



LAPORAN PENELITIAN

**ANALISIS STABILITAS TRANSGEN PADA KULTUR KALUS
TRANSFORMAN *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wallich ex NESS.**

Oleh Tim Peneliti:

Agustina Monalisa Tangapo, S.Si., M.Si. (Ketua)

Pience Veralyn Maabuat, S.Si., M.Si. (Anggota)

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS SAM RATULANGI**

2012

Dibiayai dari Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA)
Nomor: 0748/023-04.2.01/27/2012, Tanggal 9 Desember 2011

Tahun Anggaran 2012

Satuan Kerja Universitas Sam Ratulangi
Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian : Analisis Stabilitas Transgen pada Kultur Kalus Transforman *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wallich ex NESS.
2. Ketua Peneliti
 - a. Nama Lengkap : Agustina Monalisa Tangapo, S.Si., M.Si
 - b. Jenis Kelamin : Perempuan
 - c. NIP : 19830802 200604 2 004
 - d. Disiplin Ilmu : Biologi Sel dan Molekul
 - e. Pangkat/Golongan : Penata Muda / III a
 - f. Jabatan : Asisten Ahli
 - g. Fakultas/Jurusan : MIPA/Biologi
 - h. Alamat : Jl. Kampus Kleak Manado, 95115
 - i. Telepon : 0431-827932
 - j. Alamat Rumah : Jl. W.Z. Yohanes, Lingk. V, Bumi Nyiur
 - k. Telepon/Fax : 08124417209
 - l. Email : iin_truly@yahoo.co.id
3. Lokasi Penelitian : Unit Layanan Bioteknologi FMIPA UNSRAT
4. Lama Penelitian : 10 Bulan
5. Jumlah Biaya yang diusulkan : Rp. 25.000.000,-

Manado, September 2012

Ketua Peneliti,



Agustina M. Tangapo, S.Si., M.Si
NIP. 19830802 200604 2 004

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian



ABSTRAK

Penelitian tentang analisis stabilitas transgen pada kultur kalus transforman *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wallich ex NESS telah dilaksanakan secara bertahap selama 10 bulan pada tahun 2012 mulai dari pengambilan sampel, transformasi, seleksi dan analisis stabilitas ekspresi transgen pada kalus transforman pada beberapa periode subkultur. Konfirmasi integrasi T-DNA ke dalam genom *A. paniculata* dilakukan dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) dengan menggunakan primer spesifik gen *gusA* yang mengamplifikasi fragmen internal gen *gusA* dengan panjang 976 pb diikuti dengan visualisasi dengan elektroforesis. Analisis PCR yang diikuti dengan visualisasi pada elektroforesis agarosa menunjukkan munculnya larik DNA 976 pb pada lini kalus transforman putatif hasil seleksi subkultur 1-5. Berdasarkan hasil tersebut disimpulkan bahwa gen *gusA* berhasil stabil terintegrasi ke dalam genom *A. paniculata* sampai subkultur ke-5.

PRAKATA

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas anugerah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan laporan penelitian dengan judul: “Analisis Stabilitas Transgen pada Kultur Kalus Transforman *Andrographis paniculata* (Burm.f.)”. Dengan selesainya penelitian dan penyusunan laporan ini, diharapkan dapat menambah pengetahuan dan wawasan, dalam rangka pengembangan teknik transformasi sebagai salah satu pendekatan untuk peningkatan metabolit sekunder dari tanaman.

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Dirjen Pendidikan Tinggi yang telah menyediakan pendanaan dalam kegiatan penelitian dan penyusunan laporan;
2. Rektor Universitas Sam Ratulangi Manado beserta seluruh staf dan pegawai yang telah memberikan ijin kepada penulis untuk meneliti;
3. Dekan FMIPA Unsrat Manado beserta staf dan pegawai yang telah memberikan ijin dan kesempatan kepada penulis untuk melaksanakan penelitian ini;
4. Rekan sesama staf pengajar dan peneliti atas dukungan dan bantuannya.

Akhirnya penulis berharap hasil penelitian ini dapat dimanfaatkan dalam pengembangan ilmu pengetahuan.

Manado, September 2012

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
PRAKATA	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR	iv
DAFTAR LAMPIRAN	v
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	3
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	6
BAB IV. METODE PENELITIAN	7
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	9
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	13
DAFTAR PUSTAKA	13
LAMPIRAN	16

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Morfologi tanaman <i>Andrographis paniculata</i>	3
2. Struktur senyawa yang diisolasi dari ekstrak diklorometan <i>Andrographis paniculata</i>	5
3. Kalus transforman putatif tiga minggu di medium seleksi	9
4. Hasil uji GUS	10
5. Elektroferogram hasil konfirmasi PCR dengan menggunakan pasangan primer <i>gusA</i>	11

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Foto-foto Penelitian	16
2. Biodata Peneliti	18
3. Draft Artikel Ilmiah	21
4. Penggunaan Anggaran	33

BAB I. PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang Masalah

Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wallich ex NESS. merupakan salah satu tumbuhan yang telah lama digunakan sebagai bahan ramuan obat tradisional. *A. paniculata* terbukti berkhasiat untuk mencegah maupun mengobati beberapa penyakit, seperti tifus, diabetes, radang telinga, radang tenggorokan, amandel, gatal-gatal, kudis, sinusitis, dan disentri. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas anti-HIV dari ekstrak *A. paniculata* (Otake *et al.*, 1995 dalam Bhan *et al.*, 2006). *A. paniculata* mengandung andrografolid, deoksiandrografolid, dan neoandrografolid pada seluruh bagian tumbuhan.

