechin

**PENDAHULUAN**

Tanaman kakao adalah tanaman yang mempunyai nilai ekonomi tinggi karena biji kakao telah terkenal dapat dibuat aneka macam pangan olahan yang disebut coklat. Dark coklat (makanan coklat yang terdiri dari 70% bubuk coklat asli) mempunyai nutrisi tinggi, karena mengandung berbagai bioaktifitas senyawa antioksidan bioflavonoid seperti, polifenol, monomer serta Oligomer ProCianidin (OPC), katekin, epikatekin,

vitamin C yang dapat bersifat sebagai senyawa antimutagenik dan antitumor. Biji kakao juga mengandung senyawa asam lemak yang tinggi sekitar 40% diantaranya asam lemak jenuh stearat, asam lemak tak jenuh oleat dan linoleat.

Senyawa antioksidan bioflavonoid yang terdapat pada tanaman kakao 60% dari total fenolik adalah monomer flavanol yaitu katekin dan epikatekin serta oligomer prosianidin. Senyawa-senyawa tersebut dilaporkan mempunyai aktifitas antioksidan paling tinggi

dibandingkan dengan yang berasal dari sumber tanaman lain seperti pada, strobery, bluebery, anggur dll. Senyawa senyawa tersebut sangat berpotensi untuk melawan radikal bebas, menjaga kestabilan denyut jantung, sebagai antibiotik dan antikanker didalam tubuh manusia. Senyawa bioflavonoid yang bersifat antioksidan paling tinggi yaitu 60% dari total polifenol pada tanaman kakao adalah senyawa polifenol katekin, epikatekin dan prosianidin<sup>[1]</sup>.

Penelitian ini mempunyai prospek kedepan untuk produksi senyawa antioksidan turunan bioflavonoid katekin, epikatekin dan OPC secara *in vitro* dengan memanfaatkan transformasi T-DNA plasmid Ri *A. rhizogenes* untuk membentuk akar rambut. Seleksi galur *A. rhizogenes* untuk menginduksi akar rambut, menjadi tujuan utama dan komposisi medium tumbuh untuk tujuan meningkatkan pertumbuhan kultur dan produksi katekin juga menjadi perhatian berikutnya. Penelitian transformasi plasmid Ri T-DNA melalui *A. rhizogenese* belum pernah dilaporkan di jurnal nasional maupun internasional. Prospek lain dari keberhasilan teknik transformasi ini sudah dapat memproduksi senyawa antioksidan lain melalui pembentukan akar rambut yang dapat bermanfaat untuk kesehatan dan belum banyak diteliti.

Sugawa mengemukakan bahwa kultur akar rambut sebagai salah satu bentuk dari teknik kultur jaringan merupakan hasil transformasi secara genetik menggunakan *Agrobacterium rhizogenes*<sup>[2]</sup>. Kultur akar rambut memberikan banyak keuntungan, antara lain pertumbuhan jauh lebih cepat dibandingkan akar normal dan memiliki kestabilan genetik dan biokimia, serta mampu mengekspresikan pembentukan produk metabolit secara stabil sepanjang periode kultur. Toivonen L. melaporkan pada beberapa tanaman, produksi metabolit sekunder dilaporkan lebih tinggi pada akar rambut dibandingkan dengan akar dari tanaman normal atau yang diproduksi dari tanaman asalnya<sup>[3]</sup>. Hal ini menjadi dasar untuk mengembangkan penelitian akar rambut dari *T. cacao* yang tersebar di Sumatera Barat.

*A. rhizogenes* merupakan bakteri tanah yang secara alami menyebabkan penyakit berupa terbentuknya akar rambut pada berbagai tanaman. Adanya plasmid Ri (*root inducing*

*plasmid*) didalam sel *A. rhizogenes* mengakibatkan terjadinya transformasi dengan masuknya bagian T-DNA sel bakteri ke dalam DNA sel tanaman dan menyebabkan terbentuknya akar rambut pada bagian tanaman yang diinfeksi. Hasil transformasi yang berupa akar rambut dapat ditumbuhkan secara *in vitro* dan dapat dipertahankan mempunyai sifat seperti tanaman induknya, walaupun sudah terbebas dari bakteri. Menurut Giri dan Narasu ada beberapa faktor yang diketahui mempengaruhi keberhasilan dan efisiensi transformasi melalui *Agrobacterium* antara lain adalah kondisi kultur jaringan dan kondisi ko-kultivasi, kesesuaian galur bakteri dengan tanaman, komposisi medium yang digunakan dan pemilihan jaringan sebagai materi awal<sup>[4]</sup>. Dari penelitian yang telah dilakukan terhadap dua jenis kina (*Cinchona ledgeriana* dan *C. succirubra*) diketahui bahwa dari 10 galur yang diuji, hanya *A. rhizogenes* galur LBA 9457 yang mampu menginduksi akar rambut kedua jenis kina.

Biji kakao kering mengandung 12-18% senyawa fenolik dimana 60% dari total fenolik adalah monomer flavanol yaitu katekin, epikatekin dan oligomer prosianidin. Senyawa-senyawa tersebut dilaporkan sangat berpotensi untuk melawan radikal bebas dan sebagai antioksidan tinggi didalam tubuh<sup>[5]</sup>. Dilaporkan juga bahwa senyawa antioksidan pada kakao dapat mencegah penyakit kardiovaskular<sup>[6]</sup> sebagai antioksidan utama untuk kesehatan<sup>[7]</sup>, dan sumber flavonoid yang sangat baik untuk antioksidan katekin dan prosianidin adalah terbaik jika ada dalam makanan.

Katekin dan epikatekin merupakan senyawa antioksidan utama dari tanaman kakao disamping senyawa polifenol, kuersetin, dan dimer flavon lain. Sebagai antioksidan yang paling banyak digunakan adalah (+) katekin atau "cyanidol-3" yang dikenal dengan prosianidin, adalah untuk pengobatan hepatitis akut maupun kronis yang disebabkan oleh virus hepatitis<sup>[8]</sup>. Dari data yang terdapat dalam Informasi Spesialite Obat (ISO) Indonesia satu produk yang juga mengandung senyawa katekin tinggi adalah tablet entrodial untuk anti-diare.

