

# UJI STABILITAS GENETIK TANAMAN TEBU PRODUK REKAYASA GENETIK (PRG) OVEREKSPRESI GEN *SoSPS1* DAN *SoSUT1* SECARA *IN VITRO*

(Genetic Stability Assay of Genetic Modified Sugarcane that Overexpress *SoSPS1* and *SoSUT1* Gene by *In Vitro*)

Fragaria Vesca Paradisa<sup>1,2</sup>, Bambang Sugiharto<sup>1,2</sup>, Dwi Setyati<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengatahuan Alam, Universitas Jember (UNEJ)

<sup>2</sup> Center for Development of Advanced Science and Technology (CDAST)

Jln. Kalimantan 37, Jember 68121

E-mail: sugiharto.fmipa@unej.ac.id

## Abstrak

Seiring dengan kemajuan bioteknologi, saat ini telah didapatkan tanaman tebu produk rekayasa genetik (PRG), salah satunya adalah tanaman tebu overekspresi ganda (*stacked gene*) gen *SoSPS1* dan *SoSUT1*. Tanaman tersebut merupakan hasil dari proses transformasi dengan menyisipkan gen *SoSPS1* dan *SoSUT1*. Stabilitas genetik tanaman PRG overekspresi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* generasi kedua tersebut masih belum diketahui. Suatu tanaman transgenik dapat dikatakan stabil jika gen yang diinsersikan pada tanaman induk juga dapat ditemukan kembali pada tanaman generasi selanjutnya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efisiensi penggunaan eksplan tunas apikal dan tunas lateral untuk memperbanyak tebu PRG overekspresi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* secara *in vitro* serta mendapatkan tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* generasi kedua yang mampu bertahan pada media seleksi dan sudah stabil secara genetik. Adapun tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu tahapan memperbanyak *plantlet*, seleksi antibiotik dan konfirmasi PCR. Tanaman yang lolos seleksi antibiotik kanamisin dan higromisin kemudian dianalisis keberadaan gen yang diinsersikan pada tanaman induknya dengan PCR. Tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* generasi kedua yang telah stabil sebanyak 5 *plantlet*, hal ini dibuktikan dengan keberadaan pita / band *hptII* ukuran 470 bp dan *nptII* dengan ukuran 550 bp melalui analisis PCR.

**Kata Kunci:** produk rekayasa genetik, overekspresi, stabilitas genetik.

## Abstract

Along with the progress of biotechnology, they had already obtained plant cane of engineered products genetics (PRG), one of them is modified sugarcane double overexpression (*stacked gene*) genes *SoSPS1* and *SoSUT1*. The plant was the result of transforming by inserting *SoSPS1* and *SoSUT1* genes. The second generation of genetic modified sugarcane that overexpress *SoSPS1* and *SoSUT1* is still unknown. A transgenic plant can be said to be stable if the gene that inserted at the master plant can also be found again in the next generation. The purpose of this research is to know the efficient use of apical buds and lateral shoots explants for PRG sugarcane propagation and also to obtain PRG sugarcane with *SoSPS1* and *SoSUT1* genes overexpression for second generation, which are able to survive in the selection media and has been genetically stable. The stage in this research is *plantlet* multiplication, the selection of antibiotics and PCR confirmation. Plants that pass the kanamycin and hygromycin antibiotics selection then analyzed the presence of the inserted gene in the plant with PCR method. PRG sugarcane with *SoSUT1* and *SoSPS1* genes overexpression in the second generation which is stable, there are 5 *plantlets*, this is evidenced by the existence of the *hptII* band with 470 bp in size and *nptII* with 550 bp in size by PCR analysis.