Kebutuhan bahan baku obat *A. paniculata* untuk industri dan farmasi semakin meningkat sementara laju pemanenan terjadi lebih cepat dari laju kemampuan alam untuk memulihkan populasinya. Tumbuhan *A. paniculata* dipanen dari habitat aslinya oleh masyarakat untuk sumber bahan obat tradisional. Nilai manfaat dan ekonomi *A. paniculata* yang tinggi juga diikuti pengambilannya yang dilaksanakan terus menerus tanpa upaya budidaya yang tepat dapat mengancam keberadaan plasma nutfah *A. paniculata* (Winarto, 2003). Oleh sebab itulah perlu dilakukan suatu usaha untuk dapat memenuhi permintaan bahan baku-andrografolid-yang berasal dari *A. paniculata* tanpa menekan populasi di alam. Metode kultur *in vitro* dapat menjadi alternatif untuk produksi andrografolid sebagai upaya pemenuhan kebutuhan industri farmasi. 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 %).

Perkembangan ilmu pengetahuan di bidang biologi molekuler memperkenalkan teknik transformasi genetika sebagai metode untuk menciptakan varietas dengan sifat-sifat unggul. Transfer gen pada tanaman bertujuan untuk mengintegrasikan fragmen satu atau beberapa gen ke dalam genom suatu tanaman sehingga tanaman memiliki komposisi genetik yang baru. Pada tanaman *A.*

paniculata, transformasi dapat dilakukan untuk peningkatan metabolit sekunder andrografolid. Teknik ini akan menghasilkan modifikasi pada sel/jaringan tanaman yang dapat mengekspresikan karakteristik yang lebih baik dari segi hasil dan kualitas.

Metode transformasi dengan perantara *Agrobacterium* saat ini masih merupakan metode yang paling umum digunakan. Keunggulan utama transfer gen dengan menggunakan vektor plasmid pada *Agrobacterium* dibandingkan dengan transfer gen secara langsung adalah mampu mengurangi jumlah transgen sehingga berpotensi untuk mengurangi masalah ko-supresi dan instabilitas akibat keberadaan transgen (Tripathi *et al.*, 2005).

Keberhasilan transformasi genetik tanaman ditandai dengan terintegrasinya dan terekspresinya gen yang diintroduksi, dan tetap terpelihara dalam seluruh proses pembelahan sel sampai regenerasi tanaman. Selain itu, gen tetap terpelihara pada regenerasi sel, jaringan, tanaman selanjutnya. Berdasarkan latar belakang tersebut maka dilakukan penelitian tentang stabilitas transgen pada kalus transforman hasil transformasi genetik dengan perantara *Ag. tumefaciens* yang mengalami subkultur berulang-ulang.

I.2 Perumusan Masalah

Perakitan tanaman/sel/jaringan *A. paniculata* yang mengandung andrografolid dengan kandungan yang lebih tinggi dari tanaman *in vivo* melalui rekayasa genetik dapat menjadi salah satu pendekatan potensial untuk mengatasi masalah masih lebih rendahnya kandungan andrografolid pada kultur *in vitro*. Hal ini dapat ditempuh dengan cara mengintroduksi gen yang bertanggung jawab dalam *over expressi* andrografolid. Sebelum disisipkan gen yang diinginkan untuk peningkatan andrografolid, maka perlu dilakukan studi terhadap kestabilan ekspresi gen yang disisipkan (transgen), dalam hal ini gen pelapor dan penanda yang digunakan, pada kultur kalus transforman yang disubkultur berulang-ulang sebagai bagian *establishment* transformasi genetik pada *A. paniculata*.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

II.1 *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wallich ex Nees

Andrographis paniculata (Burm.f.) Wallich ex Nees atau sambiloto merupakan tanaman yang banyak digunakan sebagai obat tradisional. Tanaman ini berasal dari India yang kemudian diintroduksi dan dibudidayakan sebagai tanaman obat di berbagai negara Asia, seperti Srilangka, Cina, Thailand, Malaysia, Indonesia dan Filipina hingga Australia dan Eropa.

Klasifikasi sambiloto berdasarkan Cronquist (1981) :

- Kingdom : Plantae
- Divisi : Magnoliophyta
- Kelas : Magnoliopsida
- Subkelas : Asteridae
- Bangsa : Scrophulariales
- Suku : Acanthaceae
- Marga : *Andrographis*
- Jenis : *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wallich ex Nees



Gambar 1. Morfologi tanaman *Andrographis paniculata*.

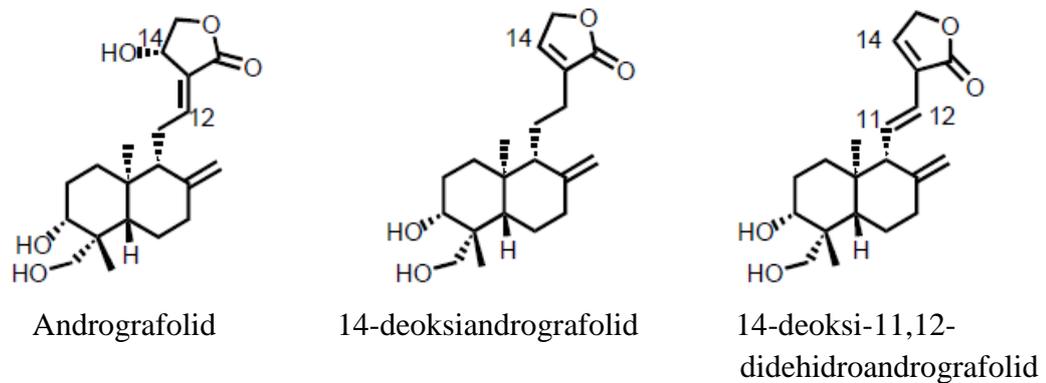
Sambiloto (Gambar 1) adalah tumbuhan semusim yang termasuk dalam suku Acanthaceae. Sambiloto terdistribusi secara luas pada Asia tenggara, India, Sri Lanka, Pakistan, Malaysia dan Indonesia serta telah dibudidayakan secara intensif di India, Cina dan Thailand. Sambiloto dapat tumbuh baik pada daerah yang memiliki curah hujan 2.000-3.000 mm/tahun, dengan kelembaban udara 78% - 87%. Sambiloto memiliki bunga yang berwarna putih dengan bercak ungu pada mahkotanya. Batang sambiloto berwarna hijau gelap dengan diameter 2-6 mm dan tinggi sepanjang 0,3 - 1,0 m (Pujiasmanto *et al.*, 2007; Jarukamjorn dan Nemoto, 2008).

