

**Induksi Akar Rambut Gandarusa
(*Justicia gendarussa* Burm. f.) dengan Perlakuan
Perbedaan Lama Waktu Infeksi *Agrobacterium rhizogenes*
strain YM072001 dan A4T
(The Induction of Gandarusa (*Justicia gendarussa* Burm. f.) Hairy Root under
Different Infection Period of *Agrobacterium rhizogenes* strain YM072001 dan
A4T)**

Dwi Kusuma Wahyuni^{1)*}, Qonitatun Nisa¹, Hery Purnobasuki¹⁾, Tri Muji Ermayanti²⁾,
Bambang Prajoga³⁾ dan Edy Setiti Wida Utami¹⁾

¹⁾ Departmen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga

²⁾ Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI

³⁾ Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga

*Email korespondensi: kusumaanwar@yahoo.com

Diterima 23 Januari 2015, diterima untuk dipublikasikan 7 Agustus 2015

Abstrak

*Penelitian ini bertujuan untuk menginduksi akar rambut eksplan daun Gandarusa (*Justicia gendarussa* Burm.f.) dengan perlakuan perbedaan lama waktu infeksi *Agrobacterium rhizogenes* strain YM072001 dan A4T dan mengevaluasi lama waktu infeksi terbaik untuk induksi akar rambut. Eksplan daun diinokulasi di media MS (Murashige dan Skoog) cair yang berisi bakteri *Agrobacterium rhizogenes* dengan OD₆₀₀ = 0,1 selama 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 menit. Kokultivasi di MS padat selama 2 hari, lalu disubkultur ke media MS padat. Data dianalisis secara deskriptif. Akar rambut mulai tumbuh pada minggu ketiga. Induksi akar rambut berhasil pada eksplan dengan perlakuan strain YMB072001 dengan lama waktu infeksi 20, 40, dan 50 menit. Strain A4T juga berhasil menginduksi eksplan membentuk akar rambut dengan perlakuan 10 menit. Lama waktu infeksi terbaik untuk strain YMB072001 adalah 20 menit dan untuk strain A4T adalah 10 menit.*

*Kata kunci: *Agrobacterium rhizogenes*, akar rambut, *Justicia gendarussa* Burm. f., waktu infeksi*

Abstract

*The objective of this study were to induce hairy root of Gandarusa leaf explants by differences of *Agrobacterium rhizogenes* infection time treatment and to evaluate the best infection time for induction. Leaf explants were inoculated on MS (Murashige dan Skoog) liquid medium with bacterial concentrations of OD₆₀₀ = 0,1 for 10, 20, 30, 40, 50, and 60 minutes and 2 days co-cultivated on MS0 solid medium then sub cultured on MS0 solid medium. Data were analyzed descriptively. Hairy roots were growing on the third week. Explants were successfully induced by strain YMB 072001 at 20, 40, and 50 minutes treatment. A4T strain was successfully induced by 10 minute of treatment. The best infection time for hairy root induction in gandarusa leaf explants for YMB 072001 strains was 20 minutes and for A4T strain was 10 minutes.*

*Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, infection time, *Justicia gendarussa* Burm. f.*

PENDAHULUAN

Tanaman obat Indonesia sangat beragam. Salah satu tanaman obat yang banyak dimanfaatkan adalah gendarusa (*Justicia gendarussa* Burm. f.). Tanaman gendarusa mengandung alkaloid, triterpenoid, tanin, justicin, steroid, dan gendarusin A dan B. Gendarusin A dan B merupakan senyawa aktif untuk antifertilitas pada pria (Prajogo *et al.* 2007).

Pemanfaatan gendarusa secara besar-besaran dihadapkan pada masalah ketersediaannya di alam, karena tanaman ini tumbuh liar dan belum dibudidayakan. Budidaya tanaman secara konvensional membutuhkan waktu yang relatif lama, kadar dan kualitas senyawa aktif yang diinginkan tidak sesuai harapan sehingga diperlukan peran bioteknologi untuk mengatasi hal ini.

Metode produksi senyawa aktif melalui teknik kultur jaringan dipandang lebih efisien jika dibandingkan dengan cara konvensional. Bahan yang diperoleh dengan teknik kultur jaringan dalam keadaan seragam sehingga tidak ada masalah dalam standarisasi. Dengan teknik kultur jaringan juga dapat dilakukan perkecambahan sehingga diperoleh senyawa aktif dengan kualitas yang lebih baik dibandingkan dengan cara konvensional (Syamkumar *et al.* 2007). Salah satu teknik kultur jaringan untuk produksi metabolit sekunder adalah kultur akar rambut (*Hairy Root Culture*).

