

**Transformasi dan Ekspresi Transien Gen Pelapor *Gusa* pada
Andrographis paniculata (Burm.F.) Wallich Ex Ness
(Transformation and Expression of Reporter Gene *Gusa* on *Andrographis
paniculata* (Burm.F.) Wallich Ex Ness)**

Agustina Tangapo ^{1)*}, Erly Marwani ²⁾, Fenny M. Dwivani ²⁾
¹⁾ Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Sam Ratulangi Manado
²⁾ Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung
E-mail korespondensi: iin_truly@yahoo.co.id

Diterima 15 Januari 2012, diterima untuk dipublikasikan 1 Februari 2012

Abstrak

Andrographis paniculata diketahui mengandung senyawa andrografolid, yaitu suatu metabolit sekunder yang memberikan efek farmakologi berupa hepatoprotektif, antiviral dan antikanker. Dalam penelitian ini dilaporkan studi awal prosedur transformasi genetik *A. paniculata* dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens*. Eksplan daun *A. paniculata* diinkubasi dengan *Ag. tumefaciens* strain LBA4404 yang mengandung vektor ganda pCAMBIA1304 dengan gen *hpt* sebagai gen penanda untuk resistensi higromisin dan gen *gusA* sebagai gen pelapor. Setelah kokultivasi, eksplan daun dikultur pada medium seleksi yang mengandung higromisin 20 mg L⁻¹ dan sefotaksim 400 mg L⁻¹. Hasil uji histokimia GUS pada potongan daun setelah tiga hari kokultivasi menunjukkan ekspresi transien GUS mencapai 18,83%. Sebanyak 64,44% jaringan *A. paniculata* yang telah berhasil ditransformasi menunjukkan regenerasi sel dengan menghasilkan kultur kalus transforman pada medium yang mengandung 20 mg/L higromisin.

Kata kunci: transformasi genetik, *Agrobacterium tumefaciens*, *Andrographis paniculata*, asai GUS.

Abstract

Andrographis paniculata is known to contain andrographolide, a secondary metabolite which shows pharmacology effects such as hepatoprotective, antiviral and anticancer. We established an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation procedure for *A. paniculata*. Leaf explants of *A. paniculata* were incubated with *Ag. tumefaciens* strain LBA4404 containing a binary vector pCAMBIA1304 with the *hpt* gene as a selectable marker for hygromycin resistance and an *gusA* gene as a reporter gene. Following co-cultivation, leaf explants were cultured on selective medium containing 20 mg L⁻¹ hygromycin and 400 mg L⁻¹ cefotaxime. GUS assays showed that only 18.83 % transformation frequency was obtained in leaf disk tissues after 3 days co-cultivation. As much as 64.44 % of the transformed tissue on MS medium containing selection agent 20 mg/L hygromycin showed cell regeneration to produce calluses.

Keywords: genetic transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, *Andrographis paniculata*, GUS assay.

PENDAHULUAN

Andrographis paniculata (Burm.f.) Wallich ex Ness (sambiloto) mengandung senyawa bioaktif seperti andrografolid, deoksiandrografolid, dan

neoandrografolid pada seluruh bagian tanaman. Kandungan medisinal utama dari *A. paniculata* adalah andrografolid, senyawa diterpenoid yang menunjukkan berbagai bioaktivitas seperti

antipiretik, antimalaria, anti inflamasi dan antikanker (Mishra *et al.* 2009, Kumar *et al.* 2004, Shen *et al.* 2002). Andrografolid, metabolit penting yang terkandung pada ekstrak *A. paniculata* menunjukkan aktivitas sitotoksik melawan sel KB (*human epidermoid carcinoma*) dan P388 *lymphocytic leukaemia* (Siripong *et al.* 1992). Kebutuhan bahan baku obat *A. paniculata* untuk industri dan farmasi semakin meningkat. Data menunjukkan kebutuhan terhadap tanaman ini untuk industri obat tradisional di Indonesia mencapai 33,47 ton simplisia kering atau setara dengan 709,60 ton berat basah per tahun (Kemala *et al.* 2003 dalam Sunardi 2008).