II.2 Kandungan Kimia dan Manfaat *Andrographis paniculata*

Komponen kimia utama *A. paniculata* yang memberikan efek farmakologi adalah andrografolid. Andrografolid merupakan metabolit sekunder yang memiliki rasa pahit dan tampilannya berupa kristal tidak berwarna, dan disebut "diterpene lactone". Zat kimia lainnya yang memberikan efek farmakologi dan memiliki rasa yang pahit, yaitu *deoxyandrographolide*, *-19 β -D-glucoside*, dan *neo-andrographolide*, yang keseluruhannya terkandung di dalam daun. Selain itu, terdapat komponen aktif lainnya yaitu *14-deoxy -11, 12-didehydroandrographolide* (andrografolid D), *homoandrographolide*, *andrographan*, *andrographon*, *andrographosterin*, dan stigmasterol (Jarukamjorn dan Nemoto, 2008).

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). Dalam Kumar *et al.* (2004) dilaporkan tentang tiga senyawa diterpen yang berhasil diisolasi, yaitu andrografolid, 14-deoksiandrografolid dan 14-deoksi-11,12-didehydroandrografolid (Gambar 2), yang menunjukkan aktivitas imunomodulatori dan antikanker terhadap sel-sel manusia. Andrografolid yang telah dipurifikasi menunjukkan aktivitas antikanker, sedangkan kedua senyawa lainnya secara sinergis menunjukkan aktivitas imunomodulatori. Selain itu, studi farmakologis lainnya mengindikasikan bahwa andrografolid yang diisolasi

melindungi fungsi hati dan kantung empedu, dan diketahui lebih aktif dari *Silymann*-obat hepatoprotektif (Niranjan *et al.*, 2010).



Gambar 2. Struktur senyawa yang diisolasi dari ekstrak diklorometan *Andrographis paniculata* (Kumar *et al.*, 2008).

II.3 Modifikasi Genetik Tanaman untuk Peningkatan Metabolit Sekunder

Teknologi rekombinan DNA memungkinkan untuk mengisolasi, mengidentifikasi dan memodifikasi suatu fragmen dari material genetik (DNA). Teknik ini dikembangkan pada awal 1970an dan selanjutnya diikuti dengan perkembangan teknik transfer gen yang memberikan kesempatan untuk menyisipkan gen asing ke dalam genom tanaman (Twyman *et al.*, 2002).

Modifikasi genetik pada tanaman dilakukan untuk berbagai tujuan seperti peningkatan ketahanan melawan hama atau penyakit, meningkatkan hasil dan kualitas tanaman. Aplikasi teknik ini dalam peningkatan kualitas dan kuantitas metabolit sekunder dilakukan dengan beberapa pendekatan yaitu mengurangi jalur kompetitif, mengurangi katabolisme dan overekspresi gen regulatori. Seperti misalnya metabolit sekunder skopolamin yang merupakan tropan alkaloid, dihasilkan pada sel-sel akar muda dan disintesis dari hyoscyamin melalui katalisis oleh enzim *hyoscyamine-6 β -hydroxylase* (H6H). Enzim H6H tersebut dikode oleh gen *h6h*. Yun *et al.* (1992) melakukan penelitian dengan mengintroduksi gen *h6h* tersebut ke *Atropa belladonna* dengan transformasi menggunakan perantara *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 dengan vektor ganda pPHY8 dan pGA482. Tanaman transgenik hasil transformasi menunjukkan overekspresi transgen yang

disisipkan, yang mana kandungan alkaloid pada daun dan batang paling banyak adalah skopolamin.

Pada saat menginfeksi, *Ag. tumefaciens* memindahkan segmen tertentu dari DNA plasmidnya ke genom tanaman. DNA yang disisipkan terintegrasi stabil pada kromosom tanaman sehingga mengubah susunan genetik tanaman dan diturunkan ke sel anak sebagai bagian integral dari kromosom. Transkripsi DNA plasmid yang terintegrasi pada tanaman mengakibatkan terjadinya proliferasi sel-sel pada daerah yang diinfeksi (tumor) sehingga terjadi pembengkakan jaringan yang disebut penyakit *crown gall*. Kemampuan alami *Ag. tumefaciens* untuk memindahkan materi genetik ke sel eukariot, menjadi dasar dari berbagai teknologi transfer gen ke dalam tanaman (Neumann *et al.*, 2009).

BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Tujuan penelitian ini adalah menganalisis stabilitas transgen pada kultur kalus *Andrographis paniculata* hasil transformasi genetik dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens* pada beberapa periode subkultur. Manfaat analisis stabilitas transgen ini sangat penting sebagai landasan dalam pengembangan teknologi transformasi genetik sebagai pendekatan untuk peningkatan kualitas dan kuantitas metabolit sekunder.

BAB IV. METODE PENELITIAN

Bagian tanaman *A. paniculata* yang digunakan sebagai eksplan induksi kalus dan transformasi adalah daun ke 2 s/d 4 di bawah pucuk, dari tanaman yang berumur 2-3 bulan, yaitu saat aktif tumbuh dan belum terjadi pembungaan. Bahan yang digunakan untuk transformasi adalah *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 yang membawa vektor ganda pCAMBIA1304 dengan gen penanda *hpt*, gen pelapor *gusA* dan mGFP.

IV.1 Prosedur Transformasi Genetik pada Jaringan *A. paniculata*

Transformasi genetik pada jaringan *A. paniculata* meliputi beberapa tahapan : tahap persiapan, transformasi, ko-kultivasi, seleksi dan regenerasi.