Mei dkk menginokulasikan bagian kotiledon dan hipokotil dari *Alhagi pseudoalhagi* dengan

*A. rhizogenes* galur A4 pada medium Murashige Skoog (MS) bebas hormon dan memperlihatkan pertumbuhan sejumlah akar rambut dalam waktu 10 hari<sup>[9]</sup>. Hasil penelitian Ermayanti dkk menggunakan *A. rhizogenes* galur ATCC 15834 berhasil menginduksi akar rambut dari eksplan daun Mimba (*Azadirachta indica*)<sup>[10]</sup>. Induksi akar rambut juga telah berhasil dilakukan pada tanaman gambir dengan menggunakan *A. rhizogenes* galur A4, LBA 9457 dan ATCC 15834.

Penelitian tentang kultur akar rambut pada tanaman kakao belum ada dilaporkan, namun kultur jaringan untuk induksi pembentukan kalus secara *invitro* pada *T. cacao* yang berhasil mendapatkan kalus pada medium MS dengan penambahan 11 mM IAA dan 0,47 mM kinetin dengan menggunakan kotiledon telah dilaporkan oleh Muswita<sup>[11]</sup>, namun penelitian tentang *T. cacao* berkaitan dengan produksi metabolit sekunder katekin belum pernah dilaporkan. Oleh karena itu dirasa perlu melakukan penelitian ini karena dapat memperoleh akar rambut hasil tanaman transgenik pada tanaman kakao. Penelitian ini merupakan tahap awal dari serangkaian penelitian untuk menghasilkan teknologi kultur akar rambut pada *T. cacao*, khususnya penggunaan beberapa galur *A. rhizogenes* untuk mendapatkan galur yang terbaik pada transformasi *T. cacao* dalam upaya produksi senyawa flavonoid katekin yang masih diimpor hingga saat ini. Kultur akar rambut yang menghasilkan katekin tinggi mempunyai prospek baik untuk produksi katekin secara bioteknologi.

## METODOLOGI

Penelitian ini dilakukan dengan metode Rancangan Acak Lengkap dengan 4 perlakuan dan 6 ulangan. Sebagai perlakuan adalah penggunaan beberapa galur *A. rhizogenes* yaitu:  
 A = tanpa *A. Rhizogenes*,  
 B = *A. rhizogenes* galur A4,  
 C = *A. rhizogenes* galur LBA 9457,  
 D = *A. rhizogenes* galur ATCC 15834  
 Total unit percobaan adalah  $6 \times 4 = 24$

## Prosedur

### Sterilisasi Alat

Sterilisasi dilakukan pada semua alat yang digunakan. Botol kultur direndam satu malam dengan deterjen dan dibilas sampai bersih, kemudian direndam dalam larutan 'bayclean' selama satu malam. Kemudian dibilas sampai bersih dan dikeringkan, selanjutnya dibungkus dengan plastik kaca dan disterilisasi dengan autoklaf pada temperatur 121 °C pada tekanan 15 psi selama 20 menit. Sterilisasi yang sama juga dilakukan pada alat-alat gelas lainnya, pinset, pisau kultur dan kertas saring.

### Pembuatan Larutan Stok Medium MS

Semua zat penyusun medium MS ditimbang dan dilarutkan menurut kelompoknya. Stok hara makro, hara mikro, vitamin dan KI dilarutkan dalam 250 mL akuades steril, stok mio-inositol dilarutkan dalam 200 mL akuades steril.

### Pembuatan Medium MS

Medium dibuat sebanyak 1 L dengan cara memasukkan masing-masing larutan stok yang telah dibuat dengan komposisi 50 mL stok makro, 5 mL stok mikro, 5 mL stok vitamin, 5 mL stok KI, 10 mL myo-inositol kedalam 200 mL akuades steril. Larutan diaduk sampai homogen. Volume akhir dibuat menjadi 1 L dengan menambahkan akuades. Selanjutnya ditambahkan 30 g gula dan pHnya diatur menjadi 5,8-6,0 dengan menggunakan pH-meter. Jika pH-nya lebih tinggi, medium ditetesi dengan HCl 0,5 N sedangkan jika lebih rendah ditetesi dengan NaOH 0,5 N. Kemudian ditambahkan pematat media atau agar sebanyak 7 g. Setelah itu, media dimasak sampai mendidih untuk melarutkan pematat mediana. Selanjutnya media dimasukkan kedalam botol kultur dan ditutup dengan aluminium foil, dilapisi kertas dan diikat dengan karet lalu disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 15 psi selama 20 menit.

Prosedur pembuatan medium MS yang digunakan untuk dekontaminasi bakteri sama dengan cara pembuatan medium MS diatas, namun ditambahkan dengan ampisilin 100 mg/L setelah medium disterilisasi.

### *Pembuatan Medium YMB Kultur Bakteri*

Medium YMB cair dan padat dibuat masing-masing sebanyak 500 mL. Medium YMB cair dibuat dengan cara memasukkan satu persatu zat kecuali agar kedalam 500 mL akuades. Larutan diaduk sampai homogen. Kemudian pH diatur menjadi 7 dengan pH meter, media dimasak sampai mendidih.

Pembuatan medium YMB padat sama dengan medium YMB cair, perbedaannya hanya ditambahkan pematat media atau agar sebanyak 7,5 g. Selanjutnya media dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditutup dengan aluminium foil kemudian dilapisi kertas dan diikat dengan karet dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 ° C, tekanan 15 psi selama 20 menit.

### *Persiapan Agrobacterium rhizogenes*

*A. rhizogenes* galur A4, LBA 9457 dan ATCC 15834 dipelihara pada medium agar miring YMB. Untuk memperoleh kultur bakteri dilakukan dengan cara memasukkan 1 ose bakteri ke dalam medium YMB cair (50 mL), kemudian diinkubasi diatas mesin pengocok (*shaker*) dengan kecepatan 100 rpm selama 48 jam.

### *Persiapan Eksplan Theobroma cacao*

Eksplan yang digunakan adalah embrio yang berasal dari biji buah kakao yang telah masak, dimana kulit buah telah mengalami perubahan warna sebesar 50% atau lebih. Kulit ari biji dilepaskan dan biji dipotong hingga tersisa sedikit kotiledon yang berfungsi untuk memperkecil kontak langsung antara permukaan embrio dengan larutan sterilisasi, selanjutnya direndam dalam larutan 'Bayclean' 3% selama 1 menit dan alkohol 70% selama 30 detik. Kemudian eksplan dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali dan dikeringkan dengan tisu steril. Selanjutnya kotiledon eksplan dilepaskan dengan menggunakan pinset steril.