Kultur akar rambut adalah induksi pembentukan struktur akar rambut dengan menginfeksi *Agrobacterium rhizogenes* pada tanaman yang akan dikultur. *Agrobacterium* mempunyai kemampuan untuk mentransfer sebagian bahan DNANYA pada sel

tanaman melalui pelukaan. DNA yang ditransfer disebut dengan T-DNA merupakan potongan beberapa ratus kilo basa dari plasmid yang dikenal dengan Ri plasmid (*root inducing plasmid*) (Nilsson dan Olsson 1997). Kelebihan teknik kultur akar rambut dibandingkan dengan teknik yang lain adalah senyawa yang dihasilkan lebih stabil karena akar yang diperoleh mempunyai genetik yang stabil, tumbuh cepat dan mudah perawatannya (Rahimi *et al.* 2008).

Pemanfaatan kultur akar rambut untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder telah banyak dilakukan, antara lain untuk produksi lobelin dari *Lobelia inflanta* L. (Yonemitsu *et al.* 1990), katarantin dan ajmalin dari *Catharanthus roseus* G. Don. (Vazquez-Flota *et al.* 1994), saponin dari *Solanum aculeatissimum* (Ikenaga *et al.* 1995) glukotropaeolin dari *Tripaeolum majus* (Wielanek dan Urbanek 1999), asam rosmarin dari *Agastache rugosa* Kuntze (Lee *et al.* 2008), dan saponin dari *Talinum paniculatum* Gaertn. (Manuhara *et al.* 2012). Sejauh ini penelitian tentang kultur akar rambut (*hairy root*) untuk memproduksi metabolit sekunder pada tanaman Gendarusa (*Justicia gendarussa* Burm. f.) belum dilaporkan.

Suatu studi awal perlu dilakukan untuk induksi akar rambut tanaman gendarusa, mengingat banyak faktor yang menentukan keberhasilan kultur akar rambut, antara lain genotip dan kondisi eksplan, ada tidaknya pelukaan, kerapatan bakteri, strain bakteri, lama infeksi dan media (Pardal *et al.* 2004). Lama infeksi sangat bervariasi tergantung jenis eksplan. Tanaman tomat dibutuhkan waktu 5 menit (Purnamaningsih 2010), tanaman ginseng jawa membutuhkan

waktu 20 menit (Wahyuningtyas 2011), *Agastache rugosa* Kuntze membutuhkan waktu 10 menit (Lee *et al.* 2008), *Valeriana sisymbriifolium* membutuhkan waktu 20 menit (Rahimi, *et al.* 2008) dan *Withania somnifera* L. dan *Solanum surttense* Burm f. membutuhkan waktu 5 menit (Pawar dan Maheswari 2003). Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk menginduksi akar rambut dengan perlakuan lama waktu infeksi *Agrobacterium rhizogenes* strain YM072100 dan strain A4T.

METODE

Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun tanaman gandarusa (*Justicia gendarussa* Burm.f.) yang diperoleh dari Balai Materia Medika Batu Malang. Kultur bakteri *Agrobacterium rhizogenes* strain YMB072001 dan A4T yang diperoleh dari Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Bogor. Bahan lain yang digunakan adalah media Murashige and Skoog (MS) padat, Media MS cair (Murashige dan Skoog 1962) antibiotik cefotaxime, nystatin, alkohol 70%, *chlorox* (Bayclin), *aquadest*, fungisida cair (Topsin 500).

Induksi dan pembentukan akar rambut pada eksplan daun

Daun gandarusa dicuci dengan sabun cair selama ± 10 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir. Setelah itu direndam dengan larutan fungisida (10 mL/500 mL air) selama kurang lebih 10 menit. Daun dibilas hingga bersih di bawah air mengalir. Di dalam ruang LAF eksplan direndam dalam larutan *chlorox* 50% selama 7 menit, selanjutnya dibilas dengan *aquadest* steril sebanyak 3 kali dan ditiriskan di atas cawan petri yang telah dialasi kertas saring steril.