Penyediaan obat dengan pemanfaatan senyawa bioaktif tanaman *in vivo* untuk skala industri bersifat tidak konsisten karena luasnya variasi kondisi lingkungan pada lokasi yang berbeda dan juga variasi genetik dari tanaman tersebut menyebabkan ketersediaan sumber penghasil senyawa bioaktif tidak stabil. Pemanfaatan teknik kultur *in vitro* dapat menyediakan sumber metabolit yang dapat digunakan secara berkelanjutan dan dapat dilakukan untuk produksi skala besar. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Marwani *et al.* (2008) menunjukkan bahwa kandungan optimum andrografolid pada kalus *A. paniculata* yaitu sebesar 0,4 %, sedangkan kandungan optimum andrografolid pada kultur sel *A. paniculata* yaitu sebesar 0,2 %. Hal ini menunjukkan bahwa produksi andrografolid melalui kultur sel dan kultur kalus lebih rendah dibandingkan kandungan andrografolid pada tanaman *in vivo* (2,07%).

Perkembangan ilmu pengetahuan di bidang biologi molekuler memperkenalkan teknik transformasi genetika sebagai metode untuk menciptakan varietas dengan sifat-sifat unggul.

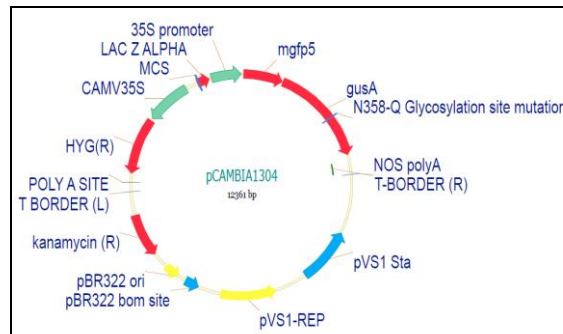
Transformasi gen dengan media bakteri *Ag. tumefaciens* merupakan cara yang relatif murah dan lebih alami dibandingkan dengan penggunaan *partikel bombardment* dan *micro injection*. Selain itu gen yang ditransformasi dengan *Ag. tumefaciens* terintegrasi lebih stabil di dalam genom tanaman target.

Transformasi genetik pada *A. paniculata* belum pernah dilaporkan. Deteksi awal terjadinya transformasi genetik dibutuhkan sebagai bagian dari optimasi transformasi genetik pada *A. paniculata*. Strategi deteksi awal yang umum dilakukan untuk mengetahui terjadinya transformasi adalah *screening* seluruh sel/jaringan tanaman yang telah ditransformasi untuk ekspresi gen pelapor. Gen pelapor yang dimaksud yaitu gen *gusA* yang mengkode enzim β -glukuronidase (GUS). Aktivitas enzim tersebut dapat secara mudah divisualisasikan dengan kehadiran substrat X-Gluc (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid*) yang diuraikan sehingga membentuk senyawa antara melalui reaksi dimerisasi oksidatif yang menghasilkan senyawa dikloro-dibromoindigo (ClBr-indigo) yang berwarna biru. Gen GUS hanya akan diekspresikan pada sel tanaman dan tidak pada *Agrobacterium*, karena adanya intron pada daerah N-terminal dari sekuens gen *gusA* (Jouanin *et al.* 1993). Penelitian ini bertujuan untuk melakukan studi awal transformasi genetik *A. paniculata* dengan perantara *Ag. tumefaciens*. Di dalam tulisan ini dilaporkan hasil penelitian transformasi dan pengujian ekspresi transien gen pelapor *gusA* pada eksplan daun *A. paniculata*.

METODE

Bahan tanaman, galur bakteri dan vektor

Eksplan yang digunakan untuk transformasi adalah daun



Gambar 1. Peta plasmid pCambia1304

tanaman *A. paniculata* yang berumur 2 sampai 3 bulan yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Rempah (Balitro) Bogor. Vektor strain LBA4404 yang membawa vektor ganda untuk transformasi genetik adalah *Ag. tumefaciens* pCambia1304 (Gambar 1) yang mengandung gen penanda *hpt*, gen pelapor *gusA*.