### *Transformasi Eksplan dengan Agrobacterium rhizogenes*

Eksplan yang bebas kontaminan diletakkan dalam cawan petri, lalu ditusuk-tusuk dengan pisau steril. Selanjutnya direndam dalam

suspensi bakteri selama 30 menit. Setelah direndam eksplan dikeringkan kertas saring untuk menghilangkan sisa bakteri dan ditanam pada medium MS. Kemudian eksplan dikultur dalam ruang kultur. Ko-kultivasi dilakukan selama 1 minggu. Untuk dekontaminasi bakteri dilakukan subkultur pada medium MS yang ditambahkan ampisilin 100 mg/L. Subkultur dilakukan kurang lebih sebanyak 3 kali sampai bebas bakteri yang ditandai dengan tidak terdapatnya koloni bakteri<sup>[9]</sup>. Selanjutnya eksplan ditanam kembali pada media padat tanpa ampisilin.

### *Isolasi DNA Plasmid Ri Agrobacterium rhizogenese*

Isolasi DNA plasmid dilakukan dengan menggunakan modifikasi. Satu mata isolat *A. rhizogenes* galur LBA 9457 yang sudah dimurnikan, dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 50 mL medium YMB dan diletakkan pada inkubator bergoyang dengan kecepatan 100 rpm selama 48 jam. Kultur dituang ke dalam tabung eppendorf 2 mL dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit sehingga terbentuk pelet. Selanjutnya pelet tersebut dilarutkan dengan 500 uL buffer TELT, ditambah dengan 50 uL, lisozim 10 mg/mL. Campuran dikocok selama 5 menit dan diinkubasikan pada suhu 37 ° C selama 1 jam. Selanjutnya campuran ditempatkan di waterbath selama 1-2 menit. Setelah itu dimasukkan ke dalam air es beberapa saat. Campuran ditambah dengan 50 uL SDS 10% dan dibolak balik sampai lisis dan terlihat berlendir. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 30 menit. Supernatan dipipet kedalam tabung eppendorf yang baru, ditambah 2-3 kali volume etanol absolut dingin dan 0,1 volume Na-asetat dan dikocok pelan. Disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 30 menit. Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan alkohol 70% lalu keringkan. Pelet dilarutkan dengan akuabides steril, disentrifugasi pada 5000 rpm selama 5 menit. Supernatan dipipet kedalam tabung eppendorf yang baru dan ditambah 2-3 kali volume etanol absolut dingin dan 0,1 volume Na-asetat 3M. Supernatan kemudian disimpan pada suhu -20 ° C selama 30 menit. Selanjutnya campuran disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit. Pelet dicuci dengan alkohol 70% dan

dikeringkan, lalu dilarutkan dengan akuabides dan ditambah 10  $\mu$ L Rnase 10 mg/mL. Campuran dihomogenkan, selanjutnya diinkubasi pada 37°C selama 1 jam. Setelah itu ditambah 0,1 kali volume Na-asetat dan 2,5 kali volume etanol absolut. Campuran dihomogenkan dan disimpan pada -20 ° C selama 30 menit, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 5 menit.

Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan alkohol 70% lalu dikeringkan. Pelet dilarutkan dengan akuabides steril dan disimpan pada suhu -20°C. Pelet dikeringkan dan dilarutkan dalam buffer TE PH 8,0, siap untuk diuji dengan PCR.

#### *Isolasi DNA Tanaman dan Akar Rambut Kakao*

Isolasi DNA tanaman dan akar rambut kakao dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode Orozco-Castillo dkk<sup>[12]</sup>. Sebanyak 0,2 – 0,3 g sampel dimasukkan kedalam mortar dingin, kemudian ditambahkan 0,1 g PVPP dan nitrogen cair, lalu digerus sampai berupa serbuk halus. Selanjutnya serbuk halus tersebut dimasukkan kedalam tabung eppendorf yang berisi 1 mL buffer ekstrasi dengan penambahan 10  $\mu$ L mercapto etanol 1% yang sebelumnya telah diinkubasikan pada suhu 65°C selama 30 menit. Campuran divorteks selama 5 menit dan diinkubasikan pada suhu 65°C selama 30 menit. Kemudian campuran didinginkan pada suhu kamar selama 5 menit. Untuk mendegradasi protein, kedalam campuran ditambahkan 1 mL larutan kloroform : isoamil alkohol v : v = 24 : 1 dan dikocok dengan vorteks selama 5 menit, diikuti dengan sentrifugasi dengan kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit. Dari hasil sentrifugasi cairan bagian atas dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf yang lain dan diekstrak kembali dengan 1 mL larutan kloroform : isoamil alkohol v : v = 24 : 1 diikuti dengan sentrifugasi dengan kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit. Cairan bagian atas dipipet ke dalam tabung lain dan ditambah dengan 5 mL isopropanol dingin. Campuran dikocok perlahan-lahan hingga homogen dan disimpan dalam lemari es pada suhu 4°C selama 30 menit. Kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 11.000 rpm. Cairan hasil sentrifugasi dibuang dan pelet

DNA dikeringkan dengan cara membalikkan tabung. Pelet DNA dilarutkan dalam 1 mL larutan buffer TE, ditambah 10  $\mu$ L Rnase 10 mg/mL, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Selanjutnya campuran ditambah Na-asetat 3 M pH 5,2 sebanyak 1/10 volume, lalu dikocok hingga homogen. Campuran disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Dari hasil sentrifugasi, cairan dibuang dan pelet DNA dicuci dengan alkohol 70% kemudian dikeringkan. Pelet DNA yang sudah kering dilarutkan dalam 500  $\mu$ L buffer TE dan siap untuk diuji dengan PCR.

#### **Penetapan kuantitas dan kualitas DNA**

Penetapan kuantitas (konsentrasi) dan kualitas DNA dilakukan dengan cara elektroforesis menurut Sambrook dkk<sup>[13]</sup>. Uji kualitas dan kuantitas DNA dilakukan dengan menggunakan larutan DNA contoh sebanyak 4  $\mu$  L, kemudian kedalamnya ditambah 8  $\mu$  L akuades dan 2  $\mu$  L loading buffer. Kuantitas dan kualitas DNA dapat ditentukan dengan cara elektroforesis menggunakan gel agarose 1% (b/v).

