

**INDUKSI AKAR RAMBUT PADA HIPOKOTIL TOMAT
(*Lycopersicon esculentum*, Mill.) MELALUI TRANSFORMASI
GENETIK DENGAN *Agrobacterium rhizogenes* DAN
PENAMBAHAN AUKSIN**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi**

oleh :

**SHINTA MARINA PUSPITA KAWAL NEGARA
0410910046-91**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2009

HALAMAN PENGESAHAN

INDUKSI AKAR RAMBUT PADA HIPOKOTIL TOMAT (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) MELALUI TRANSFORMASI GENETIK DENGAN *Agrobacterium rhizogenes* DAN PENAMBAHAN AUKSIN

oleh:
Shinta Marina Puspita Kawal Negara
0410910046-91

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 6 Juli 2009
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana
Sains dalam bidang Biologi

Pembimbing I

Pembimbing II

DR. Wahyu Widoretno, MSi.
NIP. 131 837 696

DR. Ir. Estri Laras A, MSc. St.
NIP. 131 759 408

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi
Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya

Dr. Sri Rahayu, M.Kes
NIP. 131 652 677

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Shinta Marina Puspita Kawal Negara
NIM : 0410910046-91
Program Studi : Biologi
Penulis Skripsi berjudul :

**INDUKSI AKAR RAMBUT PADA HIPOKOTIL TOMAT
(*Lycopersicon esculentum*, Mill.) MELALUI TRANSFORMASI
GENETIK DENGAN *Agrobacterium rhizogenes* DAN
PENAMBAHAN AUKSIN**

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri, tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini
2. Apabila di kemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan segala kesadaran.

Malang, 6 Juli 2009
Yang menyatakan,

Shinta Marina P. K. N.
0410910046-91

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak untuk dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan dicatat tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan dengan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



INDUKSI AKAR RAMBUT PADA HIPOKOTIL TOMAT (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) MELALUI TRANSFORMASI GENETIK DENGAN *Agrobacterium rhizogenes* DAN PENAMBAHAN AUKSIN

Abstrak

Tomat mengandung metabolit sekunder yang bermanfaat penting bagi kesehatan. Pentingnya manfaat tersebut menyebabkan kandungan metabolit sekunder perlu ditingkatkan. Teknik kultur jaringan melalui kultur akar rambut dapat meningkatkan metabolit sekunder. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh transformasi genetik dengan *A. rhizogenes* dan penambahan auksin terhadap induksi akar rambut pada hipokotil tomat. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap faktorial. Induksi akar rambut dilakukan dengan transformasi genetik dan perlakuan auksin. Transformasi genetik dilakukan dengan menginokulasi *A. rhizogenes* pada eksplan hipokotil tomat selama 0, 15, 30, dan 60 menit sedangkan perlakuan auksin dilakukan pada medium MS ditambah NAA atau IBA dengan konsentrasi 0, 2, 4, dan 6 mg/L. Eksplan akar rambut hasil transformasi genetik dan perlakuan auksin terbaik dikulturkan dalam MS cair tanpa zpt dan dengan penambahan zpt. Hasil penelitian menunjukkan bahwa transformasi genetik dengan *A. rhizogenes* pada eksplan hipokotil dapat meningkatkan jumlah dan berat basah akar rambut. Lama inokulasi 15 menit meningkatkan jumlah dan berat basah akar rambut lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Efisiensi transformasi genetik pada lama inokulasi 15 menit adalah sebesar 67%. Penambahan NAA dapat meningkatkan jumlah dan berat basah akar rambut lebih tinggi dibandingkan dengan IBA. Penambahan NAA 6 mg/L dapat meningkatkan pertumbuhan akar rambut paling tinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Meskipun demikian, IBA lebih mempercepat waktu munculnya akar rambut dibandingkan NAA. Eksplan akar rambut hasil transformasi genetik dapat menginduksi akar rambut pada media tanpa zpt lebih tinggi dibandingkan eksplan hasil perlakuan auksin sedangkan pada media dengan penambahan zpt, eksplan hasil perlakuan auksin lebih menginduksi akar rambut dibandingkan eksplan hasil transformasi genetik.

Kata Kunci : *Agrobacterium rhizogenes*, auksin, Inokulasi, *Lycopersicon esculentum*, transformasi genetic

HAIRY ROOT INDUCTION ON TOMATO (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) HYPOCOTYL WITH GENETIC TRANSFORMATION BY *Agrobacterium rhizogenes* AND ADDITION OF AUXIN

Abstract

Tomato have secondary metabolites which useful to healthy. The important of those secondary metabolites caused to increase it through tissue culture technique by hairy root culture. The aims of this research were to investigate the effect of genetic transformation with *Agrobacterium rhizogenes* and addition of auxin on the hypocotyls of tomato. This research used randomizes complete factorial design. Hairy root induction was done by genetic transformation and auxin treatment. Genetic transformation was done by *A. rhizogenes* inoculation to explants for 0, 15, 30, and 60 minutes although auxin treatment was done by cultured on MS with NAA or IBA with 0, 2, 4, and 6 mg/L. Hairy root explants from best result of genetic transformation and auxin treatment was done by cultured on liquid MS with hormone and without hormone. Result of research showed that genetic transformation with *A. rhizogenes* on hypocotyls explants increased the fresh weight and the number of hairy root. Inoculation of *A. rhizogenes* for 15 minutes increased the fresh weight and the number of hairy root than others treatment. The efficiency of genetic transformation at inoculation of 15 minute was 67%. Addition of NAA increased the fresh weight and the number of hairy root but did not increase the hairy root initiation velocity than IBA. Addition of NAA 6 mg/L more increased the hairy root induction than other treatments. Even though, IBA induced time initiation of hairy root faster than NAA Hairy root explants from genetic transformation induced hairy root on liquid MS without NAA higher than explants from auxin treatment but on liquid MS with NAA, explants from auxin treatment more induced of hairy root than explants from genetic transformation.

Key words : *Agrobacterium rhizogenes*, auxin, genetic transformation, inoculation, *Lycopersicon esculentum*,

KATA PENGANTAR

*Assalamu'alaikum warohamtullohi wabarokatuh
Bismillahirrohmanirrohim,*

Alhamdulillah Rabbal 'Alamin, puji syukur atas rahmat Allah *Subhanallahu wata'ala*, Tuhan semesta alam, yang dengan kebesaran, bimbingan, petunjuk, karunia dan ridho'Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi dengan penuh perjuangan dan banyak pengorbanan. Sholawat dan salam semoga selalu tercurahkan kepada junjungan kita Nabi besar akhir jaman, *Rasulullah Shalallahu 'Alaihi wassalam* beserta semua umatnya.

Penulisan skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains dalam bidang Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian yang panjang dari awal mencari ide hingga akhir penyelesaian selalu membutuhkan perjuangan, kesabaran, dan rahmatNya serta tidak luput dari peran serta pihak-pihak yang ikut membantu terselesaikannya skripsi ini. Maka dari itu penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

1. DR. Wahyu Widoretno, Msi selaku dosen pembimbing I dan DR. Ir. Estri Laras A, MSc. St selaku dosen pembimbing II yang telah banyak memberikan pengarahan materi, ide, dan do'a serta kesabarannya
2. Ir. Retno Mastuti, Mag. Sc. Dag.Sc., DR. Nunung Harijati, Msi, dan Tri Ardyati MAgr. PhD. selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan kritikan yang sangat membangun
3. DR. Sri Rahayu, MKes. Selaku ketua jurusan dan para bapak/ibu dosen pengajar serta karyawan staf TU dan laboran FKM mas Sugi dan mbak wati. Mereka semua adalah orang yang berhati mulia yang penuh kesabaran
4. Papa, Mama, Adek-adekku (Firhan, Faris, Koko, & Darma 'liliputQ'), Alm. Yangkungku dan Yangti juga Om tyo yang telah melengkapi keindahan hidupku, do'a dan kasih sayang mereka selalu mengiringi hingga kelulusanku
5. Saudaraku yang jauh di kota Reog atas do'a, ketelatenan, kesabaran, dan kesetiiaannya untuk studi panjangku ini
6. Efit, Faiza, Farih, Azizi, Elok, Nurul, Nanik, Elly, Deby, Asti, Asih, Fida, dan Mbak Sari juga mas Rizza dengan segala bantuan

dan kebbaikannya juga kebersamaan, semua do'a dan semangat kalian untukku

7. Semua civitas akademik angkatan 2004 dan seluruh angkatan biologi UB yang selama ini telah banyak membantu

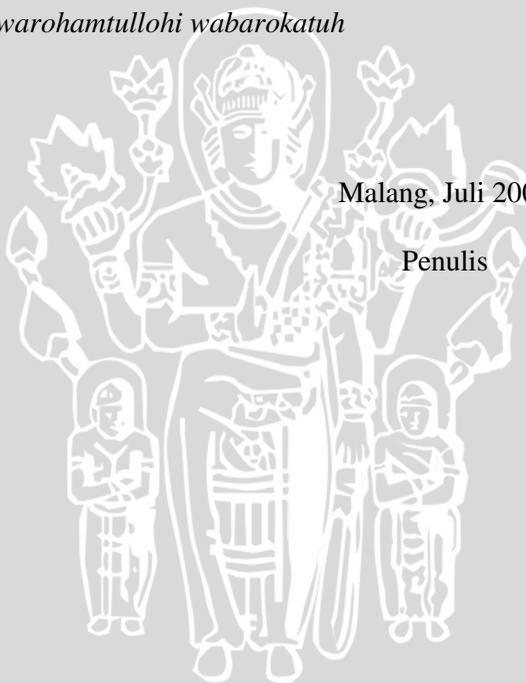
Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih banyak kekurangan. Seperti ibarat tak ada gading yang tak retak. Oleh karena itu, penulis sangat berharap kritik dan saran yang membangun untuk penelitian selanjutnya guna mendapatkan sesuatu yang baik untuk kemaslahatan ummat. Dan semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis dan semua pihak. Amin Ya Rabbal 'Alamin.

Alhamdulillah Rabbil 'Alamin

Wassalamu'alaikum warohamtullohi wabarokatuh

Malang, Juli 2009

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
Tinjauan Umum Tomat (<i>Lycopersicon</i> <i>esculentum</i> , Mill.) sebagai Tanaman Obat	5
Transformasi Genetik.....	6
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> sebagai Vektor Transformasi.....	7
Kultur Akar Rambut untuk Meningkatkan Metabolit Sekunder.....	10
Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Efisiensi Transformasi Genetik.....	12
Fisiologi, Aktifitas, dan Struktur Auksin.....	13
Pengaruh Auksin terhadap Induksi Akar Rambut	15
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat	17
3.2 Rancangan Penelitian	17
3.3 Tahapan Penelitian	
3.3.1 Pembuatan Media	17
3.3.2 Perkecambahan Biji Tomat.....	19

3.3.3	Optimasi Medium Seleksi.....	19
3.3.4	Pre-Kultur Eksplan Hipokotil Tomat.....	20
3.3.5	Persiapan Isolat <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ATCC 15834	20
3.3.6	Transformasi Genetik <i>A. rhizogenes</i> ke Eksplan Hipokotil Tomat.....	21
3.3.7	Efisiensi Transformasi Genetik.....	22
3.3.8	Induksi Akar Rambut Eksplan Hipokotil tomat Melalui Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh.....	22
3.3.9	Kultur Akar Rambut (<i>Hairy Roots Culture</i>) dalam Medium MS Cair	22
3.3.10	Evaluasi Parameter Morfologis dan Penentuan Presentase Induksi Akar.....	23
3.3.11	Analisis Data.....	23
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		
4.1	Pengaruh Transformasi Genetik Dengan <i>A. rhizogenes</i> Terhadap Induksi Akar Rambut	25
4.2	Pengaruh Penambahan Auksin Terhadap Induksi Akar Rambut.....	32
4.3	Kultur Akar Rambut	36
 BAB V PENUTUP		
5.1	Kesimpulan.....	41
5.2	Saran	41
 DAFTAR PUSTAKA		43
LAMPIRAN		51

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Mekanisme transfer T-DNA <i>Agrobacterium</i> ke dalam genom tanaman	8
Gambar 2.2 Mekanisme biosintesis fitoaleksin dan komponen metabolit sekunder sebagai dampak sistem pertahanan sel tanaman.....	12
Gambar 2.3 Struktur kimia IBA dan NAA.....	15
Gambar 4.1 Persentase jumlah eksplan akar rambut yang mati pada optimasi medium selektif kanamisin.....	26
Gambar 4.2 Pengaruh transformasi genetik dengan variasi lama inokulasi <i>A. rhizogenes</i> terhadap pembentukan akar rambut umur pada hipokotil tomat, 30 hari setelah kultur.....	27
Gambar 4.3 transformasi genetik dengan variasi lama inokulasi <i>A. rhizogenes</i> terhadap jumlah dan berat basah akar rambut pada hipokotil tomat, 30 hari setelah kultur.	28
Gambar 4.4 Respon eksplan akar rambut hasil dari variasi lama inokulasi dengan <i>A.rhizogenes</i> pada medium selektif kanamisin 100 mg/L.....	30
Gambar 4.5 Pengaruh lama inokulasi terhadap efisiensi transformasi genetik dengan <i>A. rhizogenes</i> pada medium selektif kanamisin 100 mg/L	31
Gambar 4.6 Pengaruh penambahan IBA dan NAA terhadap pembentukan akar rambut pada hipokotil tomat 30 hari setelah kultur.....	33
Gambar 4.7 Pengaruh penambahan NAA dan IBA terhadap jumlah dan berat basah akar pada hipokotil tomat 30 hari setelah kultur.....	34
Gambar 4.8 Pertumbuhan akar rambut hasil transformasi genetik dan perlakuan NAA pada medium MS cair tanpa dan dengan zpt NAA pada umur 15 hari.....	36

Gambar 4.9 Pertumbuhan akar rambut hasil transformasi genetik dan perlakuan NAA pada medium MS cair tanpa dan dengan zpt NAA pada umur 15 hari.....37

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1. Pengaruh penambahan auksin berupa NAA dan IBA terhadap kecepatan inisiasi akar rambut (n=3).....	32
---	----

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Komposisi Medium Yeast Mannitol Agar/ Broth.....	53
Lampiran 2. Komposisi Medium MS dasar.....	54
Lampiran 3. Analisis Statistik Pengaruh Penambahan kanamisin selama 30 hari pada Jumlah Eksplan yang Mati.....	55
Lampiran 4. Analisis Statistik Pengaruh Inokulasi <i>A. rhizogenes</i> terhadap jumlah dan berat basah akar berambut pada eksplan hipokotil tomat umur 30 hari	56
Lampiran 5. Analisis Statistik Pengaruh Inokulasi <i>A. rhizogenes</i> terhadap efisiensi transformasi genetik	57
Lampiran 6. Analisis Statistik Pengaruh penambahan zat pengatur tumbuh terhadap jumlah dan berat basah akar berambut pada eksplan hipokotil tomat umur 30 hari.....	58
Lampiran 7. Analisis Statistik Pengaruh Asal eksplan dan penambahan zat pengatur tumbuh terhadap jumlah akar berambut lateral pada medium MS cair	60
Lampiran 8. Skema Kerja Penelitian.....	61

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Tomat (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) merupakan tanaman budidaya yang buahnya dimanfaatkan sebagai bahan makanan segar maupun olahan yang memiliki manfaat penting bagi kesehatan. Kandungan metabolit sekunder dalam buah tomat yang berpotensi untuk kesehatan adalah likopen (Dalimartha, 1999), rhisitin dan tomatin (Tsuneo dkk, 2005). Likopen merupakan bagian dari karotenoid yang larut lemak dan memiliki khasiat sebagai antioksidan yang dapat mencegah kerusakan sel akibat radikal bebas yang dapat memicu kanker, terutama kanker payudara dan prostat (Agarwal dan Rao, 2000).

Tingginya manfaat metabolit sekunder tomat untuk kesehatan menyebabkan perlunya suatu usaha untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder tomat. Peningkatan metabolit sekunder dapat dilakukan secara *in vitro* dengan metode kultur jaringan. Metode ini dipilih karena kondisi kulturnya dapat dikontrol, waktu yang dibutuhkan relatif singkat, bebas kontaminan, dan tidak bergantung pada iklim (Farihah, 2008). Kultur jaringan untuk meningkatkan metabolit sekunder biasanya menggunakan kultur kalus, kultur suspensi sel dan kultur akar (Radji, 2005). Kultur akar merupakan kultur organ yang umum digunakan untuk meningkatkan biosintesis metabolit sekunder yang lebih optimal. Hal ini berkaitan dengan keberadaan sel-sel terdiferensiasi yang lebih banyak terdapat pada organ atau jaringan dewasa yang memiliki enzim-enzim kompleks untuk biosintesis dan akumulasi metabolit sekunder lebih tinggi dan kompleks dibandingkan jaringan muda atau yang tidak mengalami diferensiasi (Wu, 2007).

