



## Transformasi Genetik pada Kalus Embriogenik Tanaman Suku Rubiaceae Genetic Transformation in Embryogenic Callus of Rubiaceae

Mega Silvia Budaya<sup>1</sup>, Exsyupransia Mursyanti<sup>1\*</sup>, Pramana Yuda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Prodi Biologi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta*

*Jl. Babarsari No.44, Daerah Istimewa Yogyakarta, Indonesia 55281*

*Email: e.mursyanti@uajy.ac.id*

*\*Penulis Korespondensi*

### Abstract

The Rubiaceae family plants have an essential role in society, especially in health. Conventional propagation can produce new plants but takes a long time. Therefore, an efficient propagation method is needed to avoid overexploitation in nature. Embryogenic callus induction of Rubiaceae plants can be done using a combination of TDZ, 2,4-D, and NAA. Then it can be inoculated into a medium containing 6-BA and NAA to induce shoot formation. This method can be usefully applied to several aspects of biotechnology, including micropropagation and genetic transformation. Many factors influence the success of the transformation, and two of the most influential factors are the concentration of acetosyringone and *Agrobacterium tumefaciens* mediator strain. The optimal concentration of acetosyringone is 50 mg/L, producing the highest transformation efficiency percentage (%ET) when used with supervirulent strains such as *A. tumefaciens* EHA101. This literature review discusses the effect of acetosyringone at various concentrations and types of *A. tumefaciens* strains on the transformation efficiency of gen to Rubiaceae.

**Keywords:** Rubiaceae, embryogenic callus, acetosyringone, *Agrobacterium tumefaciens*, transformation efficiency

### Abstrak

Tanaman dari suku Rubiaceae memiliki peran yang penting dalam masyarakat, terutama di bidang kesehatan. Propagasi konvensional dapat menghasilkan tanaman baru namun membutuhkan waktu yang lama, sehingga diperlukan metode perbanyakan yang efisien agar tidak terjadi overeksplorasi di alam. Induksi kalus embriogenik tanaman Rubiaceae dapat dilakukan dengan menggunakan kombinasi *Thidiazuron* (TDZ), Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan *1-Naphthylacetic acid* (NAA), selanjutnya disubkultur ke medium yang mengandung 6-Benzilaminopurin (6-BA) dan NAA untuk diferensiasi membentuk tunas. Tahapan ini dapat dimanfaatkan untuk kepentingan beberapa aspek bioteknologi, termasuk diantaranya adalah mikropropagasi dan transformasi genetik. Keberhasilan transformasi genetik dipengaruhi oleh banyak faktor dimana dua faktor yang paling berpengaruh adalah konsentrasi asetosiringon dan strain *Agrobacterium tumefaciens* yang digunakan sebagai perantara transformasi genetik. Asetosiringon adalah senyawa pengaktivasi gen *vir* untuk transfer DNA ke sel tanaman. Konsentrasi asetosiringon yang paling optimal diketahui adalah 50 mg/L karena mampu menghasilkan persentase efisiensi transformasi tertinggi saat digunakan bersamaan dengan strain supervirulen seperti *A. tumefaciens* EHA101. *Literature review* ini membahas pengaruh asetosiringon pada berbagai konsentrasi dan jenis strain *A. tumefaciens* terhadap efisiensi transformasi gen ke kalus embriogenik tanaman suku Rubiaceae.

**Kata kunci:** Rubiaceae, kalus embriogenik, asetosiringon, *Agrobacterium tumefaciens*, efisiensi transformasi

Diterima: 7 Februari 2022, disetujui: 29 April 2022

## Pendahuluan

Suku Rubiaceae mencakup sejumlah besar spesies dan sebagian besar tumbuh di daerah tropis (Mabberly, 1997). Tanaman dari suku ini memiliki ciri-ciri berupa daun tunggal, kedudukan daun berhadapan atau berseling, memilik *connate* stipula pada daun yang berhadapan, dan tipe buah berupa beri, kapsul, drupe atau schizocarp (Simpson, 2010). Tanaman Rubiaceae diketahui mampu menghasilkan berbagai macam senyawa bioaktif seperti antrakuinon, iridoid, indol alkaloid, terpenoid, flavonoid dan derivatif fenolik lainnya (Atmaja et al., 2015). Oleh karena itu, tanaman Rubiaceae mempunyai potensi farmakologis yang tinggi dan dapat dimanfaatkan sebagai marker kemotaksonomik (Barreiro, 1990; Farias, 2006; dalam Martins dan Nunez, 2015). Jenis tanaman Rubiaceae yang memiliki nilai tinggi dalam kehidupan masyarakat adalah kopi arabika (*Coffea arabica*), mengkudu (*Morinda citrifolia*), dan kina (*Chincona succirubra*) (Marusin et al., 2013).

Oleh karena manfaat dari suku Rubiaceae sangat besar dibidang kesehatan, maka perlu dilakukan propagasi untuk memudahkan peningkatan ketersediaan bahan baku. Propagasi secara tradisional dapat menghasilkan tanaman baru namun membutuhkan waktu yang lama dan hanya sedikit tanaman yang dihasilkan sehingga dinilai tidak efektif (Košir et al., 2004). Tanaman yang dihasilkan melalui kultur *in vitro* mampu meningkatkan hasil panen hingga 20,4% lebih banyak dibanding tanaman hasil perbanyakan tradisional (Robinson et al., 1993). Penggunaan teknik *terminal cutting* sebagai salah satu contoh propagasi konvensional tanaman Rubiaceae juga diketahui dapat menyebabkan terjadinya penurunan laju multiplikasi (Gaber & Barakat et al., 2019). Kendala di atas dapat diatasi dengan propagasi *in vitro* yang mampu menghasilkan tanaman dalam jumlah yang banyak dengan waktu yang singkat.

Tersedianya protokol transformasi genetik yang efisien dapat dimanfaatkan untuk mempelajari fungsi gen dan menghasilkan tanaman transforman dengan karakteristik yang diinginkan, seperti tanaman tahan stress biotik maupun abiotik (Li et al., 2019a). Metode transformasi genetik yang umumnya

digunakan adalah metode rekayasa genetik menggunakan perantara *Agrobacterium tumefaciens* (Giri et al., 2004). *A. tumefaciens* adalah bakteri tanah yang mampu membentuk tumor pada bagian luka tanaman. Hal ini dikarenakan kemampuannya memasukkan T-DNA pembawa gen tumor dari plasmid Ti (*tumor-inducing plasmid*) ke dalam genom sel tanaman (De La Riva et al., 1998). Keunggulan transformasi genetik dengan perantara *A. tumefaciens* adalah sistem transformasi sel tunggal, jumlah kopi transgen yang digunakan relatif sedikit, dan salinan gen yang terintegrasi kedalam genom sel tanaman umumnya berjumlah satu sehingga mampu meminimalisir masalah ko-supresi dan instabilitas (Hansen et al., 1997).

Proses transformasi genetik menggunakan *A. tumefaciens* dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti jenis dan daya tumbuh strain *Agrobacterium*, lama waktu prekultur dan infeksi, serta senyawa yang mengaktifkan gen *vir* untuk virulensi yang terdapat pada *Agrobacterium* (Qianru et al., 2017). Gen *vir* (*virulence*) berfungsi sebagai mediator transfer T-DNA dari *Agrobacterium* ke sel tanaman. Aktivitas gen *vir* secara alami diinduksi oleh berbagai senyawa fenolik yang dikeluarkan oleh sel tanaman yang terluka. Secara *in vitro*, proses induksi dapat dilakukan dengan cara melakukan kokultivasi bagian tanaman dengan *Agrobacterium* pada medium yang mengandung asetosiringon (Stachel & Nester, 1986).