Pembuatan gel agarose dilakukan dengan melarutkan 0,3 g bubuk agarose dalam 30 mL larutan Tris-Asetat EDTA (TAE) 1 x, dan dipanaskan dalam microwave selama 1 menit. Selanjutnya gel yang sudah larut didinginkan pada suhu 65 ° C selama 30 menit dan kedalamnya ditambahkan pewarna DNA yaitu 1,5  $\mu$  L etidium bromida. Campuran dikocok secara perlahan sehingga merata dan dituangkan ke dalam cetakan elektroforesis. Sisir pembuat sumur diletakkan dengan jarak 0,5 mm-1 mm dari dasar cetakan. Selanjutnya dibiarkan selama kurang lebih 1 jam sampai gel agarose padat. Gel kemudian diletakkan kedalam *chamber* elektroforesis yang telah berisi larutan TAE 1x sampai gel terendam. Contoh DNA yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam masing-masing sumur gel.

Elektroforesis dijalankan pada tegangan 50 volt selama kurang lebih 1 jam 20 diamati di bawah UV transluminator. Konsentrasi DNA ditetapkan berdasarkan ketebalan pita standar DNA lambda yang sudah diketahui konsentrasinya yaitu sebanyak 500 ng/  $\mu$  L. Kualitas DNA yang baik ditunjukkan dari hasil

elektroforesis DNA berupa garis putih tebal yang tampak berada pada dasar sumur di bawah UV transluminator.

**Penentuan kandungan katekin**

Larutan standar katekin dibuat dengan cara melarutkan 5 mg katekin dengan etil asetat p.a dalam labu ukur 25 mL (200 ppm), lalu dibiarkan ± 1 jam sampai larut sempurna. Beberapa deretan larutan standar katekin dengan konsentrasi 0, 5, 10, 15, 20 dan 25 ppm kemudian dibuat dalam labu 50 mL. Pengukuran larutan standar katekin dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer.

Sampel akar rambut hasil transformasi sebanyak 100 mg dipotong kecil-kecil, kemudian dimaserasi dengan metanol. Selanjutnya disaring dan difraksinasi dengan heksan (1:1). Fraksi heksan dipisahkan dan dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan etil asetat (1:1). Fraksi etil asetat diambil lalu diukur absorbannya pada panjang gelombang maksimum.

**Uji konfirmasi T-DNA dengan PCR**

Hasil isolasi DNA plasmid, tanaman dan akar rambut kakao dianalisis dengan PCR menggunakan modifikasi metode Aoki dkk<sup>[14]</sup>. DNA Plasmid *A.rhizogenes*, DNA tanaman dan akar rambut kakao ditambah dengan pereaksi PCR. Pereaksi PCR berupa buffer tris-HCl 1 mM, dNTP 0,2 mM mix yang telah berisi MgCl<sub>2</sub> 25 mM, primer TL dan TR 10 pmol dan 1 unit enzim *Taq* DNA polymerase. Jumlah reaksi PCR adalah 25 µ L dengan penambahan 50 ng DNA dan H<sub>2</sub>O.

Semua campuran dimasukkan kedalam tabung ditambahkan 23 µ L mineral oil, selanjutnya tabung dimasukkan kedalam blokmesin PCR

$$\frac{\text{Jumlah eksplan yang membentuk akar rambut}}{\text{Jumlah ulangan}} \times 100 \% \dots\dots\dots(1)$$

$$\frac{\text{Jumlah eksplan yang hidup}}{\text{Jumlah ulangan}} \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

$$\frac{\text{Jumlah akar yang terbentuk}}{\text{Jumlah ulangan}} \dots\dots\dots(3)$$

**Analisis Data**

(Thermolyne Amplitron 1) yang di program 1 siklus dengan profil denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, annealing pada suhu 55 ° C, selama 1 menit dan polimerase pada suhu 72°C selama 2,5 menit. Seluruh reaksi terdiri dari 35 siklus siklus reaksi. Kedalam tabung berisi DNA hasil amplifikasi ditambah 5 µL *loading buffer* dan difraksinasi dengan elektroforesis 0,8% gel agarose yang mengandung 2,5 µ L etidium bromida 1% didalam bak elektroforesis yang berisi 1 x buffer TAE dengan kondisi arus 36 mA dan 50 volt selama kurang lebih 1 jam. Sebagai marker digunakan DNA kb Ladder. Gel hasil elektroforesis divisualisasikan di atas UV transluminator dan untuk dokumentasikan dilakukan pemotretan dengan menggunakan film Polaroid 665.

**Pengamatan**

Pengamatan dilakukan mulai dari Hari Setelah Inokulasi (HSI) selama 3 minggu. Pada percobaan ini parameter-parameter yang diamati adalah (a) *Waktu inisiasi akar rambut* : pengamatan dilakukan terhadap waktu munculnya akar rambut dimulai dari hari setelah inokulasi (HSI) selama 3 minggu, (b) *Respon pertumbuhan*, yaitu:

1. Persentase munculnya akar rambut  
Pengamatan dilakukan setelah eksplan berumur 3 minggu HSI. Persentase eksplan yang membentuk akar rambut dihitung dengan menggunakan rumus (1).
2. Persentase eksplan yang hidup  
Pengamatan dilakukan setelah eksplan berumur 3 minggu HSI dengan kriteria eksplan yang hidup tidak mengalami kecoklatan dan tidak terkontaminasi dihitung dengan menggunakan rumus (2).
3. Rata-rata jumlah akar rambut  
Penghitungan dilakukan pada akhir pengamatan yakni 3 minggu HSI dengan menggunakan rumus (3).

Data hasil penelitian yaitu: waktu inisiasi akar rambut, persentase munculnya akar rambut, persentase eksplan yang hidup, rata-rata

jumlah akar rambut dianalisis dengan metoda Rancangan Acak Lengkap (RAL), dan analisis kuantitatif katekin dengan metoda spektrofotometri. Hasil konfirmasi Ri-T-DNA transforman akar rambut dengan PCR disajikan secara lengkap.

## HASIL DAN DISKUSI

### Waktu Inisiasi Akar Rambut *Theobroma cacao* yang ditransformasi dengan Beberapa Galur *Agrobacterium rhizogenes*

Waktu inisiasi akar rambut *T. cacao* yang ditransformasi dengan beberapa galur *A. rhizogenes* disajikan pada Tabel 1. Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa tidak semua galur *A. rhizogenes* dapat menginduksi terbentuknya akar rambut *T. cacao*.