Akar yang digunakan sebagai eksplan pada kultur akar rambut dapat dihasilkan melalui transformasi genetik, baik secara langsung atau tidak langsung, atau dengan menggunakan media yang mengandung hormon spesifik. Akan tetapi transformasi genetik secara tidak langsung dengan vektor bakteri *A. rhizogenes* merupakan suatu teknik transformasi genetik yang lebih efisien dan efektif untuk menghasilkan transforman unggul dengan kandungan metabolit sekunder yang lebih tinggi, bahkan dapat dikultur dengan

media tanpa hormon (Zhi dan Min, 2006), memiliki tingkat kestabilan genetik yang tinggi dan seragam (Mathius dkk., 2004) serta dapat menghasilkan jumlah transforman yang lebih banyak, murah dan relatif lebih sederhana dibandingkan dengan teknik lainnya (Ferawati, 2001).

Transformasi genetik dengan *A. rhizogenes* pada *Mexican lemon* (*Citrus aurantifolia* Christm.) lebih efisien dibandingkan *A. tumefaciens* (Chavez-Vella, 2003). Akar rambut hasil transformasi genetik dengan *A. rhizogenes* juga dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder yaitu *anthraquinone* pada *Rubia cordifolia* (Bulgakov dkk., 2003), dan produksi *artemisin* dari *Artemisia annua* L. (Cai dkk., 1995), serta *puerarin* dari *Pueraria phaseoloides* (Shi dan Kintzios, 2003).

Agrobacterium rhizogenes dapat mentransformasikan bagian *T-DNA*, yang di dalamnya terdapat gen *rol*, ke dalam genom tanaman sehingga menyebabkan tanaman tersebut menampilkan fenotip berupa akar rambut atau dikenal dengan 'hairy root' (Mathius dkk., 2004). Salah satu *wild type* *A. rhizogenes* strain ATCC 15834 dapat menginduksi akar rambut pada berbagai jenis tanaman budidaya, contohnya tanaman *Astragalus verrucosus*, *Helichrysum italicum*, *Salvia wagneriana* dan *Solidago virgaurea* (Savona dkk., 2004), serta lebih efektif dibandingkan strain ATCC 31798, ATCC 39207 dan ATCC 11325 pada tanaman *Eucommia* (Wu, 2007).

Akar rambut juga dapat diinduksi dengan penambahan zat pengatur tumbuh eksogen pada media kultur jaringan (Caro dkk., 2003). Pembentukan jaringan akar ditentukan oleh penggunaan zat pengatur tumbuh yang tepat, baik jenis maupun konsentrasinya. Zat pengatur tumbuh yang dapat digunakan adalah auksin. Auksin sintetik yang biasa digunakan adalah *α -naphthalene-acetic acid* (NAA) dan *Indole-3 butyric acid* (IBA) (Santoso dan Nursandi, 2004). Induksi akar paling banyak pada tunas kina (*Cinchona succirubra*) yaitu dengan menambahkan kombinasi NAA dan IBA masing-masing 0,05 mg/l (Riyadi dan Tahardi, 2005), bahkan 10 mg/L IBA pada tunas *Ziziphus mauritiana* juga dapat menghasilkan akar adventif paling banyak (Sudharsan dkk., 2001). Auksin jenis NAA dan IBA merupakan jenis yang umum digunakan untuk menstimulasi pertumbuhan akar pada bagian tanaman yang terpotong (Taiz dan Zeiger, 2002).

Berdasarkan uraian di atas, induksi akar rambut pada eksplan hipokotil tomat dapat dilakukan dengan transformasi genetik dengan *A. rhizogenes* dan penambahan auksin (IBA dan NAA). Hasil terbaik dari kedua perlakuan dapat digunakan untuk kultur akar rambut dalam medium MS cair melalui kultur akar rambut hasil perlakuan terbaik dalam medium MS cair sebagai upaya awal untuk meningkatkan metabolit sekunder tomat pada penelitian selanjutnya.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah

- 2 Bagaimana pengaruh transformasi genetik dengan *A. rhizogenes* terhadap induksi akar rambut pada eksplan hipokotil tomat ?
- 3 Bagaimana pengaruh konsentrasi IBA dan NAA terhadap induksi akar rambut pada hipokotil tomat ?
- 4 Bagaimana respon pertumbuhan akar rambut hasil transformasi genetik dan perlakuan auksin pada medium tanpa zpt atau dengan penambahan zpt?

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan :

1. Mengetahui pengaruh transformasi genetik dengan *A. rhizogenes* terhadap induksi akar rambut pada eksplan hipokotil tomat
2. Mengetahui pengaruh konsentrasi IBA dan NAA terhadap induksi akar rambut pada hipokotil tomat
3. Mengetahui respon pertumbuhan akar rambut hasil transformasi genetik dan perlakuan auksin pada medium tanpa zpt atau dengan penambahan zpt

1.4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini dapat digunakan sebagai langkah awal dalam meningkatkan kandungan metabolit sekunder tomat dan dapat memberikan informasi kepada peneliti tentang metode induksi dan kultur akar rambut tomat dengan transformasi genetik serta penambahan zat pengatur tumbuh.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Umum Tomat (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) sebagai Tanaman Obat

Buah tomat merupakan salah satu jenis tanaman hortikultura yang dapat tumbuh di daerah tropis dan telah lama dikenal luas penggunaannya sebagai bahan makanan yang banyak mengandung zat gizi tinggi bagi kesehatan. Warna merah kekuningan dari buah tomat banyak mengandung zat antioksidan berupa likopen. Likopen adalah karotenoid pada tomat yang kandungannya paling tinggi dan termasuk unsur antioksidan (Agarwal dan Rao, 2000).

Tomat juga memiliki kandungan alkaloid solanin (0,007%), saponin, asam folat, asam malat, asam sitrat, bioflavonoid (termasuk rutin), protein, lemak, gula (glukosa, fruktosa), adenin, trigonelin, kholin, tomatin, mineral, (Ca, Mg, P, K, Na, Fe, sulfur, chlorine), vitamin (B1, B2, B6, C, E, niasin), dan histamin. Rutin dapat memperkuat dinding pembuluh darah kapiler. Klorin dan sulfur bermanfaat sebagai detoksifikan. Klorin alamiah menstimulir kerja hati dari terjadinya sirosis hati dan penyakit hati lainnya. Daun tomat mengandung pektin dan alkaloid yang dapat digunakan sebagai obat luar (Dalimartha, 1998).

Tomat mempunyai banyak varietas, seperti tomat buah yang berukuran besar, tomat sayur dengan ukuran lebih kecil dan tomat ceri yang hanya sebesar kelereng. Apapun jenisnya, tomat mengandung unsur gizi yang hampir sama, yakni kaya akan vitamin A, vitamin C, mineral, dan serat. Keistimewaan lain buah tomat adalah tinginya kandungan likopen. Selain memberikan warna merah pada buah tomat, likopen terbukti efektif sebagai zat antioksidan. Likopen juga dapat menurunkan risiko terkena kanker, terutama kanker prostat, lambung, tenggorokan dan usus besar. Kandungan asam klorogent dan asam p-kumarat di dalam tomat mampu melemahkan zat nitrosamin penyebab kanker. Selain itu, tomat sangat baik untuk menjaga kesehatan mata dan kulit. Zat lain seperti tomatin di dalam tomat bersifat sebagai antibiotik dan antiinflamasi, yaitu dapat menyembuhkan luka dan jerawat. Tomat juga mempunyai sifat antipiretik atau penurun demam. Polisakarida yang

tinggi di dalam tomat mampu mengatasi gangguan pencernaan seperti sembelit dan wasir (Hariana, 2007).

2.2. Transformasi Genetik

Transformasi genetik merupakan salah satu teknik rekayasa genetik yang dapat menghasilkan tanaman transgenik yang memiliki sifat baru seperti ketahanan terhadap hama, penyakit, atau herbisida, atau dapat meningkatkan kualitas hasil (Siregar, 2002), seperti meningkatkan kandungan metabolit sekunder. Teknik ini telah dilakukan untuk memanipulasi lebih dari 120 jenis spesies dari sekitar 35 famili tanaman menggunakan perantara bakteri *Agrobacterium* (tidak langsung) ataupun transformasi secara langsung (Radji, 2005). Teknik transformasi gen secara langsung contohnya perlakuan pada protoplas tanaman dengan elektroporasi, *polyethyleneglycol* (PEG), penembakan eksplan gen (*particle bombardment*) dengan *gene gun* atau di vortex dengan karbit silikon (Siregar, 2002).

Beberapa kelemahan menggunakan teknik transformasi genetik secara langsung antara lain pada *particle bombardment* yang dapat menyebabkan fragmen gen target membawa salinan gen dalam jumlah banyak ketika terintegrasi ke dalam genom tanaman, hal ini terjadi karena proses penembakan gen dilakukan secara acak. Elektroporasi juga memiliki kelemahan yaitu rendahnya efisiensi transfer gen karena sangat bergantung pada kondisi *pulse* listrik dan kondisi tanaman tertentu (Slater dkk., 2003).

Tiga faktor yang harus dipenuhi dalam transformasi genetik, yaitu ketersediaan gen yang akan diintroduksi, sistem transformasi gen ke dalam genom tanaman target dan sistem regenerasi sel-sel transforman menjadi planlet atau tanaman yang membawa dan mengekspresikan gen asing tersebut (Siswanto dkk., 2003). Beberapa gen yang dapat dimanfaatkan untuk perbaikan tanaman melalui rekayasa genetik adalah gen yang mengkode *methionine rich seed protein* yang dimanfaatkan untuk meningkatkan kandungan *methionine* pada kedelai (Siregar, 2002).

Transformasi genetik dengan perantara *Agrobacterium* telah banyak dilakukan karena teknik ini memiliki beberapa kelebihan yaitu dapat menghasilkan jumlah transforman yang banyak, murah dan relatif lebih sederhana dibandingkan dengan teknik lainnya.

Kesederhanaan teknik ini disebabkan kemampuan *Agrobacterium* dalam menginfeksi dan mengintegrasikan *T-DNA* ke dalam genom tanaman tanpa menggunakan bahan atau peralatan rumit dan kompleks, selain itu keuntungan lainnya adalah dapat dihasilkan jumlah salinan gen yang terintegrasi pada genom tanaman target biasanya hanya satu sehingga dapat mengurangi kemungkinan terganggunya fungsi gen lainnya (Ferawati, 2001). Keberhasilan transformasi genetik tanaman ditandai dengan terintegrasinya dan terekspresinya gen yang diintroduksi, dan tetap terpelihara dalam seluruh proses pembelahan sel sampai regenerasi tanaman (Siswanto dkk., 2003).

2.3. *Agrobacterium rhizogenes* sebagai Vektor Transformasi

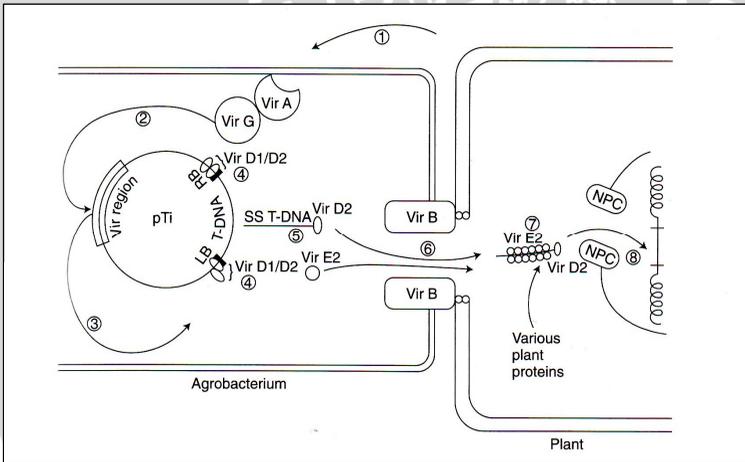
Agrobacterium rhizogenes adalah bakteri gram negatif berbentuk batang yang termasuk ke dalam familia bakteri *Rhizobiaceae* dan sering ditemukan di tanah sekitar batang dan akar tanaman (rhizopora) (Chawla, 2002). *A. rhizogenes* mempunyai kemampuan untuk mentransfer *T-DNA* dari plasmid yang dikenal dengan *Ri-plasmid* (*root inducing plasmid*) ke dalam sel tanaman melalui perlukaan. *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 (Mathius dkk., 2006).

Agrobacterium dapat diklasifikasikan menjadi 3 spesies yaitu *A. tumefaciens* dan *A. rhizogenes* yang sifatnya *virulent*, serta *A. radiobacter* yang *avirulent* atau tidak menginfeksi tanaman (Chawla, 2002). Ekspresi onkogen pada *Ri-plasmid* dari *A. rhizogenes* mencirikan pembentukan akar adventif secara besar-besaran pada tempat yang diinfeksi dan dikenal dengan '*hairy root*'. Keuntungan menggunakan kultur akar rambut (*hairy root culture*) diantaranya relatif seragam, memiliki kestabilan genetik yang tinggi, dan dapat menggunakan medium tanpa penambahan zat pengatur tumbuh, di samping itu mudah dimanipulasi untuk meningkatkan produktivitasnya (Mathius dkk., 2006).

Agrobacterium rhizogenes dapat berperan untuk memudahkan perantara transformasi *T-DNA* ke dalam banyak DNA tanaman dengan dalam waktu yang relatif cepat. *T-DNA* tersebut mengandung

left-right borders, *oncogenic*, gen sintesis *opine*, dan gen resistensi antibiotik (Slater dkk., 2005). Empat lokus yang terdapat pada *T-DNA* yang berperan untuk pembentukan akar adalah *rol A, B, C*, dan *D* (Damiano dan Moncelli, 1998). Gen *rol* merupakan bagian onkogen dari *T-DNA* (Slater dkk., 2003).

Mekanisme transfer dan integrasi *T-DNA* ke dalam *DNA* tanaman dimulai dengan penerimaan dan pengenalan sinyal yang dihasilkan oleh bagian tanaman yang terluka dengan menghasilkan suatu senyawa fenol atau berupa gula. Gambar 2.3.1 menyatakan *Agrobacterium* tersebut yang menempel pada sel tanaman melalui proses inisiasi perlekatan dengan polisakarida atau dengan jaring fibrosa selulosa yang dihasilkan bakteri. Gen *vir A* terinduksi dan merespon fenol yang dihasilkan oleh tanaman kemudian dengan fosforilasi *vir A* akan mengaktifkan *vir G*, gen *vir G* inilah yang nantinya akan mengaktifkan semua gen *vir* lainnya, selain gen *vir A* dan *vir G* (Slater dkk., 2003).



Gambar 2.1. Mekanisme Transfer *T-DNA* *Agrobacterium* ke dalam genom tanaman (Slater dkk., 2003)

Aktivasi gen *vir D1/D2* akan memotong daerah *left* dan *right borders* sehingga dihasilkan *single-stranded DNA (SS T-DNA)*. *Vir D2* berikatan kovalen pada ujung 5' dari *SS T-DNA* membentuk kompleks *T-DNA/VirD2* yang dikeluarkan dari sel bakteri melalui *T-pilus*. *T-pilus* adalah semacam sistem sekretori *membrane channel*

yang dikode oleh gen operon *virB* dan *virD4*. Gen *virE2* teraktivasi dan membuka *channel* di membran sel tanaman. Protein *VirE2* menyelubungi kompleks *T-DNA/VirD2* yang berfungsi untuk pelindung *T-DNA* dari enzim nuklease tanaman, memfasilitasi penempatan inti, dan mengkondisikan bentuk kompleks *T-DNA/virD2* agar dapat melintasi saluran pori membran inti yang dikenal dengan *nuclear-pore complex (NPC)*. Tanaman sendiri memiliki protein pengenalan (*importins*) yang berinteraksi dengan *T-DNA/VirD2* yang memasuki inti sel tanaman. *Importins* tersebut berinteraksi dengan *NLS* (*nuclear localisation signal*) yang dihasilkan oleh *virD2* sehingga terjadi penyatuan *T-DNA* dengan *DNA* tanaman (Slater dkk., 2003).