Tahap Persiapan

Tahap persiapan yang dilakukan berupa prekultur potongan daun dan aktivasi suspensi bakteri. Prekultur daun *A. paniculata* dilakukan dengan menanamkan potongan daun steril pada media MS+0,1 μ M BAP+0,5 μ M 2,4 D selama 5 hari. Potongan daun tersebut kemudian digunakan untuk tahap transformasi genetik. Aktivasi bakteri dilakukan dengan cara menginokulasi satu ose koloni bakteri *Ag. tumefaciens* pada media LB+25 mg/L rifampisin+50 g/L kanamisin sebanyak 50 ml, lalu diinkubasi pada suhu ruang dengan agitasi 150 rpm selama 24 jam atau sampai bakteri memiliki kerapatan 10^7 sel bakteri/ml setara dengan OD₆₀₀=0,8. Suspensi bakteri ini dimasukkan ke dalam tabung falcon dan disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit. Supernatan dari hasil sentrifugasi dibuang dan pellet bakteri dilarutkan dengan ½ MS cair, setelah itu suspensi bakteri tadi dilarutkan kembali dengan ½ MS cair, dengan perbandingan volume 1:3. Suspensi ini digunakan untuk infeksi *Ag. tumefaciens* pada eksplan pada tahap transformasi.

Tahap Transformasi

Tahap transformasi dilakukan dengan metode perendaman dilakukan dengan merendam eksplan daun pada suspensi bakteri dan ½ MS cair dengan agitasi 100 rpm selama 60 menit dengan dua cara yaitu tanpa *acetosyringone* dan dengan penambahan 100 μ M *acetosyringone*.

Tahap Ko-kultivasi

Setelah tahap transformasi, eksplan daun ditempatkan pada media ko-kultivasi yaitu MS+0,1 μ M BAP+0,5 μ M 2,4 D. Untuk transformasi dengan penambahan *acetosyringone* jaringan ditempatkan pada media MS+0,1 μ M BAP+0,5 μ M 2,4 D dengan penambahan 100 μ M *acetosyringone*. Ko-kultivasi dilakukan selama 3 hari pada suhu ruang dalam kondisi gelap.

IV.2 Tahap Seleksi Kalus Transforman Putatif

Tahap seleksi ini dilakukan sebagai tahap pengujian ekspresi gen *hpt* (resisten higromisin). Setelah disinfeksi, jaringan dipindahkan ke medium seleksi dengan penambahan 20 mg/L higromisin. Subkultur dilakukan setiap tiga minggu pada medium yang sama.

IV.3 Uji GUS Hasil Transformasi pada Jaringan *A. paniculata*

Uji GUS dilakukan setelah eksplan daun melalui tahap ko-kultivasi selama 3 hari. Uji GUS dilakukan dengan menggunakan campuran x-gluc + potongan jaringan yang sudah diko-kultivasi. Campuran x-gluc dibuat berdasarkan metode Kertbundit *et al* (1991).

IV.4 Tahap Analisis Integrasi T-DNA

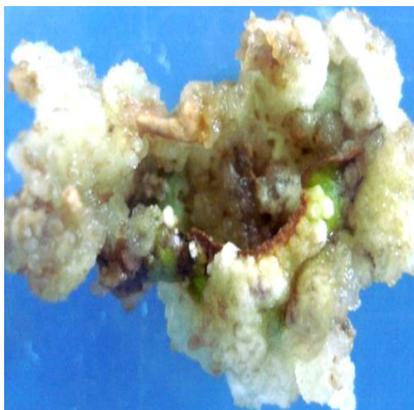
Integrasi T-DNA ke dalam genom *A. paniculata* dikonfirmasi dengan analisis *polymerase chain reaction* (PCR). PCR dilakukan dengan menggunakan primer spesifik gen *gusA* dan mengamplifikasi fragmen internal gen *gusA* dengan panjang 976 pb. Tahap pertama yang dilakukan adalah mengisolasi DNA kalus *A. paniculata* dengan metode CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*) menurut Doyle dan Doyle (1990) yang dimodifikasi oleh Lodhi *et al.* (1994). Analisis DNA dilakukan secara kuantitatif dan kualitatif. Integrasi transgen dalam jaringan tanaman dianalisis dengan PCR menggunakan primer spesifik *gusA*. Produk PCR dielektroforesis pada 1 % gel agarosa. Hasil elektroforesis diamati dan didokumentasi di atas UV transluminator. Ukuran fragmen DNA sampel yang positif terintegrasi apabila sesuai dengan kontrol positif pCAMBIA1304.

BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

V.1 Transformasi dan Seleksi

Respons eksplan potongan daun hasil transformasi mulai terlihat setelah 1 minggu pada medium seleksi yang mengandung 20 mg/L higromisin. Pada umumnya, potongan daun mengalami pencokelatan terutama bagian yang bersentuhan langsung dengan medium. Hal ini diduga akibat cekaman yang ditimbulkan oleh kehadiran higromisin. Beberapa eksplan yang mampu membentuk kalus pada medium seleksi tersebut menunjukkan bahwa eksplan tersebut resisten terhadap higromisin.

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. Kalus yang terbentuk dan dapat bertahan hidup pada medium seleksi adalah kalus transforman putatif (Gambar 3). Kalus transforman putatif menunjukkan tekstur kompak dan berwarna putih hingga putih kekuningan (krem). Persentase keberhasilan jaringan yang berdediferensiasi membentuk kalus pada medium seleksi mencapai 64,44 %.

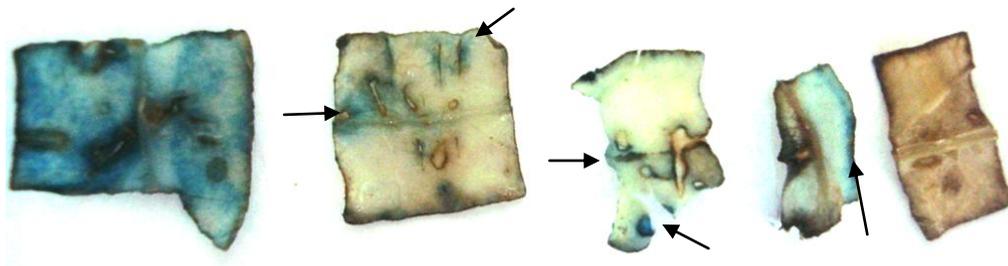


Gambar 3. Kalus transforman putatif tiga minggu di medium seleksi.

