

## Kultur akar rambut *Cinchona ledgeriana* dan *C. succirubra* dalam kultur *in vitro*

*Hairy root culture of Cinchona ledgeriana and C. succirubra by in vitro culture*

Nurita TORUAN-MATHIUS<sup>1)</sup>, REFLINI<sup>2)</sup>, NURHAIMI-HARIS<sup>1)</sup>,  
JOKO-SANTOSO<sup>3)</sup> & A. PRIANGANI-ROSWIEM<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

<sup>2)</sup> PT London Sumatera, Bahlias, Medan, Indonesia

<sup>3)</sup> Pusat Penelitian Teh dan Kina, Gambung, Bandung, Indonesia

<sup>4)</sup> Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia

### Summary

Problems encountered in hairy root culture of *C. ledgeriana* and *C. succirubra* are low percentage of transformation of explants by *Agrobacterium rhizogenes* and slow growth of hairy root. The objective of this research was to evaluate the potential of several *A. rhizogenes* strains for initiation hairy roots of *C. succirubra* and *C. ledgeriana*, and to obtain the best medium for hairy root culture of *Cinchona* species. Axenic shoot and leaves explants of eight-month-old of *C. ledgeriana* and *C. succirubra* seedlings were inoculated with *A. rhizogenes* strain ATCC-15834, ATCC-8196, R-20001, 07-20001, A4, R-MAFFA, TISTR509, TISTR510 and LBA9457. Inoculated explants were cultured in solid MS medium with the addition of 100 mg/L ampicillin. Subculture of the hairy root was performed by transferred of root pieces into fresh liquid basal medium MS, B5, White and Heller. Hairy roots from the best of basal medium were subcultured on the same medium with the addition of 50 and 100 mg/L *L*-tryptophane, three or five times concentration of MS vitamins. The integration of T-DNA of *A. rhizogenes* in hairy root was confirmed with specific primer for TL and TR-DNA of plasmid by Polymerase Chain Reaction analysis. The results showed that only *A. rhizogenes* strain LBA 9457 were effective for transformation of explants from both *Cinchona*

species. The fastest hairy roots growth were found in MS medium, while growth in others medium was poor. Hairy roots of *C. ledgeriana* has vigor and growth better than hairy roots of *C. succirubra*. MS with the addition of 50 mg/L *L*-tryptophane and three times the concentrations of vitamin is the best medium for hairy root growth and vigor. Hairy roots of *C. succirubra* and *C. ledgeriana* used in this studies were confirmed that hairy roots contained TL and TR-DNA region of Ri plasmid with molecular weight 780 and 1600 bp. The results showed that strain of *A. rhizogenes*, plant species, source of explant and composition of medium affect the initiation, growth, development and vigor of hairy roots.

[Key words: *Cinchona ledgeriana*, *Cinchona succirubra*, hairy root-culture, *Agrobacterium rhizogenes*]

### Ringkasan

Masalah dalam kultur akar rambut *C. ledgeriana* dan *C. succirubra* adalah rendahnya tingkat keberhasilan transformasi eksplan dengan *Agrobacterium rhizogenes* dan pertumbuhannya yang lambat. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi potensi dari

beberapa galur *A. Rhizogenes* untuk inisiasi, mendapatkan komposisi medium terbaik untuk pertumbuhan akar rambut *C. ledgeriana* dan *C. succirubra*, serta konfirmasi terintegrasinya TR dan TL-DNA Ri plasmid ke dalam jaringan eksplan. Eksplan batang dan daun berasal dari kecambah aksenik *C. ledgeriana* dan *C. succirubra* berumur delapan bulan diinokulasi dengan *A. rhizogenes* galur 15834, 8196, R-20001, 07-20001, A4, R.MAFFA, TISTR 509, TISTR 510 dan LBA 9457. Eksplan yang sudah diinokulasi dikulturkan dalam medium MS padat. Subkultur dilakukan dengan cara mentransfer potongan ujung akar rambut ke dalam medium cair MS, B5, White dan Heller. Akar rambut dari medium kultur yang terbaik kemudian disubkultur ke dalam medium yang sama dengan penambahan 50 dan 100 mg/L L-triptofan dengan konsentrasi vitamin sebanyak tiga kali dan lima kali dari konsentrasi normal MS. Integrasi T-DNA dalam akar rambut dikonfirmasi menggunakan *Polymerase Chain Reaction* dengan primer spesifik untuk TL dan TR-DNA plasmid. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa hanya *A. rhizogenes* galur LB9457 yang efektif menginfeksi eksplan baik batang maupun daun dari kedua spesies kina. Induksi, pertumbuhan dan vigor akar rambut yang terbaik diperoleh dari medium MS dengan penambahan 50 mg/L L-triptofan dan tiga kali konsentrasi vitamin. Hasil konfirmasi akar rambut baik dari batang maupun daun menggunakan PCR, menunjukkan bahwa TL dan TR-DNA dari Ri plasmid *A. rhizogenes* mampu menghasilkan pita-pita DNA dengan BM780 dan 1600 pb. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa galur *A. rhizogenes*, spesies tanaman, sumber eksplan dan komposisi medium berpengaruh terhadap inisiasi, pertumbuhan, perkembangan dan vigor akar rambut.

### Pendahuluan

Tanaman kina telah lama dikenal sebagai penghasil metabolit sekunder, yaitu alkaloid kuinolin. Kuinolin banyak ditemukan di dalam kulit batang tanaman

kina, sedangkan pada bagian lain seperti kayu, buah dan daun hanya ditemukan dalam kadar yang relatif sedikit (Musalam *et al.*, 1980; Staba & Chung, 1981). Kurang lebih 35 macam alkaloid kuinolin telah ditemukan pada tanaman kina, namun hanya empat macam kuinolin utama yaitu kuinin, kuinidin, sinkonin dan sinkonidin (Urdang, 1945).

Setiap jenis *Cinchona* mempunyai kandungan alkaloid kuinolin yang berbeda. *C. ledgeriana* diketahui memiliki kadar kuinin yang tinggi (4 - 13 %), sedangkan *C. succirubra* memiliki kadar kuinin yang sangat rendah (0,8-1,4 %). Akan tetapi kadar sinkonidin *C. succirubra* lebih tinggi yaitu 3,2 - 5,1 % dari pada *C. ledgeriana* yang hanya mengandung 0 - 3,4 % (Astika, 1975). Kuinin digunakan sebagai obat anti-malaria, sedangkan kuinidin selain digunakan sebagai obat anti malaria juga dapat digunakan sebagai obat untuk menormalkan denyut jantung yang tidak teratur (*cardiac arhythmic*) (Verstrijden, 1975). Pada industri minuman ringan, kuinin biasanya digunakan sebagai pemberi cita rasa (*flavoring agent*) karena rasanya pahit (Anderson *et al.*, 1986).

Prospek pasar kina dunia pada beberapa tahun terakhir ini menunjukkan kecenderungan meningkat dengan pesat. Permintaan alkaloid kuinolin di pasar dunia diperkirakan akan terus meningkat karena penggunaannya yang semakin meluas di berbagai bidang industri antara lain industri farmasi, industri minuman, industri kosmetik dan industri biopestisida. Setiap tahun terjadi peningkatan permintaan alkaloid kuinolin sebesar 20 persen. Pada tahun 2001 kebutuhan alkaloid kuinolin mencapai 175 ton dan diperkirakan pada tahun 2005 mendatang akan meningkat menjadi 275 - 300 ton dengan nilai sekitar US \$ 9.900.000 (SIL, 2000).