Evaluasi keberhasilan transformasi genetik sangat tergantung dengan adanya gen penanda (*marker gen*) pada sel transforman agar dapat dibedakan dengan sel yang tidak tertransformasi gen. Gen penanda dapat dibedakan menjadi 2 macam yaitu gen reporter dan gen seleksi. Gen reporter merupakan gen yang dapat menghasilkan respon berupa ekspresi kuantitatif fenotip pada sel transforman, contohnya adalah gen yang mensintesis enzim *opine synthase*, *chloramphenicol acetyl transferase*, β *glucuronidase (GUS)*, *bacterial luciferase (lux F2)*, *firefly luciferase (luc)*, *green fluorescent protein (GFP)*, dan antosianin. Selain itu, Gen seleksi merupakan gen yang dapat menyebabkan sel transforman hidup dan bertahan pada media yang mengandung racun atau agen seleksi yang dapat membunuh sel yang tidak tertransformasi, contohnya adalah gen resisten antibiotik seperti *neomycin phosphotransferase II (NPT II)* yang resisten terhadap kanamisin, neomisin, paromisin, kemudian gen anti metabolit seperti *methotrexate-insensitive dihydrofolate reductase (dhfr)* yang dapat menghambat sintesis *DNA* pada tanaman yang tidak tertransformasi, dan lainnya adalah gen resisten herbisida (Chawla, 2002). Perkembangan sistem seleksi berdasarkan gen penyeleksi alternatif menunjukkan bahwa sejumlah gen penyeleksi efisien untuk digunakan pada transformasi genetik tanaman, diantaranya adalah gen *ipt* dan *rol* (Rahmawati, 2003).

Sistem vektor MAT (*Multi-Auto-Transformation Vector System*) menggunakan onkogen (*onkogen*) dari bakteri *Agrobacterium* sebagai sistem penyeleksi (Rahmawati, 2003). Tipe vektor MAT yang sudah dikembangkan, yaitu tipe *ipt* dan *rol*. Tipe *ipt* (*ipt-type MAT vector system*) adalah gen *isopentenyl transferase (ipt)* dari *A.*

tumefaciens PO22 yang digunakan sebagai gen penyeleksi. Gen *ipt* menyandikan enzim *isopentenyl transferase* untuk sintesis sitokinin, yaitu hormon yang diperlukan dalam perbanyakan sel dan diferensiasi tunas. Kelebihan produksi sitokinin oleh gen *ipt* meningkatkan pembelahan sel dan diferensiasi tunas, sehingga sel yang ditransformasi akan membentuk tunas pada media bebas hormon. Tipe yang kedua adalah tipe *rol* (*rol-type MAT vector system*) di mana gen *rol A, B,* dan *C* dari *A. rhizogenes* NIAES1724 digunakan sebagai gen penyeleksi. Gen *rol* berperan dalam pembentukan dan perbanyakan akar rambut dengan meningkatkan sensitifitas terhadap auksin. Sel yang tertransformasi secara visual dapat dibedakan dengan terbentuknya akar rambut pada media bebas hormon sehingga dengan mudah dapat dipisahkan (Rahmawati, 2003).

Agrobacterium rhizogenes strain ATCC 15834 adalah tipe bakteri yang membawa agropin pada *Ri-plasmid* dengan 2 daerah *T-DNA* yaitu T_L dan T_R . Sintesis agropin dikode oleh T_R -DNA (Wen dkk., 1988). Jenis bakteri ini juga dapat digunakan untuk pembawa *binary* plasmid dari pCAMBIA1301 (Ketchum dkk., 2007) juga plasmid pRi15834 yang mengkode ekspresi agropin (Hodges dkk., 2004). Menurut Siswanto dkk., (2003) *binary vector* pCAMBIA1301 mengandung gen *npt II*, *hptII* dan gen *gus* yang telah disisipi gen *CHI* (gen *chitinase* resistensi terhadap hama-penyakit), vektor pCAMBIA1301 membawa gen penyandi seleksi terhadap resistensi higromisin dan kanamisin.

2.4. Kultur Akar Rambut untuk Meningkatkan Metabolit Sekunder

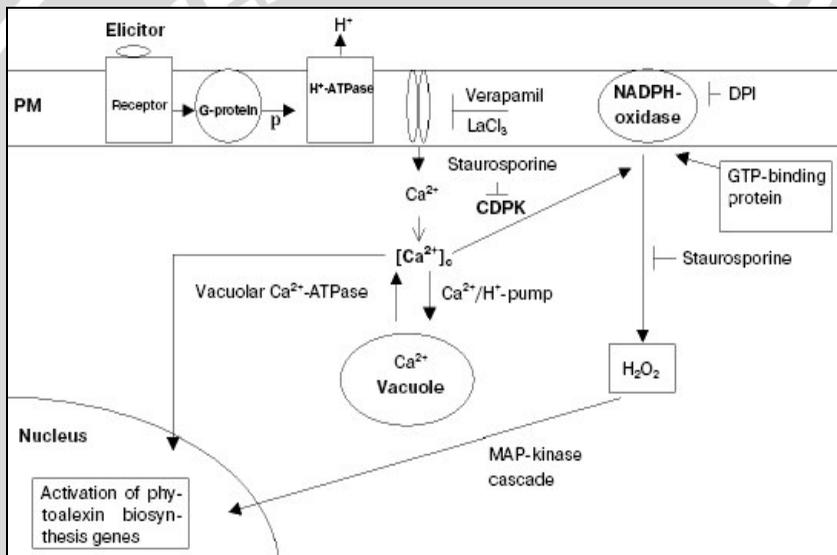
Hairy root atau akar rambut adalah akar (*radix*) yang memiliki rambut-rambut akar (*pilus radicalis*) yang berkembang dari modifikasi epidermis yang menyerupai bulu atau rambut halus. Akar rambut tersebut dapat tumbuh membentuk cabang akar atau akar rambut (*radix rambutis*) yang tumbuh dari bagian periselul menembus korteks sampai akhirnya membentuk akar baru. Cabang-cabang akar yang halus dan berbentuk seperti serabut disebut serabut akar (*fibrilla radicalis*) (Taiz dan Zeiger, 2002; Tjitrosoepomo, 2003).

Akar memiliki empat zona perkembangan, yaitu zona ujung berupa tudung akar (*root cap*), zona meristematik, zona pemanjangan (*elongation zone*), dan zona dewasa (*maturation zone*). Perkembangan akar rambut terdapat pada bagian akar yang telah dewasa atau terdiferensiasi, seperti membentuk jaringan vaskuler yaitu floem dan xilem. Akar sebagai salah satu organ tanaman yang dapat dikulturkan secara *in vitro* selain kultur tunas memiliki sel-sel atau jaringan yang telah berdiferensiasi membentuk sistem vaskular, epidermis, korteks, dan kambium (Taiz dan Zeiger, 2002). Sel-sel terdiferensiasi tersebut memiliki enzim-enzim yang lebih kompleks untuk sintesis metabolit sekunder (Fariyah, 2008). Metabolit sekunder merupakan bagian dari komponen kimia yang banyak ditemukan pada tanaman dan beberapa jenisnya dapat digunakan sebagai obat atau bahan kimia lainnya. Produksi metabolit sekunder secara *in vitro* dapat dilakukan dengan teknik kultur jaringan, yaitu dengan kultur kalus, kultur suspensi sel, dan kultur akar (Radji, 2005).

Kultur akar rambut dapat dilakukan pada medium yang bebas hormon (Savona dkk., 2004). Kultur akar rambut yang dihasilkan dari teknik transformasi genetik dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder. Salah satu contohnya adalah kultur akar rambut pada tanaman kina jenis *Cinchona* oleh gen *A. rhizogenes* (Mathius dkk., 2004). Transformasi genetik dengan *A. rhizogenes* ATCC 15834 terhadap tanaman *Glycyrrhiza glabra* L. dan *Potentilla alba* L. dapat meningkatkan kandungan flavonoid dan saponin di dalamnya (Kovalenko dkk., 2004). Selain itu, penggunaan kultur akar rambut dari tanaman *Lupinus polyphyllus* dan *L. hartwegii* dapat memproduksi *isoflavine glucosides* dalam jumlah lebih besar dari pada menggunakan perlakuan hormon (Misawa, 1994). Berbagai jenis tanaman lain juga telah diteliti peningkatan kadar metabolit sekunder yang dihasilkannya melalui transformasi genetik dengan *A. rhizogenes* antara lain adalah terhadap kultur sel atau jaringan yang berasal dari tanaman, *Digitalis lanata* (Pradel H dkk., 1997), *Papaver somniferum* L. (Park dan Yoon, 2000), dan *Solanum aviculare* (Argolo dkk., 2000).

Menurut Bulgakov dkk. (2003), peningkatan metabolit sekunder ini berhubungan dengan respon pertahanan dari tanaman akibat dari infeksi patogen. Sel tanaman memiliki sejumlah besar produk sekunder seperti terpen, fenolik, dan alkaloida yang bertindak

sebagai antipatogen. Gambar 2.4.1 menunjukkan mekanisme umum dari aktivasi pertahanan tanaman terhadap patogen melalui peningkatan fitoaleksin pada kondisi alamiah yang terjadi dengan lima tahapan, yaitu deteksi sinyal yang dihasilkan oleh patogen, aktivasi dari H⁺-ATPase, peningkatan *influx* Ca²⁺ dari interseluler ke dalam sel, aktivasi *calcium dependant protein kinase* (CDPK), yang selanjutnya mengaktivasi NADPH_oxidase yang juga dihasilkan adanya radikal aktif oksigen lalu mengaktivasi MAP_kinase yang menginisiasi peningkatan ekspresi jumlah dari gen-gen protektif termasuk gen untuk biosintesis metabolit sekunder.



Gambar 2.2 Mekanisme biosintesis fitoaleksin dan komponen metabolit sekunder sebagai dampak sistem pertahanan sel tanaman (Bulgakov dkk., 2003).

2.5. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Efisiensi Transformasi Genetik

Efisiensi transformasi genetik menggunakan *Agrobacterium* dipengaruhi oleh varietas tanaman, tipe dan umur eksplan (Nurfadhilah, 2001), lima varietas tanaman wortel yang digunakan yaitu *Nanco*, *De Chant*, *Gold*, 2027H, dan 840217 menunjukkan efisiensi paling tinggi dimiliki oleh varietas *Nanco*, demikian juga

pada jenis eksplan yang digunakan pada tanaman wortel yaitu tangkai daun, kotiledon, hipokotil dan akar wortel menunjukkan efisiensi berbeda. Efisiensi transformasi paling tinggi dari tangkai daun dan dari tiga umur yang digunakan yaitu 2, 3, dan 4 minggu juga menunjukkan perbedaan efisiensi yaitu paling tinggi efisiensinya pada umur 3 minggu (Pawlicki dkk., 1992).

Menurut Pawlicki dkk. (1992), efisiensi transformasi tertinggi didapatkan dari potongan tangkai daun wortel yang dikokultivasi selama 2-3 hari sebesar 40-45 %, dan setelah 7 hari kokultivasi terjadi penurunan efisiensi karena kesulitan mematikan bakteri. Menurut Karthikeyan dkk. (2007), efisiensi transformasi pada segmen hipokotil kacang tanah yang diinfeksi dengan *A. rhizogenes* selama 5, 10, 15, 20, dan 25 menit dan lama kokultivasi 2 hari menunjukkan besar respon pembentukan akar paling tinggi pada lama inokulasi 15 menit.

Lama kokultivasi, keberadaan *acetosyringone*, konsentrasi bakteri, dan jenis strain bakteri juga dapat mempengaruhi efisiensi transformasi genetik (Nurfadhilah, 2001), penambahan senyawa lainnya yang mengikuti transformasi seperti halnya *acetosyringone* pada tanaman *Arabidopsis thaliana* sebesar 100 μ L dapat meningkatkan efisiensi transformasi genetik (Pawlicki dkk., 1992). Bakteri *A. rhizogenes* strain LMG-150, A20/83 dan AZ/83 memiliki perbedaan efisiensi yaitu efisiensi paling tinggi dimiliki oleh strain LMG-150 dengan konsentrasi sel yang memiliki efisiensi tertinggi adalah 10^8 sel per ml dari berbagai macam konsentrasi sel yang digunakan adalah 10^6 , 10^7 , 10^8 , dan 10^9 sel per ml. Selain itu, umur eksplan yang paling tinggi efisiensinya adalah 2 hari dari umur kecambah tanaman *Cichorium intybus* yang digunakan adalah 2, 4, 6, 8, dan 10 hari (Bais dkk., 2001), dan efisiensi transformasi genetik tanaman *Triphysaria versicolor* meningkat pada kondisi gelap dan temperatur infeksi 4 °C (Tomilov dkk., 2006).

2.6. Fisiologi, Aktifitas, dan Struktur Auksin

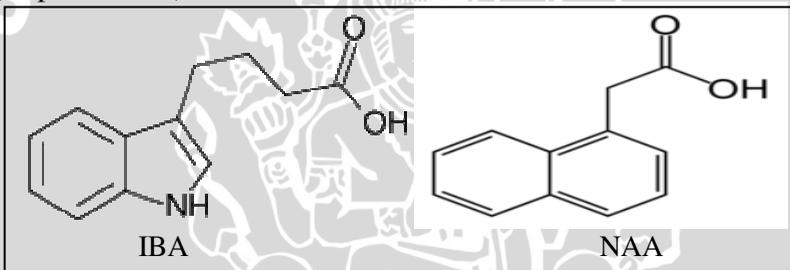
Auksin merupakan komponen regulator pertumbuhan tanaman pertama yang ditemukan dalam bentuk *indole acetic acid* (IAA). Auksin dapat mempengaruhi pembesaran sel, pemanjangan sel, pembentukan tunas dan inisiasi akar. Auksin juga dapat menginduksi produksi hormon lainnya. Bersama sitokinin, auksin

dapat mengontrol pertumbuhan batang, akar, bunga dan buah. Auksin dan sitokinin juga dapat berkerja sama untuk menstimulasi sel-sel kambium berdiferensiasi dalam batang menghasilkan xilem sekunder. Sebaliknya, auksin juga dapat menghambat pertumbuhan tunas rambut yang menyebabkan dominansi apikal, menstimulasi akar rambut dan akar adventitif. Auksin dapat bersifat toksik dalam konsentrasi tinggi, kebanyakan bersifat toksik pada tanaman dikotil dan sedikit pada monokotil (Srivastava, 2002).

Auksin memiliki aktifitas yang unik. Aktifitas auksin sangat ditentukan oleh faktor lingkungan dan struktur kimianya sendiri. Faktor lingkungan seperti keberadaan cahaya dapat mengurangi aktifitas auksin sedangkan gelap dapat meningkatkannya (Srivastava, 2002), suhu tinggi dapat merusak ikatan kimia auksin (Hopkins, 1999). Selain itu, menurut Koepfli dkk. (1983), aktifitas auksin juga ditentukan oleh struktur cincin inti, ikatan rangkap inti, derajat substitusi, keberadaan rantai samping, posisi gugus karboksil, dan bentuk isomer. Pada struktur cincin inti, adanya cincin yang *homocyclic* ataupun *heterocyclic* dengan 5-6 cincin termasuk komponen aktif, ikatan rangkap inti pada struktur cincin tak jenuh adalah aktif, derajat substitusi, salah satu contoh gugus *methyl* yang diganti dengan gugus *ethyl* pada *2-position* dari *3-indoleacetic acid* akan membentuk *2-ethyl-3-indoleacetic acid* yang tidak aktif, keberadaan rantai samping yaitu gugus karboksil (-COOH) dan rantai ester, kekurangan gugus karboksil seperti pada *indoxyl*, *1-acetylindoxyl*, dan isatin menyebabkan terjadinya inaktivasi auksin. Ikatan *methyl ester* pada *auxin a* menyebabkan inaktivasi auksin pada *Avena* dan ikatan ester pada *3-indoleacetic acid* bersifat aktif pada *Avena*, posisi gugus karboksil (ikatan rangkap dan substituent), tidak ada batasan khusus untuk panjang rantai samping yang membawa gugus karboksil tetapi auksin yang aktif setidaknya harus memiliki rantai karboksil yang dipisahkan dengan satu karbon. Rantai karboksil yang dipisahkan oleh karbon dan oksigen akan memberikan aktifitas optimal selain dengan semakin banyaknya atom karbon yang dimiliki, dan bentuk isomer *cis* (aktif)-*trans* (inaktif).

