*Hayati*, Juni 2003, hlm. 48-54
ISSN 0854-8587
Vol. 10, No. 2

# Pengaruh Jumlah Eksplan, Umur Kultur, dan Kasein Hidrolisat terhadap Biomassa dan Total Protein Kultur Akar Rambut Paria Belut

## *Effect of the Number of Explants, Age of Culture and Casein Hydrolysate on Biomass and Total Protein Content of Paria Belut Hairy Roots Culture*

**DEWI SUKMA[1], SUGENG SUDIATSO[1], SAID HARRAN[2], SUDARSONO[1*]**

*[1]Jurusan Budi Daya Pertanian, Faperta, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680*
*[2]Jurusan Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16144*

**Diterima 29 April 2002/Disetujui 26 September 2002**

**Root of *Trichosanthes* sp. has been reported containing various bioactive compounds that might have many potential uses for agriculture and human health. In this research root culture is employed as a technique to study bioactive compounds accumulated in the root tissue of *Trichosanthes cucumerina* var. *anguina*. The objectives of this study were to initiate *T. cucumerina* var. *anguina* hairy root culture using genetic transformation mediated by *Agrobacterium rhizogenes*; to select lines of *T. cucumerina* var. *anguina* hairy root that could stably grow on culture medium without plant growth regulator, and to determine factors affecting biomass and total protein content of *T. cucumerina* var. *anguina* hairy root culture. The results showed that hairy root culture of *T. cucumerina* var. *anguina* could be initiated using genetic transformation mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. The genetically transformed root cultures could grow on culture medium with no supplementation of plant growth regulator for at least 20 sub-cultures periods. The number of root tip explants used for initiating hairy root culture and the length of harvesting period significantly affected the biomass yield and total protein content. Optimal production of biomass could be achieved using seven initial tips of hairy root explants and harvested the biomass after eight days. Supplementation of casein hydrolysate did not increase biomass yield and total protein content. However, these treatments induced the development of short and bigger size hairy root.**

---

### PENDAHULUAN

Berbagai senyawa dan protein aktif disintesis oleh akar tanaman dan senyawa tersebut berpotensi untuk digunakan dalam bidang pertanian dan kesehatan (Logeman *et al.* 1992, Minami *et al.* 1992, Stirpe *et al.* 1992, Dong *et al.* 1994, Toppi *et al.* 1996, Vivanco *et al.* 1997).

Kultur akar merupakan jaringan akar yang hidup dan berdiferensiasi secara terorganisasi membentuk biomassa akar tanpa kehadiran tipe organ tanaman lainnya seperti batang, tunas, atau daun secara *in vitro* (Payne *et al.* 1992). Akar yang dikulturkan dapat berupa akar normal atau akar transgenik hasil transformasi genetika. Kultur akar transgenik diperoleh dengan menanam akar rambut yang dihasilkan dari transformasi genetika dengan bantuan *Agrobacterium rhizogenes*. Akar rambut transgenik tersebut diperoleh akibat proses transfer T-DNA dari Ri- (*root inducing*) plasmid ke genom tanaman (Nillsson & Olsson 1997). Kultur akar rambut transgenik lebih menguntungkan karena dapat dikulturkan dalam media tanpa penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT).

Akar rambut transgenik telah diinduksi dari *Luffa cylindrica* L. Roem., *Trichosanthes* sp., dan *Cucurbita pepo* L. (Savary & Flores 1994, Kondo *et al.* 1995, Toppi *et al.* 1996, 1997). Kultur akar rambut tersebut telah digunakan untuk mempelajari keberadaan senyawa bioaktif seperti *ribosome inactivating protein* (RIP) (Toppi *et al.* 1996) atau senyawa bioaktif lainnya (alkaloida, flavonoida, poliasetilena, dan fitoaleksin) (Savary & Flores 1994). Akar rambut dari *L. cylindrica* dilaporkan memproduksi RIP yang diberi nama *luffin* (Toppi *et al.* 1996). Sedangkan akar rambut dari *T. kirilowii* var. *japonicum* menghasilkan RIP yang diberi nama *trichosanthin* dan kitinase kelas III (Savary & Flores 1994).

Kultur akar rambut merupakan metode yang ideal untuk mempelajari kandungan senyawa aktif yang diproduksi tanaman karena akar rambut dapat melakukan sintesis senyawa aktif yang diinginkan, tumbuh stabil dalam media secara *in vitro* (Savary & Flores 1994, Toppi *et al.* 1996), dan mudah dimanipulasi untuk meningkatkan produksi biomassa atau senyawa aktif yang diinginkan. Manipulasi yang dapat dilakukan antara lain ialah seleksi galur akar rambut yang produktif, kondisi optimum media kultur, dan induksi produksi senyawa aktif dengan perlakuan elisitasi (Fu 1999).

---

*Penulis untuk korespondensi, Tel. +62-251-629353, Fax. +62-251-629353, E-mail: pertaipb@bogor.indo.net.id

Penggunaan jumlah eksplan awal yang optimal diperlukan untuk menghasilkan biomassa akar rambut yang sebesar-besarnya (Bhadra & Shanks 1997). Komposisi media merupakan faktor lain yang juga berpengaruh terhadap produksi biomassa dan senyawa aktif dalam kultur akar rambut (Narayanaswamy 1994) sehingga optimasi komposisi media perlu dilakukan. Kasein hidrolisat, senyawa organik kompleks yang mengandung berbagai asam amino, ditambahkan dalam media sebagai sumber N untuk peningkatan pertumbuhan akar rambut serta biosintesis senyawa protein aktif (Cresswell *et al.* 1989).

Kemampuan untuk menginduksi dan menghasilkan biomassa akar rambut dalam jumlah yang cukup sangat diperlukan untuk melakukan evaluasi keberadaan senyawa aktif pada akar rambut jenis *Trichosanthes* asal Indonesia (paria belut atau *T. cucumerina* var. *anguina*). Percobaan ini bertujuan menginduksi akar rambut dari hipokotil kecambah paria belut dengan bantuan *A. rhizogenes*, menyeleksi galur akar rambut yang tumbuh stabil dalam media tanpa penambahan ZPT, serta mempelajari pengaruh jumlah eksplan awal, umur panen, dan kasein hidrolisat terhadap hasil biomassa, kadar protein dan hasil protein total dari akar rambut paria belut.