Asetosiringon merupakan senyawa penginduksi yang umum digunakan untuk mengaktifkan gen *vir* pada *Agrobacterium* (Qianru et al., 2017). Senyawa ini juga telah digunakan untuk berbagai macam tanaman monokotil maupun dikotil dengan tujuan untuk meningkatkan efisiensi transformasi (Frame et al., 2002; Kant et al., 2007; Olhoft et al., 2003). Asetosiringon dalam konsentrasi yang rendah akan berfungsi sebagai *chemoattractant* bagi strain pembawa plasmid Ti, sedangkan pada konsentrasi yang lebih tinggi akan menyebabkan *vir-induction* sehingga terjadi transfer T-DNA (Shaw et al., 1986).

Jenis strain *Agrobacterium* yang digunakan untuk transformasi genetik diketahui sangat mempengaruhi keberhasilan transfer T-DNA kedalam genom sel tanaman dengan % *efficiency transfer* (ET) berbeda jauh antar strain (Hood et al., 1986). *Literature*

review ini dibuat dengan tujuan untuk memberikan informasi kombinasi hormon yang paling optimal dalam menginduksi kalus dan tunas pada tanaman Rubiaceae serta konsentrasi asetosiringon dan jenis strain *Agrobacterium* yang mampu menghasilkan %ET tertinggi pada tanaman Rubiaceae. Artikel yang digunakan bersumber dari hasil pencarian menggunakan kata kunci pada *Google Scholar* dan didapatkan sebanyak 50 artikel, dimana 21 artikel diantaranya yang memenuhi kriteria berupa mengandung semua kata kunci, digunakan sebagai sumber data untuk direview.

### Peran Tanaman Suku Rubiaceae di Bidang Kesehatan

Suku Rubiaceae terdiri atas 10.700 spesies dan merupakan salah satu suku Angiosperm terbesar (Mongrand *et al.*, 2005). Tanaman suku Rubiaceae telah lama digunakan dalam bidang kesehatan dan oleh masyarakat Indonesia untuk pengobatan tradisional (Sadino, 2018; Marusin *et al.*, 2013), dimana beberapa diantaranya mampu menunjukkan efek antibakteri, antivirus, anti-inflamasi, antioksidan dan analgesik (Heitzman *et al.*, 2005). Kandungan kafein salah satu spesies tanaman Rubiaceae yaitu *Coffea arabica* banyak digunakan untuk obat migrain maupun untuk stimulan sistem saraf, diuretik, vasokonstriktor, dan bronchodilator (Simoes *et al.*, 2004).

Jenis tanaman dari suku Rubiaceae lain yang juga banyak dimanfaatkan adalah tanaman kacapiring (*Gardenia jasminoides*) yang memiliki bunga berwarna putih dan berbau harum (Xiao *et al.*, 2017). Bunga kaca piring dapat digunakan sebagai obat untuk mengontrol kehamilan dalam pengobatan tradisional Cina karena kandungan asam gardenik dan asam gardenolik B pada ekstrak etil asetat (Xu *et al.*, 1987). Ekstrak daun tanaman kacapiring dapat digunakan untuk mengobati luka, phlegmon dan konjungtivitas akut karena mengandung senyawa antibakteri terhadap *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* dan *Proteus mirabilis* (Naseem & Farrukh, 2015). Ekstrak etanol buah kacapiring diketahui memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel line kanker perut SNU638 dan AGS (Lee *et al.*, 2009), sedangkan bagian akarnya memiliki aktivitas

sitotoksik terhadap sel line HeLa, A548, MCF-7 dan A354-S2 (Wang *et al.*, 2012).

### Induksi Kalus Embriogenik Suku Rubiaceae sebagai Target Transformasi Genetik

Target transformasi genetik merupakan sel/jaringan tanaman yang digunakan sebagai target integrasi transgen pembawa *gene of interest*. Syarat sebagai target transformasi genetik adalah memiliki respon terhadap medium tumbuh, tidak rekalsitran, mudah terinfeksi oleh *Agrobacterium* dan dapat beregenerasi membentuk tanaman utuh. Target transformasi dapat berupa protokorm, *protokorm like bodies*, kalus dan organ tanaman (Dwiyani *et al.*, 2016).

Embriogenesis somatik adalah proses pembentukan embrio dari sel somatik atau sel vegetatif tanpa adanya fertilisasi (Horstman *et al.*, 2017). Kalus yang bersifat embrionik memiliki kelebihan yaitu mengandung banyak sel yang bersifat meristematik sehingga dapat meningkatkan efisiensi transformasi (Escalant *et al.*, 1994). Embrio somatik juga diketahui memiliki kelebihan dalam proses transformasi genetik yaitu dapat menghasilkan embrio somatik sekunder yang dapat dijadikan sebagai target transformasi (Sidha *et al.*, 2006). Menurut Li *et al.* (2002), keuntungan lain adalah kondisi genetik yang seragam dan mudah berproliferasi.

Embrio somatik dapat diinduksi dari eksplan secara tidak langsung melalui pembentukan kalus yang bersifat embriogenik. Ciri-ciri kalus embriogenik adalah memiliki tekstur yang remah, noduler dan warnanya putih atau kekuningan (Litz & Gray, 1995). Kalus embrionik dapat diinduksi dengan perlakuan penambahan hormon eksogen berupa auksin dan sitokinin. Auksin dan sitokinin yang dihasilkan oleh tanaman secara independen tidak cukup untuk menginduksi terbentuknya kalus sehingga perlu diketahui konsentrasi hormon eksogen yang optimal agar kalus embrionik dapat terbentuk (Ahmad & Faisal, 2018).

Induksi kalus sangat dipengaruhi oleh jenis dan konsentrasi hormon yang digunakan serta kombinasinya (Roy *et al.*, 2008). Auksin diketahui mampu menginduksi terjadinya elongasi sel dan kombinasinya dengan hormon sitokinin mampu menyebabkan terjadinya

pembelahan sel. Giberelin berfungsi dalam menginduksi germinasi biji dan juga berfungsi sebagai regulator tinggi tanaman karena mampu menyebabkan pertumbuhan batang, sedangkan etilen berfungsi dalam pematangan buah. Hormon auksin dan sitokinin dibutuhkan untuk menjaga viabilitas tanaman, berbeda dengan hormon lain yang hanya berfungsi dalam regulasi tahapan perkembangan tertentu saja (Taiz & Zeiger, 2010).

Menurut Mardhiyetti *et al.* (2015), interaksi hormon auksin dan sitokinin mempengaruhi pertumbuhan morfologi sel tumbuhan, dan konsentrasinya dapat mempengaruhi pertumbuhan kalus atau organogenesis. Penelitian terdahulu (Tabel 1) mengindikasikan adanya pengaruh hormon dan/atau kombinasinya terhadap induksi kalus pada tanaman Rubiaceae. Induksi kalus tanaman Rubiaceae dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai macam eksplan, eksplan yang umum digunakan adalah daun karena jumlahnya yang banyak dalam satu tanaman sehingga lebih mudah diperoleh dalam jumlah besar. Li *et al.* (2019a) melakukan penelitian regenerasi tanaman *N. cadamba* (jabon putih) dengan menggunakan eksplan daun dan membuktikan bahwa daun berpotensi sebagai sumber eksplan untuk memperbanyak tanaman secara *in vitro* dalam waktu yang singkat.