Kultur *A. rhizogenes* dalam media YMB yang telah berumur 24 jam disiapkan. Pembuatan media transformasi dilakukan dengan cara memasukkan 10 mL suspensi bakteri dengan $OD_{600} = 0,1$ ke dalam 15 mL *erlenmeyer* yang telah berisi 15 mL MS cair. Eksplan daun yang telah dipotong-potong dimasukkan dalam *erlenmeyer* yang telah berisi media transformasi. Proses infeksi dilakukan dengan menggoyang-goyangkan sesuai dengan waktu perlakuan yaitu 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 menit. Kontrol berupa daun tanpa dilakukan infeksi bakteri. Tiap perlakuan diulang 5 kali, dan tiap ulangan terdiri dari 1 eksplan.

Eksplan ditiriskan di atas kertas saring steril, kemudian ditanam pada media MS0 padat selama 2 hari untuk proses ko-kultivasi. Setelah 2 hari, eksplan dibilas dengan media MS cair yang mengandung 500 mg/L antibiotik cefotaxime, kemudian ditanam pada media MS padat yang mengandung 500 mg/L cefotaxime dan 500 μ L/L nystatin. Subkultur dilakukan pada media yang sama hingga tidak ada bakteri yang tumbuh. Kultur diinkubasi dalam ruang gelap. Akar rambut mulai tumbuh pada minggu ke-3. Data efisiensi transformasi yang diperoleh meliputi persentase eksplan membentuk akar rambut dan jumlah akar rambut yang terbentuk setelah minggu ke-6 dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Akar rambut terbentuk pada eksplan daun gandarusa ditandai dengan munculnya tonjolan kecil berwarna putih di sekitar area pertulangan daun yang terinfeksi oleh bakteri *A. rhizogenes*. Tonjolan tersebut muncul pada pertulangan daun setelah minggu ke-2. Akar rambut terbentuk paling cepat pada

hari ke-15 dengan perlakuan lama waktu infeksi 40 menit, sedangkan pada perlakuan 20 dan 50 menit akar terbentuk pada hari ke-17 pada eksplan yang diinfeksi *A. rhizogenes* strain YMB 072001. Akar rambut terbentuk pada hari ke-28 pada eksplan yang diinfeksi *A. rhizogenes* strain A4T dengan perlakuan lama waktu infeksi selama 10 menit (Gambar 1).

Hasil penelitian tersebut seperti dengan penelitian Ermayanti *et al.* (2009), akar rambut muncul pada daerah pertulangan eksplan daun seperti pada *Artemisia cina* dan *Artemisia annua*. Lama waktu induksi akar rambut juga hampir sama dengan *Artemisia cina* dan *Artemisia annua* pada minggu ke-2 sampai minggu ke-3. Pada *Agastache rugosa* Kuntze akar rambut di minggu ke-3 (Lee *et al.* 2008), calus *Catharanthus roseus* L. pada hari kesepuluh (Zargar *et al.* 2010), *Talinum paniculatum* Gaertn pada minggu ke-2 (Manuhara *et al.* 2012), dan *Ipomoea batatas* pada hari ke-8 (Chandran dan Potty 2008).

Efisiensi transformasi ditunjukkan dengan persentase eksplan yang membentuk akar rambut. Akar rambut berhasil diinduksi oleh *A. rhizogenes* strain YMB 072001 dengan perlakuan 20 menit sebesar 40%, serta perlakuan 40 dan 50 menit masing-masing sebesar 20%. Pada eksplan perlakuan 10, 30, 60 menit dan kontrol tidak membentuk akar rambut. Akar rambut juga berhasil diinduksi oleh *A. rhizogenes* strain A4T pada perlakuan 10 menit sebesar 40%, sedangkan pada eksplan perlakuan lainnya tidak membentuk akar rambut (Gambar 2).

Akar rambut yang tumbuh pada tiap eksplan jumlahnya berbeda-beda berkisar 1-2 buah akar rambut. Data jumlah akar rambut yang tumbuh

pada tiap eksplan disajikan dalam Gambar 3.