**Key words:** genetically modified products, overexpression, genetic stability.

## PENDAHULUAN

Seiring dengan kemajuan bioteknologi, saat ini telah didapatkan tanaman tebu produk rekayasa genetik (PRG), salah satunya adalah tanaman tebu overekspresi ganda (*stacked gen*) gen *SoSPS1* dan *SoSUT1*. Tanaman tersebut merupakan hasil transformasi dengan menyisipkan gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* pada tanaman tebu. Pada dasarnya,

tanaman tebu sudah memiliki gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* endogen, dengan adanya proses transformasi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* diharapkan terjadi peningkatan aktivitas enzim *Sucrose phosphate syntase* (SPS1) dan *Sucrose transporter* (SUT) sehingga dapat meningkatkan biosintesis dan translokasi sukrosa dari *source* ke *sink* dan diperoleh tanaman tebu yang memiliki rendemen gula yang tinggi [1].

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa tanaman tebu hasil transformasi masih bersifat heterogen, gen yang diinsersikan masih belum tentu dapat ditemukan pada semua sel tanaman. Suatu tanaman transgenik dapat dikatakan stabil jika gen yang diinsersikan pada tanaman induk juga dapat ditemukan kembali pada tanaman generasi selanjutnya [2].

Bagi tanaman transgenik yang mampu melakukan persilangan sendiri dapat mencapai kestabilan genetik hingga turunan ke-4 sedangkan tanaman transgenik yang membutuhkan perantara dalam penyerbukan akan mencapai kestabilan hingga turunan ke-8 [3]. Tarique [4] menyatakan bahwa untuk melakukan seleksi dengan metode konvensional biasanya membutuhkan 10-15 tahun dalam melengkapi seleksi. Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan kultur *in vitro* melalui kultur jaringan pada tanaman tebu untuk mendapatkan tanaman stabil yang seragam dalam jumlah banyak dengan waktu yang singkat.

Menurut Ningtyas [5] Tanaman tebu PRG telah positif terinsersi oleh gen *SoSPSI* dan *SoSUTI*. Hal ini dibuktikan dengan konfirmasi keberadaan gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* melalui analisis PCR, akan tetapi tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* generasi kedua belum dikonfirmasi stabilitas genetiknya. Berdasarkan latar belakang tersebut perlu dilakukan penelitian mengenai uji stabilitas genetik pada tanaman tebu overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* generasi kedua secara *in vitro* melalui kultur jaringan menggunakan analisis PCR.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi, *Center for Development of Advanced Science and Technology* (CDAST), Universitas Jember mulai bulan Juli 2014 hingga Mei 2015.

### Pengambilan Eksplan

Eksplan yang digunakan adalah tunas apikal dan tunas lateral yang diperoleh dari tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) overekspresi gen *SoSUTI* dan *SoSPSI* hasil peneliti sebelumnya (Ningtyas, 2013). Pucukan tebu PRG yang berumur  $\pm 10$  bulan diambil dari lapang kemudian dipotong-potong. Pucukan dipotong  $\pm 30$  cm terhitung dari ruas munculnya daun hingga ruas pada tebu yang masih tertutup oleh pelepah daun. Tunas apikal yang sudah dipotong selanjutnya dibersihkan terlebih dahulu kemudian disterilkan dengan alkohol 70% dan dilewatkan api Bunsen. Tunas apikal kemudian dibuka pelepah daun satu per satu hingga didapatkan tunas bagian dalam yang berwarna putih bersih dan dipotong  $\pm 10$  mm. Tunas apikal siap ditanam pada media pertumbuhan.

Eksplan tunas lateral diperoleh dari bagian antar ruas pada tanaman. Tunas lateral kemudian dipotong dengan

ukuran 1,5 cm x 2 cm, setelah itu dibersihkan menggunakan alkohol 70% dan diletakkan pada petridish steril. Potongan ruas tersebut dicelupkan pada alkohol 96% kemudian dilewatkan pada api bunsen hingga bagian luarnya terbakar selanjutnya dibersihkan menggunakan skalpel hingga didapatkan mata tunas. Mata tunas kemudian disterilisasi menggunakan larutan klorok dengan perbandingan 1 : 3 (klorok : aquadest steril) selama 5 menit. Mata tunas dibilas menggunakan aquadest steril sebanyak 2 kali dan ditiriskan pada petridish yang telah dilapisi dengan kertas saring steril sampai sisa aquadest yang menempel hilang.