Aktifitas tersebut juga bergantung pada jenis auksin. Jenis auksin sintetik yang biasanya digunakan untuk stimulasi pertumbuhan akar pada bagian potongan tanaman adalah *Indole-3-butyric acid* (IBA) dan *α -Naphthaleneacetic acid* (NAA) (Srivastava,

2002). *Indole-3-butyric acid (1H-Indole-3-butanoic acid, IBA)* adalah jenis auksin yang hampir menyerupai auksin alami yang berwarna putih sampai kekuningan cerah seperti kristal dengan formulasi kimianya adalah $C_{12}H_{13}NO_2$ (Gambar 2.3). IBA memiliki titik leleh pada suhu $125\text{ }^{\circ}C$ pada tekanan atmosfer dan terurai sebelum titik didih. *1-Naphthaleneacetic acid (α -Naphthaleneacetic acid, Naphthylacetic acid, NAA)* merupakan komponen organik dengan formula kimia $C_{10}H_7CH_2CO_2H$ (Gambar 2.3). NAA adalah komponen padat yang tidak berwarna yang larut dalam pelarut organik dan memiliki titik didih pada suhu $135\text{ }^{\circ}C$. Ikatan satu gugus *carboxymethyl* (CH_2CO_2H) terikat pada *1-position* dari *naphthalene*. NAA juga termasuk hormon tanaman dalam kelompok auksin yang dapat digunakan untuk induksi akar pada perbanyakkan vegetatif tanaman dari potongan batang dan daun pada kultur jaringan (Hopkins, 1999).



Gambar 2.3 Struktur kimia IBA dan NAA (Hopkins, 1999).

2.7. Pengaruh Auksin terhadap Induksi Akar Rambut

Zat pengatur tumbuh merupakan senyawa organik, non-nutrisi yang dalam konsentrasi rendah dapat mendorong ataupun menghambat pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Zat pengatur tumbuh sangat dibutuhkan dalam kultur jaringan tanaman untuk proses inisiasi kalus, organogenesis, ataupun embriogenesis. Proses *in vitro* dalam organogenesis seperti halnya induksi akar memerlukan komposisi atau konsentrasi hormon yang tepat (Santoso dan Nursandi, 2004).

Zat pengatur tumbuh endogen seperti auksin alami yang mendukung pertumbuhan akar secara umum disintesis dari bagian primordia daun, tunas, daun muda dan biji yang sedang berkembang. Sedangkan sitokinin alami disintesis pada daerah ujung akar dan biji

yang berkecambah. Selain itu transpor auksin dari ujung apikal ke basal (*polar transport* atau *basipetaly*) menyebabkan auksin juga dapat ditemukan di daerah akar, terutama akar kecambah (Santoso dan Nursandi, 2004; Taiz dan Zeiger, 2002).

Zat pengatur tumbuh yang biasanya digunakan untuk induksi akar adalah auksin dan sitokinin. Jenis auksin yang biasanya digunakan adalah *indole acetic acid* (IAA), *α -naphthalene-acetic acid* (NAA) dan *Indole-3 butryic acid* (IBA). Jenis sitokinin yang biasanya digunakan adalah kinetin (*6-furfurylaminopurine*) dan BAP atau BA (*6-benzylaminopurine* atau *6-benzyladenin*) (Santoso dan Nursandi, 2004). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penggunaan auksin tunggal sudah dapat digunakan untuk induksi akar. Auksin umumnya digunakan pada kisaran 0,01-10 mg/L (Puspitasari, 2005). Rhizogenesis atau induksi akar dari tunas aksiler pada media WP (*woody plant*) dengan penambahan NAA 1-3 mg/l secara tunggal dapat menginduksi pengakaran kina rata-rata sampai 7,3 buah per tanaman, demikian pula pada tanaman teh yang berhasil meningkat sebesar 82 % dengan menggunakan NAA tunggal. Kombinasi NAA dan IBA juga dapat menghasilkan akar yang lebih tinggi dibandingkan dengan penggunaan NAA secara tunggal. Auksin sangat diperlukan dalam pertumbuhan organogenesis termasuk dalam pembentukan akar. Kombinasi auksin dengan konsentrasi yang tepat dapat meningkatkan inisiasi dan induksi akar pada kultur (Riyadi dan Tahardi, 2005).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan mulai bulan Januari 2008 sampai Mei 2009 di Laboratorium Fisiologi, Kultur Jaringan dan Mikroteknik Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan 5 percobaan yang masing-masing menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial. Percobaan pertama dengan satu faktor adalah optimasi medium seleksi kanamisin (0, 50, 100, 150, 200, dan 250 mg/L), percobaan kedua dengan satu faktor yaitu transformasi genetik dengan *A. rhizogenes* yang menggunakan variasi lama inokulasi selama 0, 15, 30, dan 60 menit. Percobaan ketiga dengan satu factor adalah efisiensi transformasi genetik pada hasil transformasi genetik, dan percobaan keempat dengan satu faktor adalah penambahan auksin yaitu jenis dan konsentrasi dari NAA atau IBA (masing-masing 0, 2, 4, 6 mg/L). Evaluasi parameter morfologis dan pengukuran kecepatan waktu munculnya akar, pengukuran berat basah dan jumlah akar rambut, serta nilai optimasi medium seleksi terbaik dan pengukuran efisiensi transformasi genetik dilakukan pada umur kultur 30 hari.

Percobaan kelima dengan satu faktor adalah kultur akar rambut hasil transformasi genetik dan perlakuan auksin terbaik pada medium MS cair tanpa zpt atau dengan penambahan zpt. Evaluasi parameter morfologis dan pengukuran kecepatan waktu munculnya akar rambut serta pengukuran berat basah dan jumlah akar rambut dilakukan pada umur kultur 15 hari.

3.3. Tahapan Penelitian

3.3.1. Pembuatan Media

Media yang digunakan adalah media pertumbuhan bakteri, media perkecambahan, media induksi akar, media optimasi atau seleksi, media transformasi, media eliminasi bakteri, dan media

kultur akar rambut. Media untuk pertumbuhan bakteri terdiri dari dua macam yaitu media miring YMA (*Yeast Mannitol Agar*) dan YMB (*Yeast Mannitol Broth*). Kedua media tersebut dibuat dengan melarutkan bahan-bahan yang tertera pada lampiran 1, kemudian ditambahkan sedikit akuades dan dihomogenisi lalu ditera pada pH 6.8 ± 0.2 dengan pHmeter. Selanjutnya dilakukan penambahan akuades sampai 1 Liter dan dihomogenisi dengan stirer serta dipanaskan sampai larutan bening atau bercampur sempurna. Media dituang ± 20 ml ke dalam botol dan ditutup dengan aluminium foil kemudian disterilisasi. Media YMA yang telah disterilkan, dimiringkan $\frac{3}{4}$ ukuran botol dan dibiarkan sampai memadat sedangkan media YMB dibuat tanpa penambahan agar.

Media perkecambahan biji tomat dibuat dengan melarutkan 1% agar ke dalam aquades dan dipanaskan sampai larut lalu dituang dalam botol kultur. Media induksi akar rambut dibuat dengan melarutkan larutan stok MS (Murashige dan skoog, 1962) ke dalam aquades (lampiran 2). Untuk medium induksi akar rambut dengan perlakuan auksin ditambah NAA atau IBA dengan masing-masing konsentrasi 0, 2, 4, dan 6 mg/L sedangkan untuk medium induksi akar rambut pada perlakuan transformasi genetik tanpa penambahan zpt. Larutan tersebut ditambah gula pasir 30 g dan dihomogenisi dengan stirer. Larutan yang telah homogen, ditera sampai hampir 1 Liter dengan akuades pada erlenmeyer 1000 ml lalu diukur pH 5.8 ± 0.2 dengan pHmeter. Pengukuran pH dilakukan dengan menambahkan NaOH 0.1 N untuk menaikkan pH sedangkan menurunkan pH dengan HCl 0.1 N. Agar sebanyak 1 % ditambahkan untuk membuat media padat dan dipanaskan sampai merata dan menjadi bening. Media tersebut dituang ke dalam botol kultur sebanyak ± 10 ml per botol sedangkan media (cair) kultur akar rambut dituang ke dalam erlenmeyer 100 ml dan mulut botol atau erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil. Medium optimasi atau seleksi transforman dibuat dengan penambahan antibiotik kanamsin pada medium MS tanpa zpt sedangkan media eliminasi bakteri ditambahkan antibiotik sefotaksim 500 mg/L sebelum media memadat. Medium kultur akar rambut pada MS cair dibuat tanpa penambahan agar.

Sterilisasi antibiotik dilakukan dengan menggunakan filter milipore $0.22 \mu\text{m}$. Setelah itu, media dengan antibiotik dituang ± 10 ml ke dalam botol kosong steril dan ditutup dengan aluminium foil.

Proses penambahan antibiotik dilakukan dalam kondisi steril di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Sterilisasi semua medium tanpa antibiotik dilakukan di dalam autoklaf pada suhu 115 °C dan tekanan 2 atm selama 10 menit.

3.3.2. Perkecambahan Biji Tomat

Biji tomat lokal kultivar *Ratna Ew Select* disterilisasi dengan cara direndam dan dikocok selama 15 menit dalam larutan kloroks 30 % (nama dagang *Bayclean*) yang mengandung zat aktif pemutih berupa NaOCl 5.25 %. Kemudian biji dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali selama masing-masing 5 menit. Perlakuan tersebut dilakukan di dalam LAF steril. Biji tomat yang telah steril ditanam dalam botol kultur yang mengandung medium agar padat yang steril dan diinkubasi dalam suhu ± 25 °C selama ± 5 hari. Hipokotil dari kecambah berumur 3 hari yang digunakan sebagai eksplan untuk induksi akar rambut adalah hipokotil yang masih berwarna hijau keunguan.

3.3.3. Optimasi Medium Seleksi

Optimasi medium seleksi bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi optimum medium seleksi yang dapat mematiskan eksplan non-transforman paling banyak. Konsentrasi optimum ini diperlukan untuk menyeleksi atau mematiskan eksplan non-transforman dari eksplan transforman atau eksplan yang berhasil ditransformasi dengan gen *A. rhizogenes* pada efisiensi transformasi genetik. Oleh karena itu, perlu dilakukan optimasi konsentrasi medium seleksi dengan antibiotik kanamisin. Konsentrasi kanamisin yang digunakan adalah 0, 50, 100, 150, 200, dan 250 mg/L. Eksplan yang digunakan adalah akar kecambah yang berumur 3 hari ditanam pada medium yang mengandung kanamisin dan diletakkan dalam rak kultur pada suhu ± 25 °C selama 30 hari dalam kondisi terang. Percobaan ini dilakukan dengan tiga kali ulangan (3 botol), setiap botol diisi eksplan sebanyak 4 akar. Konsentrasi kanamisin optimum ditentukan dengan persentase banyaknya eksplan yang mati dibanding dengan total eksplan yang digunakan.

3.3.4. Pre-Kultur Eksplan Hipokotil Tomat

Pre-kultur dilakukan dengan tujuan untuk mempersiapkan atau mengkondisikan eksplan hipokotil yang masih berwarna hijau keunguan yang akan ditransformasi agar tidak mudah mati akibat infeksi *A. rhizogenes* pada tahapan inokulasi dan kokultivasi (Gustian, 2002). Kecambah tomat yang berumur 3 hari dipotong hipokotilnya dengan panjang ± 0.5 cm. Kemudian eksplan hipokotil ditanam dalam media MS padat tanpa zpt selama 24 jam dalam kondisi terang dan suhu ± 25 °C. Eksplan yang memiliki morfologi utuh dan masih segar dipilih untuk digunakan pada tahapan transformasi genetik.

3.3.5. Persiapan Isolat *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834

Agrobacterium rhizogenes ATCC 15834 diremajakan tiap 1-2 bulan sekali ke dalam media miring YMA. Isolat bakteri diambil satu oose steril dan di-*streak* secara *continuous* di atas media YMA dan diinkubasi dalam gelap dan suhu ruang selama 48 jam. Setelah bakteri tumbuh dan dapat terlihat *streak*-nya, selanjutnya dipindahkan ke dalam refrigerator pada suhu 4 °C sampai digunakan kembali untuk transformasi genetik.

Persiapan koloni tunggal bakteri dilakukan dengan mengambil satu oose steril isolat bakteri dari media miring YMA lalu diinokulasikan ke dalam ± 45 ml media YMB dan diinkubasi dalam gelap pada suhu ± 25 °C selama 24 jam dengan digojog dalam *shaker* 150 rpm. Suspensi bakteri tersebut diambil 1 ml dengan mikropipet dan dituangkan ke dalam cawan petri kosong steril. Media YMA steril dicairkan lalu dibiarkan sampai suhu ± 40 °C dan dituang ke cawan petri yang telah berisi larutan bakteri secara *pour plate*. Inkubasi dilakukan kembali selama 48 jam pada suhu ruang atau sampai didapatkannya koloni tunggal bakteri.

Penentuan umur dan konsentrasi *A. rhizogenes* dilakukan dengan mengambil satu oose koloni tunggal dari cawan petri yang kemudian dicampurkan ke dalam ± 45 ml YMB dan digojog dengan *shaker* 150 rpm pada suhu ± 25 °C. Suspensi bakteri diinkubasi selama 22-24 jam. Setelah itu, dilakukan pengukuran *optical density* (OD) dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 600 nm sampai didapatkan nilai $OD_{600\text{ nm}} = 0.4-0.6$ (Pavlov dkk., 2002), dengan konsentrasi bakteri 10^5 sel/ml pada $OD=0.2$ (Mathius dkk., 2004).

Selanjutnya suspensi diambil 1 ml ke dalam eppendorf ukuran 1.5 ml dan disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang didapatkan, dibuang dan pelet diresuspensikan kembali dengan 1 ml MS cair secara aseptis lalu dihomogenisi dengan vortex. Suspensi bakteri tersebut merupakan bakteri yang akan digunakan dalam transformasi gen pada hipokotil tomat.

3.3.6. Transformasi Genetik *A. rhizogenes* pada Eksplan Hipokotil Tomat

Inokulasi *A. rhizogenes* dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan oleh Karthikeyan dkk. (2007), dan Nurfadhilah (2001), dengan beberapa modifikasi. Transformasi genetik dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu pre-kultur, inokulasi, kokultivasi, eliminasi bakteri, dan seleksi transforman. Hipokotil yang sebelumnya telah dipre-kultur selama 24 jam, kemudian digunakan sebagai eksplan pada transformasi genetik. Tahapan inokulasi dilakukan dengan mencampurkan 4 eksplan hipokotil dengan suspensi *A. Rhizogenes* dalam 1 ml medium MS cair. Inokulasi tersebut dilakukan dengan digojog dalam shaker pada kecepatan 100 rpm selama variasi perlakuan 0, 15, 30, dan 60 menit. Hipokotil selanjutnya dipindahkan ke dalam medium MS padat tanpa zpt selama 3 hari dalam kondisi gelap pada tahapan kokultivasi. Setelah itu, hipokotil dicuci dengan akuades steril yang ditambah dengan sefotaksim 500 mg/L selama 15 menit kemudian dikeringkan dengan kertas saring steril dan dipindahkan dalam medium MS padat yang mengandung sefotaksim 500 mg/L selama ± 25 hari dalam kondisi terang dan suhu ± 25 °C pada tahapan eliminasi bakteri.

Akar rambut yang terbentuk selama tahapan eliminasi bakteri, sebaaian dipindahkan ke dalam medium seleksi kanamisin yang memiliki konsentrasi hasil optimasi sebelumnya pada tahapan seleksi transforman dan sebagian akar rambut lainnya dilakukan pengamatan. Evaluasi parameter yang diamati meliputi deskripsi morfologis, pengukuran waktu munculnya akar rambut serta pengukuran berat basah dan jumlah akar rambut.