V.2 Ekspresi GUS pada Jaringan Transforman Putatif

Deteksi adanya β -glukuronidase (GUS) digunakan untuk mengetahui terjadinya transformasi baik transien maupun stabil (Serres dkk., 1997). 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 (Gambar 4).

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 dkk., 1990 dalam Hiei dkk., 1994).

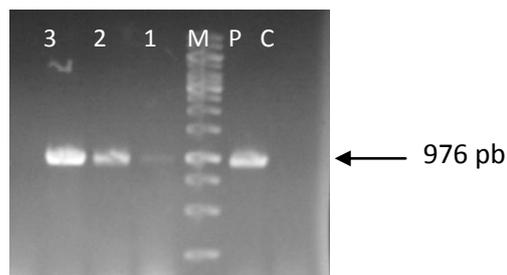


Gambar 4. Hasil uji GUS.

V. 3 Analisis Integrasi T-DNA ke Dalam Genom *Andrographis paniculata* dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Isolasi DNA dan uji insersi dengan PCR dilakukan untuk mengecek keberhasilan penyisipan gen target sebagai konfirmasi hasil seleksi antibiotik. Hasil konfirmasi integrasi T-DNA dengan teknik PCR menggunakan sepasang primer spesifik untuk gen *gusA* menunjukkan munculnya larik DNA dengan panjang 976 pb (gen *gusA*) secara spesifik pada *line* sampel kalus *A. paniculata* transforman putatif. Larik DNA dengan panjang yang sama (976 pb) muncul pada *line* kontrol positif

pCAMBIA1304 tetapi tidak muncul pada kalus nontransforman hasil seleksi pada subkultur ke-5 (Gambar 5). Hal ini membuktikan bahwa T-DNA dari *Ag. tumefaciens* telah terintegrasi pada genom kalus transforman *A. paniculata*. DNA yang diamplifikasi adalah DNA genom dari sampel kalus hasil seleksi pada subkultur 1-5 sehingga gen *gusA* (bagian dari T-DNA) yang diamplifikasi dalam PCR berasal dari T-DNA yang telah terintegrasi ke dalam genom sel tanaman, bukan T-DNA yang berada dalam sitoplasma. Menurut hasil penelitian Yusibov dkk. (1994), bahwa T-DNA dapat dideteksi dalam sitoplasma sel tanaman setelah 30 menit ko-kultivasi dan berdasarkan hasil analisis PCR terjadi penurunan T-DNA setelah dua jam waktu ko-kultivasi yang disebabkan degradasi T-DNA di sitoplasma atau T-DNA tersebut telah ditransport ke nukleus dan berintegrasi dengan genom sel tanaman.



Gambar 5. Elektroferogram hasil konfirmasi PCR dengan menggunakan pasangan primer *gusA*. Analisis untuk konfirmasi integrasi T-DNA pada kalus transforman putatif yang resisten higromisin menunjukkan amplikon 976 pb fragmen gen *gusA*; M (*molecular weight marker*), C (kalus non transforman-kontrol negatif), P (kontrol positif-pCAMBIA1304), dan line 1-3, kalus transforman putatif subkultur 5.

Analisis PCR pada sampel DNA genom kalus transforman hasil seleksi pada periode subkultur 1 - 5 menunjukkan hasil yang positif dengan menghasilkan larik hasil amplifikasi berukuran 976 pb sama dengan kontrol positif pCAMBIA1304. Hal ini memperkuat bukti bahwa gen *gusA* yang terdapat dalam konstruk T-DNA pCAMBIA1304 telah tersisipkan ke dalam genom *A. paniculata* secara stabil selama lima periode subkultur. Stabilitasnya keberadaan gen *gusA* dalam genom *A. paniculata* pada lima periode subkultur membuktikan bahwa gen yang diintroduksi telah diwariskan pada regenerasi sel selanjutnya. Transgen dapat tetap terjaga melalui siklus pembelahan sel dan dediferensiasi pada sel-sel

tanaman, karena telah terintegrasi pada genom sel tanaman (Li dkk., 2007). Nandakumar dkk. (2007) melaporkan hal yang sama pada tanaman *Juncus accuminatus* yaitu analisis PCR yang positif untuk gen *gusA* pada generasi pertama membuktikan bahwa gen yang diintroduksi telah diwariskan pada generasi selanjutnya.

Analisis molekuler dengan penggunaan PCR memberikan jaminan atas keberhasilan integrasi DNA baru ke dalam genom tanaman karena metode ini dapat meyakinkan bahwa jaringan tanaman telah mengalami transformasi genetik. Sampel kalus *A. paniculata* yang digunakan untuk isolasi DNA ditumbuhkan dalam keadaan steril, sehingga dijamin tidak ada kontaminasi bakteri *Ag. tumefaciens* sebagai vektor transformasi dalam sampel DNA hasil isolasi yang digunakan untuk PCR. Analisis molekuler tanaman hasil transformasi dengan teknik PCR juga dilakukan untuk mengetahui integrasi transgen pada genom tanaman pada penelitian transformasi kedelai dengan gen *proteinase inhibitor II (pinII)* melalui *Ag. tumefaciens* LBA4404 (Pardal dkk., 2004). Ge dkk. (2006) juga melaporkan hasil analisis molekuler dengan PCR dengan menggunakan primer spesifik gen *gusA* pada transformasi tanaman *Zoysia japonica* untuk mengetahui integrasi stabil transgen tersebut dalam genom tanaman.