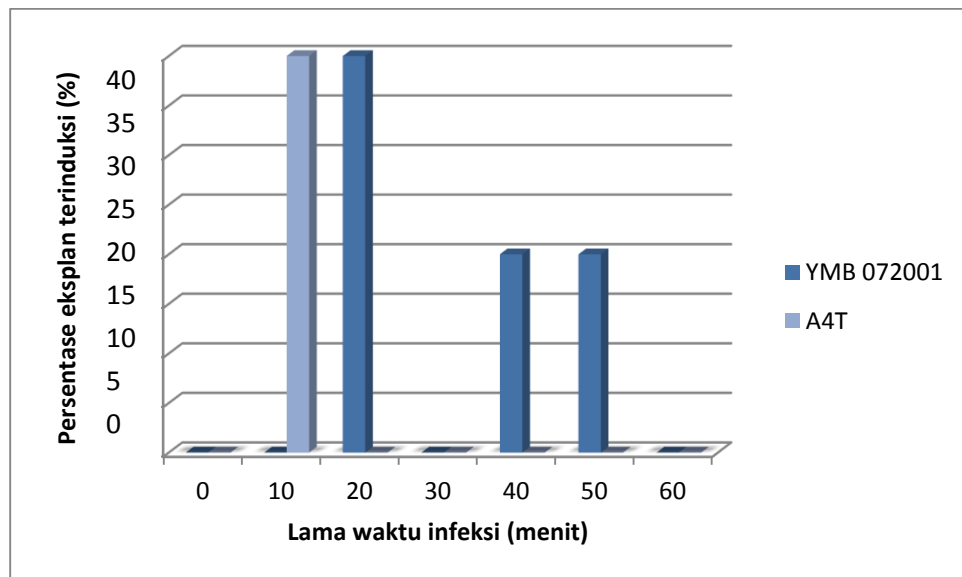
Berdasarkan Gambar 3 diketahui bahwa eksplan yang diinfeksi oleh bakteri *A. rhizogenes* strain YMB 072001 pada perlakuan 20 dan 40 menit berhasil membentuk 2 akar rambut pada tiap eksplan, dan 1 akar rambut pada eksplan perlakuan 50 menit. Sedangkan eksplan lainnya yaitu perlakuan 10, 30, dan 60 menit, dan kontrol tidak membentuk akar rambut. Eksplan yang diinfeksi oleh bakteri *A. rhizogenes* strain A4T berhasil membentuk 1 akar rambut pada tiap eksplan perlakuan 10 menit, sedangkan eksplan lainnya yaitu perlakuan 20, 30, 40, 50, 60 menit, dan kontrol tidak membentuk akar rambut.

Tidak semua eksplan yang diinfeksi oleh *A. rhizogenes* mampu membentuk akar rambut, diduga karena perendaman eksplan dalam suspensi bakteri terlalu lama dapat menyebabkan infeksi bakteri terlalu banyak sehingga jaringan tanaman menjadi stres dan tidak dapat tumbuh (Purnamaningsih 2010). Tidak terbentuknya akar rambut pada eksplan juga diduga karena eksplan tidak dapat mengeluarkan senyawa fenolik dalam jumlah yang cukup untuk dapat merangsang bakteri secara kemotaksis agar mudah menempel pada sel tanaman. Gelvin (2000) menyatakan bahwa produksi senyawa fenolik akibat pelukaan tanaman dapat membuat bakteri lebih mudah menempel pada dinding sel tanaman.

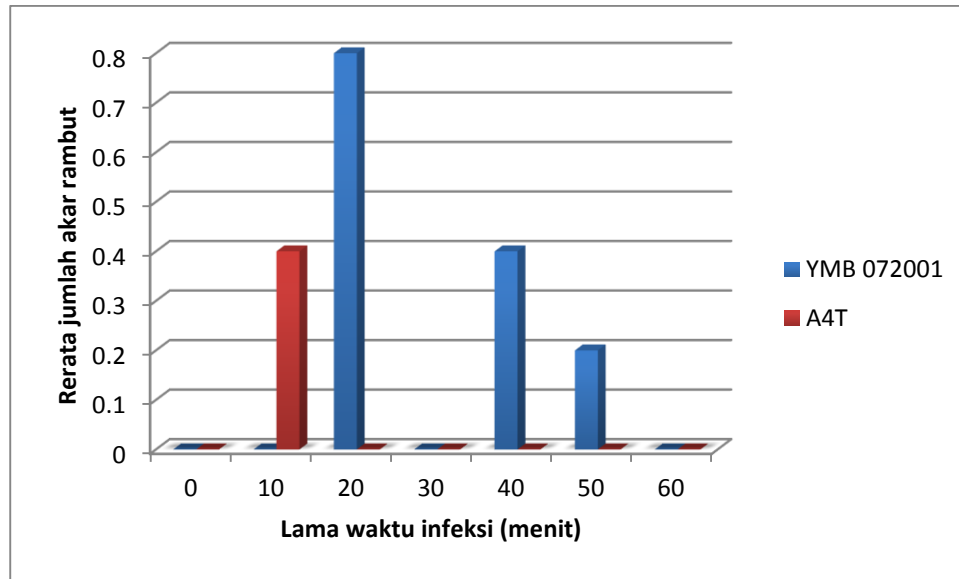
Efisiensi transformasi yang relatif rendah diduga karena adanya perbedaan kompetensi eksplan terhadap infeksi *Agrobacterium*. Ada beberapa faktor yang menentukan kompetensi eksplan, antara lain spesies atau genotip asal eksplan, jenis organ yang digunakan sebagai