Uji Sensitivitas *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 terhadap Sefotaksim

Untuk menentukan konsentrasi minimum antibiotik (sefotaksim) yang dapat digunakan untuk mengeliminasi *Ag. tumefaciens* LBA4404 dan tidak menjadi toksik bagi pertumbuhan dan perkembangan eksplan tanaman saat transformasi diperlukan uji sensitivitas *Ag. tumefaciens* dan jaringan *A. paniculata* terhadap satu seri konsentrasi larutan sefotaksim. Dalam penelitian ini dicobakan 100-1000 mg/L sefotaksim. Uji sensitivitas *Ag. tumefaciens* terhadap sefotaksim dilakukan dengan menggunakan *multiple well plates*. Konsentrasi minimum sefotaksim yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan yang digunakan untuk proses disinfeksi pada transformasi, kemudian diujikan pada jaringan *A. paniculata*.

Optimasi Medium Seleksi

Tahapan seleksi diperlukan untuk menyeleksi sel-sel atau

jaringan yang berhasil ditransformasi diantara seluruh sel atau jaringan tanaman yang ditransformasi. Uji efektivitas konsentrasi higromisin menggunakan eksplan potongan daun yang telah steril pada medium MS (Murashige & Skoog, 1962), dengan penambahan 0,5 μM 2,4-D (asam 2,4-diklorofenoksiasetat) dan 0,1 μM BAP (benzilaminopurin). Konsentrasi higromisin yang diuji adalah 0, 15, 20, 25, 30 dan 40 mg/L. Pengamatan dilakukan selama 2-3 minggu untuk melihat sensitivitas jaringan daun terhadap agen penyeleksi higromisin. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah eksplan yang mati akibat pengaruh penambahan higromisin.

Kultur *Agrobacterium tumefaciens*

Ag. tumefaciens strain LBA4404 yang mengandung pCambia1304 ditumbuhkan pada medium LB dengan penambahan antibiotik 50 mg/L kanamisin dan 25 mg/L rifampisin. Kultur bakteri tersebut diinkubasi pada suhu 28°C sambil diagitasi dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam. Setelah diinkubasi selama 24 jam atau sampai bakteri memiliki kerapatan 10^7 sel bakteri/mL, setara pada *optical density* (OD)_{600nm} = 0,8; suspensi bakteri disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Pelet bakteri diresuspensikan dengan medium 1/2 MS cair dengan perbandingan volume 1:3 selanjutnya ditambahkan

asetosiringon 100 μ M. Suspensi tersebut siap digunakan untuk tahap transformasi.

Transformasi dan Induksi Kalus Transforman

Tahap infeksi dilakukan dengan cara perendaman eksplan yang telah diprakultur ke suspensi bakteri yang telah dipersiapkan selama 60 menit, sambil diagitasi dengan kecepatan 100 rpm. Jaringan yang telah diinokulasi pada kultur bakteri kemudian dikokultivasi pada medium MS + 0,5 μ M 2,4-D + 0,1 μ M BAP + 100 μ M asetosiringon. Jaringan dipelihara pada medium kokultivasi selama tiga hari dalam kondisi gelap dengan suhu 28°C. Jaringan yang telah dikokultivasi selama tiga hari kemudian dicuci dengan akuades steril selama 5 menit sebanyak tiga kali dan disinfeksi menggunakan antibiotik sefotaksim 400 mg/L untuk mengeliminasi bakteri selama 15 menit sebanyak dua kali. Eksplan yang telah ditransformasi dipindahkan pada medium disinfeksi (MS + 0,5 μ M 2,4-D + 0,1 μ M BAP + 400 mg/L sefotaksim) selama 6 hari. Eksplan yang bertahan dipindahkan pada medium seleksi dengan penambahan 20 mg/L higromisin. Pengamatan dilakukan terhadap eksplan yang tumbuh membentuk kalus pada medium seleksi.