## BAHAN DAN METODE

**Induksi dan Inisiasi Akar Rambut.** Benih paria belut diperoleh dari daerah Weleri, Jawa Tengah. Benih dikecambahkan secara *in vitro* dengan mencuci, membuang kulit bijinya, dan merendamnya dalam campuran pestisida Agrep dan Dithane-M45 selama 24 jam. Selanjutnya benih direndam dalam larutan pemutih (Bayclin) dengan konsentrasi 20%, 15%, dan 10% berturut-turut selama 20, 15, dan 10 menit untuk menghilangkan sisa kontaminan yang masih ada. Benih ini selanjutnya dibilas tiga kali dengan air steril untuk menghilangkan sisa larutan pemutih dan dikecambahkan dalam media MS (Murashige & Skoog 1962) dengan penambahan 30 g gula dan 7 g agar-agar per liter media.

*Agrobacterium rhizogenes* galur LBA 9457 ditumbuhkan dalam media *yeast manitol broth* (YMB) padat (0.4 g ekstrak khamir , 10 g manitol, 0.1 g NaCl, 0.2 g $MgSO_4{\cdot}7H_2O$, 0.5 g $KH_2PO_4$, dan 7 g agar-agar, 1 l akuades). Media YMB padat yang digunakan diatur pada pH 7.0 lalu disterilkan pada suhu 121°C dan tekanan 1.5 psi selama 20 menit. Induksi pembentukan akar rambut dilakukan dengan cara menusukkan jarum preparat yang telah dicelupkan ke koloni bakteri berumur 3 hari ke bagian hipokotil kecambah paria belut yang berumur 14 hari.

**Percobaan 1: Seleksi Akar Rambut Hasil Transformasi.** Pertumbuhan dan perkembangan kecambah yang diinokulasi *Agrobacterium* diamati selama 21 hari. Kalus dan akar rambut yang muncul dari hipokotil yang terinfeksi *Agrobacterium* dikulturkan dalam media MS padat tanpa penambahan ZPT (MS-0) yang mengandung antibiotik Cefotaxime (250 mg/l) untuk mematikan *Agrobacterium* yang tersisa. Akar rambut yang tumbuh disubkultur dengan menanamkan ujung akarnya sepanjang 1.0-1.5 cm ke dalam media MS-0 dengan antibiotik Cefotaxime yang masih segar setiap 14 hari dan subkultur dilakukan sampai tiga kali. Akar rambut yang berkembang dari masing-masing kalus ditanam dalam botol terpisah dan dianggap sebagai satu galur.

Setelah tiga kali subkultur, akar rambut yang berhasil tumbuh dengan baik dalam media MS-0 padat tersebut selanjutnya dipindahkan ke media MS-0 cair tanpa antibiotik, diinkubasikan di atas pengocok (*shaker*) dengan kecepatan putaran 100 rpm, dan diletakkan dalam ruangan kultur yang diatur pencahayaannya (100 lux) selama 12 jam dengan suhu ruangan rata-rata antara 25-27°C. Dalam semua percobaan, pengkulturan akar rambut dalam media MS-0 cair dilakukan dalam botol kultur dengan ukuran tinggi 9 cm, diameter 6 cm, dan volume 200 ml. Dalam setiap botol kultur ditambahkan 25 ml media MS-0 cair.

Kultur akar rambut dalam media cair disubkultur dengan menanam 3-5 ujung akar berukuran 1.0-1.5 cm dengan bobot 0.1-0.2 g ke media yang masih segar setiap 12-14 hari dan pertumbuhan serta perkembangannya dimonitor selama lima kali subkultur. Galur akar rambut diseleksi berdasarkan kemampuannya untuk tumbuh dan berkembang dalam media MS-0 dan galur yang mampu tumbuh digunakan sebagai sumber eksplan. Galur akar rambut terpilih disubkultur selama 20 kali subkultur untuk mendapatkan jumlah eksplan yang cukup untuk berbagai percobaan selanjutnya.

**Percobaan 2: Pengaruh Cahaya terhadap Pertumbuhan Akar Rambut.** Untuk menguji pengaruh cahaya, kultur akar rambut diinkubasikan dalam ruangan kultur dengan dua intensitas pencahayaan (100 dan 1000 lux) selama 12 jam. Sebanyak tiga pucuk eksplan ujung akar (1.0-1.5 cm) dikulturkan dalam 25 ml media MS-0 cair. Kultur akar diinkubasikan seperti pada percobaan 1 dalam ruangan kultur dengan pencahayaan rendah (100 lux) atau tinggi (1000 lux), masing-masing selama 12 jam per hari. Unit percobaan merupakan atas satu botol kultur dan setiap kombinasi perlakuan diulang 15 kali. Kultur akar dipanen pada 12 hari sesudah tanam (HST).

**Percobaan 3: Jumlah Eksplan Awal dan Hari Panen.** Berbagai kombinasi perlakuan jumlah eksplan awal dan hari panen diuji untuk mengetahui pengaruhnya terhadap produksi biomassa akar rambut. Eksplan ujung akar (1.0-1.5 cm), sebanyak 3, 5, 7, atau 9 eksplan per botol, dikulturkan dalam 25 ml media MS-0 cair. Kultur akar diinkubasikan seperti pada percobaan 1 dalam ruangan kultur dengan pencahayaan rendah (100 lux) selama 12 jam per hari. Kultur akar dipanen pada 4, 8, atau 12 hari sesudah tanam (HST). Unit percobaan merupakan satu botol kultur dan setiap kombinasi perlakuan diulang empat kali (total empat botol untuk setiap kombinasi perlakuan).