Gambar 1. Eksplan yang membentuk akar rambut yang diinfeksi *A. rhizogenes* strain YMB 072001 selama 40 menit (A), selama 50 menit (B), dan yang diinfeksi *A. rhizogenes* strain A4T selama 10 menit (C).



Gambar 2. Grafik persentase eksplan yang membentuk akar rambut dengan berbagai lama waktu infeksi *A. rhizogenes* strain YMB 072001 dan A4T



Gambar 3. Grafik rerata jumlah akar rambut yang terbentuk pada eksplan daun gandarusa dengan berbagai lama waktu infeksi *A. rhizogenes* strain YMB 072001 dan A4T

eksplan, tingkat perkembangan organ, bahkan historis dari masing-masing eksplan yang digunakan (Toruan-Mathius *et al.* 2004, Toruan-Mathius *et al.* 2007, Hu dan Du 2006, Ermayanti *et al.* 2009, Saleh dan Thuc 2009, Chandran dan Potty 2011, Pawar dan Maheswari 2004, Swain *et al.* 2012) Swain *et al.* (2012) menunjukkan bahwa penggunaan internodus *Clitoria ternatea* lebih rentan inokulasi *Agrobacterium* dibandingkan dengan daun. Eksplan yang diambil dari ruang terbuka jauh lebih responsif terhadap inokulasi dibanding eksplan yang diambil dari tanaman *in vitro*.

Owen dan Smigocki (1988) menjelaskan bahwa kemampuan infeksi *Agrobacterium* terhadap tanaman berbeda-beda dalam efektivitas transfer T-DNA, disebabkan karena adanya hubungan antara virulensi isolat *Agrobacterium* yang dipakai dan kerentanan kultivar tanaman. Tiap spesies tanaman atau bahkan kultivar tanaman dalam

spesies yang sama mempunyai tingkat kerentanan terhadap *Agrobacterium* yang berbeda-beda. Perbedaan jumlah eksplan yang terinduksi dan jumlah akar rambut yang terbentuk pada penelitian ini diduga akibat perbedaan virulensi isolat *Agrobacterium rhizogenes* yang digunakan dan kerentanan kultivar tanaman. Ermayanti *et al.* (2009) menggunakan 10 strain yang berbeda menghasilkan prosentase transformasi yang berbeda.

KESIMPULAN

Akar rambut berhasil diinduksi dari daun Gandarusa (*Justicia gandarussa* Burm.f.) dengan menggunakan perbedaan lama waktu infeksi *Agrobacterium rhizogenes* strain YM072001 dan A4T. Lama waktu infeksi yang terbaik adalah 20 menit untuk strain YM072001 dan 10 menit untuk strain A4T.