Pengujian GUS

Pengujian GUS dilakukan pada eksplan potongan daun *A. paniculata* yang telah ditransformasi dan dikokultivasi tiga hari. Pengujian GUS dilakukan berdasarkan metode Kertbundit (1991). Campuran X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid) dipersiapkan dengan cara mencampurkan 1 mM X-Gluc; 0,1 mM $K_3Fe(CN)_6$; 0,1 mM $K_4Fe(CN)_6$; 50 mM fosfat buffer ($NaH_2PO_4/NaHPO_4$), dengan pH 7,0. Eksplan yang telah dikokultivasi tiga hari diinkubasi selama 24 jam dalam

larutan X-Gluc tersebut pada suhu 37 °C dalam gelap, setelah itu eksplan dicuci dengan metanol, dilanjutkan dengan pengamatan terhadap eksplan yang mengekspresikan gen *gusA* dengan adanya warna biru pada eksplan. Pengamatan luas penutupan bercak biru (*stain*) pada jaringan yang mengekspresikan GUS dilakukan menurut metode Utomo (2004) yang dimodifikasi, dengan menggunakan program *Adobe Photoshop* dengan menampilkan *grid*-nya sehingga dapat menghitung persentase luas penutupan bercak biru pada GUS berdasarkan perhitungan persentase luas penutupan bercak biru positif GUS = (jumlah kotak jaringan berwarna biru/jumlah seluruh kotak jaringan) x 100%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sensitivitas *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 terhadap Sefotaksim

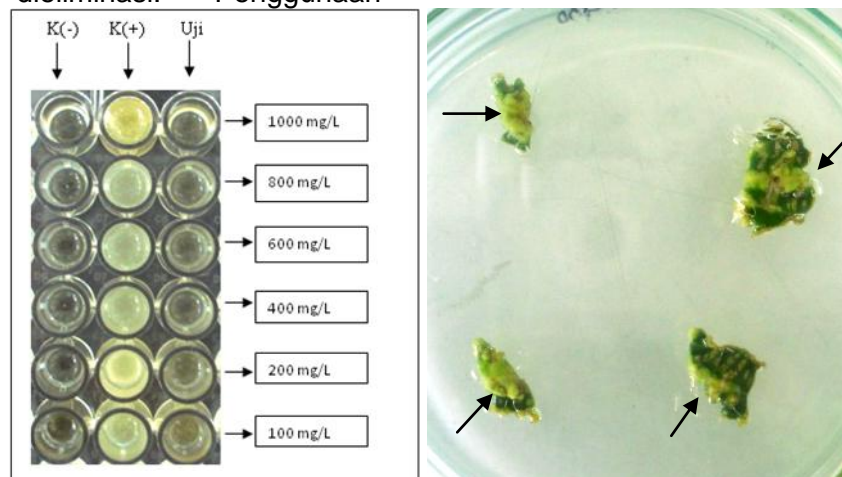
Hasil uji sensitivitas *Ag. tumefaciens* terhadap sefotaksim menunjukkan bahwa bakteri masih tetap dapat bertumbuh pada pemberian sefotaksim 100-200 mg/L, pertumbuhan *Ag. tumefaciens* terhambat pada konsentrasi sefotaksim \geq 400 mg/L (Gambar 2). Berdasarkan hasil ini berarti konsentrasi terkecil (minimum) sefotaksim yang dapat menghambat pertumbuhan *Ag. tumefaciens* adalah 400 mg/L. Oleh karena itu, dalam penelitian ini digunakan konsentrasi 400 mg/L sefotaksim sebagai konsentrasi minimum untuk mengeliminasi bakteri pada tahap disinfeksi.

Keberhasilan transformasi genetik melibatkan interaksi antara sistem seleksi sel/jaringan transforman, dan kontrol terhadap vektor yang digunakan dalam transformasi yaitu *Agrobacterium*. Keberhasilan eliminasi *Ag. tumefaciens* dalam prosedur