**Percobaan 4: Penambahan Kasein Hidrolisat dalam Media.** Penambahan berbagai konsentrasi kasein hidrolisat ke dalam media MS-0 diuji untuk mengetahui pengaruh kasein hidrolisat terhadap produksi biomassa dan protein total akar rambut paria belut. Kasein hidrolisat ditambahkan ke dalam media MS-0 dengan konsentrasi 50, 100, atau 150 mg/l.

Perlakuan media MS-0 tanpa penambahan kasein hidrolisat digunakan sebagai kontrol. Dalam percobaan ini digunakan tiga eksplan ujung akar (1.0-1.5 cm) per botol yang dikulturkan dalam 25 ml media MS-0. Unit percobaan merupakan satu botol kultur dan setiap perlakuan diulang 12 kali (total 12 botol untuk setiap perlakuan). Kultur akar diinkubasikan seperti pada percobaan 3 dan dipanen pada waktu 12 HST.

**Kandungan Protein Total.** Kandungan protein total diekstrak dari akar rambut dengan menggerus contoh akar rambut yang dianalisis (0.2 g bobot kering) dalam 10 ml larutan penyangga fosfat, pH 7 ($NaH_2PO_4$ 10 mM, $Na_2HPO_4$ 15 mM, KCl 100 mM, $Na_2EDTA$ 2mM, dan PVP 0.75%) yang telah didinginkan pada suhu 0°C. Selanjutnya campuran gerusan tersebut diendapkan dengan sentrifugasi (8000 rpm) selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang didapat dipisahkan dan ke dalam endapan yang didapat ditambahkan kembali 10 ml larutan penyangga fosfat untuk mengekstraksi sisa-sisa protein yang masih tertinggal. Campuran disentrifugasi kembali (8000 rpm) selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh dari ekstraksi yang kedua digabungkan dengan yang pertama dan ditera sehingga menjadi 25 ml dengan penambahan larutan penyangga fosfat. Kandungan protein terlarut yang didapat dalam gabungan hasil dua kali ekstraksi tersebut ditentukan dengan metode Asai Bradford. Kadar protein dan hasil protein total ditentukan berdasarkan bobot kering biomassa yang dianalisis.

**Pengamatan dan Analisis Data.** Pengamatan dilakukan terhadap pertumbuhan dan perkembangan akar rambut, bobot segar dan bobot kering biomassa akar rambut, persentase bahan kering, kadar protein, dan hasil protein total. Bobot segar biomassa ditentukan dengan menimbang akar rambut yang telah ditiriskan dari media yang menempel sedangkan bobot kering biomassa ditentukan dengan menimbang akar rambut yang telah dikeringkan dengan *freeze drier*. Persentase bahan kering ditentukan dengan menghitung nisbah antara bobot kering dan bobot basah biomassa akar rambut. Kadar protein ditentukan berdasarkan pada kurva standar yang dibuat dengan menggunakan berbagai konsentrasi protein yang telah ditentukan sedangkan hasil protein total dihitung dengan perkalian antara kadar protein dengan bobot kering biomassa akar rambut. Data yang didapat dianalisis secara statistika dengan menggunakan paket program statistik SAS.

## HASIL

**Seleksi Akar Rambut Hasil Transformasi.** Hipokotil paria belut yang terinfeksi oleh *A. rhizogenes* galur LBA 9457 membentuk struktur seperti tumor atau kalus pada 4-7 hari setelah inokulasi (HSI) dengan frekuensi 47% pada 7 HSI dan 56% pada 21 HSI. Sedangkan akar rambut mulai berkembang pada jaringan kalus hasil transformasi *Agrobacterium* pada 14 HSI dengan frekuensi 43% pada 21 HSI.

Selain lokasi perkembangannya, morfologi akar rambut pada tahapan inisiasi dan akar normal yang berkembang dari kecambah tidak dapat dibedakan. Akan tetapi, fenotipe akar rambut hasil transformasi dalam media MS-0 dapat dibedakan dari akar normal kecambah. Akar normal tidak berkembang dan mati sedangkan akar rambut hasil transformasi dapat tumbuh dan berkembang normal dalam media MS-0. Dalam media MS-0 morfologi akar rambut yang tumbuh bervariasi dari gemuk dan pendek (Gambar 1a) atau langsing dan memanjang (Gambar 1b).

Sebanyak 42 galur akar rambut yang masing-masing berasal dari kecambah berbeda, hanya 13 galur berhasil dievaluasi pertumbuhannya dalam media MS-0 (Tabel 1). Galur akar rambut lainnya terkontaminasi oleh *Agrobacterium* sejak awal sehingga tidak dapat dievaluasi lebih lanjut. Ke-13 galur akar rambut yang dievaluasi setelah satu kali subkultur, enam galur tidak berkembang dan tujuh galur yang lain, yaitu TC-1, TC-3, TC-4, TC-6, TC-10, TC-11, dan TC-15 mampu tumbuh dalam media MS-0 cair meskipun empat galur dari keenam galur tersebut tidak mampu tumbuh setelah subkultur berikutnya. Galur akar rambut TC-6 tumbuh dan berkembang dan menghasilkan biomassa tertinggi. Galur akar rambut TC-6 selanjutnya diperbanyak dan dijadikan sebagai sumber eksplan dalam berbagai percobaan selanjutnya.

**Pengaruh Cahaya terhadap Pertumbuhan Akar Rambut.** Perbedaan intensitas cahaya yang diberikan dalam ruangan inkubasi tidak berpengaruh terhadap bobot biomassa akar rambut yang dipanen. Rata-rata pertambahan bobot biomassa akar rambut yang dipanen dari kultur dengan pencahayaan 1000 lux tidak berbeda nyata dengan 100 lux (Tabel 2).