Perlakuan kontrol atau tanpa inokulasi dengan *A. rhizogenes* tidak memperlihatkan pemunculan akar rambut. Hasil yang sama juga dapat dilihat pada inokulasi dengan galur ATCC 15834. Hal ini disebabkan karena tidak terjadinya transfer T-DNA bakteri kedalam genom tanaman sehingga tidak terjadi pembentukan akar rambut.

Hal ini disebabkan oleh ketidaksesuaian galur *A. rhizogenes* dengan eksplan kakao. Winans<sup>[15]</sup> mengatakan bahwa keberhasilan proses transfer T-DNA tergantung dari kecocokan/kompatibilitas antara receptor tanaman dengan isolat *Agrobacterium* yang digunakan. Kompatibilitas ini ditunjukkan dengan kemampuan *Agrobacterium* untuk menerima isyarat dari tanaman peka yang luka dan diikuti dengan terinduksinya faktor virulensi yang diperlukan dalam proses transfer T-DNA.

Kemampuan inokulasi *Agrobacterium* terhadap tanaman berbeda-beda dalam efektivitas transfer T-DNANYA. Hal ini berhubungan dengan virulensi isolat *Agrobacterium* yang dipakai dan kerentanan kultivar tanaman. Sedangkan inokulasi dengan *A. rhizogenes* galur A4 dan LBA 9457

memperlihatkan pemunculan akar rambut karena masuknya bagian T-DNA dari *A. rhizogenes* ke dalam genom tanaman *T. cacao*.

Hasil penelitian Noli<sup>[16]</sup> bahwa dari 9 galur *A. rhizogenes* yang diujicobakan terhadap dua jenis kina yaitu *Cinchona ledgeriana* dan *C. succirubra* (Rubiaceae), hanya satu galur yaitu galur LBA 9457 yang memperlihatkan respon dalam membentuk akar rambut. Ini dapat disebabkan karena adanya perbedaan kemampuan *Agrobacterium* untuk dapat menginduksi akar rambut.

Hasil penelitian Giri dkk<sup>[4]</sup>, dari 6 galur *A. rhizogenes* yaitu A4, ATCC 15834, K<sub>599</sub>, LBA 9402, 9365, dan 9340, ternyata 5 galur terbukti dapat menginduksi akar rambut *Artemisia annua*. Hanya galur K<sub>599</sub> yang tidak memperlihatkan respon pertumbuhan akar rambut. Hal ini disebabkan oleh perbedaan kemampuan dari *Agrobacterium* untuk dapat menginduksi akar rambut.

Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa waktu inisiasi akar rambut yang tercepat terjadi pada perlakuan inokulasi dengan galur LBA 9457 yaitu 10 HSI. Berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan Sukma dkk<sup>[17]</sup> terhadap Paria Belut (*T. cucumerina*), dimana akar rambut mulai berkembang pada jaringan kalus hasil transformasi pada 14 HSI yang diinfeksi dengan *A. rhizogenes* galur LBA 9457.

Adanya perbedaan waktu inisiasi akar rambut *T. cacao* pada masing-masing galur *A. rhizogenes* disebabkan karena perbedaan gen pada plasmid Ri yang masuk ke kromosom tanaman *T. cacao*. Perbedaan kemampuan *Agrobacterium* untuk menginduksi akar rambut juga ditemukan dari empat galur *A. rhizogenes* yang diinokulasikan pada *Brassica napus*, yaitu galur ATCC 8196, ATCC 5835, A4RS dan LBA 9402, ternyata tidak ada akar rambut yang terbentuk dengan menggunakan *A. rhizogenes* galur ATCC 8196. Sedangkan galur ATCC 5835, A4RS dan LBA 9402 dapat dengan sukses menghasilkan akar rambut dengan frekuensi transformasi yang berbeda<sup>[18]</sup>.

**Tabel 1. Waktu Inisiasi Akar Rambut *T. cacao* yang ditransformasi dengan Beberapa Galur *A. rhizogenes* (HSI)**

Galur <i>A. rhizogenes</i>	Waktu inisiasi (HSI)						Munculnya akar rambut (hari)
	Ulangan						
	1	2	3	4	5	6	
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0
A4	0	0	0	0	14	0	14
LBA 9457	15	10	11	0	10	16	10-16
ATCC 15834	0	0	0	0	0	0	0

Keterangan : HSI = Hari Setelah Inokulasi

Penelitian yang dilakukan oleh Sumaryati<sup>[19]</sup> terhadap *Uncaria gambir* dengan menggunakan *A. rhizogenes* galur A4, LBA 9457, dan ATCC 15834 memperlihatkan bahwa pemunculan akar rambut tercepat terjadi pada hasil transformasi dengan *A. rhizogenes* galur LBA 9457 yaitu pada 5 HSI.

Pada pengamatan yang telah dilakukan inokulasi dengan *A. rhizogenes* galur A4 memperlihatkan pemunculan akar rambut yang terjadi pada hari ke 15 HSI. Berbeda dengan hasil penelitian yang telah dilakukan Mei dkk<sup>[9]</sup> pada tanaman *Alhagi pseudoalhagi*, setelah diinokulasi bagian kotiledon dan hypokotiledon dengan *A. rhizogenes* galur A4, akar rambut muncul dalam waktu 10 hari setelah diinfeksi.

Bajaj dan Ishimaru menjelaskan bahwa keberhasilan dalam membentuk akar rambut dari eksplan yang diinokulasi merupakan suatu indikasi terjadinya proses transfer T-DNA yang berasal dari plasmid Ri *A. rhizogenes* pada genom sel tanaman *T. cacao*. Pada prinsipnya infeksi tanaman oleh *A. rhizogenes* menyebabkan masuknya satu atau kedua bagian dari transfer DNA (TL dan TR) yang terkandung dalam plasmid bakteri dan berintegrasi ke dalam genom tanaman<sup>[20]</sup>.

Integrasi DNA plasmid Ri ke dalam genom sel tanaman menyebabkan berkembangnya akar adventif. Proses pembentukan akar rambut terjadi karena T-DNA membawa gen-gen rol yang penting untuk menginduksi akar rambut. Di dalam T-DNA juga terdapat berbagai gen penyandi protein yang berperan dalam proses biosintesis zat pengatur tumbuh yaitu auksin dan sitokinin di dalam sel tanaman.