DAFTAR PUSTAKA

- Chandran RP, Potty VP (2008) Induction of hairy roots through the mediation of four strains of *Agrobacterium rhizogenes* on five host plants. *Indian Journal of Biotechnology* 7:122-128
- Ermayanti TM, Al-Hafiizh, Rahmawati S, Aryanti (2009) Transformasi *Artemisia cina* dan *Artemisia annua* dengan *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Applied and Industrial Biotechnology in Tropical Region 2* (2):1-5
- Gelvin SB (2000) *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51(1): 223
- Hu Z, Du M (2006) Hairy roots and its application in plant genetic engineering. *Journal of Integrative Plant Biology* 48(2): 121-127
- Ikenaga T, Oyama T, Muranaka T (1995) Growth and steroidal saponin production in hairy root culture in *Atropa belladonna*. *Plant Cell Reports* 14:413-417
- Lee SY, Xu H, Kim YK, Park UP (2008) Rosmarinic acid production in hairy root cultures of *Agastache rugosa* Kuntze. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 969-972
- Manuhara YSW, Yachya A, Kristanti AN (2012) Effect of aeration density on biomass and saponin content of *Talinum paniculatum* Gaertn. hairy root in balloon type bubble bioreactor. *Journal of Pharmacology and Biomedics Science* 2(4):47-52
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473
- Nilsson O, Olsson O (1997) Getting to the root: the role of The *Agrobacterium rhizogenes* rol genes in the formation of hairy roots. *Physiologia Plantarum* 100: 463-473
- Owens LD, Smigocki AC (1988) Transformation of soybean cells using mixed strains of *Agrobacterium tumefaciens* and phenolic compounds. *Plant Physiology* 88: 570-573
- Pardal SJ, Wattimena GA, Aswidinnoor H, Herman M, Listanto E, Slamet (2004) Transfer gen *proteinase inhibitor* II pada kedelai melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens* untuk ketahanan terhadap hama penggerek polong (*Etiella zinckenella* Tr.). *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 9(1):20-28
- Pawar PK, Maheswari VL (2004) *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in two medicinally important of family *Solanaceae*. *Indian Journal of Biotechnology* 3:414-417
- Prajogo BEW, Dudy S, Mulja HS (2007) Analisis kadar gendarusin A pada tanaman budidaya *Justicia gendarussa* Burm. f.. *Jurnal Farmasi Indonesia* 3: 176 – 180
- Purnamaningsih R (2010) Introduksi gen *DefH9-iaaM* dan *DefH9-R1-iaaM* ke dalam genom tanaman tomat menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens*. *Jurnal Agro Biogen* 6(1): 18-25
- Rahimi K, Haghbeen K, Marefatjo J, Jazii FR, Sheikhani R (2008) Successful production of hairy root of *Valeriana*

- sisymbriifolium* by
Agrobacterium rhizogenes.
Biotechnology 7(2):200-204
- Saleh NM, Thuc LV (2009)
Assessment of hairy roots
induction in *Solenostemon
scutellarioides* by different
strain of *Agrobacterium
rhizogenes*. African Journal of
Biotechnology 8(15):3519-
3523
- Swain SS, Sahu L, Pal A, Barik DP,
Pradhan C, Chand PK (2012)
Hairy root cultures of butterfly
pea (*Clitoria ternatea* L.):
Agrobacterium X Plant factor
influencing transformation.
Word Journal of Microbiology
and Biotechnology 28:729-739
- Syamkumar S, Sasikumar B (2007)
Molecular marker based
genetic diversity analysis of
curcuma species from India.
Scientia Horticulturae 112:
235-241
- Toruan-Mathius NT, Reflini, Haris N,
Santoso J, Roswiem AP (2004)
Kultur akar rambut *Cinchona
ledgeriana* dan *C. succirubra*
dalam kultur in vitro. Menara
Perkebunan 72(2):72-87
- Toruan-Mathius NT, Siti-Chalimah,
Muhadiono, Aznam L, Haran S
(2007) Kultur akar rambut in
vitro serta pemanfaatan kultur
ganda untuk pertumbuhan dan
perkembangan endomikoriza
(*Gigaspora* sp. dan
Acaulospora sp.). Menara
Perkebunan 75(1): 20-31
- Vazquez-Flota F, Moreno-Volenzuela
O, Miranda-Ham ML, Loyola-
Vorgas VM (1994)
Catharantine and ajmalicine
synthesis in *Catharanthus
roseus* hairy root culture. Plant
Cell Tissue, and Organ Culture
38: 273-279
- Wahyuningtyas E (2011) Pengaruh
konsentrasi dan lama waktu
infeksi *Agrobacterium
rhizogenes* strain 510 terhadap
induksi akar eksplan daun
gingseng jawa (*Talinum
paniculatum* Gaertn.). Skripsi.
Fakultas Sains dan Teknologi.
Universitas Airlangga.
Surabaya.
- Wielanek M, Urbanek H (1999)
Glucotropaeolin and
myrosinase production in hairy
root cultures of *Tropaeolum
majus*. Plant Cell Tissue and
Organ Culture 57: 39-45
- Yonemitsu H, Shimomura K, Satake
M, Mochida S, Tanaka M,
Endo T, Kaji A (1990) Lobeline
production by hairy root culture
of *Lobelia inflata* L. Plant Cell
Report 9: 307-310
- Zargar M, Farahani F, Nabavi T
(2010) Hairy root production of
transgenic *Catharanthus
roseus* L. plants with
Agrobacterium rhizogenes
under in-vitro conditons.
Journal of Medicinal Plants
Research 4(21):2199-2203