Kendala yang dihadapi adalah diperlukan waktu paling sedikit tujuh tahun untuk dapat memanen kulit batang dan produksi alkaloid tertinggi baru dapat diperoleh setelah tanaman berumur 20 tahun. Usaha-usaha yang telah dilakukan untuk memproduksi alkaloid kuinolin antara lain dengan memanfaatkan teknik kultur jaringan. Salah satu keuntungan teknik kultur jaringan dibandingkan dengan cara konvensional adalah kemampuan dalam menghasilkan senyawa kimia dalam waktu yang relatif singkat dan kemampuan untuk memproduksi senyawa yang sukar diperoleh secara alami. Hal ini didasari oleh sifat totipotensi sel tanaman (Fowler, 1983).

Staba & Chung (1981) telah berhasil memproduksi kuinolin pada kultur daun *C. ledgeriana*. Sedangkan Mulder-Krieger *et al.* (1982) juga berhasil mendapatkan kuinin dari kalus *C. pubescens*. Kuinin dan kuinidin juga berhasil diperoleh dari kultur akar *C. ledgeriana* (Anderson *et al.*, 1982). Scragg (1986) berhasil memperoleh kuinidin dari kalus *C. ledgeriana*. Sedangkan Hay (1986) mendapatkan kuinin dan kuinidin pada kultur akar *C. ledgeriana*. Produksi alkaloid kina melalui kultur jaringan masih menunjukkan produksi yang rendah. Hal ini diduga karena pertumbuhan sel yang lambat dan diperlukannya sejumlah hormon pertumbuhan dengan konsentrasi yang tepat. Rhodes *et al.* (1986) menerangkan bahwa banyak persenyawaan tidak ekonomis diproduksi melalui kultur suspensi dan tingkat heterogenitasnya juga tinggi. Kultur cenderung tidak stabil dari masa ke masa. Adanya kendala-kendala yang dihadapi tersebut telah membuka suatu pengembangan teknik baru untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang lebih tinggi, yakni dengan memanfaatkan trans-

formasi *Agrobacterium* untuk menghasilkan akar rambut.

*Agrobacterium* merupakan bakteri tanah gram negatif yang termasuk pada kelompok Rhizobiaceae, mempunyai kemampuan untuk mentransfer sebagian bahan genetiknya (DNA) pada sel tanaman melalui pelukaan DNA yang ditransfer disebut dengan T-DNA merupakan potongan beberapa ratus kilo basa dari plasmid yang dikenal dengan Ri plasmid (*root inducing plasmid*) (Nilson & Olsson 1997). T-DNA akan terintegrasi pada kromosom tanaman dan akan mengekspresikan gen-gen untuk mensintesis senyawa opin, di samping itu T-DNA juga mengandung onkogen yaitu gen-gen yang berperan untuk menyandi hormon pertumbuhan auksin dan sitokinin. Apabila onkogen terekspresi maka akan terjadi pertumbuhan cepat dari sel. Ekspresi onkogen pada plasmid Ri mencirikan pembentukan akar adventif secara besar-besaran pada tempat yang diinfeksi dan dikenal dengan 'hairy root' (akar rambut) (Nilson & Olsson 1997).

Pemanfaatan kultur akar rambut untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder telah banyak dilakukan, antara lain lobelin dari *Lobelia inflanta* L. (Yonemitsu *et al.*, 1990), katarantin dan ajmalin dari *Catharanthus roseus* (Vazquez-Flota *et al.*, 1994), saponin dari *Solanum aculeatissimum* (Ikenaga *et al.*, 1995), glukotropaeolin dari *Tropaeolum majus* (Wielanek & Urbanek, 1999), hiosiamin dan skopolamin dari *Atropa belladonna* (Kamada *et al.*, 1986 & Aoki *et al.*, 1997) dan *Datura innoxia* (Boitel-Conti *et al.*, 2000). Keuntungan menggunakan kultur akar rambut di antaranya relatif seragam, memiliki kestabilan genetik yang tinggi, dan dapat menggunakan medium tanpa penambahan zat pengatur

tumbuh, di samping itu mudah dimanipulasi untuk meningkatkan produktivitasnya.

Kultur akar rambut pada tanaman kina untuk memproduksi kuinolin juga telah dilakukan oleh Hamill *et al.* (1989) pada *C. ledgeriana* dengan *A. rhizogenes* galur LBA 9402 dan R1000, dan Geerling *et al.* (1999) pada *C. officinalis* dengan galur LBA 9402. Namun produksi kuinolinnya masih rendah dan diperoleh dalam periode waktu lebih dari satu tahun. Hal ini disebabkan laju pertumbuhan akar rambut yang sangat lambat. Namun sistem produksi ini jauh lebih menguntungkan dibandingkan dengan tanamannya yang baru dapat dipanen setelah berumur lebih dari tujuh tahun.

Adanya kendala dalam kultur akar rambut tanaman kina disebabkan belum ditemukan komposisi medium yang tepat untuk pertumbuhan akar rambut. Menurut Giri & Narasu (2000) medium tumbuh memberikan pengaruh yang nyata terhadap induksi akar rambut dan produksi metabolit sekunder. Untuk memperoleh pertumbuhan akar rambut yang optimal, kondisi kultur harus diatur pada tingkat optimum.

Penelitian ini bertujuan untuk (i) menyeleksi beberapa galur *A. rhizogenes* yang dapat menginokulasi *C. succirubra* dan *C. ledgeriana*, (ii) mendapatkan medium yang optimum untuk pertumbuhan akar rambut *C. succirubra* dan *C. ledgeriana*, dan (iii) mendapatkan akar rambut tanaman kina yang telah terintegrasi T-DNA.

### Bahan dan Metode

Penelitian terdiri dari tiga tahapan percobaan, yaitu (i) menyeleksi galur *A. rhizogenes* yang dapat menginduksi pembentukan akar rambut pada

*C. succirubra* dan *C. ledgeriana*, (ii) optimasi medium untuk pertumbuhan akar rambut dari percobaan (i), dan (iii) konfirmasi transfer T-DNA pada akar rambut dari percobaan (ii).

#### *Seleksi galur A. rhizogenes untuk induksi akar rambut*

Eksplan *C. ledgeriana* dan *C. succirubra* yang digunakan untuk menginduksi terbentuknya akar rambut berasal dari kecambah berumur delapan minggu yang dikulturkan secara *in vitro* dalam medium Murashige & Skoog (1962) padat tanpa zat pengatur tumbuh. Kultur diinkubasi dalam ruang kultur pada suhu 25°C, dengan intensitas cahaya 16.000 luks selama 12 jam/hari.

Untuk efisiensi transformasi, eksplan berupa daun dan batang dari kecambah *in vitro*, dilukai dengan cara ditusuk-tusuk dengan pisau steril dan dikokultivasi selama 60 menit di dalam suspensi bakteri. Sebelum digunakan bakteri dikulturkan selama 48 jam dalam medium YMB dan dikocok pada mesin pengocok dengan kecepatan 100 rpm. Populasi bakteri dalam medium diukur dengan spektrofotometer, yaitu sebanyak  $10^5$  sel/mL ( $OD_{600} = 0,2$ ). *A. rhizogenes* yang diuji adalah galur ATCC-15834, ATCC- 8196, R20001, 07-20001, LBA9457, A4,R-MAFFA, TISTR509 dan TISTR510, berasal dari koleksi laboratorium Mikrobiologi, LIPI, Cibinong.