Eksresi dari gen-gen ini membuat terjadinya perimbangan baru dari zat pengatur tumbuh internal yang akhirnya menyebabkan terjadinya induksi akar rambut. Eksplan yang

tidak membentuk akar rambut setelah diinokulasi disebabkan tidak terintegrasinya T-DNA pada sel tersebut.

### Respon Pertumbuhan *Theobroma cacao* yang ditransformasi dengan Beberapa Galur *Agrobacterium rhizogenes*

Respon awal dari eksplan *T. cacao* yang diinokulasi dengan *A. rhizogenes* adalah terbentuknya akar rambut dan eksplan yang tidak membentuk akar rambut sebagian akan mati (Gambar 1). Dari gambar dapat dilihat bahwa pertumbuhan akar rambut *T. cacao* hasil transformasi masing-masing galur *Agrobacterium* sangat berbeda terutama dalam jumlah akar rambut yang muncul.

Hasil inokulasi eksplan menunjukkan bahwa hanya galur LBA 9457 yang mampu menginduksi pembentukan akar rambut lebih dari 50% dari total pengulangan. Keberhasilan dalam membentuk akar rambut dari eksplan yang diinokulasi merupakan suatu indikasi terjadinya proses transfer T-DNA yang berasal dari plasmid Ri *A. rhizogenes* pada genom sel embrio kakao.

Kompetensi eksplan ditentukan oleh beberapa faktor, antara lain spesies atau genotip asal eksplan, jenis organ yang digunakan sebagai eksplan, tingkat perkembangan organ, bahkan historis dari masing-masing eksplan yang digunakan. Respon pertumbuhan *T. cacao* yang ditransformasi dengan beberapa galur *A. rhizogenes* yaitu munculnya akar rambut, eksplan yang hidup, dan rata-rata jumlah akar yang muncul disajikan pada Tabel 2.

Dari Tabel 2 dapat dilihat bahwa tanaman *T. cacao* ini peka terhadap infeksi *A. rhizogenes*. Dari ketiga galur yang digunakan menunjukkan respon yang berbeda terhadap infeksi *A. rhizogenes*. Untuk persentase



munculnya akar rambut tertinggi diperoleh pada perlakuan inokulasi dengan *A. rhizogenes* galur LBA 9457 yaitu sebesar 83,33%, berbeda dengan perlakuan dengan kontrol yaitu sebesar 0%, perlakuan inokulasi dengan galur A4 sebesar 16,66%, dan ATCC 15834 sebesar 0%.

Akar rambut yang terbentuk dari eksplan *T. cacao* pertumbuhannya sangat berbeda baik

dalam jumlah akar maupun persentase munculnya akar rambut pada masing-masing galur yang diujikan. Tabel 2 memperlihatkan bahwa inokulasi dengan galur yang berbeda akan memperlihatkan respon pemunculan akar rambut yang berbeda. Hal yang sama juga ditemui pada persentase eksplan yang hidup. Dimana perlakuan dengan LBA 9457 memperlihatkan persentase hidup tertinggi.



Gambar 1. Respon *T. cacao* yang diinokulasikan dengan beberapa galur *A. rhizogenes*

Keterangan :

→ = akar rambut

- (a) Eksplan tanpa inokulasi bakteri
- (b) Akar rambut *T. cacao* yang diinduksi dengan galur A4.
- (c) Akar rambut *T. cacao* yang diinduksi dengan galur LBA 9457.
- (d) Eksplan yang diinduksi dengan galur ATCC 15834.

**Tabel 2. Respon pertumbuhan *T. cacao* Hasil Transformasi dengan Beberapa Galur *A. rhizogenes***

Galur <i>A. rhizogenes</i>	Respon Pertumbuhan		
	Persentase muncul akar rambut (%)	Persentase eksplan yang hidup (%)	Rata-rata jumlah akar rambut
Kontrol	0	16,66	0
A4	16,66	66,66	1
LBA 9457	83,33	83,33	5
ATCC 15834	0	0	0

Hasil penelitian yang dilakukan Herlina terhadap tanaman nilam (*Pogestemon cablin*), persentase pertumbuhan akar rambut dari inokulasi *A. rhizogenes* galur LBA 9402, LBA 9455 dan LBA 9457 yang diuji menunjukkan

angka yang sama yaitu 77,78%<sup>[21]</sup>. Demikian pula untuk persentase pertumbuhan akar rambut dan tunas yaitu sebesar 22,22%. Walaupun persentase pertumbuhan sama, tetapi laju pertumbuhan akar rambut yang

dihasilkan dari setiap galur tersebut berbeda. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan Noli terhadap tanaman kina (*Cinchona ledgeriana* dan *C. succirubra* (Rubiaceae) rata-rata persentase pembentukan akar rambut hasil transformasi *A. rhizogenes* galur LBA 9457 berkisar dari 60-70%<sup>[16]</sup>.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Ercan<sup>[22]</sup> terhadap inokulasi *Rubia tinctorum* dari beberapa daerah di Turki dengan menggunakan beberapa galur *A. rhizogenes* dapat dilihat untuk *R. tinctorum* yang berasal dari Kenya yang diinokulasikan dengan galur ATCC 15834 persentase eksplan yang membentuk akar rambut adalah 75%, inokulasi dengan galur R1000 adalah 50%, dan inokulasi dengan galur 9356 adalah 18% sedangkan untuk inokulasi dengan galur 2628 persentase eksplan yang membentuk akar rambut adalah 23%.

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, untuk rata-rata jumlah akar rambut yang paling tinggi dapat terlihat pada perlakuan *A. rhizogenes* galur LBA 9457 yaitu sebesar 5,4 dan diikuti dengan galur A4 dimana rata-rata jumlah akar rambut sebesar 1. Berdasarkan rata-rata jumlah akar rambut dan persentase pemunculan akar rambut maka dapat dinyatakan bahwa inokulasi dengan menggunakan galur LBA 9457 menunjukkan hasil terbaik.

Pemanfaatan kultur akar rambut untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder telah banyak dilakukan, antara lain lobelin dari *Lobelia inflata* dan katarantin dan ajmalin dari *Catharantus roseus*. Hasil penelitian Lodhi dan Charlwood<sup>[23]</sup> terhadap kultur akar rambut *Rubia Peregrina* (Rubiaceae) hasil transformasi dengan *A. rhizogenes* galur LBA 9402, produksi anthracquinones yang dihasilkan dua kali lipat dari tanaman lapangan ( $2,12 \pm 0,12$  dan  $1,23 \pm 0,12$  mg g<sup>-1</sup> bobot kering).