Rentang waktu yang dibutuhkan dari penanaman eksplan hingga terbentuk gumpalan kalus diketahui bervariasi antar penelitian (Tabel 1.). Hal ini disebabkan oleh adanya perbedaan jenis tanaman, jenis hormon dan jenis eksplan yang digunakan. Rentang waktu yang pendek untuk induksi kalus lebih menguntungkan karena mampu mempersingkat waktu pengerjaan. Selain waktu induksi kalus, ciri-ciri kalus yang dihasilkan antar penelitian juga berbeda (Tabel 1.). Liu *et al.* (2018) mengungkapkan bahwa hormon tidak hanya mampu mempengaruhi laju pembentukan kalus, namun juga mempengaruhi tekstur dan penampilan kalus.

Beberapa jenis kalus yang dapat terbentuk dari tanaman Rubiaceae, yaitu *friable*, *semi-friable* dan *compact* (Tabel 1.).

Menurut George *et al.* (2008), kalus yang baik adalah yang bersifat *friable* atau remah karena penyerapan nutrisi dari mediumnya akan lebih efisien akibat luas permukaan kalus yang kontak dengan medium tinggi. Oleh karena itu, kalus yang *friable* lebih sesuai untuk digunakan sebagai target transformasi karena bakteri lebih mudah menginfeksi seluruh bagian sel kalus secara merata, dan antibiotik pada tahap seleksi juga dapat dengan mudah kontak dengan seluruh sel.

Terdapat dua sifat kalus yang dihasilkan dari beberapa penelitian yaitu embriogenik dan non-embriogenik. Menurut Koetle *et al.* (2015), regenerasi tanaman secara *in vitro* banyak menggunakan embrio somatik yang berasal dari kalus embriogenik. Kalus semacam ini mempunyai daya regenerasi yang tinggi sehingga berpotensi sebagai target transformasi genetik. Kalus non-embriogenik dapat diinduksi menjadi kalus embriogenik dengan perlakuan hormon seperti yang dilakukan oleh Midhu *et al.*, (2019) pada induksi kalus embriogenik *O. pectinata* dengan hormon *Indole Acetic Acid* (IAA).

Berdasarkan data penelitian pada Tabel 1, perlakuan induksi hormon terbaik diperoleh pada penelitian Li *et al.* (2019c) yang melakukan induksi kalus pada *I. chinensis* dan Li *et al.* (2019a) yang melakukan induksi kalus pada *N. cadamba*. Hal ini dapat dilihat dari pendeknya rentang waktu yang dibutuhkan untuk menginduksi kalus embriogenik yang *friable* dari eksplan daun. Kemiripan jenis hormon pada perlakuan terbaik serta respon tanaman yang dihasilkan antar kedua spesies tersebut membuktikan adanya korelasi secara fisiologis antar spesies dalam famili Rubiaceae dalam merespon penambahan hormon eksogen untuk induksi kalus embriogenik. Pitman (2004) mengungkapkan bahwa tanaman yang berada dalam satu famili atau genus yang sama memiliki bentukan yang mirip dan sering kali memiliki kandungan kimia dan sifat penyembuhan yang sama.

**Tabel 1.** Pengaruh hormon terhadap induksi kalus Rubiaceae berdasarkan penelitian terdahulu

Jenis Tanaman	Jenis Eksplan	Jenis Hormon dan Konsentrasi Waktu		Kalus				Referensi
		(mg/L)	(hari)	Warna	Jenis	Sifat	Jumlah	
<i>G. jasminoides</i>	Daun	TDZ (4)	60	Hijau	F	NE	+++	(Gabr <i>et al.</i> , 2017)
<i>G. jasminoides</i>	Daun	Kinetin (0.3) + NAA (0.5)	12	Kuning Kehijauan	C	NE	+++	(Liu <i>et al.</i> , 2018)
<i>G. jasminoides</i>	Nodus	2,4-D (0.5)	35	Putih dan Hijau	F	E	+++	(Gaber & Barakat, 2019)
<i>Ixora coccinea</i>	Daun	2,4-D (10)	60	Putih dan Hijau	F	NE	+	(Onsa <i>et al.</i> , 2018)
<i>Ixora chinensis</i>	Daun	6-BA (4) + TDZ (1) + NAA (1)	30	Hijau	F	E	+++	(Li <i>et al.</i> , 2019c)
<i>M. tuberosa</i>	Kotiledon	2,4-D (2) + Kinetin (2)	30	Hijau kekuningan	F	E	+++	(Sari <i>et al.</i> , 2018)
<i>O. mungos L.</i>	Daun	NAA (19.96) + BA (1)	30	Kuning	F	NE	+++	(Krishnan <i>et al.</i> , 2019)
<i>O. mungos L.</i>	Daun	NAA (3) + 2,4-D (1) + Kinetin (0.5)	21	Hijau keputihan	F	NE	+++	(Deepthi & Satheshkumar, 2016)
<i>O. pectinata</i>	Daun	2,4-D (0.5)	30	Kuning	SF	NE	+++	(Midhu <i>et al.</i> , 2019)
<i>N. cadamba</i>	Daun	TDZ (3) + 2,4-D (0.1) + NAA (0.05)	21	Hijau	F	E	+++	(Li <i>et al.</i> , 2019a)
<i>N. cadamba</i>	Nodus	BAP (0.8)	21	Hijau keputihan	C	NE	+++	(Mok & Ho, 2019)
<i>N. cadamba</i>	Kotiledon + petiole	TDZ (5) + NAA (5)	30*	Hijau	F	E	+++	(Huang <i>et al.</i> , 2020)
<i>N. cadamba</i>	Hipokotil	TDZ (5) + NAA (5)	30*	Hijau	F	E	+++	(Huang <i>et al.</i> , 2020)

Keterangan:

F : Friable

SF : Semi-friable.

C : Compact

E : Embriogenik

NE : Non Embriogenik

\* : Tunas berasal dari kalus embriogenik sudah terbentuk

+ : Sedikit

+++ : Banyak

Perbedaan diantara kedua penelitian tersebut terletak pada kemampuan kalus untuk menghasilkan tunas. Sebanyak 23,7% kalus embriogenik *I. chinensis* (Li *et al.*, 2019c) mampu menghasilkan tunas, sedangkan pada tanaman *N. cadamba* sebanyak 71,4% kalus embriogenik mampu menghasilkan tunas (Li *et al.*, 2019a). Kedua pengamatan ini dilakukan 1 bulan setelah kalus embriogenik terbentuk. Perbedaan persentase pembentukan tunas yang signifikan ini salah satunya disebabkan oleh adanya perlakuan tambahan pada penelitian Li *et al.* (2019a) berupa subkultur kalus

embriogenik pada medium yang mengandung hormon 0.05 mg/L NAA dan 0.5 (atau 1) mg/L 6-BA setelah kalus embriogenik terbentuk.

Adapun persentase pembentukan kalus embriogenik pada penelitian Li *et al.* (2019c) yang menggunakan 4 mg/L 6-BA + 1 mg/L TDZ + 1 mg/L NAA adalah sebesar 92.3%, sedangkan pada penelitian Li *et al.* (2019a) yang menggunakan 0.1 mg/L 2,4-D + 3 mg/L TDZ + 0.05 mg/L NAA dihasilkan persentase pembentukan kalus embriogenik sebesar 86.77%. Persentase pembentukan kalus pada penelitian Li *et al.* (2019c) diketahui lebih

besar daripada Li *et al.* (2019a), namun persentase pembentukan tunas yang dihasilkan Li *et al.* (2019c) jauh lebih rendah dibandingkan dengan penelitian Li *et al.* (2019a). Berdasarkan hal tersebut maka dapat dikatakan bahwa kombinasi hormon yang paling baik dan efisien dalam menghasilkan kalus embriogenik dengan kemampuan regenerasi tinggi pada tanaman Rubiaceae adalah kombinasi TDZ, 2,4-D dan NAA, dan dilanjutkan subkultur pada medium yang mengandung 6-BA dan NAA untuk induksi tunas. Pada penelitian ini diketahui bahwa saat subkultur tidak dilakukan, jumlah tunas yang dihasilkan sangat sedikit dan kalus yang tidak tumbuh menjadi tunas tidak dapat diinduksi membentuk tunas, sehingga dapat dikatakan bahwa perlakuan subkultur ke medium yang mengandung 6-BA dan NAA ini memiliki peran yang penting.