Untuk menghilangkan bakteri yang tersisa pada permukaan eksplan, eksplan dikulturkan pada medium dasar MS padat dengan penambahan ampisilin 100 mg/L. Eksplan dipindahkan beberapa kali pada medium yang sama sampai bebas bakteri. Selanjutnya eksplan aksenik dipindah-

### *Kultur akar rambut Cinchona ledgeriana dan C. succirubra ....*

kan pada medium dasar MS padat tanpa ampisilin. Kultur diinkubasi dalam ruang gelap pada suhu 25°C. Peubah yang diamati adalah waktu inisiasi munculnya akar rambut, persentase terbentuknya akar rambut pada masing-masing eksplan dan respons yang ditimbulkan oleh masing-masing galur bakteri, jenis tanaman kina dan asal eksplan yang digunakan.

#### *Optimasi medium untuk pertumbuhan akar rambut*

Untuk pertumbuhan akar rambut digunakan medium dasar MS padat (Murashige & Skoog, 1962), B5 (Gamborg *et al.*, 1968), White (White *et al.*, 1985) dan Heller (Heller, 1953). Akar rambut dari masing-masing medium kemudian dipotong ujungnya sepanjang  $\pm 2$  cm dan dikultur pada medium dasar yang sama dalam bentuk cair. Percobaan diulang sebanyak lima kali, dan tiap ulangan terdiri dari dua potong akar rambut. Untuk mendapatkan pertumbuhan akar rambut yang lebih baik, akar rambut yang berasal dari medium dasar terbaik dipotong ujung akarnya sepanjang  $\pm 2$  cm dan dikultur pada medium MS dengan penambahan L-triptofan 50 mg/L (MS 50 L) dan 100 mg/L (MS 100L) serta vitamin dengan konsentrasi tiga (MS3V) dan lima (MS5V) kali vitamin MS normal. Percobaan diulang sebanyak lima kali dan tiap ulangan terdiri dari dua potong akar rambut.

Kultur diletakkan pada mesin pengocok dengan kecepatan 100 rpm, dan diinkubasi selama tujuh minggu pada suhu 25°C  $\pm$  2°C dan kelembaban nisbi udara 80 - 90%. Peubah yang diukur berupa panjang, jumlah percabangan dan bobot basah akar rambut pada kultur akar rambut berumur tujuh minggu. Untuk pengukuran peubah yang

diamati, akar rambut di keluarkan dari dalam kultur kemudian dimasukkan ke dalam cawan Petri berisi kertas saring yang berfungsi untuk mengeringkan akar rambut. Akar rambut yang sudah agak kering dipindahkan ke dalam cawan Petri tanpa kertas saring yang di bawahnya diletakkan kertas milimeter blok berukuran, untuk mengukur panjang akar rambut. Jumlah percabangan akar rambut dihitung berdasarkan percabangan utama.

#### *Konfirmasi transformasi TR dan T-DNA plasmid dengan PCR*

Konfirmasi terjadinya integrasi T-DNA, yaitu daerah TL dan TR-DNA dari *A. rhizogenes* terhadap sel tanaman kina dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Untuk kontrol positif digunakan DNA plasmid *A. rhizogenes* LB9457 dan untuk kontrol negatif digunakan DNA daun dan akar tanaman kina *in vitro*. Sedangkan DNA uji adalah DNA dari akar rambut *C. succirubra* dan *C. ledgeriana*.

Isolasi DNA plasmid dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode Sambrook *et al.* (1989). Galur *A. rhizogenes* LB9457 dikultur pada medium YMB cair dan diletakkan pada mesin pengocok dengan kecepatan 100 rpm selama 48 jam. Kultur dituang ke dalam tabung *Eppendorf* 2 mL dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama dua menit sehingga membentuk pelet. Pelet yang terbentuk dilarutkan dengan bufer TELT (50 mM Tris-Cl pH 7,5; 82 mM EDTA, 2,5 M LiCl, 0,4% Triton X-100). Ke dalam campuran ditambahkan 50  $\mu$ L lisozim 10 mg/mL dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam.

Setelah itu campuran dimasukkan ke

dalam air mendidih selama 1-2 menit diikuti dengan perendaman di dalam air es beberapa saat. Selanjutnya ke dalam campuran ditambahkan 50 µL SDS 10% dan dibolak-balik sampai lisis dan terlihat berlendir. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama dua menit pada suhu ruang. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung baru dan ke dalamnya ditambahkan 2-3 volume etanol absolut dingin. Untuk memurnikan DNA, ke dalam campuran ditambahkan 0,1 volume Na asetat 3M dan disimpan pada suhu -20°C selama 30 menit. Selanjutnya campuran disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama dua menit sehingga membentuk pelet DNA. Pelet DNA dicuci dengan alkohol 70% lalu dikeringkan dengan vakum dan dilarutkan dengan akuabides steril. DNA yang diperoleh dapat digunakan untuk pengujian dengan PCR.

#### *Isolasi DNA daun, batang dan akar rambut tanaman kina*

Isolasi dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode CTAB (Orozco-Castillo *et al.*, 1994). Hasil isolasi DNA plasmid *A. rhizogenes* dan DNA daun, dan akar rambut tanaman kina dianalisis dengan PCR berdasarkan modifikasi metode Aoki *et al.* (1997). Pereaksi PCR berupa bufer TrisHCl 1 mM + dNTP 0,2 mM mix yang telah berisi MgCl<sub>2</sub> 200 µM + primer TL dan TR 10 pmol + enzim *Taq DNA Polymerase* 1 unit. Volume reaksi untuk PCR adalah 25 µL dengan penambahan 50 ng DNA dan H<sub>2</sub>O. Reaksi PCR dilakukan dengan menggunakan *Thermolyne Amplitron I* dengan kondisi denaturasi pada suhu 94°C selama satu menit, *annealing* pada suhu 55°C selama satu menit dan polimerasi pada suhu

72°C selama 2,5 menit sampai 35 siklus reaksi.

Hasil PCR difraksinasi melalui gel elektroforesis dengan konsentrasi 0,8% agarose dan penambahan *loading dye brom-phenolblue* sebagai pemberat. Elektroforesis dilakukan dengan kondisi arus 36 mA, 100 volt selama 60 menit. Sebagai marker digunakan DNA 1 kb lader. Hasil elektroforesis dilihat dengan menggunakan UV luminar dan didokumentasi dengan menggunakan kamera dan film Polaroid 665.

Primer TL berupa *ro/B1* sekuen (5' ATGGATCCCAAATTGCTATTCC CCCA CGA 3') dan *ro/B2* sekuen (5' TTAGGCTT CTTTCATTCGGGTTTAC TGCAGC 3'). Sedangkan untuk TR1 sekuen (5' GGA AA TTGTGGCTCGTTGTGGAC3') dan TR2 sekuen (5' AATCGTTCAGAGAGC GTCC GAAGTT 3') (Ermayanti *et al.*, 2000).

Sedangkan peubah yang diamati adalah pita DNA dari akar rambut yang mempunyai bobot molekul yang sama dengan TR dan L-NA plasmid *A. rhizogenes* pada gel elektroforesis hasil PCR.

## **Hasil dan Pembahasan**

### *Seleksi galur A. rhizogenes untuk induksi akar rambut*

Hasil inokulasi eksplan menunjukkan bahwa hanya galur LBA9457 yang mampu menginduksi pembentukan akar rambut baik pada *C. succirubra* maupun *C. ledgeriana*. Setelah kultur berumur tujuh minggu persentase eksplan yang mati dari hasil inokulasi dengan galur LBA9457 adalah sebesar 30% (ulangan sebanyak 15 kali), sedangkan pada eksplan yang di-

inokulasi dengan galur ATCC-15834, ATCC-8196, R20001, 07-20001, LBA9457, A4, R-MAFFA, TISTR509 dan TISTR510 sebesar 100%. Hasil ini menunjukkan adanya perbedaan kemampuan galur *A. rhizogenes* untuk menginokulasi sel tanaman kina.