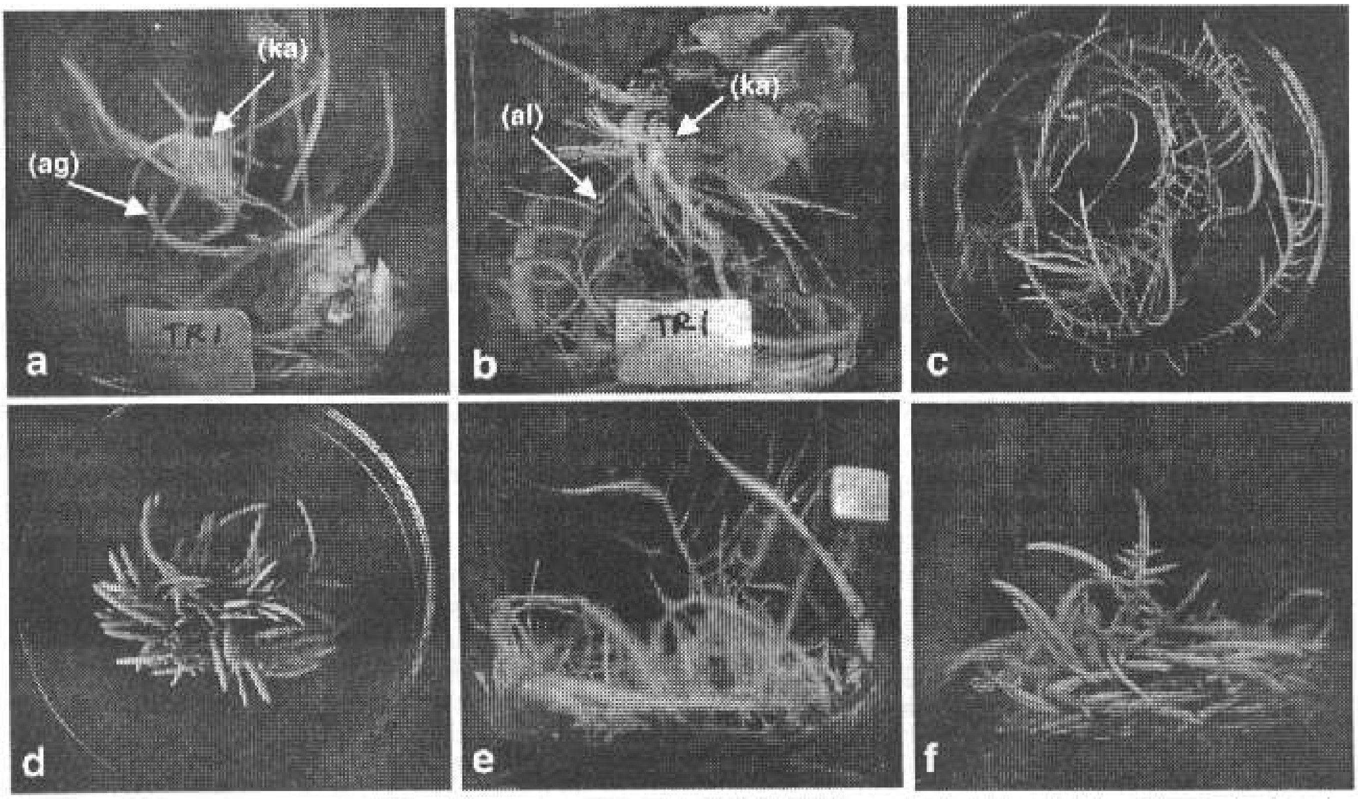
Intensitas cahaya berpengaruh terhadap perkembangan akar rambut yang dikulturkan. Akar rambut yang ditumbuhkan dengan pencahayaan 1000 lux mempunyai morfologi akar lateral dan aksilar yang gemuk dan pendek (Gambar 1b dan 1c). Sebaliknya, akar rambut yang ditumbuhkan dengan pencahayaan 100 lux mempunyai morfologi akar lateral dan aksilar yang langsing dan memanjang (Gambar 1d dan 1e).

**Jumlah Eksplan Awal dan Hari Panen.** Jumlah eksplan awal dan umur panen berpengaruh nyata terhadap bobot basah

Tabel 1. Pertumbuhan berbagai galur akar rambut dari kecambah paria belut (*Trichosanthes cucumerina* var. *anguina*) yang diinokulasi *Agrobacterium rhizogenes* dan dikulturkan dalam media MS-0 setelah 1-5 kali subkultur

| Klon akar rambut | Bobot panen akar rambut | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | SK-1 | SK-2 | SK-3 | SK-4 | SK-5 |
| TC-1 | 0.70 | 2.70 | 4.59 | 2.96 | 2.96 |
| TC-2 | 0.35 | - | - | - | - |
| TC-3 | 1.67 | TD | TD | TD | TD |
| TC-4 | 3.16 | 1.95 | 4.19 | TD | TD |
| TC-5 | 0.04 | - | - | - | - |
| TC-6 | 3.23 | 5.26 | 5.48 | 7.01 | 6.42 |
| TC-8 | 0.03 | - | - | - | - |
| TC-9 | 0.35 | - | - | - | - |
| TC-10 | 0.76 | TD | TD | TD | TD |
| TC-11 | 0.91 | TD | TD | TD | TD |
| TC-14 | 0.02 | - | - | - | - |
| TC-15 | 1.03 | TD | TD | TD | TD |
| TC-19 | 0.37 | - | - | - | - |

TD: evaluasi tidak dilanjutkan karena kultur akar rambut terkontaminasi dengan *Agrobacterium*. (-) akar rambut tidak tumbuh dan berkembang, tetapi tidak terkontaminasi dengan *Agrobacterium*




Gambar 1. Induksi dan inisiasi akar rambut dari bagian hipokotil kecambah paria belut (*Trichosanthes cucumerina* var. *anguina*) dengan bantuan *Agrobacterium rhizogenes* serta pertumbuhannya dalam kultur akar rambut secara *in vitro*. (a) dan (b) Induksi dan inisiasi akar rambut dari hipokotil kecambah paria belut, ka: jaringan kalus yang berkembang pada bagian hipokotil yang terinfeksi *Agrobacterium*, ag: tipe akar rambut gemuk dan pendek, al: akar rambut langsing dan panjang dengan banyak akar aksilar. Perkembangan akar rambut dalam media MS-0 padat (c) dan MS-0 cair (e) yang diinkubasikan dengan pencahayaan 100 lux selama 12 jam. Perkembangan akar rambut dalam media MS-0 padat (d) dan MS-0 cair (f) yang diinkubasikan dengan pencahayaan 1000 lux selama 12 jam.