transformasi genetik yang dilakukan setelah tahap kokultivasi terhadap eksplan yang telah ditransformasi, merupakan tahap yang penting untuk menjamin ketahanan hidup sel dan jaringan transforman. Menurut penelitian yang dilakukan Okkels dan Pederson (1988) dalam Silva dan Fukai (2001) dilaporkan bahwa diantara enam antibiotik yang diuji yaitu karbenisilin, sefotaksim, kanamisin, tetrasiklin, streptomisin, kloramfenikol, higromisin B; antibiotik sefotaksim dan karbenisilin menunjukkan hasil yang paling efektif dalam mengeliminasi *Agrobacterium*. Terdapat beberapa antibiotik yang efektif untuk mengeliminasi *Agrobacterium* pada transformasi genetik, yaitu sefotaksim, karbenisilin, vankomisin dan timentin (Nauerby *et al.* 1997). Jenis antibiotik tersebut memiliki kekuatan yang berbeda untuk mengeliminasi *Agrobacterium*, salah satunya penentunya yaitu tergantung pada strain bakteri yang akan dieliminasi. Penggunaan

sefotaksim pada tahap disinfeksi dalam penelitian ini juga mengacu pada penelitian Silva dan Fukai (2001) yang melaporkan bahwa sefotaksim efektif melawan strain LBA4404, sedangkan karbenisilin paling efektif melawan bakteri *Ag. tumefaciens* strain EHA101.

Berdasarkan hasil uji sensitivitas yang telah dilakukan, konsentrasi sefotaksim yang digunakan untuk mengeliminasi bakteri dalam penelitian ini adalah 400 mg/L. Konsentrasi tersebut kemudian diujikan pada jaringan tanaman *A. paniculata* (Gambar 2), hasilnya menunjukkan bahwa pada konsentrasi sefotaksim 400 mg/L tidak berpengaruh negatif pada pembentukan kalus dari jaringan *A. paniculata*, sehingga pada konsentrasi sefotaksim 400 mg/L dianggap tidak memiliki efek toksik terhadap pertumbuhan dan perkembangan jaringan tanaman *A. paniculata*.



Gambar 2. Hasil uji sensitivitas *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 terhadap sefotaksim (kiri) K(-): kontrol negatif pengenceran antibiotik menggunakan medium cair tanpa kultur bakteri, K(+): kontrol positif pengenceran kultur bakteri menggunakan medium cair tanpa antibiotik, dan kolom uji menunjukkan pengenceran antibiotik dengan kultur bakteri; pembentukan kalus *Andrographis paniculata* (tanda panah) pada medium dengan penambahan 400 mg/L sefotaksim (kanan).

Optimasi Medium Seleksi

Hasil uji sensitivitas jaringan *A. paniculata* terhadap konsentrasi higromisin (agen penanda/penyeleksi jaringan tertransformasi dengan pCAMBIA1304) menunjukkan kematian eksplan dengan persentase yang berbeda-beda (Tabel 1). Eksplan yang ditanam pada medium dengan penambahan higromisin pada konsentrasi 25, 30 dan 40 mg/L mengalami kematian pada minggu kedua dengan persentase di atas 40%, dan mencapai kematian 100% pada minggu ketiga. Kematian eksplan tampak dengan terjadinya pencokelatan pada seluruh bagian eksplan. Pada medium dengan konsentrasi higromisin 20 mg/L, kematian eksplan mencapai 25% pada minggu ke 2, pada minggu ketiga kematian mencapai 95%, dan pada minggu keempat mencapai 100%. Pada konsentrasi higromisin 15 mg/L, eksplan masih dapat berkembang membentuk kalus pada beberapa bagian dan kalus yang terbentuk pertumbuhannya lebih lambat dibandingkan dengan kontrol (konsentrasi higromisin 0 mg/L), lalu mengalami kematian seluruhnya pada minggu kelima. Berdasarkan hasil ini maka konsentrasi higromisin yang digunakan dalam seleksi transforman yaitu 20 mg/L.