Owen & Smigocki (1988) menjelaskan bahwa kemampuan inokulasi *Agrobacterium* terhadap tanaman berbeda-beda dalam efektivitas transfer T-DNA. Hal ini berhubungan dengan virulensi isolat *Agrobacterium* yang dipakai dan kerentanan kultivar tanaman. Winans (1992) juga mengungkapkan bahwa keberhasilan proses inokulasi dan transfer T-DNA tergantung dari kompatibilitas antara kultivar dan isolat *Agrobacterium* yang dipakai. Kompatibilitas ini ditunjukkan dengan kemampuan *Agrobacterium* untuk menerima isyarat dari tanaman peka yang luka dan diikuti dengan terinduksinya faktor virulensi yang diperlukan dalam proses inokulasi.

Berdasarkan kompatibilitas gen tersebut, tidak terbentuknya akar rambut kemungkinan karena tidak kompatibelnya gen T-DNA *A. rhizogenes* terhadap kromosom tanaman kina sehingga T-DNA tidak terintegrasi pada sel genom tanaman kina. Pada tanaman tinggi terdapat suatu rangkaian DNA yang cukup besar yang tidak aktif menyandi protein. Apabila posisi T-DNA yang disisipkan tidak bersifat acak dalam genom tanaman dan hanya terintegrasi dalam DNA yang tidak aktif maka tidak dapat diekspresikan oleh tanaman.

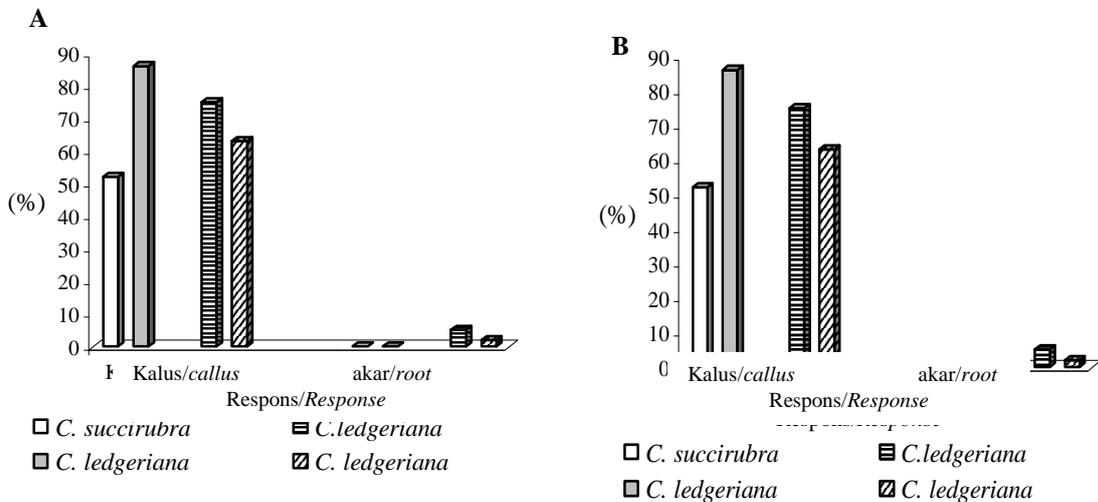
Perbedaan kemampuan *Agrobacterium* untuk menginduksi akar rambut juga ditemukan, dari empat galur *A. rhizogenes* yang diinokulasikan pada *Brassica napus*, yaitu galur ATCC-8196, ATCC-5835, A4RS dan LBA 9402, ternyata tidak ada akar

rambut yang terbentuk dengan menggunakan *A. rhizogenes* galur ATCC-8196. Sedangkan galur ATCC-5835, A4RS dan LBA9402 dapat dengan sukses menghasilkan akar rambut dengan frekuensi transformasi yang berbeda (Menze & Mollers, 1999).

Hamill *et al.* (1989) menginokulasikan dua galur *A. rhizogenes* pada *C. ledgeriana*, yaitu LBA9402 dan R1000 pada tanaman kina. Dari hasil tersebut dilaporkan bahwa hanya galur LBA9402 yang dapat menginduksi pembentukan akar rambut dan dalam waktu lebih dari enam bulan. Geerling *et al.* (1999) juga melaporkan bahwa LBA 9402 yang diinokulasikan pada *C. officinalis* sangat sulit untuk dapat menginduksi pembentukan akar rambut. Hal tersebut kemungkinan karena tanaman kina merupakan tanaman tahunan dan berkayu yang secara alami pertumbuhannya juga lambat.

#### *Respons Cinchona sp. setelah diinokulasikan dengan A. rhizogenes*

Respons awal *Cinchona* setelah diinokulasikan dengan *A. rhizogenes* LBA 9457 selama tiga minggu memperlihatkan adanya pembentukan kalus dan pembentukan akar pada tempat inokulasi. Akan tetapi hampir semua pembentukan akar rambut diawali dengan pembentukan kalus. Selanjutnya pada permukaan kalus yang terbentuk tersebut terjadi pembentukan akar rambut. Pada eksplan daun, baik pada *C. succirubra* maupun *C. ledgeriana* seluruh eksplan memperlihatkan respons awal berkalus pada tempat inokulasi. Sedangkan pada eksplan batang memperlihatkan adanya respons awal berkalus dan juga respons terbentuknya akar secara langsung pada tempat inokulasi. Persentase akar muncul secara langsung



Gambar 1. Respons *C. succirubra* dan *C. Ledgeriana* untuk membentuk kalus dan akar rambut (A) empat minggu dan (B) delapan minggu setelah inokulasi dengan *A. Rhizogenes* galur LBA 9457.

Figure 1. Response of *C. succirubra* and *C. ledgeriana* for callus and hairy roots formation (A) four-week and (B) eight-week after inoculation with *A. rhizogenes* strain LBA 9457.

pada tempat inokulasi sekitar 5% untuk *C. succirubra* dan 2% untuk *C. ledgeriana* (Gambar 1A & 1B).

Pada respons awal eksplan membentuk kalus, tidak semua kalus dapat berdiferensiasi menjadi akar rambut. Ada beberapa eksplan yang hanya mengekspresikan kalus tanpa disertai dengan diferensiasi menjadi akar rambut. Dari seluruh eksplan yang diinokulasi hanya sekitar 60% yang membentuk akar rambut. Keberhasilan dalam membentuk akar dari bagian eksplan yang diinokulasi merupakan suatu indikasi terjadinya proses transfer T-DNA yang berasal dari plasmid Ri *A. rhizogenes* pada genom sel tanaman kina. Proses pembentukan akar rambut terjadi karena di dalam T-DNA terdapat berbagai gen penyandi protein yang berperan dalam proses biosintesis zat pengatur tumbuh yaitu

auksin dan sitokinin di dalam sel tanaman. Ekspresi dari gen-gen ini membuat terjadinya perimbangan baru dari zat pengatur tumbuh internal yang akhirnya menyebabkan terjadinya induksi pembentukan akar rambut. Menurut Gelvin (1990) pembentukan kalus yang terjadi pada permukaan eksplan sebelum munculnya akar rambut terjadi karena konsentrasi auksin dan sitokinin yang seimbang.