Ratio auksin dan sitokinin yang sama besar akan menyebabkan terbentuknya kalus, sedangkan saat ratio auksin yang lebih tinggi maka akan menginduksi pembentukan akar dan ratio sitokinin yang lebih tinggi akan menginduksi pembentukan tunas (Skoog & Miller, 1957). Tingginya persentase induksi kalus yang didapatkan dari perlakuan konsentrasi sitokinin, yaitu 6-BA dan TDZ, yang tinggi pada penelitian Li *et al.* (2019a) dan Li *et al.* (2019c) menunjukkan bahwa kandungan hormon auksin endogen pada tanaman Rubiaceae cukup tinggi. Hal ini dikarenakan kalus hanya akan terbentuk saat ratio kandungan auksin dan sitokinin setara.

Hasil penelitian Li *et al.* (2019a) menunjukkan bahwa penggunaan TDZ + 2,4-D + NAA mampu menghasilkan % induksi kalus yang lebih tinggi dan bersifat embriogenik dibandingkan dengan penggunaan 6-BA + NAA yang juga mampu menghasilkan kalus namun dengan persentase yang lebih rendah dan kalus bersifat non-embriogenik. Berdasarkan hasil penelitian tersebut maka kombinasi TDZ + 2,4-D + NAA digunakan untuk induksi kalus embriogenik yang kemudian disubkultur ke medium yang mengandung 6-BA + NAA untuk menginduksi tunas karena kalus yang tidak disubkultur ke medium tersebut diketahui tidak dapat berdiferensiasi membentuk tunas.

### **Pengaruh Strain *A. tumefaciens* terhadap Efisiensi Transformasi Genetik Suku Rubiaceae**

Pada proses transformasi genetik tanaman, bakteri *Agrobacterium* berperan dalam melakukan invasi ke sel tanaman saat terinduksi oleh asetosiringon atau monosakarida sehingga menyebabkan terjadinya integrasi T-DNA kedalam genom sel target. Banyak strain *Agrobacterium* yang telah dikembangkan dan digunakan dalam penelitian transformasi genetik tanaman. Penelitian pengaruh variasi strain *Agrobacterium* terhadap efisiensi transformasi genetik telah lama dipelajari dan hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak semua tanaman memberikan respon yang sama saat dilakukan transformasi menggunakan strain yang sama sehingga penting untuk dilakukan eksplorasi lebih lanjut terhadap strain *Agrobacterium* yang mampu memberikan efisiensi transformasi terbaik (Wang *et al.*, 2020).

Strain yang paling *virulent* pada tanaman tembakau dan tomat diketahui adalah *A. tumefaciens* A281. Penelitian lanjutan menunjukkan bahwa lokus yang memberikan sifat *hypervirulent* dari strain A281 ini berada diluar area T-DNA (Hood *et al.*, 1986). Bakteri *A. tumefaciens* A281 diketahui paling banyak digunakan dalam penelitian transformasi genetik karena memiliki kemampuan menginduksi tumor yang lebih baik serta memiliki jangkauan *host* yang lebih luas dibandingkan dengan strain *Agrobacterium* yang lain (Jin *et al.*, 1987).

Persentase efisiensi transformasi tanaman Rubiaceae yang dihasilkan dari setiap penelitian diketahui berbeda-beda (Tabel 2.). Pérez-Piñeiro *et al.* (2012), mengungkapkan bahwa optimasi tahapan transformasi genetik sulit untuk dilakukan karena banyaknya faktor yang berperan dalam mendukung keberhasilan sebuah proses transformasi. Faktor-faktor yang berpengaruh tersebut diantaranya adalah strain *Agrobacterium*, jenis tanaman, dan kondisi setiap tahapan transformasi.

Kesamaan yang dimiliki oleh penelitian Hatanaka *et al.* (1999), Siswanto *et al.* (2003), dan Canche-Moo *et al.* (2006) pada Tabel 2 adalah bahwa ketiga penelitian tersebut menggunakan jenis tanaman yang sama yaitu *Coffea canephora*. Efisiensi

transformasi tertinggi didapatkan pada penelitian yang dilakukan oleh Hatanaka *et al.* (1999), yaitu sebesar 38,3%, diikuti dengan penelitian Canche-Moo *et al.* (2006) yaitu sebesar 11% dan Siswanto *et al.* (2003) yaitu sebesar 8%. Adanya perbedaan pada %ET

yang dihasilkan ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor, yaitu perbedaan strain *Agrobacterium* yang digunakan dan perbedaan kondisi tahapan transformasi yang dilakukan dalam penelitian.

**Tabel 2.** Strain *A. tumefaciens* pada transformasi genetik tanaman Rubiaceae

Jenis Tanaman	Target Transformasi	Strain <i>Agrobacterium</i>	%ET	Referensi
<i>N. cadamba</i>	Daun	<i>A. tumefaciens</i> GV3101	5%*	(Li <i>et al.</i> , 2019b)
<i>C. arabica</i> (L.)	Kalus embriogenik	<i>A. tumefaciens</i> EHA105	>90%	(Ribas <i>et al.</i> , 2011)
<i>C. canephora</i>	Kalus embriogenik	<i>A. tumefaciens</i> EHA101	38.3%	(Hatanaka <i>et al.</i> , 1999)
<i>C. canephora</i>	Kalus embriogenik	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404	8%	(Siswanto <i>et al.</i> , 2003)
<i>C. canephora</i>	Embrio tahap torpedo	<i>A. tumefaciens</i> C58C1	11%	(Canche-Moo <i>et al.</i> , 2006)

Keterangan:

Perhitungan %ET dilakukan menggunakan rumus (jumlah eksplan positif PCR/ total eksplan yang ditransformasi) x 100%

\*Perhitungan dilakukan dengan menggunakan rumus (jumlah eksplan positif PCR/ jumlah eksplan yang lolos medium seleksi) x 100%

Hatanaka *et al.* (1999) dalam penelitiannya menggunakan *A. tumefaciens* EHA101 dan kokultivasi dilakukan menggunakan medium WPM. Hood *et al.* (1986) menjelaskan bahwa strain EHA101 merupakan derivatif dari strain A281 dan termasuk strain super virulen. Hal ini menunjukkan bahwa penelitian Hatanaka *et al.* (1999) memiliki keunggulan pada tahapan transformasi sehingga %ET yang dihasilkan lebih besar dibandingkan dengan penelitian *C. canephora* lainnya.