Transformasi dan Seleksi

Keberhasilan transformasi dalam penelitian ini diamati dari

kemampuan jaringan untuk bertahan hidup dan berdediferensiasi membentuk kalus pada medium seleksi berupa medium MS + 0,5 μ M 2,4-D + 0,1 μ M BAP + 400 mg/L sefotaksim + 20 mg/L higromisin serta berdasarkan uji histokimia. Tumbuhan *A. paniculata* merupakan tumbuhan yang alaminya tidak toleran terhadap higromisin, karena tidak memiliki gen resisten higromisin. Eksplan potongan daun *A. paniculata* yang tampak mampu bertahan hidup dengan membentuk kalus pada media yang mengandung higromisin 20 mg/L diduga disebabkan DNA genom tanaman tersebut telah tersisipi gen asing (mengalami transformasi genetik), dalam penelitian ini berupa gen resisten antibiotik higromisin. Eksplan yang mengalami pencokelatan pada seluruh bagian dan akhirnya mati, diduga merupakan eksplan yang tidak tertransformasi, karena tidak mampu bertahan dalam medium mengandung 20 mg/L higromisin (Gambar 3a). Kalus yang terbentuk dan dapat bertahan hidup pada medium seleksi adalah kalus transforman putatif (Gambar 3c). Kalus transforman putatif menunjukkan tekstur kompak dan berwarna putih hingga putih kekuningan (krem), sama halnya dengan kalus nontransforman yang menunjukkan tekstur kompak (Gambar 3b).

Tabel 1. Hasil uji sensitivitas jaringan *Andrographis paniculata* terhadap higromisin

Konsentrasi higromisin (mg/L)	Persentase eksplan mati (%)				
	Minggu				
	1	2	3	4	5
0	0	0	0	0	0
15	0	0	47	88	100
20	0	25	95	100	
25	0	41	100		
30	0	65	100		
40	0	75	100		

Persentase keberhasilan jaringan yang berdediferensiasi membentuk kalus pada medium seleksi mencapai 64,44 %. Berdasarkan hasil tersebut tampak bahwa metode infeksi dengan teknik perendaman dan penambahan asetosiringon pada tahap infeksi dan kokultivasi berperan dalam proses penyisipan T-DNA ke dalam sel *A. paniculata* sehingga terjadi transformasi genetik pada *A. paniculata*. Teknik transformasi genetik yang dilakukan pada penelitian ini yaitu metode infeksi dengan perendaman eksplan dalam suspensi bakteri yang ditambahkan asetosiringon dan metode kokultivasi juga dengan penambahan asetosiringon. Teknik perendaman merupakan teknik yang umum digunakan untuk infeksi dalam transformasi genetik (Hong *et al.* 2007, Li *et al.* 2007, Sharma *et al.* 2009).

Pada tahap infeksi dan kokultivasi digunakan asetosiringon yang bertujuan untuk meningkatkan efisiensi transformasi. Asetosiringon merupakan senyawa fenolik yang dihasilkan oleh sel-sel tanaman yang mengalami luka, yang dapat menginduksi transkripsi dari gen-gen *vir* pada Ti-plasmid *Agrobacterium*. Oleh sebab itu juga, selain penambahan asetosiringon, eksplan dilukai terlebih dahulu sebelum direndam dalam suspensi bakteri,

dengan asumsi akan meningkatkan produksi sinyal fenolik. Induksi transkripsi gen-gen *vir* tersebut melalui interaksi antara produk *virA* dan *virG* berperan dalam proses transfer T-DNA ke dalam sel tanaman. Bakteri memiliki sistem kemotaksis dengan sensitivitas tinggi sebagai respons terhadap gula, asam amino dan senyawa fenolik dari tanaman. Pada konsentrasi rendah asetosiringon berperan sebagai kemoatraktan untuk bakteri menempel, dimana bakteri bermigrasi menuju sel-sel yang mengalami luka, tempat konsentrasi asetosiringon lebih tinggi mempengaruhi induksi *vir* dan selanjutnya transfer T-DNA (Gelvin 2000).