Kalus-kalus yang tidak berdiferensiasi menjadi akar rambut diduga karena tidak terintegrasinya TL-DNA pada sel-sel tersebut. Nillson & Olsson (1997) menjelaskan bahwa TL-DNA membawa gen-gen *rol*, yaitu *rolA*, *rolB*, *rolC* dan *rolD*. Sedangkan Vilaine *et al.* (1987) dan Rhodes *et al.* (1994) menemukan bahwa *rolA* yang pertama kali bertanggung jawab terhadap pertumbuhan akar rambut pada tembakau,

sedangkan *rolB* merupakan faktor utama pembentukan akar rambut.

Hasil pengujian dengan melakukan inokulasi pada daun dan batang dari *C. succirubra* dan *C. ledgeriana* menunjukkan bahwa pada *C. succirubra*, persentase pembentukan akar rambut pada eksplan batang lebih tinggi dibandingkan dengan eksplan daun, yaitu sekitar 63%. Sedangkan pada *C. ledgeriana* persentase pembentukan akar rambut lebih tinggi pada eksplan daun, yaitu sekitar 68% (Gambar 1A & 1B). Hasil tersebut menunjukkan bahwa adanya perbedaan kompetensi eksplan terhadap inokulasi *Agrobacterium*.

Menurut Potrykus (1991) ada beberapa faktor yang menentukan kompetensi eksplan, antara lain spesies atau genotip asal eksplan, jenis organ yang digunakan sebagai eksplan, tingkat perkembangan organ, bahkan historis dari masing-masing eksplan yang digunakan. Bergmann *et al.* (1997) mengemukakan bahwa pada *Pinus radiata*, pucuk *in vitro* lebih rentan inokulasi *Agrobacterium* dibandingkan dengan pucuk hasil penyemaian di rumah kaca.

#### *Inisiasi dan pertumbuhan akar rambut tanaman kina*

Pada sebagian besar eksplan (sebanyak 60-63% yang terinduksi), kalus telah muncul minggu ke dua setelah inokulasi. Sedangkan akar rambut umumnya muncul minggu ke tiga setelah inokulasi. Pertumbuhan akar rambut dari eksplan-eksplan tersebut sangat beragam. Hal ini terlihat dari akar yang terbentuk menghasilkan panjang akar yang berbeda-beda. Beberapa akar yang terbentuk pada eksplan dapat terus tumbuh, akan tetapi sebagian besar akar tidak mengalami pertambahan panjang akar yang berarti. Akar

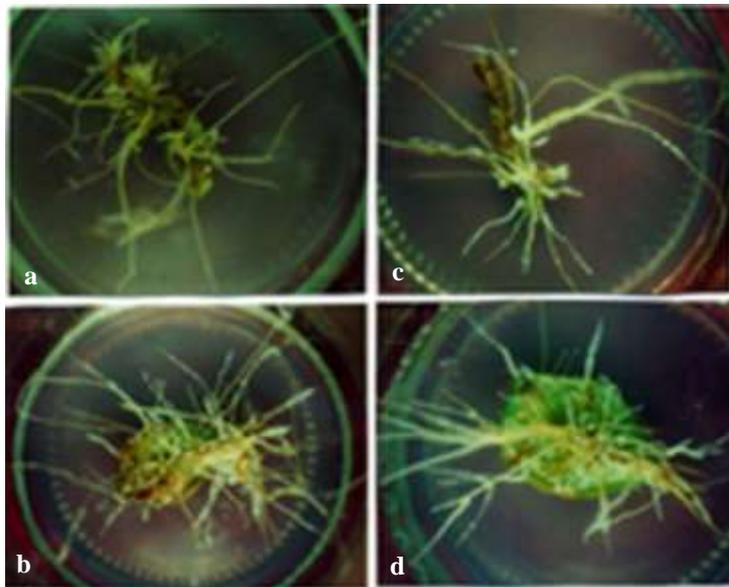
yang tidak tumbuh tersebut lama kelamaan menjadi cokelat dan akhirnya mati.

Setelah tiga bulan sebagian besar akar yang terbentuk hanya menunjukkan panjang akar 6-8 mm. Persentase akar rambut dengan panjang akar lebih dari 10 mm hanya sekitar 15%. Adanya perbedaan respons eksplan tersebut kemungkinan karena eksplan berasal dari benih atau sumber eksplan yang memiliki potensi genetik yang berbeda. Setelah diinokulasi selama tujuh minggu, persentase *C. ledgeriana* dan *C. succirubra* yang terinduksi membentuk akar rambut berturut-turut sekitar 74% dan 63%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa *C. ledgeriana* lebih rentan inokulasi LBA 9457 dibandingkan dengan *C. Succirubra* (Gambar 1). Stomp *et al.* (1990) juga menemukan adanya perbedaan respons yang terjadi pada tiap-tiap jenis tanaman pinus setelah diinokulasi dengan *Agrobacterium*. Menurut Hinchee *et al.* (1990) tiap spesies tanaman atau bahkan tiap kultivar tanaman dalam spesies yang sama mempunyai tingkat kerentanan terhadap *Agrobacterium* yang berbeda-beda.

Morfologi dan perpanjangan akar rambut kedua jenis tanaman kina juga memperlihatkan adanya perbedaan. Perpanjangan akar rambut *C. ledgeriana* lebih cepat dari pada akar rambut *C. succirubra*. Sedangkan dari morfologi akar rambut yang terbentuk, akar rambut *C. succirubra* memperlihatkan percabangan akar yang lebih banyak dan akar lebih besar (Gambar 2).

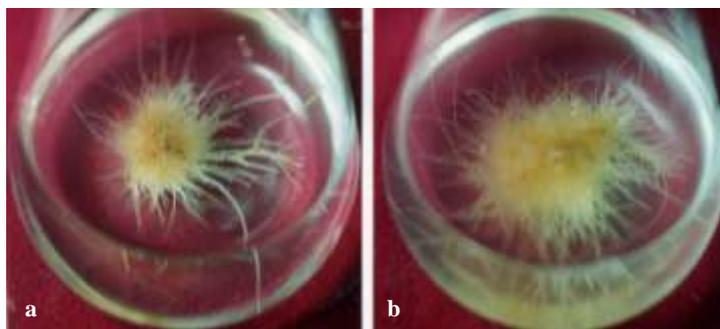
#### *Optimasi medium untuk pertumbuhan akar rambut*

Akar rambut yang digunakan pada percobaan kedua merupakan akar rambut *C. ledgeriana* yang diperoleh pada percobaan pertama. Akar yang dipilih adalah



Gambar 2. Akar rambut *C. succirubra*, pada eksplan (a) batang, dan (b) daun. Akar rambut *C. Ledgeriana* pada eksplan (c) batang, dan (d) daun berumur empat bulan setelah inokulasi dengan *A. Rhizogenes* LBA9457.

Figure 2. Hairy root of *C. succirubra*, from (a) shoot, and (b) leaf. Hairy roots of *C. ledgeriana*, from explants (c) shoot, and (d) leaves, four-month after inoculation with *A. rhizogenes* strain LBA9457.



Gambar 3. Kultur akar rambut *C. ledgeriana* (a), dan *C. succirubra* (b) pada medium MS cair dengan penambahan 50 mg/L L-triptofan dan vitamin tiga kali konsentrasi MS, umur tiga bulan.

Figure 3. Hairy root culture of *C. ledgeriana* (a), and *C. succirubra* in liquid MS with the addition of 50 mg/L L-tryptophane and vitamins with concentration three times of MS, three-month-old.

akar yang tumbuh lebih cepat dan lebih vigor. Setelah dikultur pada medium padat dan medium cair terlihat bahwa pertumbuhan akar rambut lebih cepat pada medium cair dibandingkan dengan pertumbuhan pada medium padat. Demikian juga percabangan akar lateral yang terbentuk lebih banyak. Pertumbuhan akar rambut sangat lambat, hal tersebut dilihat dari panjang maksimum akar hanya sekitar 4 cm dengan percabangan lateral yang terbentuk setelah dikulturkan selama dua bulan (Gambar 2).