Keberhasilan transformasi genetik tanaman tidak hanya membutuhkan teknik yang dapat menyisipkan DNA yang fungsional ke dalam sel tetapi juga menghasilkan sel/jaringan berlipat ganda dan terekspresinya transgen yang disisipkan secara stabil pada regenerasi sel/jaringan. Pewarisan transgen yang stabil dan ekspresi yang konsisten merupakan parameter yang penting untuk keberhasilan transformasi genetik. Transformasi genetik pada tanaman dengan perantara *Ag. tumefaciens* merupakan metode yang memiliki beberapa keuntungan dibandingkan metode transfer DNA secara langsung. Zhang dkk. (2005) melaporkan hasil penelitian tentang pewarisan dan stabilitas transgen *acetolactate synthase (als)* dalam tanaman transgenik jagung yang dihasilkan dengan menggunakan metode transformasi yang berbeda yaitu *particle bombardment* dan transformasi dengan perantara *Agrobacterium*. Analisis dilakukan pada tiga generasi dengan menggunakan PCR dan skrining menggunakan herbisida,

dilaporkan bahwa teknik transformasi yang dengan perantara *Agrobacterium* dapat menghasilkan proporsi kestabilan yang lebih besar, jumlah kopi yang sedikit (umumnya 1-2), memudahkan mendapatkan keturunan mengandung transgen secara stabil dan menghasilkan sel/jaringan/tanaman transgenik yang diinginkan dalam jumlah yang banyak, sedangkan transformasi dengan metode *particle bombardment* cenderung menghasilkan lebih banyak jumlah kopi dan sisi penyisipan transgen dalam genom tanaman.

BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN

VI.1 Kesimpulan

1. Jaringan *Andrographis paniculata* berhasil berdediferensiasi membentuk kalus pada medium seleksi dan bertahan di medium seleksi selama lima periode subkultur.
2. Transgen (gen *gusA*) berhasil terintegrasi ke dalam genom *A. paniculata* secara stabil selama lima periode subkultur.

VI.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai konstruk gen yang dapat meningkatkan kandungan andrografolid pada *A. paniculata*.

DAFTAR PUSTAKA

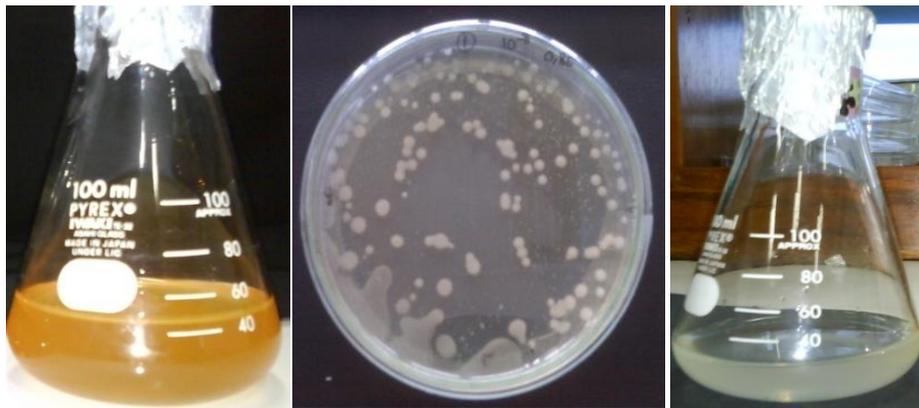
- Bhan, M.K., Dhar, A.K., Khan, S., Lattoo, S.K., Gupta, K.K., dan Choudhary, D.K. (2006) : Screening and Optimization of *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees for Total Andrographolide Content, Yield and Its Components, *Scientia Horticulturae*, **107**, 386–391.
- Burgos, R.A., Hancke, J.L., Bertoglio, J.C., Aguirre., A., Arriagada, S., Calvo, M., dan Caceres, D.D. (2009) : Efficacy of An *Andrographis paniculata* Composition for the Relief of Rheumatoid Arthritis Symptoms: A Prospective Randomized Placebo-controlled Trial, *Clinical Rheumatology*, **28**, 931-946.

- Cronquist, A. (1981) : *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*, Columbia University Press, New York.
- Gelvin, S. B. (2003) : *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: The Biology behind The "Gene-Jockeying" Tool, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**(1), 16-37.
- Jarukamjorn, K., dan Nemoto, N. (2008) : Pharmacological Aspects of *Andrographis paniculata* on Health and Its Major Diterpenoid Constituent Andrographolide, *Journal of Health Science*, **54**(4), 370-381.
- Jouhikainen, K., Lindgren, L., Jokelainen, T., Hiltunen, R., Teeri, T.H., dan Oksman-Caldentey, KM. (1999) : Enhancement of Scopolamine Production in *Hyoscyamus muticus* L. Hairy Root Cultures by Genetic Engineering, *Planta*, **208**, 545-551.
- Kertbundit, S., De Greeve, H., Deboeck, F., Montagu, M.V. dan 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 R.A., Sridevi, K., Kumar, N.V., Nanduri, S., dan Rajagopal, S. (2004) : Anticancer and Immunostimulatory Compounds from *Andrographis paniculata*, *Journal Ethanopharmacol*, **92**, 291–295.
- Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C., dan Citovsky, V. (2001) : Genetic Transformation of HeLa Cells by *Agrobacterium*, *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **98**(4), 1871-1876.
- Lodhi, M.A., Ye., G.N., Weeden, N.F., dan Reisch, B.I. (1994) : A Simple and Efficient Method for DNA Extraction from Grapevine Cultivars and *Vitis* Species, *Plant Molecular Biology Reporter*, **12**(1), 6-13.
- Marwani, E., Astriati, N., Munfarida, I., dan Kadar, V.R. (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*.
- Neumann, K.H., Kumar, A., dan Imani, J. (2009) : *Plant Cell and Tissue Culture- A Tool in Biotechnology*, 249p, Springer-Verlag, Berlin.
- Niranjan, A., Tewari, S.K., dan Lehri, A. (2010) : Biological Activities of *Kalmegh* (*Andrographis paniculata* Nees) and Its Active Principles - A Review, *Indian Journal of Natural Products and Resources*, **1**, 125-135.