Canche-Moo *et al.* (2006) dalam penelitiannya menggunakan *A. tumefaciens* C58C1 dan Siswanto *et al.* (2003) menggunakan *A. tumefaciens* LBA4404. Kedua strain yang digunakan tersebut diketahui termasuk dalam strain yang virulensinya standar atau rendah (Pérez-Piñeiro *et al.*, 2012). Wang *et al.* (2020) melakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh strain *Agrobacterium* yang digunakan terhadap keberhasilan efisiensi transformasi dan hasil penelitian menunjukkan bahwa transformasi genetik menggunakan *A. tumefaciens* LBA4404 mengalami kegagalan, transformasi dengan *A. tumefaciens* C58C1 dapat berhasil namun menghasilkan efisiensi transformasi yang rendah, sedangkan transformasi dengan *A. tumefaciens* EHA105 dan AGL-1 berhasil dilakukan dan menghasilkan efisiensi

transformasi tertinggi dengan jumlah transforman yang lebih banyak tiga kali lipat. Hasil ini juga sesuai dengan penelitian transformasi genetik pada *M. truncatula cv. Jemalong* (Chabaud *et al.*, 2003) dan *S. schenckii* (Zhang *et al.*, 2011). Bakteri *A. tumefaciens* dengan strain yang berbeda membutuhkan kondisi optimum yang berbeda juga, seperti konsentrasi asetosiringon, durasi, suhu kokultivasi, dan konsentrasi bakteri, sehingga rendahnya efisiensi transformasi yang dihasilkan oleh strain yang virulensinya rendah, seperti LBA4404 dan C58C1, dapat diatasi dengan melakukan optimasi kondisi transformasi genetik (Wang *et al.*, 2020).

### Pengaruh Asetosiringon terhadap Efisiensi Transformasi Genetik Suku Rubiaceae

Bakteri *A. tumefaciens* diketahui bantuan senyawa induksi yang berupa monosakarida atau asetosiringon. Asetosiringon, dengan rumus molekul C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> dan berat molekul 196,2 g/mol, merupakan senyawa penginduksi yang umum digunakan untuk mengaktifkan gen *vir* pada *Agrobacterium* (PubChem, 2021; Qianru *et al.*, 2017). Proses transformasi genetik dengan bantuan *Agrobacterium* sangat kompleks karena melibatkan interaksi banyak protein dalam prosesnya.

Mekanismenya bermula dari interaksi antara asetosiringon dengan VirA pada permukaan sel membran *Agrobacterium* yang menyebabkan terjadinya fosforilasi dan signal diteruskan ke VirG. Kejadian *phosphorylation cascade* ini menyebabkan teraktivasinya gen *vir* lain pada Ti-plasmid yang bertanggung jawab dalam pembentukan tumor dan transfer T-DNA. Tahapan transfer T-DNA ini juga melibatkan protein VirD2, VirE1 dan VirF yang terletak di sitoplasma sel *Agrobacterium* supaya T-DNA dapat mencapai daerah sitoplasma sel tanaman target melalui jalur protein yang dibentuk oleh VirB dan VirD4 pada permukaan sel membran *Agrobacterium*. Terjadinya integrasi T-DNA ke dalam genom sel *host* akan dibantu oleh *host proteins*. (Stachel & Nester, 1986; Michielse et al., 2004; Bulgakov et al., 2006; Tzfira et al., 2017; Wang et al., 2020;).

Asetosiringon dalam konsentrasi yang tepat dapat digunakan untuk meningkatkan

efisiensi transformasi (Jia et al., 2015). Menurut Sah et al. (2014), konsentrasi asetosiringon yang terlalu tinggi dapat menyebabkan nekrosis pada jaringan eksplan dan turunnya efisiensi transformasi. Gnasekaran et al. (2014) dalam penelitiannya pada *protocorm-like-bodies* (PLB) anggrek *Vanda* menunjukkan bahwa penambahan asetosiringon di atas batas optimalnya akan meningkatkan terjadinya *browning* pada jaringan. Berdasarkan hasil penelitian terdahulu terkait konsentrasi optimum asetosiringon pada tanaman Rubiaceae (Tabel 3), diketahui bahwa spesies yang berbeda memiliki konsentrasi optimum asetosiringon yang berbeda. Perlakuan pre-kokultivasi dan kokultivasi yang berbeda pada tanaman yang sama juga diketahui mempengaruhi konsentrasi asetosiringon yang dibutuhkan. Menurut Godwin et al. (1991), efek dari asetosiringon ini dapat bervariasi tergantung spesies tanaman yang digunakan.

**Tabel 3.** Konsentrasi optimum asetosiringon pada transformasi genetik tanaman Rubiaceae

Jenis Tanaman	Target Transformasi	Tahap Penambahan AS dan Konsentrasinya	%ET	Referensi
<i>N. cadamba</i>	Daun	Resuspensi bakteri (39 mg/L AS), Medium kokultivasi (20 mg/L AS)	5%*	(Li et al., 2019b)
<i>C. arabica</i> (L.)	Kalus embriogenik	Tidak dilakukan penambahan AS	>90%	(Ribas et al., 2011)
<i>C. canephora</i>	Kalus embriogenik	Medium kokultivasi (50 mg/L AS)	38.3%	(Hatanaka et al., 1999)
<i>C. canephora</i>	Kalus embriogenik	Resuspensi bakteri (100 mg/LAS), Medium kokultivasi (150 mg/L AS)	8%	(Siswanto et al., 2003)
<i>C. canephora</i>	Embrio tahap torpedo	Resuspensi bakteri (20 mg/L AS)	11%	(Canche-Moo et al., 2006)

Keterangan:

Perhitungan %ET dilakukan menggunakan rumus (jumlah eksplan positif PCR/ total eksplan yang ditransformasi) x 100%

\*Perhitungan dilakukan dengan menggunakan rumus (jumlah eksplan positif PCR/ jumlah eksplan yang lolos medium seleksi) x 100%

Tabel 3 menunjukkan adanya variasi % ET yang dihasilkan dari setiap penelitian transformasi genetik pada tanaman Rubiaceae. Hal ini dapat disebabkan adanya perbedaan kondisi eksplan serta adanya variasi perlakuan dalam tahapan transformasi genetik. Hasil transformasi genetik pada medium seleksi yang mengandung antibiotik pada penelitian Canche-Moo et al. (2006) menghasilkan survival rate sebesar 33%. Selanjutnya dilakukan subkultur pada medium yang sama

setiap 15 hari, dan dalam waktu 2 bulan embrio somatik tahap torpedo sudah terbentuk, serta 90% diantaranya berhasil berkecambah menjadi tanaman utuh dengan %ET sebesar 11% (Tabel 3). Hal ini berbeda dengan Siswanto et al. (2003) yang menghasilkan survival rate lebih tinggi (41%) setelah eksplan dikultur pada medium seleksi selama 1 bulan dan dilanjutkan subkultur pada medium regenerasi selama 10 minggu untuk menginduksi embrio somatik. Embrio somatik



pada fase kotiledon dilakukan subkultur lagi ke medium tanpa Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) dan dalam waktu 1 bulan 49,8% berkecambah, namun hanya 28,6% (28 plantlet) dari kecambah tersebut yang mampu membentuk plantlet normal.

Persentase efisiensi transformasi yang dihasilkan dari penelitian Siswanto *et al.* (2003) ini adalah sebesar 8% (Tabel 3). Nilai ini lebih rendah dibandingkan dengan Canche-Moo *et al.* (2006) yang menghasilkan %ET sebesar 11% meskipun persentase tanaman yang hidup pada medium seleksi pada Siswanto *et al.* (2003) lebih tinggi. Hal ini dapat disebabkan oleh adanya *false positive* pada eksplan yang hidup di medium seleksi yang dapat disebabkan oleh lebih pendeknya waktu inkubasi pada medium seleksi sehingga masih terdapat eksplan non transforman yang hidup pada medium.