Pertumbuhan akar rambut yang lebih cepat pada medium cair kemungkinan disebabkan oleh permukaan eksplan yang kontak langsung dengan medium lebih luas dan karena adanya pengocokan medium, menyebabkan penyerapan hara lebih efektif serta senyawa-senyawa toksik atau senyawa penghambat yang mungkin terakumulasi di sekitar jaringan akan mudah dipisahkan sehingga tidak merusak jaringan.

Variasi medium kultur yang digunakan memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan akar rambut tanaman kina. Dilihat dari ukuran panjang akar dan percabangan akar lateral yang terbentuk, pertumbuhan akar rambut lebih baik pada medium dasar MS. Hal tersebut kemungkinan karena dari empat medium dasar yang digunakan yaitu

#### *Optimasi medium*

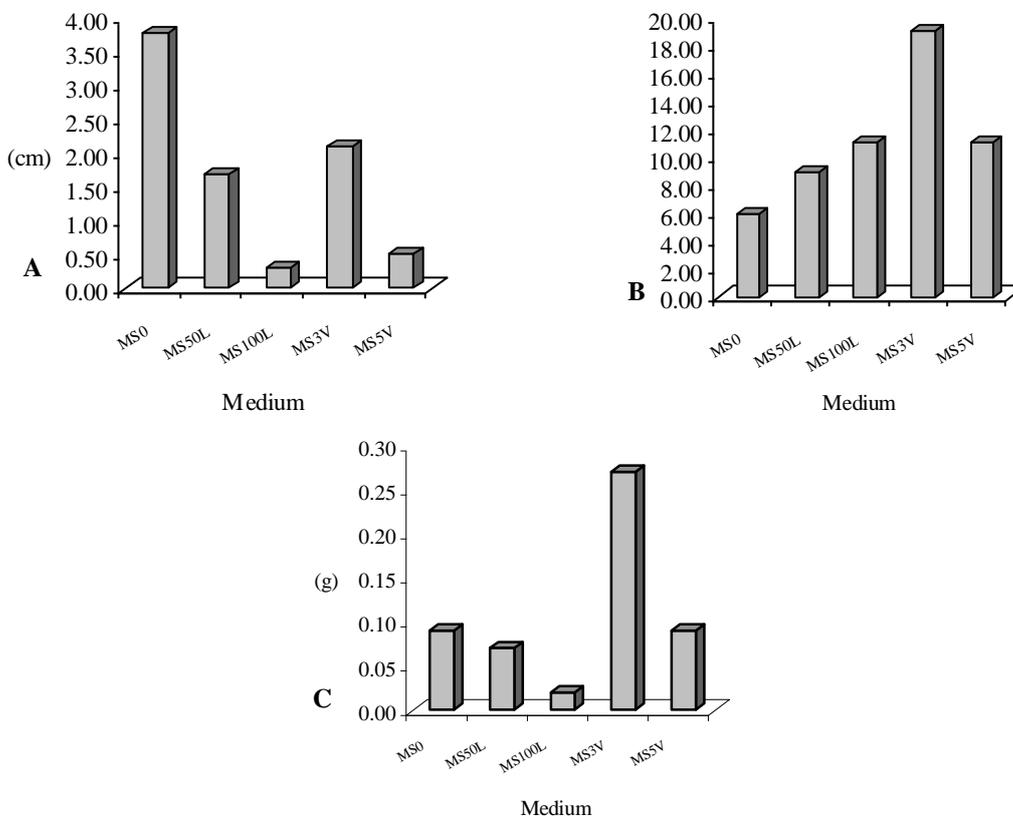
Akar rambut yang dikultur pada medium dasar MS disubkulturkan pada medium MS modifikasi. Akar rambut yang digunakan adalah klon akar yang tumbuh lebih cepat dan lebih vigor. Ada empat medium MS modifikasi yang digunakan yaitu MS50L, MS100L, MS3V dan MS5V. Penambahan prekursor L-triptofan menunjukkan penghambatan pertumbuhan

akar rambut. Hal ini dilihat dari ukuran panjang akar rambut, namun percabangan akar tetap terbentuk (Gambar 3).

Terjadinya penghambatan pertumbuhan akar rambut diduga karena komposisi auksin yang berlebihan. Hal tersebut terjadikarena L-triptofan akan diubah oleh enzim triptofan 2-monooksidase dan amino hidrolase menjadi IAA (auksin). Auksin dapat menyebabkan pembelahan sel di dalam sel jaringan akar, tetapi juga dapat menyebabkan jaringan akar mengeluarkan etilen yang merupakan penyebab langsung penghambatan. Menurut Gunawan & Ermawati (1992) konsentrasi auksin yang rendah dapat meningkatkan pertumbuhan, sebaliknya konsentrasi auksin yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan. Wattimena *et al.* (1992) menerangkan bahwa pada tahap awal pengaruh auksin adalah pembentukan sekumpulan akar-akar lateral, tetapi pada tahap selanjutnya tidak terjadi penambahan pembentukan akar. Hal ini menjelaskan bahwa adanya faktor selain auksin yang diperlukan dan telah habis digunakan. Faktor tersebut mungkin terbentuk di dalam ujung akar.

Medium MS3V dan MS5V merupakan medium dengan peningkatan konsentrasi vitamin medium dasar MS. Pada MS3V dan MS5V tersebut akar rambut memperlihatkan percabangan lateral yang lebih banyak dan terbentuk bulu-bulu akar pada ujung akar. Akan tetapi percabangan akar tersebut memiliki ukuran yang lebih pendek dibandingkan dengan akar yang dikultur pada medium MS tanpa modifikasi.

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pada medium MS50L rerata panjang akar dan jumlah cabang akar rambut berturut-turut adalah 1,7 cm dan 9,0 cabang. Sedangkan pada medium MS100L rerata



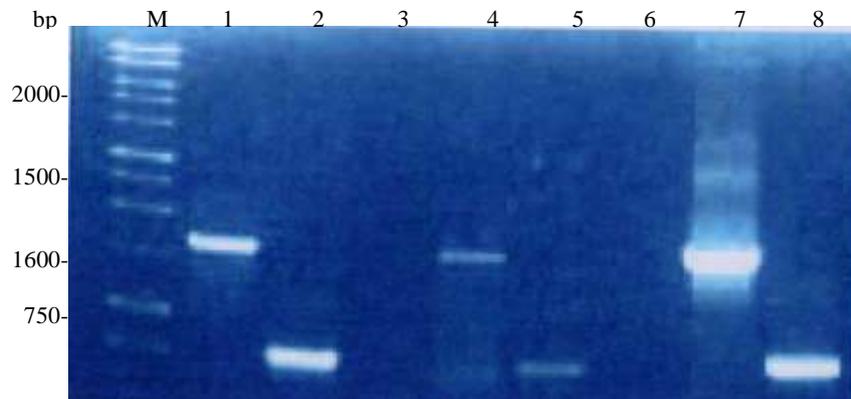
Gambar 4. Panjang (A), jumlah (B) dan bobot basah akar rambut (C) *C. ledgeriana* yang dikultur selama delapan minggu pada medium MS (MS0), MS + 50 mg/L L-triptofan (MS50L), MS + 100 mg/L L-triptofan (MS100L), MS + vitamin tiga kali MS (MS3V), dan MS + lima kali vitamin MS (MS5V).