### Penanaman dan Perbanyakan Eksplan

Eksplan tunas apikal dan tunas lateral kemudian ditanam pada media pertumbuhan yang berada didalam botol kultur. Komposisi Media Pertumbuhan Tunas Apikal dan Tunas Lateral dapat dilihat pada tabel 3.1

Tabel 1. Komposisi Media Pertumbuhan Tunas Apikal dan Tunas Lateral

Eksplan	Komposisi Media Pertumbuhan
Tunas apikal	MS + 2 ml BA 2 ppm + 2,5 ml Glutamin 100 ppm + 25 $\mu$ l Kinetin 0,5 ppm
Tunas lateral	MS + 1,5 ml BA 1,5 ppm + 2,5 ml Glutamin 100 ppm+ 500 $\mu$ l GA 0,1 ppm

Dalam setiap botol kultur ditanami sebanyak 2 eksplan, selanjutnya botol-botol kultur tersebut diinkubasi di ruang gelap selama 1 minggu kemudian dipindahkan ke ruang terang. Selama proses inkubasi di ruang terang dilakukan subkultur pada eksplan menggunakan media yang sama. Subkultur dilakukan selama 3 minggu sekali hingga diperoleh *plantlet* dengan perakaran yang kuat, batang yang besar, dan daun yang berwarna hijau segar sehingga siap untuk dilakukan tahapan seleksi.

### Seleksi dan Regenerasi Eksplan

Eksplan yang telah beregenerasi menjadi *plantlet* selanjutnya ditanam pada media seleksi. Seleksi dilakukan pada media MS padat yang telah ditambah antibiotik kanamisin 50 mg.L<sup>-1</sup> pada seleksi 1 dan kanamisin 50 mg.L<sup>-1</sup> + higromisin 20 mg.L<sup>-1</sup> pada seleksi 2 dan 3. Masing-masing seleksi membutuhkan waktu 3 minggu inkubasi.

Seleksi dilakukan pada *plantlet* yang telah mempunyai anakan dengan tinggi  $\pm 5-7$  cm dan memiliki perakaran yang kuat. *Plantlet* yang lolos dari media seleksi selanjutnya ditumbuhkan pada media regenerasi yaitu media MS untuk dilakukan perbanyakan.

## Isolasi Genom

Sampel daun tebu PRG yang digunakan untuk isolasi genom tanaman tebu sebanyak 0,1 gram dihaluskan dengan menambahkan  $N_2$  cair. Serbuk yang didapatkan dipindah ke *microtube* (1,5 ml) dan ditambahkan 600  $\mu$ l *Nucle lysis*, kemudian divortex dan diinkubasi pada suhu  $65^{\circ}C$  selama 15 menit. Setelah itu, ditambahkan 3  $\mu$ l *RNAse Solution*, dihomogenkan dengan cara membolak-balikkan *microtube* (*swirling*) 2-5 kali. Setelah homogen, diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}C$  selama 15 menit, didinginkan pada suhu ruang selama 5 menit. Selanjutnya, ditambahkan 200  $\mu$ l *Protein Precipitation Solution*, divortex, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang telah didapat dipindah pada *microtube* 1,5 ml dan ditambahkan 600  $\mu$ l isopropanol, kemudian di *swirling* dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Pellet yang didapatkan ditambah 600  $\mu$ l ethanol 70%, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Pellet yang dihasilkan diambil dan dikeringkan selama 3 menit, pada pellet tersebut ditambahkan 100  $\mu$ l *DNA Rehydration Solution* dan diinkubasi pada suhu  $65^{\circ}C$  selama 1 jam. DNA selanjutnya disimpan pada suhu  $20^{\circ}C$ .