3.3.7. Efisiensi Transformasi Genetik

Keberhasilan transformasi genetik dapat diketahui dengan pengukuran efisiensi transformasi genetik pada tahapan seleksi

eksplan transforman. Sebagian eksplan akar rambut yang terbentuk dari hasil transformasi genetik dengan *A. rhizogenes* selama variasi inokulasi 0, 15, 30, dan 60 menit, ditanam ke dalam medium seleksi yang mengandung kanamisin dengan konsentrasi hasil optimasi terbaik yang didapatkan pada percobaan sebelumnya. Setiap perlakuan variasi inokulasi, diulang sebanyak tiga kali (tiga botol) dengan masing-masing botol diisi dengan 3-4 eksplan akar rambut dengan ukuran potongan sepanjang ± 1 cm. Inkubasi dilakukan selama ± 30 hari dalam kondisi terang dan suhu ± 25 °C. Pengamatan dilakukan dengan menghitung persentase jumlah eksplan yang masih hidup atau yang membentuk akar rambut dalam medium selektif.

3.3.8. Induksi Akar Rambut dari Eksplan Hipokotil tomat Melalui penambahan Zat Pengatur Tumbuh

Hipokotil dari kecambah yang berumur 3 hari dipotong sepanjang ± 0.5 cm dan ditanam secara aseptis dalam medium dasar MS padat dengan penambahan auksin yang berupa NAA dan IBA. Konsentrasi NAA dan IBA yang digunakan masing-masing adalah 0, 2, 4, dan 6 mg/L. Hipokotil dalam medium MS yang ditambah variasi konsentrasi NAA dan IBA, diinkubasi selama 30 hari pada kondisi terang dan suhu ± 25 °C. Evaluasi parameter yang dilakukan meliputi deskripsi morfologis, pengukuran waktu munculnya akar rambut serta pengukuran berat basah dan jumlah akar rambut.

3.3.9. Kultur Akar Rambut Hasil Transformasi Genetik dan Perlakuan Auksin Terbaik dalam Medium MS Cair Tanpa ZPT dan dengan Penambahan ZPT

Eksplan akar rambut yang telah dihasilkan dari perlakuan terbaik pada transformasi genetik dengan *A. rhizogenes* dan penambahan zat pengatur tumbuh serta akar kecambah sebagai kontrol, digunakan untuk kultur akar rambut dalam medium MS cair. Eksplan akar rambut tersebut dipotong sepanjang ± 2 cm dan digojog dengan shaker pada kecepatan 150 rpm dalam erlenmeyer 100 ml yang berisi 50 ml medium MS cair. Perlakuan variasi konsentrasi zpt (mg/L) yang digunakan yaitu 0 dan konsentrasi zpt terbaik dalam menginduksi akar rambut. Proses tersebut dilakukan secara acak lengkap dan setiap erlenmeyer diisikan empat eksplan akar rambut dengan tiga kali ulangan (3 erlenmeyer ukuran 100 ml). Kultur akar

rambut diinkubasi selama ± 15 hari dalam suhu ± 25 °C dan kondisi terang. Pengamatan yang dilakukan adalah evaluasi parameter morfologis dan pengukuran jumlah akar rambut.

3.3.10. Evaluasi Parameter dan Penentuan Persentase Pertumbuhan Akar Rambut

Evaluasi parameter morfologis dilakukan dengan mengamati morfologi akar rambut secara deskriptif yaitu sifat akar rambut, rambut akar, dan serabut akar yang dibedakan morfologinya berdasarkan gambar 3.1. Penghitungan jumlah akar rambut dilakukan dengan menghitung rata-rata akar rambut tanpa serabut akar yang terbentuk tiap eksplan, kemudian berat basah akar total ditimbang dengan timbangan digital lalu dikurangi berat basah awal. Rata-rata berat basah akar ditimbang setelah dibersihkan dari medium dengan kuas gambar dan dikeringkan dengan kertas tisu selama ± 30 detik.

Parameter efisiensi transformasi genetik diukur dengan menghitung persentase eksplan yang hidup atau membentuk akar rambut dengan perhitungan sebagai berikut, (Kumar dkk., 2006):

$$\% \text{ eksplan yang membentuk akar} = \frac{M}{N} * 100$$

Keterangan :

M = Jumlah Eksplan yang membentuk akar rambut

N = Jumlah Total Eksplan

3.3.11. Analisis Data

Data pada semua percobaan dianalisis secara statistik menggunakan analisis ragam ANOVA (*Analysis of Variance*) satu arah. Jika didapatkan beda nyata maka dilanjutkan dengan uji Duncan pada selang kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) melalui paket program SPSS 13.0 for Windows.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

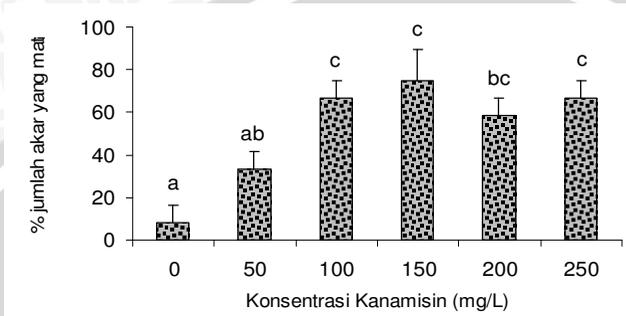
4.1 Pengaruh Transformasi Genetik dengan *A. rhizogenes* terhadap Pertumbuhan Akar Rambut

Agrobacterium rhizogenes memiliki gen penanda resistensi kanamisin pada *T-DNA*-nya. Adanya resistensi eksplan terhadap kanamisin menunjukkan eksplan telah tertransformasi genetik oleh *T-DNA A. rhizogenes*. Untuk mendapatkan konsentrasi kanamisin yang dapat mematikan eksplan akar rambut secara maksimal perlu dilakukan optimasi medium seleksi. Selanjutnya konsentrasi kanamisin tersebut digunakan untuk menyeleksi eksplan transforman sehingga dapat diketahui efisiensi atau keberhasilan transformasi genetik. Kanamisin merupakan antibiotik yang dapat berikatan pada salah satu protein dalam ribosom sehingga mencegah gerakan ribosom yang mengakibatkan kegagalan sintesis protein (Mutschler, 1986).

Penambahan kanamisin dapat meningkatkan kematian eksplan akar rambut kecambah. Persentase eksplan yang mengalami kematian mengalami peningkatan seiring dengan meningkatnya konsentrasi kanamisin. Respon eksplan pada medium seleksi dengan berbagai variasi konsentrasi 0, 50, 100, 150, 200, dan 250 mg/L kanamisin menunjukkan bahwa jumlah eksplan akar rambut yang mati mengalami peningkatan nyata pada penambahan konsentrasi kanamisin 100 mg/L sebesar 67% dibandingkan dengan kontrol (tanpa kanamisin) pada lama kultur 30 hari. Tetapi pada konsentrasi yang semakin tinggi (>100 mg/L), jumlah eksplan akar rambut yang mengalami kematian tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan (Gambar 4.1 dan Lampiran 3). Berdasarkan hal tersebut, maka konsentrasi kanamisin yang tepat untuk mengetahui keberhasilan transformasi pada pengukuran efisiensi transformasi genetik adalah 100 mg/L.

Respon eksplan terhadap kanamisin ternyata bervariasi. Hal ini menunjukkan bahwa eksplan tomat yang masih hidup pada medium seleksi diduga memiliki toleransi terhadap kanamisin. Toleransi terhadap kanamisin tergantung dari jenis eksplan yang digunakan seperti pada kalus tebu varietas POJ 3016 yang mengalami kematian eksplan hanya sebesar 85% pada penambahan kanamisin 300 mg/L

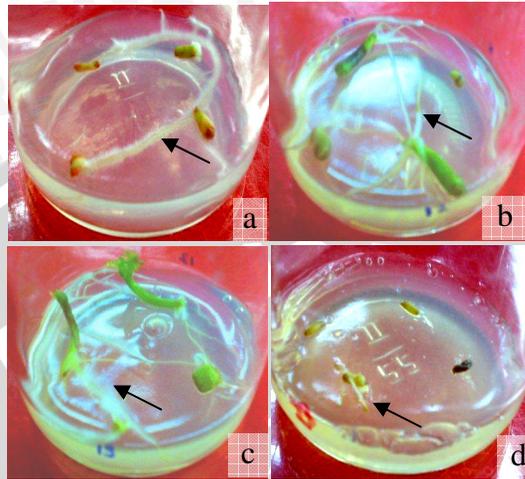
(Rokhmayanti, 2001) sedangkan pada varietas Ps 862, kematian eksplan dapat mencapai 100% pada penambahan kanamisin 150 mg/L (Nurfadhilah, 2001).



Gambar 4.1 Persentase jumlah eksplan akar rambut yang mati pada optimasi medium selektif kanamisin. Keterangan: huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji duncan dengan selang kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Garis bar menunjukkan standard error ($n=3$).

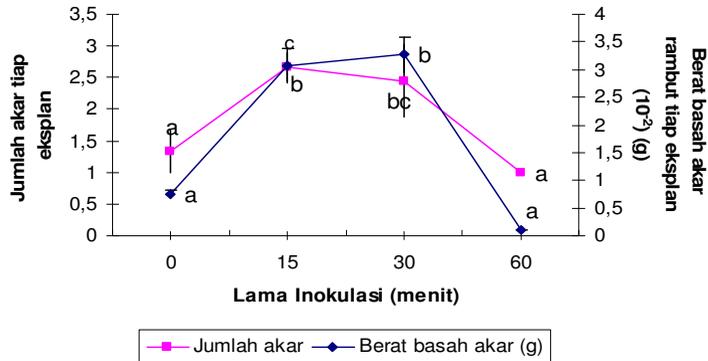
Transformasi genetik dengan beberapa variasi lama inokulasi *A. rhizogenes* tidak mempengaruhi waktu munculnya akar rambut. Pertumbuhan akar rambut hasil inokulasi dengan *A. rhizogenes* menghasilkan respon waktu munculnya akar rambut pada kontrol dan perlakuan 15, 30, dan 60 menit berturut-turut adalah 3, 3, 6, dan 3 hari. Secara umum waktu munculnya akar rambut adalah pada hari ke-3 setelah inokulasi.

Pembentukan akar rambut pada eksplan akar yang ditransformasi genetik dengan *A. rhizogenes*, secara umum diawali dengan pembengkakan eksplan. Akar rambut terbentuk secara langsung pada bagian yang terinfeksi *A. rhizogenes* dan menunjukkan morfologi yang hampir sama pada semua perlakuan. Pada lama inokulasi 15 dan 30 menit dihasilkan akar rambut yang panjang, agak tebal, berwarna putih kekuningan dan memiliki rambut akar yang cukup banyak sedangkan pada lama inokulasi 60 menit menunjukkan akar rambut yang kecil dan pendek dengan rambut akar yang sedikit. Kontrol (tanpa transformasi) menghasilkan akar rambut yang panjang tapi berukuran kecil atau tipis berwarna putih dengan rambut akar yang cukup banyak (Gambar 4.2).



Gambar 4.2 Pengaruh transformasi genetik dengan variasi lama inokulasi *A. rhizogenes* terhadap pembentukan akar rambut umur pada hipokotil tomat, 30 hari setelah kultur. Tanda panah menunjukkan akar rambut. Keterangan: lama inokulasi *A. rhizogenes* 0, 15, 30, 60 menit (a, b, c, d).

Transformasi genetik dengan *A. rhizogenes* tidak mempengaruhi kecepatan waktu munculnya akar rambut tetapi meningkatkan jumlah dan berat basah akar rambut. Inokulasi dengan *A. rhizogenes* selama 15 menit dapat menyebabkan peningkatan jumlah akar rambut tiap eksplan dibandingkan kontrol (tanpa transformasi). Jumlah akar rambut tiap eksplan mulai mengalami penurunan yang signifikan pada lama inokulasi 60 menit walau penurunan jumlah akar rambut sudah tampak terjadi pada lama inokulasi 30 menit. Pola peningkatan yang sama juga terjadi pada peningkatan berat basah akar rambut pada perlakuan transformasi genetik. Peningkatan lama inokulasi menyebabkan meningkatnya berat basah akar rambut yang signifikan sebesar 0,0331 dan 0,033 g pada lama inokulasi 15 dan 30 menit dibandingkan kontrol. Namun, pada lama inokulasi 60 menit terjadi penurunan berat basah akar rambut yang cenderung lebih rendah dari pada kontrol (Gambar 4.3. dan Lampiran 4).



Gambar 4.3 Pengaruh transformasi genetik dengan variasi lama inokulasi *A. rhizogenes* terhadap jumlah dan berat basah akar rambut pada hipokotil tomat, 30 hari setelah kultur. Keterangan: huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji duncan dengan selang kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Garis bar menunjukkan standard error ($n=3$).

Respon eksplan dalam peningkatan jumlah dan berat basah akar rambut setelah tertransformasi dengan *T-DNA A. rhizogenes* merupakan dampak dari ekspresi gen rol pada onkogen yang sensitif terhadap produksi auksin untuk pertumbuhan akar rambut. Menurut Puspitasari (2005), auksin mampu merangsang pembelahan dan pembesaran sel, auksin dapat meningkatkan pembentukan akar dan menghambat pembentukan tunas sedangkan sitokinin berperan dalam induksi dan multiplikasi tunas serta memacu pembelahan sel. Penelitian yang dilakukan oleh Karthikeyan dkk, (2007) yang menggunakan hipokotil kacang tanah dapat menghasilkan jumlah akar rambut lebih tinggi pada perlakuan lama inokulasi 15 menit sebanyak 20 akar rambut tiap eksplan dibandingkan dengan lama inokulasi 5 dan 10 menit. Selain itu, eksplan yang ditransformasi dengan *A. rhizogenes* dapat menunjukkan peningkatan jumlah dan berat basah akar dibandingkan dengan kontrol. Hal yang sama juga terjadi pada tanaman *Vitis vinifera* yang ditransformasi dengan *A. rhizogenes* yaitu dapat mengalami peningkatan jumlah dan berat basah akar rambut pada eksplan ujung tunas (Martins dkk, 2005).

Rendahnya jumlah akar rambut yang terbentuk pada lama inokulasi >30 menit pada hipokotil tomat diduga karena adanya

penghambatan pertumbuhan akar rambut akibat terlalu banyaknya infeksi *A. rhizogenes* sehingga menyebabkan kesulitan tanaman dalam memperoleh nutrisi dari medium. *Agrobacterium rhizogenes* yang terlalu banyak dapat menjadi saingan sel tanaman dalam mengambil nutrisi medium karena baik *A. rhizogenes* maupun sel tanaman membutuhkan sumber karbon untuk energinya dan karbon tersebut banyak terdapat dalam medium kultur. Selain itu, *A. rhizogenes* yang berada dalam jumlah banyak dapat mengakibatkan akumulasi sisa metabolisme dari bakteri tersebut yang diduga dikeluarkan ke dalam medium akibatnya dapat mengganggu metabolisme tanaman. Karthikeyan dkk (2007), menyatakan bahwa inokulasi *A. rhizogenes* yang lebih lama (>25 menit) menyebabkan penurunan jumlah akar rambut yang terbentuk.

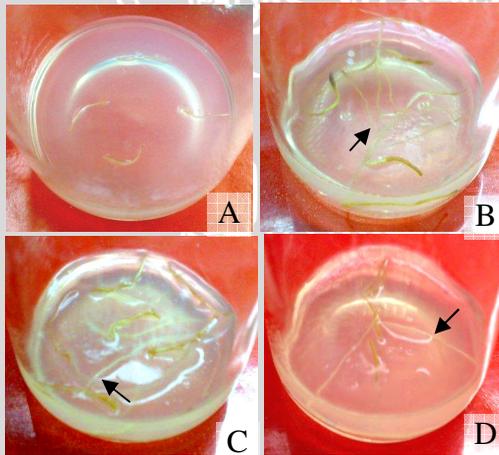
Kematian eksplan juga dapat disebabkan adanya respon hipersensitif atau pencoklatan eksplan dari hasil sistem pertahanan tanaman terhadap serangan patogen. Menurut Nurfadilah (2001), pencoklatan terjadi akibat produksi asam fenol berlebihan dari mekanisme pertahanan tanaman yang dapat mengakibatkan kematian sel. Fenol adalah komponen senyawa metabolit sekunder yang memiliki banyak jenis dan dapat bertindak sebagai sistem pertahanan tanaman terhadap serangan patogen dan herbivora (Taiz dan Zeiger, 2002).