Figure 4. Length (A), numbers (B), and fresh weight of hairy root (C) *C. ledgeriana* cultured during Eight weeks in MS (MS0), MS +50 mg/L L-tryptophane (MS50L), MS +100 mg/L L-tryptophane (MS100L), MS + vitamins, three times MS (MS3V), and five times (MS5V).

panjang akar adalah 0,3 cm dengan 11,0 cabang. Rerata panjang akar dan jumlah cabang akar rambut yang dikultur pada medium MS3V dan MS5V berturut-turut 2,1 cm dengan 19,0 cabang dan 0,5 cm dengan 11,0 cabang. Sedangkan pada medium MS tanpa modifikasi yang menjadi

kan sebagai kontrol, rerata panjang akar rambut adalah 3,8 cm dengan rerata jumlah cabang adalah 6,0 cabang (Gambar 4 A&B).

Berdasarkan panjang akar dan jumlah cabang akar yang terbentuk, akar rambut tanaman kina lebih baik dikulturkan pada medium MS3V. Vitamin dalam medium MS



Gambar 5. Fraksinasi DNA setelah PCR. (M) marka 1 kb ladder DNA. (1) Akar rambut *C. succirubra* dengan primer TR, (2) primer *rol B*, (3) daun *C. succirubra* dengan primer *rol B*, (4) akar rambut *C. ledgeriana* dengan primer TR, (5) *A. rhizogenes* galur LBA 9457, (7) primer TR, (8) primer *rol B*.

Figure 5. DNA fractionation after PCR. (M) 1 kb DNA ladder. (1) Hairy root of *C. succirubra* with TR primer, (2) primer *rol B*, (3) *C. succirubra* leaves with *rol B* primer, (4) hairy root *C. ledgeriana* with TR primer, (5) *A. rhizogenes* strain LBA 9457, (7) TR primer, (8) *rol B* primer.

umumnya merupakan kelompok vitamin B. Menurut George & Sherrington (1984).

Vitamin B berfungsi mempercepat pembelahan sel pada meristem akar dan juga berperan sebagai koenzim dalam reaksi yang menghasilkan energi dan reaksi-reaksi enzimatik. Beberapa vitamin dapat meningkatkan pembentukan akar lateral. Ikenaga *et al.* (1995) memperoleh pertumbuhan akar rambut *Solanum aculeatis-simum* lebih baik pada medium B5 dengan 3% sukrosa dibandingkan dengan medium Linsmaier & Skoog (LS). Sedangkan Yonemitsu *et al.* (1990) menyatakan bahwa pertumbuhan akar rambut *Lobelia inflata* L. memperlihatkan morfologi yang berbeda antara akar rambut yang dikultur dalam medium 1/2 MS, MS dan B5 dengan medium NN. Kultur akar rambut pada medium 1/2 MS, MS dan

B5 memperlihatkan percabangan lateral dan rambut-rambut akar yang lebih banyak dari pada akar rambut yang dikultur pada medium NN. Dibandingkan dengan bobot basah akar, akar rambut yang dikulturkan pada medium MS3V menunjukkan bobot akar yang lebih besar dari pada akar yang dikulturkan pada medium MS5V, MS50L, S100L dan MS tanpa modifikasi (Gambar 4 C). Konfirmasi transformasi TR dan TL-DNA plasmid dengan PCR

Fraksinasi hasil amplifikasi DNA memperlihatkan bahwa semua sampel menghasilkan pola pita yang sama dengan kontrol positif (plasmid), kecuali kontrol negatif (non transformasi) tidak menghasilkan pita DNA. Dari pola pita yang terbentuk, kedua bagian T-DNA dapat terintegrasi pada semua akar rambut. Bagian TL-DNA (*rol B*)

muncul dengan bobot molekul 780 bp, sedangkan bagian TR-DNA muncul dengan bobot molekul 1600 bp (Gambar 5). Ri plasmid yang terdapat pada *A. rhizogenes* umumnya berukuran sekitar 140-235 kb dan ragmen DNA yang ditransfer ke dalam sel tanaman sekitar 14-42 kb yang merupakan daerah TR dan TL-DNA (Dow Kung *et al.*, 1993). Ermayanti *et al.* (2000) dan Subroto *et al.* (2000) mendapatkan galur bakteri ATCC-15834 yang diinokulasikan ke tanaman *Azadirachta* dan *Solanum nigrum* menunjukkan hasil analisis PCR pada 780 bp untuk TL-DNA dan 1672 bp untuk TR-DNA. Sedangkan Lodhi & Charlwood (1996) juga mendapatkan hasil analisis PCR dari *A. rhizogenes* galur LBA 9402 pada 0,78 kb untuk TL-DNA.

### Kesimpulan

Dari sembilan galur *A. rhizogenes* yang diinokulasikan, hanya galur LBA 9457 yang dapat menginduksi pembentukan akar rambut pada *C. succirubra* dan *C. ledgeriana*. Hasil inokulasi tersebut terlihat *C. ledgeriana* lebih rentan dibandingkan dengan *C. succirubra*. Secara keseluruhan dari hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pertumbuhan akar rambut tanaman kina relatif lambat.

Berdasarkan panjang akar, jumlah percabangan akar lateral dan bobot basah akar, pertumbuhan akar rambut lebih baik pada medium dasar MS dan medium modifikasi MS3V. Akar rambut yang dikultur pada medium dasar MS berbeda secara fenotip dibandingkan dengan akar rambut yang dikultur pada medium MS3V. Hasil uji konfirmasi transfer DNA, kedua bagian TL dan TR-DNA dapat terintegrasi

pada akar rambut yang diperoleh. Pita TR dan TL-DNA muncul pada gel elektroforesis dengan bobot molekul DNA masing-masing 1600 pb dan 780 pb.

### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada (i) Dewan Riset Nasional (DRN) dan lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) yang telah membiayai penelitian ini melalui proyek Riset kompetitif Riset Unggulan Terpadu (RUT) XI dengan surat perjanjian No. 14.262/SK/RUT/2004; (ii). Laboratorium mikrobiologi, LIPI, Cibinong atas izin menggunakan koleksi *A. Rhizogenes*.

### Daftar Pustaka

- Anderson, L.A., A.T. Keene & J.D. Philipson (1982). Alkaloid production by leaf organ, root organ and cell suspension culture of *Cinchona ledgeriana*. *Plant Med.*, 86, 22-27.
- Anderson, L.A., J.D. Philipson & M.F.S. Robert (1986). Aspect of alkaloid production by plant cells cultures. In P. Morris *et al.* (eds.) *Secondary Metabolism in Plant Cells Culture*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Aoki, T, H. Matsumoto, Y. Asako, Y. Matsunaga & K. Shimomura (1997). Variation of alkaloid productivity among several clones of hairy roots and regenerated plants of *Atropa belladonna* transformed with *Agrobacterium rhizogenes* 15834. *Plant Cell Rep.*, 16, 282-286.
- Astika, W. (1975) . Klon QRC, asal usul dan daya produksinya. *Warta BPTK*, 1 (2,3), 175 - 192.