Tabel 2. Pengaruh cahaya terhadap bobot segar biomassa dari akar rambut yang dikulturkan dalam media MS-0 setelah berumur 12 hari

| No. botol kultur | Bobot eksplan (g) | | Bobot panen (g) | | Pertambahan bobot (g) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1000 lux | 100 lux | 1000 lux | 100 lux | 1000 lux | 100 lux |
| 1 | 0.25 | 0.34 | 2.97 | 4.52 | 2.72 | 4.18 |
| 2 | 0.24 | 0.22 | 4.28 | 3.73 | 4.04 | 3.51 |
| 3 | 0.19 | 0.22 | 4.42 | 7.25 | 4.23 | 7.03 |
| 4 | 0.02 | 0.31 | 3.37 | 3.59 | 3.35 | 3.28 |
| 5 | 0.27 | 0.30 | 2.86 | 3.96 | 2.59 | 3.66 |
| 6 | 0.48 | 0.36 | 4.35 | 3.30 | 3.87 | 2.94 |
| 7 | 0.19 | 0.54 | 3.93 | 5.01 | 3.74 | 4.47 |
| 8 | 0.25 | 0.14 | 6.00 | 3.23 | 5.75 | 3.09 |
| 9 | 0.18 | 0.10 | 4.01 | 2.53 | 3.83 | 2.43 |
| 10 | 0.35 | 0.14 | 5.27 | 3.32 | 4.92 | 3.18 |
| 11 | 0.38 | 0.19 | 4.28 | 3.51 | 3.90 | 3.32 |
| 12 | 0.22 | 0.18 | 6.57 | 5.24 | 6.35 | 5.06 |
| 13 | 0.34 | 0.20 | 2.97 | 3.66 | 2.63 | 3.46 |
| 14 | 0.39 | 0.21 | 3.09 | 8.85 | 2.70 | 8.64 |
| 15 | 0.25 | 0.25 | 3.16 | 3.96 | 2.91 | 3.71 |
| Rata-rata ± SD | 0.27a ± 0.11 | 0.25a ± 0.11 | 4.10a ± 1.13 | 4.38a ± 1.67 | 3.84a ± 1.13 | 4.13a ± 1.66 |

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama untuk tiap peubah yang diamati menunjukkan tidak ada perbedaan antara dua kondisi pencahayaan berdasarkan uji T dengan taraf 5%.

akar rambut yang dipanen, tetapi pengaruh interaksinya tidak nyata. Rata-rata bobot basah biomassa akar rambut yang dipanen nyata meningkat dengan peningkatan jumlah eksplan awal yang dikulturkan. Kultur 3 eksplan ujung akar per botol nyata menghasilkan bobot basah biomassa akar rambut lebih rendah dibandingkan dengan penggunaan 7 atau 9 eksplan ujung akar per botol (Tabel 3).

Rata-rata bobot basah biomassa akar rambut nyata meningkat antara kultur yang dipanen pada 4, 8, atau 12 HST (Tabel 3). Dengan bobot segar eksplan awal pada saat tanam sebesar 0.1-0.2 g setelah 12 HST dapat diperoleh rata-rata bobot segar biomassa akar rambut sebesar 4.0-5.0 g. Jumlah eksplan awal tidak berpengaruh nyata terhadap persentase bahan kering yang dipanen, sedangkan umur panen nyata meningkatkan persentase bahan kering. Kultur akar rambut yang dipanen pada 12 HST nyata mempunyai persentase bahan kering lebih tinggi dibandingkan dengan pada umur 4 atau 8 HST (Tabel 3).

Pengaruh umur panen terhadap bobot kering biomassa akar rambut bergantung pada jumlah eksplan awal yang dikulturkan. Bobot kering biomassa akar rambut nyata meningkat pada kultur yang dipanen antara umur panen 4-12 HST pada perlakuan jumlah eksplan awal 3 ujung akar per botol. Sebaliknya pada penggunaan jumlah eksplan awal 5-9 ujung akar per botol, peningkatan yang nyata untuk bobot kering biomassa hanya terjadi pada umur panen antara 4 HST dan 8 HST (Tabel 4). Dengan demikian pertumbuhan akar rambut lebih cepat mencapai tahapan stasioner jika digunakan eksplan awal sebanyak 5-9 ujung akar per botol.

Tabel 3. Pengaruh jumlah eksplan awal dan hari panen pada 4, 8, atau 12 hari setelah tanam terhadap bobot segar dan persentase bahan kering biomassa akar rambut paria belut (*Trichosanthes cucumerina* var. *anguina*)

| Jumlah eksplan awal | Bobot segar (g) | | | Bahan kering (%) | | | Rata-rata | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 4 HST | 8 HST | 12 HST | 4 HST | 8 HST | 12 HST | g | % |
| 3 | 0.61 | 2.46 | 4.20 | 7 | 6 | 8 | 2.42b | 7.1 |
| 5 | 0.72 | 2.86 | 4.39 | 7 | 7 | 8 | 2.99ab | 7.2 |
| 7 | 0.88 | 4.64 | 5.11 | 7 | 7 | 8 | 3.54a | 7.1 |
| 9 | 1.33 | 4.11 | 5.07 | 6 | 7 | 7 | 3.51a | 6.8 |
| Rata-rata | 0.88c | 3.77b | 4.69a | 7b | 7b | 8a | - | - |

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada baris atau kolom tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan dengan taraf 5%