Ribas *et al.* (2011) melakukan transformasi genetik pada *C. arabica* dan menghasilkan %ET sebesar >90% tanpa penambahan asetosiringon. Hal ini kemungkinan jumlah kandungan senyawa fenolik yang dihasilkan tanaman sudah cukup untuk mengaktifkan gen *vir*, selain itu *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 yang digunakan merupakan strain hipervirulen (Yu *et al.*, 2013). Siswanto *et al.* (2003) mengungkapkan bahwa transformasi dapat terjadi tanpa adanya penambahan asetosiringon, yang dibuktikan dengan adanya kalus transforman yang tumbuh pada perlakuan tanpa asetosiringon meskipun persentasenya lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan lain yang menggunakan bantuan asetosiringon. Hasil serupa terjadi pada penelitian transformasi *Camellia sinensis* (Qianru *et al.*, 2017), *Arachis hypogaea* (Karthik *et al.*, 2018), *Veratum dahuricum* (Ma *et al.*, 2020), dan *Oryza sativa cv. Fatmawati* (Sisharmini *et al.*, 2019) dimana transformasi masih terjadi pada perlakuan tanpa asetosiringon, namun penambahan asetosiringon pada konsentrasi tertentu menyebabkan terjadinya peningkatan %ET yang signifikan. Tingginya %ET pada penelitian Ribas *et al.* (2011) juga disebabkan oleh adanya optimasi terhadap banyak faktor, yaitu optimasi tipe kalus, warna kalus, umur kalus, OD600 *Agrobacterium*, suhu kokultivasi, konsentrasi medium MS, dan konsentrasi hormon 6-BA dan 2,4-D yang

digunakan dalam medium sehingga transformasi dilakukan menggunakan protokol yang sudah dioptimasi untuk mendapatkan %ET maksimum.

Konsentrasi asetosiringon yang digunakan pada tahapan kokultivasi sebesar 50 mg/L pada penelitian Hatanaka *et al.* (1999), 20 mg/L (100  $\mu$ M) pada penelitian Canche-Moo *et al.* (2006), 150 mg/L pada penelitian Siswanto *et al.* (2003) dan 39 mg/L (200  $\mu$ M) pada penelitian Li *et al.* (2019b). Berdasarkan data tersebut diketahui bahwa kisaran konsentrasi asetosiringon yang digunakan pada transformasi tanaman Rubiaceae berkisar antara 20-150 mg/L. Variasi ini dapat terjadi karena setiap tanaman memiliki kandungan fenolik endogen yang berbeda-beda sehingga jumlah asetosiringon yang dibutuhkan juga berbeda. Selain itu, banyak faktor lain yang mempengaruhi jumlah asetosiringon yang dibutuhkan, seperti strain *Agrobacterium* yang digunakan serta kondisi saat transformasi dilakukan.

Sisharmini *et al.* (2019) melakukan transformasi pada tanaman padi Fatmawati (*Oryza sativa cv. Fatmawati*) dan %ET tertinggi yang didapatkan yaitu sebesar 5% saat 20 mg/L (100  $\mu$ M) asetosiringon digunakan, sedangkan perlakuan tanpa asetosiringon memberikan %ET yang sama dengan perlakuan 39 mg/L (200  $\mu$ M) asetosiringon, yaitu sebesar 2%. Nilai %ET dalam penelitian ini meningkat sebesar 7,84% saat transformasi dilakukan menggunakan konsentrasi asetosiringon dan higromisin yang optimasi. Karthik *et al.* (2018) melakukan transformasi pada berbagai kultivar tanaman kacang tanah (*Arachis hypogaea* L.) dan saat melakukan optimasi didapatkan %  $\beta$ -glukuronidase (GUS) positif tertinggi yaitu sebesar 19,6% ketika 29 mg/L (150  $\mu$ M) asetosiringon digunakan, sedangkan perlakuan tanpa asetosiringon memberikan %GUS positif sebesar 14,3%. Saat transformasi dilakukan dengan kondisi faktor-faktornya optimum, didapatkan %GUS positif sebesar 31,3%-38,6% pada kelima kultivar yang diuji. Penelitian oleh Karthik *et al.* (2018) dan Ribas *et al.* (2011) menunjukkan bahwa optimasi faktor-faktor yang mempengaruhi transformasi genetik perlu dilakukan untuk meningkatkan keberhasilan transformasi dan meningkatkan efisiensi transformasi genetik. Hasil penelitian Karthik *et al.* (2018) juga menunjukkan bahwa

saat kondisi transformasi tidak optimal dan hanya konsentrasi asetosiringon yang dioptimasi, perbedaan %GUS positif antara perlakuan tanpa asetosiringon dengan perlakuan penambahan 29 mg/L asetosiringon tidak jauh berbeda.

Qianru *et al.* (2017) melakukan transformasi pada *C. sinensis* dan hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi asetosiringon yang optimum adalah pada 29 mg/L (150  $\mu$ mol/L) dengan %GUS positif sebesar 54,6%, sedangkan perlakuan tanpa asetosiringon memberikan %GUS positif sebesar 8%. Ma *et al.* (2020) melakukan penelitian transformasi pada *V. dahuricum* dan hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi asetosiringon yang optimal adalah sebanyak 4 mg/L (20  $\mu$ M) dengan nilai %ET sebesar 14%, sedangkan pada perlakuan tanpa asetosiringon transformasi masih terjadi dan dihasilkan nilai %ET sebesar 6%. Penurunan %ET terjadi seiring dengan adanya penambahan asetosiringon diatas konsentrasi optimal 4 mg/L (20  $\mu$ M). Pada penelitian Ma *et al.* (2020), penurunan %ET ini disebabkan oleh adanya *Agrobacterium overgrowth*. Sah *et al.* (2014) mengungkapkan bahwa tingginya konsentrasi asetosiringon di atas batas optimum juga dapat menyebabkan terjadinya nekrosis pada jaringan eksplan sehingga %ET yang dihasilkan semakin menurun.

Penelitian yang dilakukan oleh Li *et al.* (2019b) menghasilkan efisiensi transformasi sebesar 5%. Nilai yang didapatkan dari perhitungan (jumlah tanaman positif transforman/total eksplan resisten kanamisin) x100% ini akan menghasilkan %ET yang semakin rendah saat rumus (jumlah tanaman positif transforman/total eksplan yang ditransformasi) x100% digunakan. Rendahnya persentase tranforman positif yang dihasilkan ini dapat disebabkan karena tidak dilakukannya optimasi faktor-faktor lain yang memengaruhi keberhasilan transformasi termasuk diantaranya konsentrasi asetosiringon. Optimasi yang dilakukan pada penelitian ini hanya terletak pada konsentrasi hormon yang akan mendukung regenerasi *N. cadamba* dan konsentrasi antibiotik yang optimal untuk menyeleksi tanaman transforman.

Berdasarkan hasil penelitian pada Tabel 3, dapat diketahui bahwa terdapat banyak faktor yang mempengaruhi

keberhasilan transformasi genetik tanaman Rubiaceae, salah satunya adalah konsentrasi asetosiringon. Optimasi terhadap konsentrasi asetosiringon dan penggunaan *A. tumefaciens* yang *supervirulent* diketahui mampu meningkatkan nilai %ET secara signifikan.

## Simpulan

Kalus embriogenik tanaman Rubiaceae dapat diinduksi dengan kombinasi hormon auksin dan sitokinin eksogen. Kombinasi hormon yang paling optimal untuk menginduksi kalus embriogenik yaitu TDZ, 2,4-D dan NAA. Medium subkultur yang mengandung kombinasi hormone 6-BA dan NAA dapat meningkatkan pembentukan tunas dari kalus embriogenik tanaman suku Rubiaceae. Konsentrasi asetosiringon yang optimal dan *A. tumefaciens* yang *supervirulent* adalah dua faktor utama yang mampu meningkatkan nilai %ET secara signifikan. Penggunaan asetosiringon 50 mg/L pada tahap infeksi serta kokultivasi dan *A. tumefaciens* EHA101 *supervirulent* diketahui mampu menghasilkan %ET tertinggi pada tanaman Rubiaceae.