Hasil uji dari kontrol yang mati dan inokulasi dengan ATCC 15834 memberikan hasil yang sama yaitu negatif dimana hasil uji tidak memperlihatkan perubahan warna. Hal ini disebabkan tidak tumbuhnya eksplan sehingga metabolit yang diharapkan tidak terbentuk. Hasil uji dari inokulasi dengan galur

LBA 9457 memperlihatkan intensitas warna yang lebih pekat. Banyaknya jumlah akar berkemungkinan mengandung senyawa flavonoid yang lebih tinggi sehingga menyebabkan perubahan warna yang lebih pekat. Hasil ini sesuai dengan penelitian Ermayanti yang melaporkan bahwa produksi metabolit sekunder lebih tinggi pada akar rambut dibandingkan pada tanaman normal atau yang diproduksi dari tanaman asalnya<sup>[10]</sup>.

Dari penelitian ini maka dapat dilakukan serangkaian penelitian lanjutan tentang penentuan jenis senyawa flavonoid yang dihasilkan pada tanaman *T. cacao* yang telah ditransformasi dan upaya meningkatkan produksi flavonoid dari *T. cacao* melalui kultur akar rambut. Akar yang muncul dikultur dalam medium cair sehingga pertumbuhannya akan semakin cepat. Namun masih ada beberapa faktor yang mempengaruhi pertumbuhan akar rambut dan produksi metabolit sekunder diantaranya kestabilan sel dan genetiknya<sup>[19]</sup>.

### Identifikasi Flavonoid dan Penentuan Kandungan Katekin

Identifikasi flavonoid yang dilakukan pada tanaman *T.cacao* hasil transformasi dengan *A. rhizogenes* memperlihatkan kandungan flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan tanaman non transforman/kontrol. Hal ini dapat dilihat dari warna yang muncul pada sampel setelah ditambahkan HCl pekat dan serbuk Mg (Gambar 2).

### Analisa Kuantitatif Katekin

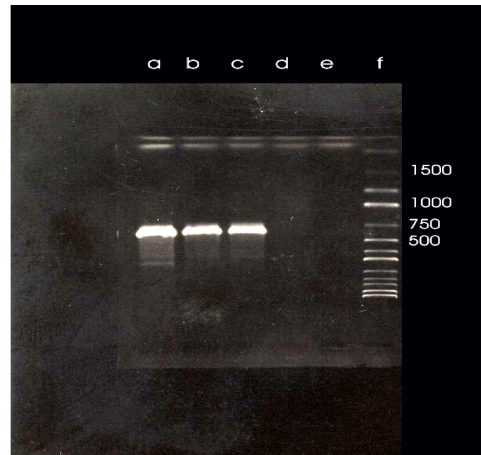
Penentuan kandungan katekin secara kuantitatif hasil transformasi dengan *A. rhizogenes* dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV. Spektrum dari senyawa katekin memperlihatkan puncak serapan yang khas pada panjang gelombang 260-280 nm dan puncak serapan maksimum (A) = 0,2 terjadi pada  $\lambda$  280 nm.

Spektrum dari sampel akar rambut hasil transformasi dengan *A. rhizogenes* memperlihatkan puncak serapan yang muncul pada  $\lambda$  280 nm dan A= 0,16. Kandungan katekin yang diukur pada sampel tanaman ini dibandingkan dengan kandungan katekin pada

pengukuran absorban standar katekin. Dari harga absorban larutan standar katekin didapatkan persamaan regresi  $Y = 0,0162x - 0,0335$ .

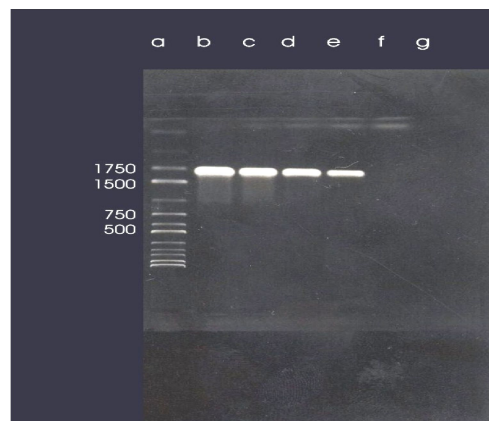
Dengan mensubstitusikan harga absorban sampel ke dalam persamaan di atas dapat diketahui kandungan katekin pada kontrol non transformasi dan hasil transformasi akar rambut *A.rizogenese* LBA 9457, masing-

masing sebesar 0,196% dan 0,87%. Dari hasil uji secara kuantitatif ini juga terlihat bahwa kandungan katekin pada tanaman *T.cacao* hasil transformasi lebih tinggi dari (4 x lipat) dibandingkan tanaman non transformasi. Kandungan transforman lain sangat kecil dibandingkan non transforman data tidak ditampilkan.



**Gambar 2.** Amplifikasi fragmen TL-DNA pada akar *T.cacao* hasil transformasi dengan *A.rhizogenes* galur LBA 9457.

*Keterangan:* (a) Plasmid *A. rhizogenes* (primer *rol B*), (b) akar rambut transforman *T.cacao* Trinitario (primer *rol B*), (c) akar rambut Transforman *T.cacao* Forestero (primer *rol B*), (d) dan (e) Non transform *T.cacao* (f) Marker 1 kb DNA Ladder



**Gambar 3.** Amplifikasi fragmen TR-DNA pada akar *T.cacao* hasil transformasi dengan *A.rhizogenes* LBA 9457.

*Keterangan:* (a) Marker 1 kb DNA Ladder, (b) & (c) Plasmid *A. Rhizogenes galur* LBA 9457 (primer TR), (c) akar rambut *T.cacao* transforman Trinitario (primer TR), (d) Akar rambut *T.cacao* Forestero (primer TR), (e) Transforman (primer TR), (f) dan (g) Non Transform (primer TR).



**Gambar 4.** Kandungan flavonoid secara kualitatif

Keterangan :

- a. Sampel awal sebelum penambahan HCl pekat dan serbuk Mg
- b. Kandungan flavonoid non akar rambut *T.cacao* Non transforman/kontrol yaitu: +1.
- c. Kandungan flavonoid pada akar rambut hasil Transformasi kultur *in vitro* yaitu :+ 4.