Ekspresi GUS pada Jaringan Transforman Putatif

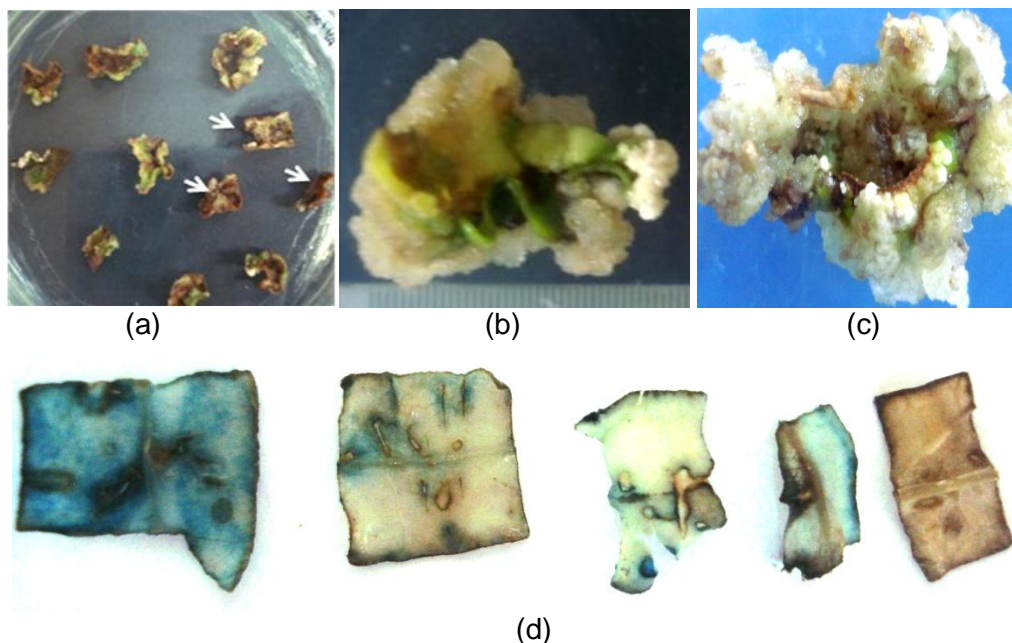
Deteksi adanya β -glukuronidase (GUS) digunakan untuk mengetahui terjadinya transformasi baik transien maupun stabil. Ekspresi GUS pada potongan daun setelah kokultivasi maupun pada kalus hasil seleksi, ditunjukkan oleh terbentuknya warna kebiruan sebagai hasil hidrolisis substrat X-gluc oleh enzim β -glukuronidase (Gambar 3d). Hasil uji pada tahap awal (tiga hari setelah kokultivasi) dari sepuluh ulangan yang diuji semuanya positif menunjukkan

warna kebiruan tetapi tidak merata pada seluruh bagian eksplan. Luas penutupan area GUS yang berwarna kebiruan mencapai rata-rata 18,11 %.

Gen *gusA* yang terdapat pada T-DNA plasmid pCAMBIA1304 berukuran 1866 pb dengan promotor CamV35S. Apabila T-DNA telah terintegrasi pada genom tanaman maka gen yang terdapat pada T-DNA dapat diekspresikan pada sel tanaman, sehingga gen *gusA* yang terdapat pada T-DNA tersebut pun akan terekspresikan. Adanya intron pada sequens gen *gusA* membuat gen ini sangat baik sebagai gen pelapor untuk diekspresikan pada sel-sel tumbuhan karena tidak diekspresikan pada *Ag. tumefaciens* yang menempel pada jaringan (Ohta *et al.* 1990 dalam Hiei *et al.* 1994).

Hasil pengujian GUS transien menunjukkan bahwa tidak seluruh bagian eksplan tertransformasi

seperti yang dijelaskan di atas. Hal ini ditandai dengan warna biru yang tidak merata pada seluruh bagian eksplan atau menunjukkan fenomena kimerik (Gambar 3d). Diduga bahwa keadaan eksplan daun yang tidak seragam mempengaruhi keberhasilan transformasi. Chaidamsari *et al.* (1999) juga melaporkan tidak meratanya atau rendahnya intensitas warna biru pada jaringan petal dan daun tanaman kakao yang ditransformasi disebabkan rendahnya jumlah GUS atau rendahnya kualitas reaksi perubahan warna oleh GUS. Fenomena seperti ini juga dilaporkan oleh Hiei *et al.* (1994) pada koloni sel yang resisten higromisin dimana warna biru tidak seragam pada seluruh bagian ketika diuji yang disebabkan karena tidak meratanya proses transformasi yang terjadi.