Perbedaan komponen dinding sel dari *A. rhizogenes* serta adanya enzim pendegradasi membran sel tanaman dapat menyebabkan tanaman meresponnya sebagai elisitor biotik yang kemudian menginduksi biosintesis fitoaleksin. Fitoaleksin merupakan kelompok kimiawi dari berbagai macam metabolit sekunder tanaman yang memiliki aktifitas antimikrobal dan terakumulasi di sekitar daerah infeksi (Taiz dan Zeiger, 2002). Fitoaleksin disintesis melalui mekanisme kompleks yang melibatkan aktivasi H⁺ATPase, influx Ca²⁺ dan aktivasi CDPKb serta NADPH₂ oksidase dan enzim-enzim lainnya yang berhubungan dengan biosintesis fitoaleksin (Bulgakov dkk, 2003).

Faktor lain yang juga sangat penting dalam keberhasilan pembentukan akar rambut melalui transformasi genetik adalah jenis eksplan, jenis strain *A. rhizogenes*, dan kondisi kultur. Penelitian Kharmakar dkk. (2001), menunjukkan bahwa eksplan hipokotil dari *Holostemma adakodien* yang diberi perlakuan inokulasi *A. rhizogenes* dapat menghasilkan akar rambut lebih tinggi

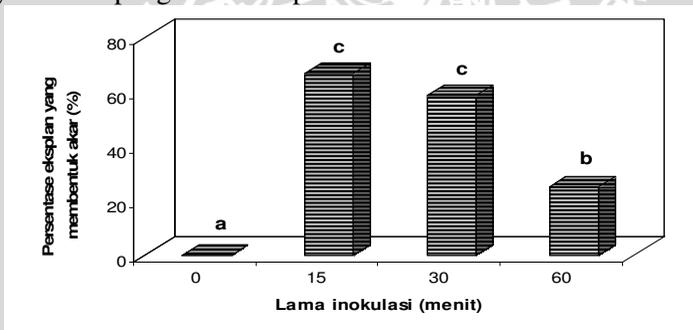
dibandingkan eksplan dari daun, kalus, dan segmen internodus. Menurut Wu, (2007) *A. rhizogenes* strain ATCC 15834 dapat mentransfer gennya ke dalam gen tanaman *Eucommia* lebih efektif dari pada strain ATCC 31798, ATCC 39207, dan ATCC 11325. Selain itu, kondisi kultur seperti gelap dan dingin juga dapat meningkatkan transformasi genetik pada tanaman *Triphysaria versicolor* (Tomilov dkk., 2006). Selain peningkatan jumlah dan berat basah akar rambut, keberhasilan transformasi genetik dapat diketahui dengan pengukuran efisiensi transformasi genetik.

Efisiensi transformasi genetik pada tahapan seleksi eksplan transforman dilakukan dengan menentukan jumlah eksplan transforman yang masih hidup pada medium selektif (Enriquez-Obregon dkk., 1998 dan Utomo, 2004). Berdasarkan pada optimasi medium selektif kanamisin maka konsentrasi kanamisin yang digunakan untuk pengukuran efisiensi transformasi genetik adalah 100 mg/L. Eksplan akar rambut yang tidak tertransformasi (kontrol) tidak mengalami pemanjangan atau pertumbuhan akar rambut dan akhirnya mati sedangkan yang tertransformasi masih dapat bertahan hidup atau mengalami pemanjangan atau pertumbuhan akar rambut (Gambar 4.4).



Gambar 4.4 Respon eksplan akar rambut hasil dari variasi lama inokulasi dengan *A.rhizogenes* pada medium selektif kanamisin 100 mg/L. Keterangan: perlakuan lama inokulasi 0, 15, 30, dan 60 menit (A, B, C, dan D). Tanda panah menunjukkan akar rambut transforman.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa lama inokulasi mempengaruhi persentase efisiensi transformasi pada medium seleksi (+kanamisin 100 mg/L). Persentase pembentukan eksplan akar rambut tiap eksplan pada masing-masing perlakuan lama inokulasi mengalami peningkatan yang signifikan terhadap kontrol. Kontrol (lama inokulasi 0 menit) tidak menunjukkan adanya pembentukan akar rambut. Berbeda dengan perlakuan lama inokulasi 15, 30 dan 60 menit yang dapat menghasilkan pembentukan akar rambut sampai sebesar 67%, 58%, dan 25%. Lama inokulasi 60 menit menunjukkan persentase pembentukan akar rambut yang lebih sedikit, yaitu hanya rata-rata 1 atau 2 eksplan akar yang dapat membentuk akar rambut dibandingkan dengan lama inokulasi 15 dan 30 menit (Gambar 4.5. dan Lampiran 5). Berdasarkan hal tersebut, akar rambut yang masih hidup atau mengalami pembentukan akar rambut paling optimal terjadi pada lama inokulasi 15 menit. Sedangkan waktu inokulasi yang terlalu lama (60 menit) dapat menyebabkan penghambatan pembentukan akar rambut.



Gambar 4.5 Pengaruh lama inokulasi terhadap efisiensi transformasi genetik dengan *A. rhizogenes* pada medium selektif kanamisin 100 mg/L. Keterangan: huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji duncan dengan selang kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$).

Penghambatan pembentukan akar rambut diduga disebabkan jumlah *A. rhizogenes* yang terlalu tinggi pada waktu inokulasi yang terlalu lama sehingga mengakibatkan kematian eksplan meningkat sebelum sempat terinfeksi oleh *A. rhizogenes*. Kematian eksplan tersebut menyebabkan efisiensi transformasi genetik *A. rhizogenes*

menjadi rendah. Sedangkan lama inokulasi 15 menit dapat membentuk akar rambut transforman lebih optimal pada medium selektif yang menandakan tingginya efisiensi transformasi genetik. Akar rambut transforman adalah akar rambut yang tetap mengalami pertumbuhan pada medium selektif karena dapat mensintesis enzim *NPT II* dari hasil keberhasilan *T-DNA* yang terintegrasi pada genom sel tanaman tersebut. Enzim *NPT II* dapat menghambat kerja kanamisin. Menurut Nurfadilah (2001), enzim *NPT II* dapat mentransfer fosfat dalam proses fosforilasi kemudian berikatan dengan kanamisin sehingga kanamisin menjadi inaktif dan tidak dapat mengikat protein dalam ribosom.

4.2 Pengaruh Penambahan Auksin terhadap Pertumbuhan Akar Rambut

Respon eksplan hipokotil tomat terhadap penambahan auksin pada medium ditandai dengan tumbuhnya akar rambut. Pertumbuhan akar rambut yang diberi perlakuan tersebut menunjukkan perbedaan respon waktu munculnya akar rambut. Secara umum, penambahan IBA lebih mempercepat munculnya akar rambut pada hari ke-3 dibandingkan kontrol maupun dengan penambahan NAA. Penambahan NAA menyebabkan waktu munculnya akar rambut sedikit lambat yaitu pada hari ke-9 sampai hari ke-15 (Tabel 1). Hal ini menandakan bahwa penambahan auksin dapat mempengaruhi waktu munculnya akar rambut pada hipokotil tomat.

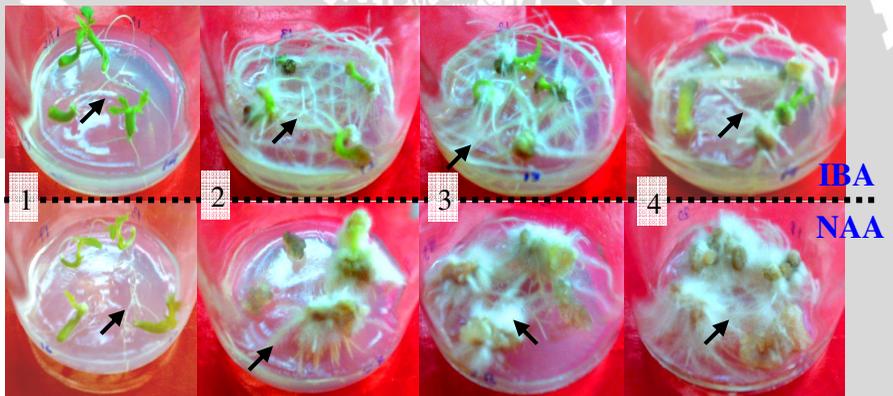
Tabel 1. Pengaruh penambahan auksin berupa NAA dan IBA terhadap kecepatan inisiasi akar rambut (n=3)

Perlakuan		Kecepatan inisiasi (hari)	
Zat Pengatur Tumbuh (mg/L)	IBA	0	6
		2	3
		4	3
	NAA	6	6
		2	9
		4	15
	6	9	

Keterangan: n= jumlah ulangan

Penambahan auksin (NAA dan IBA) pada medium juga menghasilkan perbedaan morfologi akar rambut. Secara umum,

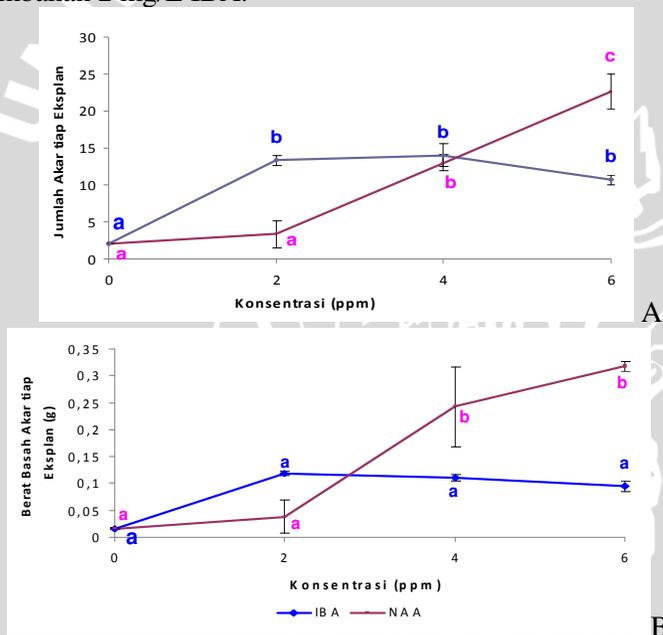
eksplan hipokotil yang ditanam pada medium kontrol dan penambahan auksin diawali dengan pembengkakan eksplan. Setelah itu, eksplan hipokotil pada kontrol dan penambahan IBA mengalami pembentukan akar rambut secara langsung tetapi pada penambahan NAA akar terbentuk secara tidak langsung yaitu diawali dengan pembentukan kalus pada minggu pertama. Perlakuan penambahan IBA menghasilkan akar rambut yang terbentuk pada ujung-ujung eksplan yang terpotong dan memiliki karakteristik berukuran panjang dan kecil dengan rambut akar yang lebih sedikit berwarna putih. Sedangkan pada perlakuan penambahan NAA terjadi pembentukan akar rambut pada hampir seluruh permukaan kalus dan memiliki karakteristik berukuran pendek dan tebal atau lebih besar dengan rambut akar yang terbentuk lebih banyak sehingga tampak seperti kapas berwarna putih (Gambar 4.6).



Gambar 4.6 Pengaruh penambahan IBA dan NAA terhadap pembentukan akar rambut pada hipokotil tomat 30 hari setelah kultur. Keterangan: konsentrasi auksin 0, 2, 4, 6 mg/L (1,2,3,4), tanda panah menunjukkan akar rambut.

Selain mempengaruhi waktu munculnya akar rambut, penambahan NAA dan IBA juga mempengaruhi jumlah dan berat basah akar rambut selama lama kultur 30 hari. Penambahan NAA dapat menyebabkan jumlah dan berat basah akar rambut terus mengalami peningkatan. Peningkatan jumlah dan berat basah akar rambut yang optimal terjadi pada NAA dengan konsentrasi 6 mg/L sebanyak 23 akar dengan berat basah 0,318 g tiap eksplan

dibandingkan dengan kontrol sebesar 2 akar dengan berat basah 0,017 g tiap eksplan. Sedangkan peningkatan jumlah dan berat basah akar rambut yang optimal terjadi pada IBA dengan konsentrasi 2 mg/L yaitu terjadi peningkatan jumlah akar rambut yang signifikan sebesar 14 akar dibandingkan dengan kontrol tetapi peningkatan berat basah akar rambutnya tidak berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol kemudian cenderung mengalami penurunan jumlah dan berat basah akar rambut pada konsentrasi yang semakin tinggi. (Gambar 4.7 dan Lampiran 6). Berdasarkan hal tersebut, penambahan NAA dengan konsentrasi 6 mg/L lebih optimal menghasilkan jumlah dan berat basah akar rambut dibandingkan penambahan 2 mg/L IBA.



Gambar 4.7 Pengaruh penambahan NAA dan IBA terhadap jumlah dan berat basah akar pada hipokotil tomat 30 hari setelah kultur. A; jumlah akar rambut tiap eksplan dan B; berat basah akar rambut tiap eksplan. Keterangan: huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan dengan selang kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Garis bar menunjukkan standard error (n=3).

Efektifitas NAA lebih tinggi dibandingkan IBA dalam meningkatkan jumlah dan berat basah akar rambut meskipun tidak dapat mempercepat waktu munculnya akar rambut. Hal ini menunjukkan adanya pengaruh dari struktur NAA yang berbeda dengan IBA. NAA adalah jenis auksin sintetik yang lebih stabil dan sangat efektif untuk menginduksi akar pada bagian potongan eksplan. Menurut Rostiana dan Seswita (2007), NAA adalah jenis auksin sintetik yang dapat menginduksi perakaran lebih optimal dibandingkan IBA pada *Chrysanthemum cinerariifolium*. Variasi konsentrasi auksin untuk optimalitas induksi akar tersebut bergantung pada jenis tanaman, jenis eksplan, dan jenis auksin yang digunakan. Selain itu, waktu inisiasi akar cenderung semakin cepat bila ditambahkan auksin dalam konsentrasi rendah. Pembentukan akar pada kontrol diduga karena adanya auksin endogen (IAA endogen). Penelitian ini juga menunjukkan bahwa kontrol memiliki waktu inisiasi akar yang lebih cepat dibandingkan penambahan auksin eksogen (NAA).

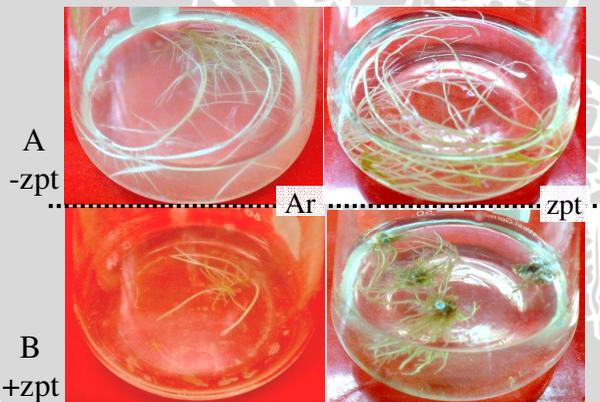
Penghambatan pembentukan akar pada penambahan IBA dengan konsentrasi tinggi mengindikasikan bahwa kelebihan IBA dapat lebih cepat menstimulasi pembentukan etilen dibandingkan NAA. Menurut Hansen dan Grossmann (2000), etilen dapat menghambat pertumbuhan akar. Selain itu, adanya struktur IBA yang memiliki ikatan N pada rantai siklik karbonnya. IBA juga memiliki ikatan karbon yang lebih tinggi pada gugus karboksilnya sehingga kelebihan nutrisi diduga dapat menyebabkan penghambatan pertumbuhan akar. Menurut Rostiana dan Seswita (2007), pada IBA terdapat atom N pada struktur kimianya sedangkan pada NAA tidak terdapat atom N. Hal ini menyatakan bahwa jumlah nitrogen yang melimpah pada media dapat menghambat pertumbuhan akar. Penelitian ini juga menyatakan bahwa NAA adalah jenis auksin yang lebih efektif untuk meningkatkan jumlah akar dibandingkan dengan IBA dan IAA. Hal ini juga didukung oleh Riyadi dan Tahardi (2005), bahwa penambahan NAA tunggal sudah dapat menginduksi akar kina sampai 7,3 buah tiap eksplan.

Penambahan auksin dibandingkan transformasi genetik memberikan respon yang berbeda terhadap pembentukan akar rambut pada hipokotil tomat. Respon pembentukan akar rambut pada waktu munculnya akar rambut lebih dipengaruhi oleh penambahan auksin dibandingkan transformasi genetik. Hal ini

disebabkan proses pengenalan sinyal tanaman oleh bakteri sampai terintegrasinya *T-DNA* bakteri ke dalam genom tanaman yang diikuti dengan ekspresi onkogen (sintesis hormon auksin dan sitokinin) memerlukan waktu panjang. Ercan dkk. (1999), menyatakan bahwa inisiasi akar rambut terjadi pada 10-12 hari setelah kokultivasi pada kotiledon *Rubia tinctorum* dan 8-10 hari pada irisan wortel (Danesh dkk, 2006).