Tabel 4. Pengaruh jumlah eksplan awal dan hari panen pada 4, 8, atau 12 hari setelah tanam terhadap bobot kering biomasa akar rambut paria belut (*Trichosanthes cucumerina* var. *anguina*)

| Jumlah eksplan awal | Bobot kering biomassa (g) | | |
|---|---|---|---|
| | 4 HST | 8 HST | 12 HST |
| 3 | 0.04cA | 0.14bB | 0.34aA |
| 5 | 0.05bA | 0.27aA | 0.35aA |
| 7 | 0.06bA | 0.32aA | 0.38aA |
| 9 | 0.08bA | 0.30aA | 0.35aA |

Angka yang diikuti oleh huruf kecil sama pada baris atau huruf kapital sama pada kolom tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan dengan taraf 5%

Tabel 5. Pengaruh jumlah eksplan awal dan hari panen pada 4, 8, atau 12 hari setelah tanam terhadap kadar protein dan hasil protein total yang diisolasi dari biomassa akar rambut paria belut (*Trichosanthes cucumerina* var. *anguina*)

| Jumlah eksplan awal | Kadar protein (mg/g bobot kering) | | | Hasil protein total (mg) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 4 HST | 8 HST | 12 HST | 4 HST | 8 HST | 12 HST |
| 3 | 169.9aA | 173.1aA | 124.7bA | 7.9 | 34.6 | 48.6 |
| 5 | 163.4aA | 148.4bB | 124.7bA | 8.7 | 36.2 | 48.6 |
| 7 | 166.2aA | 147.3bB | 124.7bA | 8.9 | 41.2 | 48.6 |
| 9. | 169.0aA | 143.4bB | 124.7bA | 15.2 | 39.5 | 48.6 |
| Rata-rata | 167.1 | 153.1 | 131.3 | 10.2c | 37.9b | 45.2a |

Angka yang diikuti oleh huruf kecil sama pada baris atau huruf kapital sama pada kolom tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan dengan taraf 5%

Kadar protein yang diisolasi dari akar rambut paria belut dipengaruhi oleh interaksi antara jumlah eksplan awal dan umur panen. Kadar protein pada penggunaan jumlah eksplan awal 3 ujung akar per botol menurun ketika akar rambut dipanen 12 HST. Sebaliknya, jika digunakan jumlah eksplan awal sebanyak 5-9 ujung akar per botol kadar protein mulai menurun ketika akar rambut dipanen pada 8 HST. Kadar protein tertinggi didapat dari biomassa akar rambut yang ditanam dengan jumlah eksplan awal 3 ujung akar per botol dan dipanen pada 8 HST (Tabel 5).

Hanya umur panen yang berpengaruh nyata terhadap hasil protein total yang diekstrak dari biomassa akar rambut. Kultur akar rambut yang dipanen antara 4-12 HST nyata meningkatkan hasil protein totalnya. Nilai tertinggi untuk hasil protein total didapatkan dari biomassa akar rambut yang dipanen pada 12 HST (Tabel 5).

**Penambahan Kasein Hidrolisat dalam Media.** Penambahan kasein hidrolisat dalam media tidak berpengaruh nyata terhadap bobot segar, bobot kering, dan persentase bahan kering biomassa akar rambut yang diperoleh (Tabel 6). Sebaliknya, kadar protein dan hasil protein total yang diekstrak dari biomassa akar rambut nyata dipengaruhi oleh penambahan kasein hidrolisat. Penambahan kasein hidrolisat ke dalam media sampai dengan 100 mg/l nyata meningkatkan kadar protein akar rambut dibandingkan dengan kontrol. Akan tetapi, penambahan kasein hidrolisat dengan konsentrasi 150 mg/l menurunkan kadar protein (Tabel 6). Perlakuan kontrol tanpa penambahan kasein hidrolisat menghasilkan protein total tertinggi. Berlawanan dengan kadar protein, penambahan kasein hidrolisat dalam media menyebabkan terjadi penurunan hasil protein total yang didapat (Tabel 6).

## PEMBAHASAN

Penggunaan kultur akar rambut hasil transformasi genetika dengan bantuan *A. rhizogenes* merupakan alternatif teknik untuk mengisolasi dan mempelajari berbagai senyawa aktif yang dihasilkan oleh akar tanaman (Savary & Flores 1994). Akar *Trichosanthes* sp. dilaporkan mempunyai kandungan sejumlah senyawa aktif yang berguna (Dong *et al.* 1994, Kondo *et al.* 1995).

*Agrobacterium rhizogenes* mampu mentransfer T-DNA ke dalam genom sel tanaman yang terinfeksi. Pada T-DNA

Tabel 6. Pengaruh penambahan kasein hidrolisat dalam media MS-0 terhadap hasil biomassa, kadar protein dan hasil protein total rambut paria belut (*Trichosanthes cucumerina* var. *anguina*)

| Kasein hidrolisat (mg/l) | Bobot biomassa (g) | | Persen bahan kering (%) | Kadar protein (mg/g BK) | Hasil total protein (mg) |
|---|---|---|---|---|---|
| | Basah | Kering | | | |
| 0 | 4.4 | 0.32 | 7.5 | 125.3b | 42.4a |
| 50 | 3.6 | 0.27 | 7.6 | 134.5a | 30.6b |
| 100 | 3.5 | 0.26 | 7.7 | 133.1a | 33.8b |
| 150 | 3.1 | 0.25 | 8.4 | 116.8c | 29.0b |

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan dengan taraf 5%

yang ditransfer tersebut terdapat sejumlah gen *rol*, yaitu gen penyandi protein yang membuat sel menjadi lebih sensitif terhadap ZPT dan gen-gen lain penyandi enzim untuk sintesis ZPT (Nilsson & Olsson 1997, Gelvin 2000). Transfer sejumlah gen tersebut ke genom sel tanaman menghasilkan pembentukan akar rambut transgenik yang mampu terus tumbuh dan berkembang meskipun dikulturkan dalam media MS-0. Dalam penelitian ini kemampuan akar rambut untuk tumbuh dalam media MS-0 dijadikan sebagai dasar untuk menyeleksi akar rambut hasil transformasi karena akar normal dari kecambah yang tidak terinfeksi *Agrobacterium* tidak berkembang dan mati dalam media MS-0. Analisis molekuler untuk mendeteksi T-DNA yang terintegrasi dalam genom sel akar rambut atau protein yang terekspresi dari beberapa gen yang ada pada T-DNA tidak dilakukan mengingat berbagai keterbatasan teknis dan nonteknis.