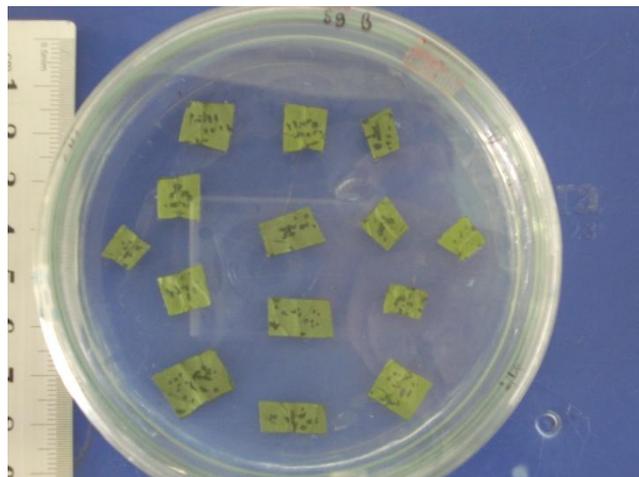
- Praveen, N., Manohar, S.H., Naik, P.M., Nayeem, A., Jeong, J.H., dan Murthy, H.N. (2009) : Production of Andrographolide from Adventitious Root Cultures of *Andrographis paniculata*, *Current Science*, **96**(5), 694-697.
- Pujiasmanto, B., Moenidar, J., Syamsulbahri dan Kuswanto. (2007) : Kajian Agroekologi dan Morfologi Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness.) Pada Berbagai Habitat, *Biodiversitas*, **8**(4), 326-329.
- Siripong, P., Kongkathip, B., Preechanukool, K., Picha, P., Tunsuwan, K., dan Taylor, W.C. (1992) : Cytotoxic Diterpenoid Constituents from *Andrographis paniculata* Nees Leaves, *Journal of Science in Society*, **18**, 187-194.
- Tripathi, L., Tripathi J.N., dan Hughes, J. d'A. (2005) : *Agrobacterium*-mediated Transformation of Plantain (*Musa* spp.) Cultivar Agbagba, *African Journal of Biotechnology*, **4**(12), 1378-1383.
- Twyman, R.M., Christou, P., dan Stoger, E. (2002) : Genetic Transformation of Plants and Their Cells, 126-157 *dalam* Oksman-Caldentey, K.M., dan Barz, W.H., Eds, *Plant Biotechnology and Transgenic Plants*, 694p, Marcel Dekker Inc, New York.
- Winarto, W. P. (2003) : *Sambiloto: Budidaya dan Pemanfaatan Untuk Obat*, 71 p, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Yun, DJ., Hashimoto, T., dan Yamada, Y. (1992) : Metabolic Engineering of Medicinal Plants: Transgenic *Atropa belladonna* with an Improved Alkaloid Composition (scopolamine/hyoscyamine-6 β -hydroxylase), *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **89**, 11799-11803.
- Yusron, M., Januwati, M., dan Pribadi, E.R. (2005) : Budidaya Tanaman Sambiloto. *Sirkuler Balitro*, **11**, 1-5.
- Zhao, J., Yang, G., Liu, H., Wang, D., Song, X., dan Chen, Y. (2002) : Determination of Andrographolide, Deoxyandrographolide and Neoandrographolide in the Chinese Herb *Andrographis paniculata* by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, *Phytochemical Analysis*, **13**, 222-227.

LAMPIRAN

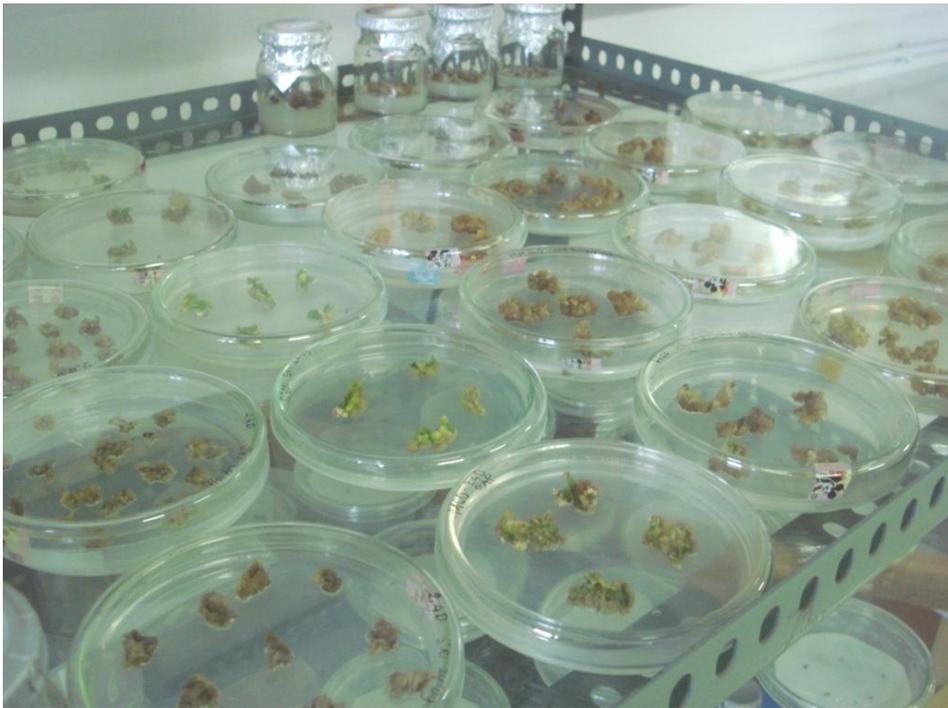
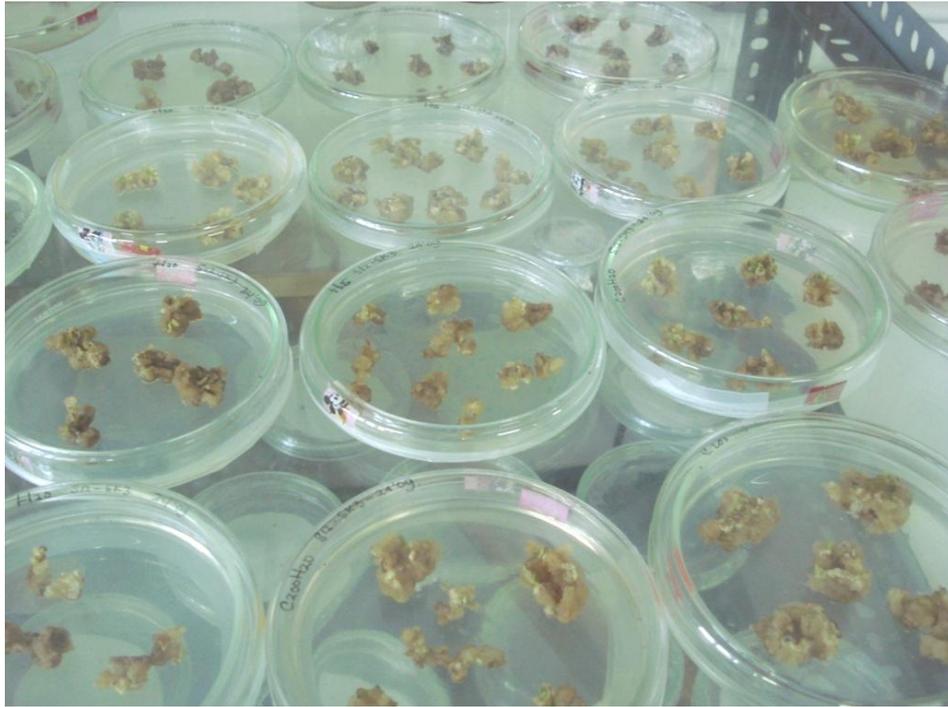
1. Foto-foto Penelitian