- Bergman, B.A. J. Dukes & A.M. Stomp (1997). Infection of *Pinus radiata* with *Agrobacterium rhizogenes* and long-term growth of detached hairy root *in vitro*. *New Zealand J. Forestry Sci.*, **27**(1)11-22.
- Boitel-Conti, M., J.V. Laberche, A.Lanove, C.Ducrocq & B.S. Sangwan-Norreel (2000). Influence of feeding precursors on tropane alkaloid production during an abiotic stress in *Datura innoxia* transformed roots. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **60**, 131-137.
- Dow-Kung, S. & C.J. Arntzen (1993). *Plant Biotechnology*. Boston, Butterworths.
- Fowler, M.W. (1983). Commercial application and economics aspects of plant mass cell culture. In Mantel SH & Smith (eds.) *Plant Biotechnology* Cambridge, Cambridge University Press.
- Gamborg, O.L., R.A.Miller & K. Oyama (1968). Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cell. *Exp. Cell Res.* **50**, 151 – 158.
- Geerlings, A., D. Hallard, A.M. Caballero, I.L. Cardoso, R. van der Heijden & Verpoorte (1999). Alkaloid production by a *Cinchona officinalis* 'Ledgeriana' hairy root culture containing constitutive expression constructs of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase cDNAs from *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.*, **19**, 191-196.
- George, E.F. & P.D. Sherrington (1984). *Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories*. England, Exegetics Ltd.
- Giri, A. & M.L.Narasu (2000). Transgenic hairy root: recent trends and applications. *Biotech. Adv.*, **18**, 1-22.
- Gunawan L.W. & A. Ernawati (1992). Produk metabolit sekunder. *Dalam* Harran, S. & N. Ansori (Eds). *Bioteknologi Pertanian 2*. Bogor, PAU Institut Pertanian Bogor.
- Hamill, J.D., R.J. Robins & M.J.C. Rhodes (1989). Alkaloid production by transformed root cultures of *Cinchona ledgeriana*. *Planta Med.*, **55**, 354-358.
- Hay, C.A., L.A. Anderson, M.F.Robert & J.D. Phillipson (1986). *In vitro cultures of Cinchona spesies. precursor feeding of C. ledgeriana root organ suspension cultures with L-tryptophan*. Berlin, Springer-Verlag.
- Heller, R. (1953). Recherches sur la nutrition minerale de tissues vegetanx cultivees *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Biol. Veg.*, **1**, 1 – 11.
- Hinchee, M. A. W., C.A.Newell, D.V.Connor-Ward, T.A. Armstrong, W.R.Deaton, S.S. Sato & R.J. Rozman (1990). Transformation and regeneration of non Solanaceous crop plants, In J.P. Gustafson (ed). *Gene Manipulation in Plant Improvement*. New York, Plenum Press. p. 203- 212.
- Ikenaga, T., T. Oyama & T. Muranaka (1995). Growth and steroidal saponin production in hairy root cultures of *Solanum aculeatissimum*. *Plant Cell Rep.*, **14**, 413-417.
- Kamada, H., N. Okamura, M.Satake, H.Harada & K. Shimomura (1986). Alkaloid production by hairy root culture in *Atropla belladonna*. *Plant Cell Rep.*, **5**, 239-242.
- Linsmaier, E.M. & F. Skoog (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **18**, 100-127.
- Lodhi, A.H. & B.V. Charlwood (1996). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Rubia peregrine* L. *in vitro* accumulation of Anthraquinones. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **46**,103-108.

Kultur akar rambut *Cinchona ledgeriana* dan *C. succirubra* ....

- Menze, A. & C. Moller (1999). Transformation of different *Brassica napus* cultivars with three different strains of *Agrobacterium rhizogenes*. In *Proc. the 10<sup>th</sup> Int. Rapeseed Congress*, Canberra, Australia.
- Murashige, T. & F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**, 473 – 497.
- Musalam, Y., Titik Sukasmono & Supria (1980). Alkaloid kinina di dalam tanaman kina *Cinchona ledgeriana*. *Warta BPTK*, **6**, 88-93.
- Nillson, O. & O. Olsson (1997). Getting to the root : the role of The *Agrobacterium rhizogenes* rol genes in the formation of hairy roots. *Physiol. Plant.*, **100**, 463-473.
- Orozco-Castillo, C., K.J. Chalmers, R. Waugh & W. Powell (1994). Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, **87**, 934-938.
- Owens, L.D. & A.C. Smigocki (1988). Transformation of soybean cell using mixed strains of *Agrobacterium tumefaciens* and phenolic compounds. *Plant Physiol.*, **88**, 570- 573.
- Potrykus, I. (1990). Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and result. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **42**, 205- 225.
- Rhodes, M.J.C., M. Hilton, A.J. Parr, J.D. Hamill & R.J. Robins (1986). Nicotine production by hairy roots cultures of *Nicotiana rustica*: fermentation and products recovery. *Biotechnol. Lett.*, **8**, 415-420.
- Rhodes, M. J.C., A.J. Parr, A. Giuliatti & E.L.H. Aird (1994). Influence of exogenous hormones on the growth and secondary metabolite formation in transformed root cultures. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **38**, 143-151.
- Sambrook, J.E. & T. Frits & Maniatis (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. New York.
- Scragg, A.H., P.Morris & J. Ailan (1986). The effect of plant growth regulators and alkaloid formation in *Cinchona ledgeriana* callus culture. *J. Plant Physiol.*, **124**, 371-377.
- SIL. (2000). *Peluang Pasar dan Perkembangan Industri Kina Indonesia*. Sinkona Indonesia Lestari.
- Staba, E.J. & A.C. Chung (1981). Quinine and Quinidine production by *Cinchona* leaf, root and unorganized cultures. *Phytochem.*, **20** (11), 2495-2481.
- Stomp, A.M., C. Loopstra, W.S.Chilton, R.R. Sederoff & L.W. Moore (1990). Extended host range of *Agrobacterium tumefaciens* in the genus *Pinus*. *Plant Physiol.*, **92**, 1226- 1232.
- Subroto, M.A., D. Sudradjat, A. Djanakum & E. Widayat (2000). Peningkatan efisiensi regenerasi akar rambut *Solanum nigrum* L. melalui induksi dengan hormon eksogen. *Dalam Pros. Seminar Hasil Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi II*. p. 279-287.
- Urdang, G. (1945). The legend of *Cinchona*. *The Scientific Monthly*, **61**, 17-20.
- Vazquez-Flota, F., O.Moreno-Volenzuela, M.L. Miranda-Ham & J. Loyola-Vorgas V.M. (1994). Catharanthine and ajmaciline synthesis in *Catharanthus roseus* hairy root culture. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **38**, 273-279.
- Verstrijden, U. (1975). Beberapa aspek kimia kinina dan kinidina. *Warta BPTK* **1**, 109-118.

- Vilaine, F., C. Charbonnier & F. Casse-Delbart (1987). Further insight concerning the TL-region of the Ri-plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* strain A4 transfer of a 1.9 kb fragment is sufficient to induce transformed roots on tobacco leaf fragments. *Mol. Gen.Genet.*, **210**, 111-115.
- Wattimena, G.A., L.W. Gunawan, N.A. Mattjik, N.M.A. Wiendi & A. Ermawati (1992). *Bioteknologi Tanaman Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman*. Bogor, PAU Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor.
- White, F.F., B.H. Taylor, G.A. Huffman, M.P. Gordon & E.W. Nester (1985). Molecular genetic analysis of the transferred DNA regions of the root inducing plasmid *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Bacteriol.*, 164 (1), 33-44.
- Wielanek, M. & H. Urbanek (1999). Glucotropaeolin and myrosinase production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus*. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, 57, 39-45.
- Winans, S. (1992). Two way chemical signaling *Agrobacterium* plant interactions. *Microbiol. Rev.*, **56**, 12- 31.
- Yonemitsu, H., K. Shimosmura, M.Satake, S. Mochida, M.Tanaka, T. Endo & A. Kaji (1990). Lobeline production by hairy root culture of *Lobelia inflata* L. *Plant Cell Rep.*, **9**, 307-310.