Ke-13 galur akar rambut yang diuji, 7 galur (54%) berhasil tumbuh dalam media MS-0. Berdasarkan kemampuannya untuk tumbuh dalam media tanpa ZPT, 7 galur akar rambut tersebut merupakan akar transgenik hasil transformasi genetika dengan bantuan *A. rhizogenes*. Akar rambut yang dievaluasi sebagian besar diisolasi dari kalus yang terbentuk akibat infeksi *A. rhizogenes*. Kesulitan dalam mematikan kontaminan *Agrobacterium* setelah proses transformasi genetika menyebabkan jumlah galur akar rambut yang dapat dievaluasi dalam penelitian ini sedikit.

Kesulitan mematikan kontaminan *Agrobacterium* merupakan salah satu kendala dalam meningkatkan frekuensi hasil transformasi genetika dengan bantuan *Agrobacterium* (Shackelford & Chlan 1996). Berbagai faktor lain yang berpengaruh terhadap frekuensi mendapatkan jaringan transgenik antara lain: pelukaan, penggunaan senyawa penginduksi (*aceto-syringone*), dan jaringan tanaman yang digunakan sebagai eksplan. Transfer T-DNA dari *Agrobacterium* ke sel tanaman merupakan proses kompleks dan dipengaruhi oleh berbagai faktor yang berasal dari sel tanaman dan dari *Agrobacterium* (Gelvin 2000).

Kultur akar rambut dengan pencahayaan 1000 lux menyebabkan perkembangan akar rambut dengan morfologi akar lateral dan aksilar gemuk dan pendek sedangkan pada pencahayaan 100 lux morfologi akar lateral dan aksilar langsing dan panjang. Pencahayaan dilaporkan mempengaruhi perkembangan akar rambut dalam kultur *in vitro* (Flores *et al.* 1993, Savary & Flores 1994). Untuk *T. kirilowii*, penyinaran langsung (1000 lux) yang diberikan pada kultur menyebabkan akar rambut menjadi berwarna hijau. Pada penelitian tersebut, akar rambut yang dikulturkan juga mempunyai morfologi akar lateral dan aksilar gemuk dan pendek (Savary & Flores 1994).

Dalam penelitian dengan jumlah eksplan awal 3 ujung akar per botol, pola pertumbuhan galur akar rambut pada media tanpa ZPT mengikuti pola pertumbuhan sigmoid, secara umum ujung akar yang dikulturkan memasuki fase antara (linear) antara 4-8 HST dan fase pertumbuhan stasioner setelah 12 HST.

Pada fase pertumbuhan linear, biomassa dan kadar pro- pertumbuhan lambat antara 0-4 HST, fase pertumbuhan cepat tein akar rambut dalam kultur meningkat cepat. Pada fase pertumbuhan linear, sel akar rambut aktif membelah diri dan mensintesis berbagai senyawa metabolit primer termasuk protein. Akan tetapi, biomassa akar rambut yang didapat pada fase pertumbuhan linear antara 4-12 HST belum maksimal sehingga hasil total protein yang diperoleh rendah. Peningkatan kadar protein akar rambut pada fase pertumbuhan linear juga diamati dalam kultur akar rambut *Brassica napus* (Agostini *et al.* 1997).

Fase pertumbuhan stasioner untuk jumlah eksplan awal antara 5-9 ujung akar per botol dicapai dalam waktu yang lebih cepat (8 HST). Selain jumlah eksplan, berbagai faktor telah dilaporkan berpengaruh terhadap kecepatan pencapaian fase pertumbuhan stasioner dalam kultur akar rambut antara lain: galur akar rambut, volume media dan botol kultur yang digunakan, komposisi media, dan kondisi lingkungan ruangan inkubasi (Savary & Flores 1994, Toppi *et al.* 1996).

Protein aktif trikosantin yang dihasilkan oleh akar *T. kirilowii* (Savary & Flores 1994) secara alami diakumulasikan pada saat akar tanaman ini memasuki fase pertumbuhan sekunder dengan ciri morfologi akar membentuk struktur seperti umbi (*storage root*). Fase pertumbuhan sekunder akar *T. kirilowii* tersebut setara dengan fase pertumbuhan stasioner dalam kultur akar rambut, pada fase ini secara morfologi akar rambut memendek, mengalami pertumbuhan melebar, kaku, dan mempunyai jumlah percabangan akar rambut yang sedikit. Dalam kultur akar rambut, fase pertumbuhan stasioner merupakan periode akumulasi senyawa dan protein aktif mulai dilakukan.

Hasil percobaan menunjukkan fase pertumbuhan stasioner dapat dicapai dalam waktu yang lebih cepat jika digunakan jumlah eksplan awal lebih banyak, sehingga kultur akar rambut memasuki fase produksi dan akumulasi senyawa aktif dalam waktu yang lebih singkat. Hubungan antara eksplan awal yang lebih banyak dan tercapai fase pertumbuhan stasioner yang lebih cepat juga diamati pada kultur akar rambut *Datura stramonium* (Sikuli & Demeyer 1997).

Selain jumlah eksplan awal, dalam penelitian ini saat panen akar rambut berpengaruh nyata terhadap kadar protein dan kandungan protein total yang didapat dari kultur akar rambut *T. cucumerina* var. *anguina*. Kadar protein dari semua perlakuan jumlah eksplan menurun dengan semakin lama umur panen, tetapi hasil protein totalnya meningkat. Peningkatan hasil protein total lebih disebabkan oleh peningkatan bobot kering biomassa akar dengan bertambahnya waktu panen. Dalam hal ini meskipun kadar protein menurun, penurunannya dapat diimbangi oleh peningkatan bobot kering biomassa yang dipanen dengan bertambahnya saat panen sehingga hasil protein total semakin meningkat.