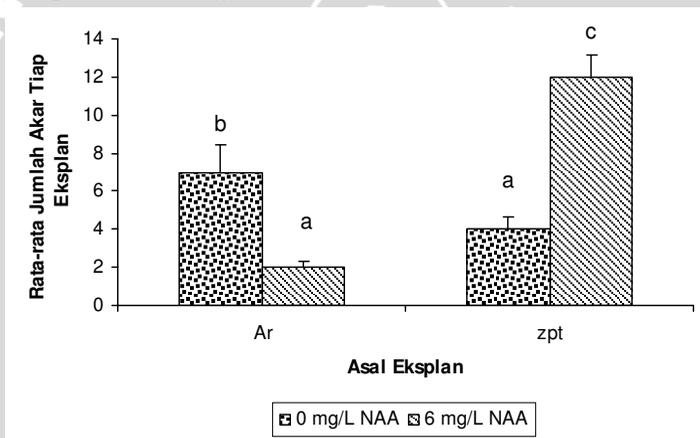
4.3 Kultur Akar Rambut

Akar rambut hasil transformasi genetik dan perlakuan NAA terbaik dikultur pada medium MS cair tanpa penambahan zpt dan 6 mg/L NAA memberikan respon pembentukan akar rambut yang berbeda. Perlakuan tersebut mempengaruhi morfologi akar rambut yang terbentuk. Secara umum, eksplan yang berasal dari transformasi genetik dan penambahan NAA yang dikultur dalam medium tanpa NAA menghasilkan akar rambut yang lebih panjang dan kecil serta banyak ditumbuhi serabut akar sedangkan pada penambahan NAA, eksplan mengalami pembentukan kalus lalu diikuti dengan pembentukan akar rambut yang pendek dan lebih tebal serta lebih sedikit serabut akarnya (Gambar 4.8).



Gambar 4.8 Pertumbuhan akar rambut hasil transformasi genetik dan perlakuan NAA pada medium MS cair tanpa dan dengan zpt NAA pada umur 15 hari. Keterangan: penambahan zpt 0 dan 6 mg/L NAA (A,B); asal eksplan dari transformasi genetik (Ar), dan perlakuan NAA (zpt).

Selain mempengaruhi morfologi akar rambut, eksplan yang berasal dari transformasi genetik dan penambahan NAA yang dikultur pada medium MS cair tanpa zpt dan ditambah zpt juga mempengaruhi jumlah akar rambut. Respon eksplan yang berasal dari transformasi genetik memberikan jumlah akar rambut yang lebih banyak pada medium MS cair tanpa zpt sebesar 7 akar rambut tiap eksplan. Sebaliknya eksplan yang berasal dari transformasi genetik memberikan jumlah akar rambut yang lebih sedikit pada medium MS cair + zpt yaitu 2 akar rambut tiap eksplan dibandingkan kontrol dan eksplan yang berasal dari penambahan NAA (Gambar 4.8. Lampiran 7). Peningkatan dan penurunan jumlah akar rambut tersebut menunjukkan adanya akar rambut transforman yang dapat mengekspresikan onkogen.



Gambar 4.9 Pertumbuhan akar rambut hasil transformasi genetik dan perlakuan NAA pada medium MS cair tanpa dan dengan zpt NAA pada umur 15 hari. Keterangan; asal eksplan dari transformasi genetic (Ar) dan perlakuan NAA (zpt). Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji duncan dengan selang kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Garis bar menunjukkan standard error (n=3).

Pembentukan kalus dan penebalan akar rambut pada penambahan NAA menunjukkan adanya peristiwa organogenesis tidak langsung pada eksplan. NAA merupakan auksin sintetik yang mampu merangsang pembesaran dan pembelahan sel sehingga eksplan cenderung menghasilkan kalus sebelum membentuk akar

rambut. Rantai kelompok karboksil pada struktur kimia NAA dipisahkan oleh karbon yang lebih sedikit akibatnya aktifitas NAA dalam menghasilkan sel-sel amorf (kalus) cenderung lebih banyak. Menurut Koepfli dkk, (1983) aktifitas auksin salah satunya ditentukan oleh adanya rantai keasaman. Posisi dan panjang rantai keasaman sangat mempengaruhi aktifitas auksin. Rantai yang memiliki kelompok karboksil (-COOH) yang dipisahkan oleh satu karbon (NAA), satu karbon dan satu oksigen (2,4-D) akan memberikan aktifitas yang optimal selain dengan semakin banyaknya atom karbon (IBA dengan tiga karbon).

Ekspresi onkogen pada eksplan transforman yaitu dapat mensintesis auksin endogen sendiri untuk pembentukkan akar rambut. Adanya auksin endogen yang disintesis sendiri oleh eksplan yang berasal dari transformasi genetik menyebabkan peningkatan jumlah akar dalam medium MS tanpa zpt. *DNA* yang mengkode enzim untuk sintesis hormon tersebut berasal dari *T-DNA* dari *A. rhizogenes* pada bagian onkogen yang disisipkan ke dalam *DNA nuclear* sel tanaman selama proses transformasi genetik. Menurut Rahmawati (2003), daerah *T-DNA* mengandung gen-gen *rol* pada bagian onkogen yang berperan dalam pembentukkan dan perbanyakkan akar rambut dengan meningkatkan sensitifitas terhadap auksin. Menurut Chawla (2002), onkogen memiliki dua gen yang menyandi enzim untuk sintesis hormon pertumbuhan yaitu *tms1* dan *tms2* (*tumor morphology shoot*) untuk mengkode enzim *tryptophan mono-oxygense* dan *indole-3-acetamide hydrolase* untuk sintesis auksin sedangkan *tmr* (*tumor morphology root*) untuk mengkode enzim *isopentyl transferase* untuk sintesis sitokinin.

Penurunan jumlah akar rambut yang berasal dari transformasi genetik pada medium dengan penambahan zpt menunjukkan adanya penghambatan pembentukkan akar. Penghambatan terjadi akibat dari akumulasi auksin eksogen dan endogen. Kandungan auksin yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan dengan memicu produksi etilen. Menurut Hansen dan Grossmann (2000), auksin dalam level atau konsentrasi tinggi mampu menghambat pertumbuhan akar dengan menstimulasi produksi enzim *aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase* untuk sintesis hormon etilen yang selanjutnya menjadi pemicu akumulasi asam absisat (ABA) pada tanaman *Galium aparine*.

Pertumbuhan serabut akar diduga akibat dari adanya mobilisasi hormon dari eksplan akar (jaringan atau sel-sel dewasa) menuju akar rambut yang masih muda (meristematik). Akibatnya hormon terkonsentrasi pada akar rambut yang menyebabkan tingginya pertumbuhan serabut akar. Menurut Taiz dan Zeiger (2002), transpor auksin secara *acropetally* melalui floem sangat penting untuk mengontrol proses penting pertumbuhan seperti pembentukan percabangan akar dan pembelahan sel kambium.

Pembentukan akar juga terjadi pada eksplan yang berasal dari kontrol yang dikultur dalam medium tanpa hormon. Hal ini dikarenakan auksin juga mengalami transpor *basipetaly* atau transpor auksin dari ujung primordia daun ke ujung akar akibatnya eksplan akar memiliki auksin endogen. Menurut Taiz dan Zeiger (2002), hormon endogen seperti auksin alami yang mendukung pertumbuhan akar secara umum disintesis dari bagian primordia daun, tunas, daun muda dan biji yang sedang berkembang. Kemudian ditranspor dari ujung apikal ke basal (*polar transport* atau *basipetaly*) menyebabkan auksin juga dapat ditemukan di daerah akar.



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB V PENUTUP

4.4 Kesimpulan

Transformasi genetik dengan *A. rhizogenes* dapat meningkatkan jumlah dan berat basah akar rambut. Inokulasi *A. rhizogenes* selama 15 menit lebih meningkatkan jumlah dan berat basah akar rambut dibandingkan perlakuan lain. Efisiensi transformasi genetik pada lama inokulasi 15 menit sebesar 67%. Penambahan NAA dapat meningkatkan jumlah dan berat basah akar rambut lebih tinggi dibandingkan dengan IBA. Penambahan NAA 6 mg/L dapat meningkatkan pertumbuhan akar rambut paling tinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Meskipun demikian, IBA lebih mempercepat waktu munculnya akar rambut dibandingkan NAA.

Eksplan akar rambut hasil transformasi genetik pada kultur akar rambut dalam MS cair tanpa NAA menghasilkan jumlah akar rambut yang lebih banyak dibandingkan dengan MS cair yang ditambah NAA. Berbeda dengan eksplan hasil perlakuan auksin yang dapat menghasilkan akar rambut lebih tinggi pada medium MS dengan penambahan zpt dibandingkan eksplan hasil transformasi genetik.

4.5 Saran

Penambahan NAA masih menunjukkan adanya peningkatan pertumbuhan akar pada konsentrasi yang semakin tinggi, oleh karena itu perlu ditingkatkan konsentrasi NAA untuk melihat optimalisasi pertumbuhan akar rambut. Selain itu, eksplan hasil transformasi genetik menghasilkan jumlah akar rambut yang lebih rendah pada medium MS dengan penambahan NAA, oleh karena itu perlu dilakukan penambahan IBA untuk melihat perbedaan pola pertumbuhan akar rambut.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, S. dan Rao, A.V. 2000. Tomato Lycopene and Its Role In Human Health and Chronic Diseases. Article of review. Canadian Medical Association
- Atlas, R. M. 2004. Hand Book of Microbiological Media, Third Edition. CRC Press. New York.
- Argolo, A.C.; Charlwood, B.V.; dan Plesch, M. 2000. The Regulation of Solasodine Production by *Agrobacterium rhizogenes* Transformed Roots of *Solanum aviculare*. *Planta Medica*. 66: 448-451.
- Bais, H. P.; Venkatesh, R. T.; Chandrashekar, A., dan Ravishankar, G. A. 2001. *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation of Witloof Chicory–*In Vitro* Shoot Regeneration and Induction of Flowering. *Current Science*. 80(1): 83-87.
- Bulgakov, V.P.; Tchernoded, G. K.; Mischenko, N. P.; Shkryl, Yu. N.; Glazunov, V. P.; Fedoreyev, S. A.; dan Zhuravlev, Yu. N. 2003. Increase in Anthraquinone Content in *Rubia cordifolia* Cells Transformed by *rol* Genes Does Not Involve Activation of the NADPH Oxidase Signaling Pathway. *Biochemistry Moscow*. 68(7): 795-801..
- Cai, G.; Li, G.; dan Ye, H. 1995. Hairy Roots Culture of *Artemisia annua* L. by Ri Plasmid Transformation and Biosynthesis of Artemisinin. *Chin J Biotechnol*. 11: 227-235.
- Caro, L. A.; Santecchia, N.; Marinangeli, P. A.; Curvetto, N. R.; dan Hernández, L. F. 2003. *Agrobacterium rhizogenes* vs Auxinic Induction for In Vitro Rhizogenesis of *Prosopis chilensis* and *Nothofagus alpine*. *Biocell*. 27(3): 311-318.
- Chabaud, M.; Boisson-Dernier, A.; Zhang, J.; Taylor, C. G.; Yu, O., dan Barker, D. G. 2006. *Agrobacterium rhizogenes*-

Mediated Root Transformation. *Medicago Truncatula Handbook Version*. Hal 1-8.

Chávez-Vela, N. A.; Chávez-Ortiz, L. I.; Pérez-olphe, E. B. 2003. Resumen Transformación Genética Del Naranja Agrio Usando *Agrobacterium rhizogenes* Genetik (Transformation of Sour Orange Using *Agrobacterium rhizogenes*). *Publicado Como Artículo En Agrociencia*. 37: 629-639.

Chawla, H.S. 2002. Introduction to Plant Biotechnology 2nd Edition. Science Publishers, Inc. New Hampshire, U.S.A. Hal 365-366.

Dalimartha, S. 1999. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia, Jilid 3. Penerbit Puspa Swara, Anggota IKAPI. Jakarta.

Damiano, C. dan Monticelli, S. 1998. In Vitro Fruit Trees Rooting by *Agrobacterium rhizogenes* Wild Type Infection. *Research Article, EJB Electronic Biotechnology ISSN*. 1(2): 0717-345.

Danesh Y.R.; Goltapeh, E. M.; Alizadeh, A.; dan Sanavy, M. M. 2006. Optimizing Carrot Hairy Root Production for Monoxenic Culture of Arbuscular Mycorrhizal Fungi In Iran. *Biological Science*, ISSN 1727-3048, Asian Network for Scientific Information. 6(1): 87-91.

Rahmawati, S. 2003. Gen Penyeleksi Alternatif untuk Transformasi Tanaman. Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi-LIPI. *Buletin AgroBio*. 6(1): 26-33.

Enriquez-Obregon, G. A.; Vazquez-Padron, R. I.; dan Housein, D. L. 1998. Herbicide-Resistant Sugarcane (*Saccharum officinarum*, L.) Plants by *Agrobacterium*-mediated Transformation. *Planta*. 206: 20-27.

Ercan, A. G.; Taskin, K. M.; Turgut, K.; dan Yuce, S. 1999. *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Hairy Root Formation In Some *Rubia Tinctorum* L. Populations Grown In Turkey. *Research Article of Botany*. 23: 373-377.

- Ferawati, E. N. N. 2001. Efisiensi Transformasi Gen *Cod A* dengan Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* pada Eksplan Daun Tebu Varietas Ps 851. Skripsi. Fakultas Matematika, Universitas Brawijaya. Malang.
- Farihah, M. 2008. Pengaruh Pektin terhadap Kandungan Kuersetin pada Kalus The (*Camelia sinensis* L. O. Kuntze). Skripsi. Fakultas Matematika, Universitas Brawijaya. Malang.
- Puspitasari, I. 2005. Pemanjangan Tunas dan Pembentukan Akar Secara In Vitro pada Tanaman Krisan (*Chrysanthemum sp.*). Skripsi. Fakultas Matematika, Universitas Brawijaya. Malang.
- Gustian. 2002. Transformasi Genetik dengan Bantuan *Agrobacterium* dan Regenerasi Tanaman Transgenik pada Kedelai (*Glycine max* L. Merr). Disertasi. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Hansen, H dan Grossmann, K. 2000. Auxin Induced Ethylene Triggers Abscisic Acid Biosynthesis and Growth Inhibition. *Plant Physiol.* 124 (2). 1437-1448.
- Hariana, H. A. 2007. Tumbuhan Obat dan Khasiatnya, Seri 3 Agrisehat. Penebar Swadaya. Yogyakarta.
- Hodges, L. D.; Cuperus, J.; dan Ream, W. 2004. *Agrobacterium rhizogenes* GALLS Protein Substitutes for *Agrobacterium tumefaciens* Single-Stranded DNA-Binding Protein *VirE2*. *Bacteriology*, American Society for Microbiology. 186(10):3065-3077.
- Hopkins, W. G. 1999. Introduction to Plant Physiology, 2nd Edition. John Wiley And Sons, Inc. New York.
- Karthikeyan, A; Palanivel, S.; Parvathy, S.; dan Bhakya, R. R. 2007. Hairy Root Induction From Hypocotyls Segments of Groundnut (*Arachis hypogaea* L). *African biotechnology, Academic Journal* ISSN 1684-5315. 6(15) pp: 1817-1820.

Ketchum, R. E. B.; Wherland, L.; dan Croteau, R. B. 2007. Stable Transformation and Long-Term Maintenance of Transgenic *Taxus* Cell Suspension Cultures. *Plants Cells Reports, Springer Berlin*. 26(7): 1025-1033.

Kharmakar, S. H.; Keshayachandran, R.; Nazeem, P. A.; dan Giriya, D. 2001. Hairy Root Induction In Adapathiyam (*Holostemma adakodien* K. Schum.). *Tropical Agriculture*. College of Horticulture. 39: 102-107.

Koepfli, J. B.; Thimann, K. V.; dan Went, F. W. 1983. Phytohormones : Structure and Physiological Activity I. www.Jbc.Org. The Gates and Crellin Laboratories of Chemistry and The William G. Kerckhoff Laboratories of *The Biological Sciences*, California Institute Of Technolopj, Pasadena. 763-780.