Gambar 3. (a) eksplan yang bertahan dan tidak bertahan pada medium seleksi (tanda panah menunjukkan eksplan yang tidak bertahan), (b) kalus nontransforman, (c) kalus transforman berumur tiga minggu di medium seleksi, (d) Hasil uji GUS (warna biru menunjukkan positif uji GUS), eksplan paling kanan adalah kontrol/eksplan yang tidak ditransformasi.

KESIMPULAN

Jaringan *Andrographis paniculata* berhasil ditransformasi dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 yang membawa vektor ganda pCAMBIA1304 yang ditunjukkan dengan adanya dediferensiasi jaringan membentuk kultur kalus pada medium MS + 0,5 µM 2,4-D + 0,1 µM BAP + 400 mg/L sefotaksim dan agen seleksi berupa 20 mg/L higromisin, dengan persentase ekspresi transien GUS mencapai 18,11%. Persentase keberhasilan jaringan yang berdediferensiasi membentuk kalus pada medium seleksi tersebut sebesar 64,44 %.

DAFTAR PUSTAKA

- Chaidamsari T, Suwanto A, Winata L, Santoso D (1999) Transformasi dan ekspresi gen GUS pada beberapa jaringan tanaman kakao. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 4:28-35
- Gelvin, S B (2000) *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51:223-256
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA, *The Plant Journal* 6:271-282
- Hong HP, Zhang H, Olhoft P, Hill S, Wiley H, Toren E, Hillebrand H, Jones T, Cheng M (2007) Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via *Agrobacterium* in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 43:558-568
- Jouanin L, Brasileiro ACM, Leple JC, Pilate G, Cornu D (1993) Genetic transformation: a short review of methods and their application, results and perspectives for forest trees. *Annals of Forest Science* 50: 325-336
- Kertbundit S, De Greeve H, Deboeck F, Montagu MV, Hernalsteens J P (1991) In vivo random β-Glucuronidase gene fusions in *Arabidopsis thaliana*. USA. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 88:5212-5216
- Kumar RA, Sridevi K, Kumar NV, Nanduri S, Rajagopal S (2004) Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*, *Journal Ethnopharmacol* 92:291–295
- Li HQ, Xu J, Chen L, Li MR (2007) Establishment of an efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated leaf disc transformation of *Thellungiella halophila*, *Plant Cell Reports* 26:1785–1789
- Marwani E, Astriati N, Munfarida I, Kadar VR (2008) Establishment and improvement of Andrographolide (a potent anticancer agent) production in cell culture of *Andrographis paniculata*, Report of Granted Research the Asahi Glass Foundation.
- Mishra K, Dash AP, Swain BK, Dey N (2009) Anti-malarial activities of *Andrographis paniculata* and *Hedyotis corymbosa* extracts and their combination with curcumin, *Malarial Journal* 8:1-9
- Nauerby B, Billing K, Wyndaele R (1997) Influence of the

- antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentration suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 123:169-177
- Sharma MK, Solanke AU, Jani D, Singh Y, Sharma AK (2009) A simple and efficient *Agrobacterium*-mediated procedure for transformation of tomato. *Journal of Biosciences* 34:423-433
- Shen Y, Chen C, Chiou W (2002) Andrographolide prevents oxygen radical production by human neutrophils: possible mechanism(s) involved in its anti-inflammatory effect. *British Journal of Pharmacology* 135: 399-406
- Silva JAT, Fukai S (2001) The impact of carbenicillin, cefotaxime and vancomycin on *Chrysanthemum* and *Tobacco* TCL morphogenesis and *Agrobacterium* growth. *Journal of Applied Horticulture* 3:3-12
- Siripong P, Kongkathip B, Preechanukool K, Picha P, Tunsuwan K, Taylor WC (1992) Cytotoxic diterpenoid constituents from *Andrographis paniculata* Nees leaves. *Journal of Science in Society* 18:187-194
- Sunardi (2008) Teknik pembibitan sambiloto untuk menghasilkan bibit yang standar. *Buletin Teknik Pertanian* 13:37-39
- Utomo SD (2004) Pengaruh strain *Agrobacterium* terhadap efisiensi transformasi genetik jagung genotipe Hibrida Hill. *Ilmu Pertanian* 11:1-10