Kasein hidrolisat merupakan senyawa organik kompleks yang banyak mengandung asam amino sehingga penambahan kasein hidrolisat diharapkan membantu meningkatkan hasil biomassa dan kandungan protein total akar rambut. Penambahan kasein hidrolisat sampai dengan 150 mg/l tidak meningkatkan hasil biomassa akar rambut jika dibandingkan dengan kontrol. Meskipun tidak meningkatkan hasil biomassa, penambahan kasein hidrolisat menyebabkan perubahan morfologi akar rambut dengan ukuran lebih pendek dan percabangan lebih sedikit. Berbagai karakteristik morfologi tersebut merupakan ciri-ciri akar pada fase pertumbuhan sekunder. Dalam percobaan ini penambahan kasein hidrolisat dalam media meningkatkan kadar protein, tetapi menurunkan hasil protein total. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya pada tanaman *Tropaleum majus*, penambahan asam amino L-sisteina atau fenilalanina dalam media masing-masing menurunkan hasil biomassa akar rambut yang dipanen hingga 35% dan 40% dibanding dengan kontrol. Meskipun hasil biomassa yang didapat lebih rendah, tetapi hasil senyawa aktif *glucotropaeolin* meningkat antara 40%-70% dibanding dengan kontrol (Wielanek & Urbanek 1999).

## UCAPAN TERIMA KASIH

Sebagian penelitian ini dibiayai oleh *Graduate Team Research Grant, University Research for Graduate Education (URGE) Project*, Departemen Pendidikan Nasional, Republik Indonesia. Dewi Sukma memperoleh beasiswa BPPS dari Departemen Pendidikan Nasional, Republik Indonesia. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Yusnita yang telah membantu dalam pemotretan.

## DAFTAR PUSTAKA

Agostini E, Forchetti SMD, Tigiier HA. 1997. Production of peroxidases by hairy roots of *Brassica napus*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 47:177-182.

Bhadra R, Shanks JV. 1997. Transient studies of nutrient uptake, growth and indole alkaloid accumulation in heterotrophic cultures of hairy roots of *Catharanthus roseus*. *Biotech Bioengineering* 55:527-534.

Cresswell RC, Fowler MW, Stafford A, Stepan-Sarkissian G. 1989. Inputs and outputs: primary substrates and secondary metabolism. Di dalam: Kurz WGW (ed). *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures II*. Berlin: Springer Verlag. hlm 14-26.

Dong TX, Ng TB, Yeung HW, Wong RNS. 1994. Isolation and characterization of a novel ribosome inactivating protein, β-kirilowin, from the seed of *Trichosanthes kirilowii*. *Biochem Biophys Res Com* 199:387-393.

Flores HE, Dai YR, Cuello JL, Maldonado-Mendoza IE, Loyola-Vargas VM. 1993. Green roots: photosynthesis and photoautotrophy in an underground plant organ. *Plant Physiol* 101:363-371.

Fu TJ. 1999. Plant cell and tissue culture for food ingredient production: an introduction. Di dalam: Fu TJ, Sing G, Curtis WR (ed). *Plant Cell and Tissue Culture for the Production of Food Ingredient*. New York: Kluwer Academic. hlm 1-6.

Gelvin SB. 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu Rev Plant Mol Biol* 51:223-256.

Kondo T, Inoue M, Mizukami H, Ogihara Y. 1995. Cytotoxic activity of bryonolic acid isolated from transformed hairt roots of *Trichosanthes kirilowii* var. *japonicum*. *Biol Pharm Bull* 18:726-729.

Logeman J, Jach G, Tommerup H, Mundy J, Schell J. 1992. Expression of barley ribosome-inactivating protein leads to increased fungal protection in transgenic tobacco plants. *BioTechnology* 10:305-308.

Minami Y, Nakahara Y, Funatsu G. 1992. Isolation and characterization of two momordins, ribosome in-activating protein from seed of bitter gourd (*Momordica charantia*). *Biosci Biotech Biochem* 569:1470-1477.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.

Narayanaswamy S. 1994. *Plant Cell and Tissue Culture*. New Delhi: Tata McGraw-Hill Publ.

Nilsson O, Olsson O. 1997. Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes rol* genes in the formation of hairy roots. *Physiol Plant* 100:463-473.

Payne GF, Bringi V, Prince CL, Shuler ML. 1992. *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*. New York: Wiley.

Savary BJ, Flores HE. 1994. Biosynthesis of defense-related protein in transformed root cultures of *Trichosanthes kirilowii* Maxim var. *japonicum* (Kitam). *Plant Physiol* 106:1195-1204.

Shackelford NJ, Chlan CA. 1996. Identification of antibiotics that are effective in eliminating *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molec Biol Rep* 141:50-57.

Sikuli NN, Demeyer K. 1997. Influence of the ion composition of the medium on alkaloid production by "hairy root" of *Datura stramonium*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 47:261-267.

Stirpe F, Barbieri L, Batteli MG, Soria M, Lappi D. 1992. Ribosome inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Bio Technology* 10:405-413.

Toppi LSD, Gorini P, Properzi G, Barbieri L, Spano L. 1996. Production of ribosome-inactivating protein from hairy root cultures of *Luffa cyllindrica* (L) Roem. *Plant Cell Rep* 15:910-913.

Toppi LSD, Pecchioni N, Durantee M. 1997. *Cucurbita pepo* L can be transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 51:89-93.

Vivanco JM, Weitzel D, Flores HE. 1997. Characterization of a major storage root protein isolated from the Andean root crop *Mirabilis expansa*. Di dalam: *Advances and Perspectives on the Function of Plant Roots*. Proceeding of the 11th Annual Penn State Symposium in Plant Physiol. Maryland, 22-24 Mei 1997. hlm 454-457.

Wielanek M, Urbanek H. 1999. Glucotropaelin and myrosinase production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 57:39-45.