## Daftar Pustaka

- Ahmad, N. & Faisal, M. (2018). *Thidiazuron: From urea derivative to plant growth regulator*. Springer Singapore. Singapore.
- Atmaja, A. V., Nansy, E. & Purwanti, N. U. (2015). Uji aktivitas larvasida ekstrak etanol daun soka (*Ixora javanica* (blume) dc) terhadap larva *Aedes aegypti*. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran*: 1–8.
- Barreiro, E. J. (1990). Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. *Química Nova* 113: 29–39.
- Bulgakov, V. P., Kiselev, K. V., Yakovlev, K. V., Zhuravlev, Y. N., Gontcharov, A. A., & Odintsova, N. A. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of sea urchin embryos. *Biotechnology Journal* 41: 454–61.
- Canche-Moo, R. L. R., Ku-Gonzalez, A., Burgeff, C., Loyola-Vargas, V. M., Rodríguez-Zapata, L. C., & Castaño, E. 2006. Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 384: 373–7.

- Chabaud, M., De Carvalho-Niebel, F. & Barker, D. G. (2003). Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Plant Cell Reports* 122: 46–51.
- De La Riva, GA et al. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: A natural tool for plant transformation.” *Electronic Journal of Biotechnology* no. 31: 25–48.
- Deepthi, S. & Satheeshkumar, K. (2016). Enhanced camptothecin production induced by elicitors in the cell suspension cultures of *Ophiorrhiza mungos* Linn. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 3124: 483–93.
- Dwiyani, R., Yuswanti, H., Darmawati, I. A. P., & Mayadewi, N. N. (2016). *Transformasi Genetik pada Tanaman melalui Agrobacterium tumefaciens*. Swasta Nulus. Bali.
- Escalant, J. V., Teisson, C. & Cote, F. (1994). Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 430: 181–6.
- Farias, F. M. (2006). *Psychotria myriantha mill arg. (rubiaceae): caracterização dos alcalóides e avaliação das atividades antiqumiotóxica e sobre o sistema nervoso central [Dissertation]*. Federal University of Rio Grande do Sul. Brazil.
- Frame, B. R., Shou, H., Chikwamba, R. K., Zhang, Z., Xiang, C., Fonger, T. M., Pegg, S. E. K., Li, B., Nettleton, D. S., Pei, D., & Wang, K. (2002). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Physiology* 1129: 13–22.
- Gaber, M. K., & Barakat, A. A. (2019). Micropropagation and somatic embryogenesis induction of *Gardenia jasminoides* plants. *Alexandria Science Exchange Journal* 40: 190–202.
- Gabr, A. H., Arafa, N. M., El-Ashry, A. A. E., & El-Bahr, M. K. (2017). Impact of zeatin and thidiazuron on phenols and flavonoids accumulation in callus cultures of *Gardenia (Gardenia jasminoides)*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 720: 328–35.
- George, E. F., Hall, M. A. & Klerk, G. J. D. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer. Netherlands.
- Giri, C. C., Shyamkumar, B. & Anjaneyulu, C. (2004). Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: An overview. *Trees - Structure and Function* 218: 115–35.
- Gnasekaran, P., Antony, J. J. J., Uddain, J., & Subramaniam, S. (2014). *Agrobacterium* -mediated transformation of the recalcitrant Vanda Kasem’s delight orchid with higher efficiency. *The Scientific World Journal* 1: 14–6.
- Hansen, G., Shillito, R. D. & Chilton, M. D. (1997). T-strand integration in maize protoplasts after codelivery of a T-DNA substrate and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2194: 11726–30.
- Hatanaka, T., Choi, Y. E., Kusano, T., & Sano, H. (1999). Transgenic plants of coffee *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation.” *Plant Cell Reports* 219: 106–10.
- Heitzman, M. E., Neto, C. C., Winiarz, E., Vaisberg, A. J., & Hammond, G. B. (2005). Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry* 166: 5–29.
- Hood, E. E., Helmer, G. L., Fraley, R. T., & Chilton, M. D. (1986). The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *Journal of Bacteriology* 3168: 1291–301.
- Horstman, A., Bemer, M. & Boutilier, K. (2017). A transcriptional view on somatic embryogenesis. *Regeneration* 44: 201–16.
- Huang, H., Wei, Y., Zhai, Y., Ouyang, K., Chen, X., & Bai, L. (2020). High frequency regeneration of plants via callus-mediated organogenesis from cotyledon and hypocotyl cultures in a multipurpose tropical tree (*Neolamarkia cadamba*). *Scientific Reports* 110: 1–10.
- Jia, Y., Yao, X., Zhao, M., Zhao, Q., Du, Y., Yu, C., & Xie, F. (2015). Comparison of soybean transformation efficiency and plant factors affecting transformation during the *Agrobacterium* infection process. *International Journal of Molecular Sciences* 816: 18522–43.
- Jin, S. G., Komari, T., Gordon, M. P., & Nester, E.

- W. (1987). Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281. *Journal of bacteriology* 10169: 4417–25.
- Kant, P., Kant, S., Jain, R. K., & Chaudhury, V. K. (2007). *Agrobacterium*-mediated high frequency transformation in dwarf recalcitrant rice cultivars. *Biologia Plantarum* 151: 61–8.
- Karthik, S., Pavan, G., Sathish, S., Siva, R., Kumar, P. S., & Manickavasagam, M. (2018). Genotype-independent and enhanced in planta *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of peanut [*Arachis hypogaea* (L.)]. *3 Biotech* 48: 1–15.
- Koetle, M. J., Finnie, J. F., Balázs, E., & Van Staden, J. (2015). A review on factors affecting the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in ornamental monocotyledonous geophytes. *South African Journal of Botany* 98: 37–44.
- Košir, P., Škof, S. & Luthar, Z. (2004). Direct shoot regeneration from nodes of *Phalaenopsis orchids*. *Acta agriculturae Slovenica* 832: 233–42.
- Krishnan, J. J., Gangaprasad, A. & Satheeshkumar, K. (2019). Biosynthesis of camptothecin from callus and cell suspension cultures of *Ophiorrhiza mungos* L. var. *angustifolia* (Thw.) Hook. f. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences* 389: 893–902.
- Lee, J. H., Lee, D. U. & Jeong, C. S. (2009). *Gardenia jasminoides* Ellis ethanol extract and its constituents reduce the risks of gastritis and reverse gastric lesions in rats. *Food and Chemical Toxicology* 647: 1127–31.
- Li, D. D., Shi, W. & Deng, X. X. (2002). *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calluses of Ponkan mandarin and the regeneration of plants containing the chimeric ribonuclease gene. *Plant Cell Reports* 221: 153–6.
- <sup>[a]</sup>Li, J. J., Zhang, D., Que, Q., Chen, X., & Ouyang, K. (2019). Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of the miracle tree *Neolamarckia cadamba*. *Industrial Crops and Products* 130: 443–9.
- <sup>[b]</sup>Li, J. J., Zhang, D., Ouyang, K. X., & Chen, X. Y. (2019). High frequency plant regeneration from leaf culture of *Neolamarckia cadamba*. *Plant Biotechnology* 36(1): 13–9.
- <sup>[c]</sup>Li, T. G., Cai, H., Wang, T. X., Fu, Y. G., Yang, W. H., Zhao, A. J., Cui, Z., & Wang, J. (2019). Plant regeneration in *Ixora chinensis* from young leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 139(3): 605–608.
- Litz, R. E. & Gray, D. J. (1995). Somatic embryogenesis improvement. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11: 416–425.
- Liu, Z. B., Chen, J. G., Yin, Z. P., Shanguan, X. C., Peng, D. Y., Lu, T., & Lin, P. (2018). Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation increase content and yield of chlorogenic acid and its derivatives in *Gardenia jasminoides* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 134(1): 79–93.
- Ma, R., Yu, Z., Cai, Q., Li, H., Dong, Y., Oksman-Caldentey, K. M. & Rischer, H. (2020). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the medicinal plant *Veratrum dahuricum*. *Plants* 9(2): 1–12.
- Mabberly, D. J. (1997). *The Plant-Book*. Cambridge University Press. Oxford.
- Martins, D. & Nunez, C. V. (2015). Secondary metabolites from Rubiaceae species. *Molecules* 20(7): 13422–13495.
- Marusin, S., Saefudin, S. & Chairul, C. (2013). Potensi sifat antioksidan pada 10 jenis ekstrak dari famili Rubiaceae. *Jurnal Biologi Indonesia* 9(1): 93–100.
- Michielse, C. B., Ram, A. F. J., Hooykaas, P. J. J. & Van Den Hondel, C. A. M. J. J. Role of bacterial virulence proteins in *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus awamori*. *Fungal Genetics and Biology* 541: 571–8.
- Midhu, C. K., Hima, S., Binoy, J., & Satheeshkumar, K. (2019). Influence of incubation period on callus tissues for plant regeneration in *Ophiorrhiza pectinata* Arn. through somatic embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences* 489: 1439–46.
- Mok, P. K. & Ho, W. S. (2019). Rapid in vitro propagation and efficient acclimatisation protocols of *Neolamarckia cadamba*. *Asian Journal of Plant Sciences* 418: 153–63.