Bahan Tanaman dan Kultur Bakteri yang digunakan



Prakultur Eksplan



Kultur Kalus Transforman *Andrographis paniculata*

2. Biodata Peneliti

BIODATA KETUA PENELITI

1. Identitas

- a. Nama Lengkap : Agustina Monalisa Tangapo, S.Si., M.Si.
b. Tempat/Tanggal Lahir : Poso, 2 Agustus 1983
c. Jenis Kelamin : Perempuan
d. NIP : 19830802 200604 2 004
e. Pangkat/Golongan : Penata Muda/IIIa
f. Pusat Penelitian : Universitas Sam Ratulangi
g. Alamat : Jl. Kampus Kleak, Manado, 95115
h. Telepon/Faks : 0431-827932
i. Alamat Rumah : Jl. W.Z. Yohanes, Lingk. V, Bumi Nyiur,
Kec. Wanea, Manado, 95119
j. Telepon : 08124417209
k. Email : iin_truly@yahoo.co.id

2. Pendidikan

No.	Pendidikan	Tempat	Tahun Selesai	Bidang
1	SD : Kr. GKST I Poso	Kab.Poso-Sulteng	1995	-
2	SMP : Negeri I Poso	Kab.Poso-Sulteng	1998	-
3	SMUN 2 Manado	Manado	2001	IPA
4	Sarjana (S1)	Universitas Sam Ratulangi	2005	Biologi
5	Pascasarjana (S2)	Institut Teknologi Bandung	2011	Biologi (Biologi Sel dan Molekul)

3. Pengalaman Penelitian

No.	Judul Penelitian	Tahun
1.	Efektivitas Antibakteri Ekstrak Tumbuhan Daun Sendok (<i>Plantago major</i>) Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	2004
2.	Studi Awal Transformasi Genetik <i>Andrographis paniculata</i> (Burm.f.) Wallich ex Nees. dengan Perantara <i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain LBA4404	2010

4. Publikasi Ilmiah

No.	Judul	Nama Jurnal	Keterangan
1.	Efektivitas Antibakteri Ekstrak Tumbuhan Daun Sendok (<i>Plantago major</i>) Terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	<i>Eugenia</i> , Tahun 2006.	Penulis Anggota
2	Transformasi dan ekspresi transien gen pelapor <i>gusA</i> pada <i>Andrographis paniculata</i> (Burm.f.) Wallich ex Ness (<i>in progress</i>).	Jurnal Bios Logos, Tahun 2012	Penulis Utama

Manado, 12 September 2012
Peneliti Utama,

Agustina Monalisa Tangapo, S.Si., M.Si.
NIP. 19830802 200604 2 004

BIODATA PENELITI ANGGOTA

1. Identitas

- a. Nama Lengkap : Pience Veralyn Maabuat, S.Si., M.Si.
b. Tempat/Tanggal Lahir : Manado, 8 Februari 1980
c. Jenis Kelamin : Perempuan
d. NIP : 19800208 200701 2 002
e. Pangkat/Golongan : Penata Muda/IIIa
f. Pusat Penelitian : Universitas Sam Ratulangi
g. Alamat : Jl. Kampus Kleak, Manado, 95115
h. Telepon/Faks : 0431-827932
i. Alamat Rumah : Bukit Doa Meras, Kec. Bunaken, Manado
j. Telepon : 08124434845
k. Email : thealyn@yahoo.co.id

2. Pendidikan

No	Tingkat	Pendidikan	Jurusan	Tahun	Tempat
1	SD	SD Negeri 53 Manado		1992	Manado
2	SLTP	SMP Kristen Eben Haezar 02		1995	Manado
3	SMU	SMU Negeri 2 Manado	IPA	1998	Manado
4	Sarjana	Fakultas MIPA Unsrat	Biologi	2005	Manado
5	Pascasarjana	UNSRAT	Agronomi	2011	Manado

3. Penelitian dan Pengabdian

No	Judul Penelitian	Tahun	Posisi Peneliti	Pemberi Dana
1	Sumberdaya Padang Lamun di Pulau Kemujang dan sekitarnya	2009	Anggota	Ditjen Dikti
2	Distribusi dan kelimpahan padang lamun di Pantai Molas, Kecamatan Bunaken	2009	Anggota	Sendiri
3	Penyuluhan Demam Berdarah di Kelurahan Meras	2011	Ketua	Dikti

Manado, 12 September 2012
Peneliti Anggota,

Pience Veralyn Maabuat, S.Si., M.Si.
NIP. 19800208 200701 2 002