Kovalenko, P. G.; Antonjuk, V. P.; dan Maliuta, S. S. 2004. Secondary metabolites synthesis in transformed cells of *Glycyrrhiza glabra* L. and *Potentilla alba* L. as producers of radioprotective compounds. *Ukrainica Bioorganica Acta*. (1)2: 13-22.

Kumar, V; Sharma, A.; Prasad, B. C. N.; Gururaj, H. B.; dan Ravishankar, G. A. 2006. *Agrobacterium rhizogenes* Mediated Genetik Transformation Resulting In Hairy Root Formation is Enhanced by Ultrasonication and Acetosyringone Treatment. *Electronic Biotechnology ISSN*. 9(4): 0717-3458.

Martins, T. M.; Domingos, A.; Novo, C.; dan Lourenco, P. M. L. 2003. Effect of *Agrobacterium rhizogenes* Infection on In Vitro Rooting of *Vitis vinifera*. *Research Botany*. 42(3): 159-161.

Mathius, T, N; Reflini; Nurhaimi-Haris; Joko-Santoso, dan A. Priangani Roswiem. 2004. Kultur akar rambut *Cinchona ledgeriana* dan *C. succirubra* dalam kultur *in vitro*. *Menara Perkebunan*. 72(2): 72-87.

- Mathius, T. N.; Haris, N.; Santoso, J.; dan Heri, A. R. 2006. Pengaruh Elisitasi Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Alkaloida Kinolin dari Akar Rambut Tanaman Kina (*Cinchona succirubra* Pavon ex Klotzsch). *Jurnal Menara Perkebunan*. 72(1): 10-22.
- Misawa, M. 1994. Plant Tissue Culture: An Alternative For Production Of Useful Metabolite. *Fao Agricultural Services Bulletin* No. 108.
- Murashige, T. dan Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15(3): 473-497.
- Mutschler, E. 1986. Dinamika Obat, Edisi Kelima. Terjemahan M. B. Widian dan A. S. Ranti. 1991. Penerbit ITB. Bandung.
- Nurfadhilah, S. 2001. Pengaruh Umur Tebu Varietas Ps 862 dan Lama Kokultivasi Terhadap Efisiensi Transformasi Genetik Melalui *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Matematika, Universitas Brawijaya. Malang.
- Park, J. M. dan Yoon, S. Y. 2000. Production of Sanguinarine by Suspension Culture of *Papaver somniferum* in Bioreactors. *Ferm Bioeng*. 74: 292-296.
- Pavlov, A.; Kovatcheva, P.; Georgiev, V.; Koleva, I.; dan Ilieva, M. 2002. Biosynthesis and Radical Scavenging Activity of Betalains During the Cultivation of Red Beet (*Beta vulgaris*) Hairy Root Cultures. *Planta*. 57(c): 640-644.
- Pawlicki, N.; Rajbir, S. S.; dan Brigitte, S. S. N. 1992. Factors Influencing The *Agrobacterium tumefaciens* of Carrot (*Daucus carota*, L.). *Plant Cell, Tissue, and Organs Culture*. 31: 129-139.
- Pradel, H.; Dumkelehmman, U.; Diettrich, B.; dan Luckner, M. 1997. Hairy Root Cultures Of *Digitalis lanata* Secondary

Metabolism and Plant Regeneration. *Plant Physiol.* 151: 209-215.

Puspitasari, I. 2005. Pemanjangan Tunas dan Pembentukan Akar Secara *In Vitro* pada Tanaman Krisan (*Chrysanthemum sp.*). Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Matematika, Universitas Brawijaya. Malang.

Radji, M. 2005. Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. *Review Artikel.* 2(3):113-126.

Rahmawati, S. 2003. Gen Penyeleksi Alternatif untuk Transformasi Tanaman. Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi-LIPI. *Buletin AgroBio.* 6(1): 26-33.

Riyadi, I. Dan Tahardi, J. S. 2005. Pengaruh NAA dan IBA Terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Tunas Kina (*Cinchona Succirubra*). Effects Of NAA and IBA on the Growth and Development of *Cinchona Succirubra* Shoots. *Bioteknologi Pertanian,* 10(2): 45-50.

Fariyah, M. 2008. Pengaruh Pektin Terhadap Kandungan Kuersetin pada Kalus The (*Camelia sinensis* L. O. Kuntze). Skripsi. Fakultas Matematika, Universitas Brawijaya. Malang.

Rokhmayanti, D. 2001. Pengaruh Umur Kalus Tebu Varietas POJ 3016 dan Jumlah Sel *Agrobacterium tumefaciens*. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Matematika, Universitas Brawijaya. Malang.

Rostiana, O. dan Seswita, D. 2007. Pengaruh *Indole Butyric Acid* Dan *Naphtaleine Acetic Acid* Terhadap Induksi Perakaran Tunas Piretrum [*Chrysanthemum cinerariifolium* (Trevir.)Vis.] Klon Prau 6 Secara *In Vitro*. *Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik.* 18(1): 39-48.

Santoso, U dan Nursandi, F. 2004. Kultur Jaringan Tanaman. UMM (Universitas Muhammadiyah Malang) Press. Malang. Hal 141-148.

- Savona, M.; Ruffoni, B.; Amoretti, M.; Pistelli, L.; Bertoli, A.; dan Giovannini, A. 2004. Hairy Root Cultures for the Production of Secondary Metabolites. *Poster Abstrak*. Proceedings of the XLVIII Italian Society of Agricultural Genetiks – SIFV-SIGA Joint Meeting Lecce, ISBN 88-900622-5-8
- Shi, H. P. dan Kintzios, S. 2003. Genetik Transformation of *Pueraria phaseoloides* with *Agrobacterium rhizogenes* and Puerarin Production In Hairy Roots. *Plant Cell Reports*. 21: 1103-1107.
- Siregar, E. B. M. 2002. Crop Improvement Via Genetik Engineering (Perbaikan Tanaman Via Rekayasa Genetika). Fakultas Pertanian Program Studi Ilmu Kehutanan, Universitas Sumatera Utara. Digitized by USU digital library.
- Siswanto; Oktavia, F.; Budiani, A.; Sudarsono; Priyono; dan Mawardi, S. 2003. Transformasi Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dengan Gen Kitinase melalui *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Transformation of Robusta Coffee (*Coffea canephora*) with Chitinase Gene Mediated by *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404). *Menara Perkebunan*. 71(2): 56-69.
- Slater, A.; Scott, N.; dan Fowler, M. 2003. Plant Biotechnology, the Genetik Manipulation of Plants. Oxford University press, Inc. New York. Hal 59-62.
- Srivastava, L. M. 2002. Plant Growth and Development, Hormones and Environment. Academic Press; an Imprint of Elsifier Science. New York.
- Sudhersan, C.; Aboel-Nil, M.; and Hussain, J. 2001. *In vitro* propagation of *Ziziphus mauritiana* cultivar Umran by Shoot tip and nodal multiplication. *Current Science*. (80)2: 122-128.
- Taiz, L. dan Zeiger, E. 2002. Plant Physiology. 3rd Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland.

Tjitrosoepomo, G. 2003. Morfologi Tumbuhan. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.

Tomilov, A.; Tomilova, N.; dan Yoder, J. I. 2006. *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* Transformed Roots of the Parasitic Plant *Triphysaria Versicolor* Retain Parasitic Competence. *Planta*. DOI 10.1007/s00425-006-0415-9.

Tsuneo N.; Tomonori, U.; dan Tetsuya, M. 2005. Detection of a Phytoalexin (Rishitin) and an Antifungal Compounds (Tomatine) in Tomato Hypocotyls Treated with Water Solution of Some Iron Compounds. *Bulletin of The Yamagata University. Agriculture Science. Japan*. 185-193.

Utomo, S. D. 2004. Pengaruh Strain *Agrobacterium* terhadap Efisiensi Transformasi Genetik Jagung Genotipe Hibrida Hiii (the Effect of Strains of *Agrobacterium* on the Efficiency of Genetik Transformation of Hiii Maize Hybrid). *Ilmu Pertanian*. 11 (2): 1-10.

Wen, H. S.; Pettitt, A.; Guern, J.; dan Tempot, J. 1988. Hairy Roots are More Sensitive to Auxin than Normal Roots (*Agrobacterium rhizogenes*/ Root Elongation/Proton Excretion/ Transmembrane Potential/ 1-Naphthaleneacetic Acid). *Botany, Proc. Natl. Acad. Sci.* 85(2): 3417-3421.

Wu, X. J. 2007. Establishment and Chemical Analysis of Hairy Roots of *Eucommia ulmoides*. Disertasi. the School of Renewable Natural Resources. China.

Zhi, B. H. dan Min, D. 2006. Hairy Root and Its Application in Plant Genetik Engineering. *Review Integrative Plant Biology*. 48127(2): 121-128.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi Medium Yeast Mannitol Agar/ Broth (Atlas, 2004)

Bahan	Berat (g/L)
K_2HPO_4	0.5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
NaCl	0.1
Ekstrak Yeast	0.4
D-Mannitol	10

Tambahan : Agar 11 g/L
pH 6.8 ± 0.2



Lampiran 2. Komposisi Medium MS (Murashige-Skoog, 1962)

Larutan Stok	Bahan	Berat (mg/L)	Berat untuk 100 ml (g)	Pengambilan 1 Liter Media (ml)
A	NH ₄ NO ₃	1650	8.25	20
B	KNO ₃	1900	9.5	20
C	CaCl ₂ .H ₂ O	440	4.4	10
D	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	3.7	10
	KH ₂ PO ₄	170	1.7	
E	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	0.56	5
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.3	0.75	
F	H ₃ BO ₃	6.2	0.12	5
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	0.34	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	0.17	
G	KI	0.83	0.2	0.5
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.05	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.005	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.005	
Vitamin MS	Nicotinic Acid	0.5	0.05	1
	Pyridoxine-HCl	0.5	0.05	
	Thiamine-HCl	0.1	0.01	
	Glycine	2	0.2	
Myo Zpt	Myo-inositol	100	1	10
	Auksin/sitokinin		0.1	1 ml / 1 mg/L

Keterangan :

Penambahan per Liter media → Agar batangan 10 gram
Gula pasir 30 gram

Lampiran 3. Analisis Statistik Pengaruh Penambahan kanamisin selama 30 hari pada Jumlah Eksplan yang Mati.

Tabel 1. Statistik Deskriptif Jumlah Akar yang mati

[Kanamisin] (mg/L)	Ulangan	Rata-rata (%)	Std. Deviation	Std. Error
0	3	8.	14.434	8.333
50	3	33	14.434	8.333
100	3	67	14.434	8.333
150	3	75	25.000	14.434
200	3	58	14.434	8.333
250	3	67	14.434	8.333
Total	18	51	27.749	6.541

Tabel 2. Uji ANOVA

Sumber Keragaman	JK	db	KT	Fhit	Sig.*
interaksi	47534722	1	47534722	171125	.000
perlakuan	9756944	5	1951389	7025	.003
galat	3333333	12	277778		
total	60625000	18			

* Nilai dianggap signifikan jika kurang dari 0.05

Lampiran 4. Analisis Statistik Pengaruh Inokulasi *A. rhizogenes* Terhadap Jumlah Dan Berat Basah Akar Rambut Pada Eksplan Hipokotil Tomat Umur 30 Hari.

Tabel 1. Statistik Deskriptif Jumlah Akar

Perlakuan (menit)	N	Rata-rata	Std. Deviasi	Std. Error
0	3	1	0.577	0.333
15	3	3	0.382	0.220
30	3	2	1.005	0.580
60	3	1	0.000	0.000
Total	12	1.861	0.905	0.261

Tabel 2. Uji ANOVA

Sumber Keragaman	JK	db	KT	Fhit	Sig.*
interaksi	42	1	41.565	111.701	0.000
perlakuan	6	3	2.009	5.400	0.025
galat	2.977	8	0.372		
total	50.569	12			

* Nilai dianggap signifikan jika kurang dari 0.05

Tabel 3. Statistik Deskriptif Berat Basah Akar

Perlakuan (menit)	N	Rata-rata (g)	Std. Deviasi	Std. Error
0	3	0.007	0.002	0.001
15	3	0.031	0.010	0.006
30	3	0.033	0.002	0.001
60	3	0.001	0.001	0.000
Total	12	0.018	0.015	0.004

Tabel 4. Uji ANOVA

Sumber Keragaman	JK	db	KT	Fhit	Sig.*
interaksi	0.004	1	0.004	140.226	0.000
perlakuan	0.002	3	0.001	28.315	0.000
galat	0	8	0.000		
total	0.006	12			

* Nilai dianggap signifikan jika kurang dari 0.05

Lampiran 5. Analisis Statistik Pengaruh Inokulasi *A. rhizogenes* Terhadap Efisiensi Transformasi Genetik.

Tabel 1. Statistik Deskriptif Jumlah Eksplan akar yang Hidup

Perlakuan (menit)	Ulangan	Rata-rata	Std. Deviation
0	3	0	0.000
15	3	67	12.730
30	3	58	20.973
60	2	25	0.000
Total	11	38	29.172

Tabel 2. Uji ANOVA

Sumber Keragaman	JK	db	KT	Fhit	Sig.*
interaksi	13379.63	1	13379.63	77.798	4.86E-05
perlakuan	7306.471	3	2435.49	14.162	0.002
galat	1203.852	7	171.979		
total	23055.78	11			

* Nilai dianggap signifikan jika kurang dari 0.05

Lampiran 6. Analisis Statistik Pengaruh Penambahan Zat Pengatur Tumbuh Terhadap Jumlah Dan Berat Basah Akar Rambut Pada Eksplan Hipokotil Tomat Umur 30 Hari.

Tabel 1. Statistik Deskriptif Jumlah Akar

Perlakuan	N	Rata-rata	Std. Deviasi	Std. Error
0 mg/L	3	2	0	0
2 mg/L IBA	3	13	1.155	0.667
4 mg/L IBA	3	14	2.646	1.528
6 mg/L IBA	3	11	1.155	0.667
2 mg/L NAA	3	3	3.215	1.856
4 mg/L NAA	3	13	2	1.155
6 mg/L NAA	3	23	4.163	2.404
Total	21	12	6.944	1.515

Tabel 2. Uji ANOVA

Sumber Keragaman	JK	db	KT	Fhit	Sig.*
interaksi	2675	1	2675	452.976	0.000
perlakuan	881.619	6	147	24.884	0.000
galat	82.667	14	6		
total	3639	21			

* Nilai dianggap signifikan jika kurang dari 0.05

Tabel 3. Statistik Deskriptif Berat Basah Akar

Perlakuan	N	Rata-rata (g)	Std. Deviasi	Std. Error
0 mg/L	3	0.017	0.001	0.001
2 mg/L IBA	3	0.119	0.007	0.004
4 mg/L IBA	3	0.111	0.011	0.006
6 mg/L IBA	3	0.095	0.018	0.010
2 mg/L NAA	3	0.038	0.054	0.031
4 mg/L NAA	3	0.243	0.129	0.074
6 mg/L NAA	3	0.318	0.015	0.009
Total	21	0.134	0.112	0.025

Tabel 4. Uji ANOVA

Sumber Keragaman	JK	db	KT	Fhit	Sig.*
interaksi	0	1	0	130.902	0.000
perlakuan	0.212	6	0	12.222	0.000
galat	0.041	14	0		
total	0.631782	21			

* Nilai dianggap signifikan jika kurang dari 0.05



Lampiran 7. Analisis Statistik Pengaruh Asal Eksplan Dan Penambahan Zat Pengatur Tumbuh Terhadap Jumlah Akar Rambut Rambut Pada Medium MS Cair.

Tabel 1. Statistik Deskriptif Jumlah Akar

Asal Eksplan	[NAA] (mg/L)	N	Rata-rata	Std. Deviasi	Std. Error
<i>A. rhizogenes</i>	0	3	7	3	1.453
<i>A. rhizogenes</i>	6	3	2	1	0.333
6 mg/L NAA	0	3	4	1	0.667
6 mg/L NAA	6	3	12	2	1.155
Total		18	5.889	3.894	0.918

Tabel 2. uji ANOVA

Sumber Keragaman	JK	db	KT	Fhit	Sig.*
interaksi	456.3	1.0	456.3	152.1	0.0
perlakuan	185.7	3.0	61.9	20.6	0.0
galat	24	8	3		
total	666	12			

* Nilai dianggap signifikan jika kurang dari 0.05

Lampiran 8. Skema Kerja Penelitian.