**KESIMPULAN**

Berdasarkan penelitian tentang induksi akar rambut *Theobroma cacao* dengan beberapa galur *Agrobacterium rhizogenes* dalam upaya produksi senyawa flavonoid secara *in vitro* yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa dari ketiga galur yang telah diuji hanya dua galur *A. rhizogenes* yaitu galur A4 dan LBA 9457 yang dapat menginduksi akar rambut *T. cacao*. Persentase eksplan yang dapat membentuk akar rambut dari inokulasi galur A4 sebesar 16,66 % dan 83,33 % dari inokulasi dengan LBA 9457. Dari hasil transformasi *T. cacao* dengan *A. rhizogenese* galur LBA 9457 yang mengandung senyawa katekin tertinggi sebanyak lebih dari 4 kali lipat (0,87%) dibandingkan hasil non transformasi (0,19%).

**UCAPAN TERIMA KASIH**

Ucapan terimakasih ditujukan pada DP2M, Departemen Pendidikan Nasional Proyek Penelitian Fundamental tahun 2008 kontrak No:005/SP2H/PP/DP2M/III/2006.

Penghargaan yang tinggi juga diberikan pada kelompok Penelitian Bioteknologi Tanaman FMIPA-UNAND Padang, atas semua kerja sama yang baik.

**DAFTAR PUSTAKA**

1. Kim, H, & Keeney, P. G. 1984. Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47. 3693-3701.
2. Sugawa, H, Kagami, dan Suzuki, 2004. High-frequency transformation of *Lobelia erinus* L. by *agrobacterium rhizogenes*-mediated gene transfer. *Plant cell reports* 22 (10): 759-764.
3. Toivonen, L. 1993. Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites. *Journal of Biotechnology*. Prog. 9 : 12-20.
4. Giri, A., and M. L. Narasu, 2000. Transgenic Hairy Root : Recent Trends and Applications. *Biotechnology Advances*. 18: 1-22.
5. Sanbogi, C., Osakabe, N., Natsume, M., Takizawa, T., Gomi, S., & Osawa, T. (1998). Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 454–457.
6. Heiss C, Dejam A, Kleinbongard P, Schewe T, Sies H, Kelm M, 2003, Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *JAMA*, 290:1030-1031.
7. Waterhouse AL, Shirley JR, Donovan JL, 1996, Antioxidants in chocolate [letter]. *Lancet*, 348:834.
8. Bakhtiar, A. 2005. Potensi Senyawa Bahan Alam Flavonoid Sebagai Obat dan Kosmetik. Universitas Andalas. Padang.
9. Mei, Y. W., Wang, J.B., Luo, D., Jia, J. F. 2001. Regeneration of Plants From Callus Cultures of Roots Induced by *Agrobacterium rhizogenes* on *Alhagipseudoalhagi*. [http://gob.oupjournals.org/cgi/content/abstracy/73/6/60.29 Mei 2005](http://gob.oupjournals.org/cgi/content/abstracy/73/6/60.29%20Mei%202005).
10. Ermayanti, T. M., L. Sari. E. M. R. Siregar & Sudrajat. D. 2000. Transformasi Mimba (*Azadirachta indica* A JUSS) dengan *Agrobacterium rhizogenes* galur ATCC 15834. *Puslitbang Bioteknologi*. LIPI.

11. Muswita. 1992. induksi kalus pada *Kakao dengan Medium MS dengan Penambahan 2,4 D, IAA dan BA*. Skripsi Sarjana Biologi. Universitas Andalas. Padang.
12. Orozco-Castillo, K., J. Chalmers, R. Waugh and W. Powell. 1994. Detection of Generic Diversity and Selective Gene Integration In Coffe Using RAPD Marker. *Theor.Appl.Genet.* 87: 934-938.
13. Sambrook, J.E., E.T. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Lab Press. New York p. 568-600.
14. Aoki, Y., H. Matsumoto, Y. Asako, Y. Matsunaga, and K. Shimomura. 1997. Variation Of Alkaloid Productivity Among Several Clones Of Hairy Roots and Generated Plants Of *Atropa belladonna* Transformed With *Agrobacterium rhizogenes* 15834. *Plant Cell Reports* 16: 282-286.
15. Winans.S. 1992. Two Ways Chemical Signalling Agrobacterium-plant interactions. *Microbiol.rev.* 56:12-31.
16. Noli, Z. A. 2004. *Pertumbuhan dan Produksi Alkaloid Kinolina dari Kultur Akar Rambut Kina (Cinchona ledgeriana Moens dan C. succirubra Pavon ex Klotzsch) Hasil Transformasi Agrobacterium rhizogenes Glaur LBA 9457*. Disertasi. Universitas Padjajaran. Bandung.
17. Sukmadjaja, D., dan P, Doran. 2001. Kinetik dan Karakteristik Pertumbuhan Kultur Akar Rambut dari Beberapa Genotipe *Arabidopsis thaliana*. *Jurnal Bioteknologi Pertanian*. Vol.6.No.2.pp.67-73.
18. Sumaryati, Desrina dan N.Z. Aneloi, 2006, Induksi akar rambut tanaman Gambir (*Uncaria gambir* Roxb) dengan plasmid Ri beberapa galur Agrobacterium rhizogenese secara In vitro, Laporan Penelitian, 1-51.
19. Bajaj, Y. P. S., and K. Ishimaru. 1999. Genetic Transformation of Medicinal Plant. In Bajaj, Y. P. S (eds). *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Transfenic Medicinal Plants*. Springe-verlag. Berlin. 3-7.
20. Herlina N. D., 1995. *Kepekaan Nilam (Pogostemon cablin Benth) Terhadap Infeksi Agrobacterium rhizogenes*. Skripsi Sarjana Biologi. IPB, Bogor
21. Ercan, G. A., Taskin M., Turgut, K. dan Yuce, S. 1999. *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Hairy Root Formation in Some *Rubia tinctorum* L. Populations Grown in Turkey. *Research Article* 23 : 373-377.
22. Lodhi, A.H. and B.V Charlwood (1996). *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Rubia pregrine* L. In vitro accunulation of Anthraquionones. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* 46: 103-108.
23. Sheng, J., and Citovsky. 1996. Agrobacterium-plant Cell DNA Tranport, have Virulence Proteins will Travel. *Plant Cell*: 1699-1710.