- Mongrand, S., Badoc, A., Patouille, B., Lacomblez, C., Chavent, M., & Bessoule, J. J. (2005). Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition. *Phytochemistry* 566: 549–59.
- Naseem, T. & Farrukh, M. A. (2015). Antibacterial activity of green synthesis of iron nanoparticles using *Lawsonia inermis* and *Gardenia jasminoides* leaves extract. *Journal of Chemistry* 1: 1–7.
- Olhoft, P. M., Flagel, L. E., Donovan, C. M., & Somers, D. A. (2003). Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta* 5216: 723–35.
- Onsa, R. A. H., Ellatif, I. A. E. A., Osman, M. G. E., & Abdullah, T. L. (2018). Effect of growth regulators in in vitro micropropagation of *Ixora coccinea*. *International Journal of Scientific and Research Publications (IJSRP)* 8(11): 144–145.
- Pitman, V. (2004). *Aromatherapy: A Practical Approach*. Nelson Thornes Ltd. Cheltenham.
- Prez-Pieiro, P., Gago, J., Landn, M. & Gallego, P. (2012). *Transgenic Plants - Advances and Limitations*. InTech. London.
- Qianru, L.V., Chen, C., Xu, Y., Hu, S., Wang, L., Sun, K., Chen, X., & Li, X. (2017). Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation systems in tea plant (*Camellia sinensis*). *Horticultural Plant Journal* 33: 105–9.
- Ribas, A. F., Dechamp, E., Champion, A., Bertrand, B., Combes, M. C., Verdeil, J. L., Lapeyre, F., Lashermes, P., & Etienne, H. (2011). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. *BMC Plant Biology* 111: 92.
- Robinson, JC; Fraser, C dan Eckstein, K. (1993). A field comparison of conventional suckers with tissue culture banana planting material over three crop cycles. *Journal of Horticultural Science* no. 668: 831–6.
- Roy, A., Ghosh, S., Chaudhuri, M. & Saha, P. K. (2008). Effect of different plant hormones on callus induction in *Gymnema sylvestris* R.Br. (Asclepiadaceae). *African Journal of Biotechnology* 137: 2209–11.
- Sadino, A. (2018). A review on medicinal plants with antidiabetic activity from Rubiaceae family. *International Research Journal Of Pharmacy* 79: 36–41.
- Sah, S. J., Kaur, A., Kaur, G., & Cheema, G. S. (2014). Genetic transformation of rice: problems, progress and prospects. *Rice Research: Open Access* 3(1): 1-10.
- Sari, Y. P., Kusumawati, E., Saleh, C., Kustiawan, W., & Sukartingsih. (2018). Effect of sucrose and plant growth regulators on callogenesis and preliminary secondary metabolic of different explant *Myrmecodia tuberosa*. *Nusantara Bioscience* 310: 183–92.
- Shaw, C. H., Ashby, A. M. & Watson, M. D. (1986). Plant tumour induction. *Nature* 324: 415.
- Sidha, M., Suprasanna, P., Bapat, V. A., Kulkarni, U. G., & Shinde, B. N. (2006). Developing somatic embryogenic culture system and plant regeneration in banana. *BARC Newsletter* 1: 153-161.
- Simoes, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., & Petrovick, P. R. (2004). *Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento*. UFSC University Press. Brazil.
- Simpson., & Michael G. (2010). *Diversity and Classification of Flowering Plants: Eudicots*. Elsevier B.V. Amsterdam.
- Sisharmini, A., Purwoko, B. S., Khumaida, N. & Trijatmiko, D. K. R. (2019). Optimasi konsentrasi asetosiringon dan higromisin dalam transformasi genetik padi Fatmawati dengan perantaraan *Agrobacterium tumefaciens*. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)* 46(3): 223–30.
- Siswanto., Oktavia, F., Budiani, A., Sudarsono., Priyono., & Mawardi, S. Transformasi kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan gen kitinase melalui *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 transformation of robusta coffee (*Coffea canephora*) with chitinase gene mediated by *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. *Menara Perkebunan* 71(2): 56–69.
- Skoog, F., & Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 11: 118–30.
- Stachel, S. E. & Nester, E. W. (1986). The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of

- Agrobacterium tumefaciens*. *The EMBO Journal* 75: 1445–54.
- Taiz., Lincoln., & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*. Sinauer Associates. Massachusetts.
- Tzfira, T., Hohn, B., & Gelvin, S. B. (2017). *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. Amsterdam.
- Wang, J., Lu, J., Lv, C., Xu, T., & Jia, L. (2012). Three new triterpenoid saponins from root of *Gardenia jasminoides* Ellis. *Fitoterapia* 83: 1396–401.
- Wang, S., Chen, H., Wang, Y., Pan, C., Tang, X., Zhang, H., Chen, W., & Chen, Y. Q. (2020). Effects of *Agrobacterium tumefaciens* strain types on the *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency of filamentous fungus *Mortierella alpina*. *Letters in Applied Microbiology* 570: 388–93.
- Xiao, W., Li, S., Wang, S. & Ho, C. T. (2017). Chemistry and bioactivity of *Gardenia jasminoides*. *Journal of Food and Drug Analysis* 125: 43–61.
- Xu, R., Qin, G., Zhu, D., Fan, Z., Jiang, D., Jhan, B., Wang, J., & Wang, Y. L. (1987). Study on the chemical constituents of the antifertility plant *Gardenia jasminoides* Ellis: I. Structure of gardenic acid B an early pregnancy terminating component. *Acta Chimica Sinica* 345: 301–4.
- Yu, G. R., Liu, Y., Du, W. P., Song, J., Lin, M., Xu, L. Y., Xiao, F. M. & Liu, Y. S. (2013). Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated immature embryo transformation system and transformation of glyphosate-resistant gene 2mG2-EPSPS in Maize (*Zea mays* L.). *Journal of Integrative Agriculture* 12: 2134–42.
- Zhang, Y., Li, G., He, D., Yu, B., Yokoyama, K., & Wang, L. (2011). Efficient insertional mutagenesis system for the dimorphic pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Microbiological Methods* 84: 418–22.