## Analisis Polymerase chain reaction (PCR)

Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan *KAPA Master Mix* yang komposisinya terdiri dari *Taq DNA Polimerase*, Magnesium chloride, 2 kali konsentrasi reaksi buffer dan nukleotida (dATP, dCTP, dGTP, dTTP masing-masing 0,4 mM). Dalam satu kali reaksi memiliki total volume 25  $\mu$ l dengan larutan yang terdiri dari *Roche Master Mix* 10  $\mu$ l, masing-masing primer (*forward* dan *reverse*) 1  $\mu$ l, template genom 2  $\mu$ l dan ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ l. Untuk mengetahui keberadaan gen target *SoSPS1* dan gen *SoSUT1* dari genom tanaman PRG maka dilakukan analisis PCR menggunakan primer *nptII* F/R dengan sekuen sebagai berikut: primer *nptII* (*the neomycin phosphotransferaseII gene*)-F (5'-GTC ATC TCA CCT TGC TCC TGCC-3'), primer *nptII*-R (5'-GTC GCT TGG TCG GTC ATT TCG-3') dengan ukuran 550 bp dan primer *hptII* (*the hygromycin phosphotransferaseII gene*)-F (5'- CCG CAA GGA ATC GGT CAA TA -3'), primer *hptII*-R (5'- CCC AAG CTG CAT CAT CGA AA -3') dengan ukuran 470 bp. DNA hasil PCR kemudian dianalisis dengan elektroforesis pada 1% gel agarosa. Marker DNA yang digunakan adalah marker 1 Kb *Ladder* sebanyak 3  $\mu$ l untuk melihat ukuran pita DNA yang telah teramplifikasi. Hasil elektroforesis dilihat dan didokumentasikan menggunakan *geldoc*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Perbanyak *Plantlet* Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) Overekspresi Gen *SoSPS1* Dan *SoSUT1* Secara *In Vitro*

Tanaman tebu PRG yang tersisa sebanyak 5 *event* kemudian diperbanyak melalui mikropropagasi sebagai persiapan untuk ditanam pada media seleksi. Perbanyak dilakukan menggunakan sumber eksplan dari tunas apikal dan tunas lateral pada media perbanyak yang terdiri dari MS + Glutamin 100 ppm

Tunas apikal memiliki kemampuan meristematik yang lebih cepat jika dibandingkan dengan tunas lateral akan tetapi penggunaan tunas lateral lebih efisien daripada tunas apikal dikarenakan jumlah tunas lateral dalam satu tanaman lebih banyak dibandingkan tunas apikal. Satu tanaman hanya memiliki satu tunas apikal saja, oleh karena itu untuk perbanyak dengan tunas apikal dibutuhkan tanaman dalam jumlah yang banyak pula sehingga hal ini menjadi tidak efisien [6]. *Plantlet* yang telah diperbanyak selanjutnya akan ditumbuhkan pada media seleksi.

Tabel 2. Jumlah *plantlet* tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* dan *SoSPS1* yang telah diperbanyak pada media MS + Glutamin 100 ppm

Event	Jumlah Tunas yang ditanam		Tunas yang tumbuh		$\Sigma$ <i>Plantlet</i> yang dihasilkan
	Tunas Apikal	Tunas Lateral	Tunas Apikal	Tunas Lateral	
3.2A	1	5	0	3	135
3.2B	1	5	0	3	128
2.6B	1	5	0	2	135
3,4	1	5	1	4	140
2.12B	1	5	0	3	100

### Seleksi *Plantlet* Tanaman Tebu PRG Overekspresi Gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* Pada Media yang Mengandung Antibiotik.

*Plantlet* yang telah diperbanyak secara *in vitro*  $\pm 50$  *plantlet* anakan kemudian ditumbuhkan pada media seleksi dengan antibiotik higromisin dan kanamisin. Penggunaan kedua antibiotik ini berfungsi sebagai *selectable marker* sesuai dengan plasmid yang diinsersikan dalam tanaman [7]. Dalam penelitian ini tidak semua *plantlet* mampu lolos dalam media seleksi 1,2 dan 3. Antibiotik kanamisin dapat membuat organ tanaman yang tidak transforman menjadi etiolasi dan klorosis sehingga menyebabkan kematian pada tanaman [8]. Etiolasi dan klorosis tersebut disebabkan oleh biogenesis kloroplas terganggu karena antibiotik kanamisin memiliki kemampuan untuk menghambat sintesis protein dengan cara mengganggu proses translasi mRNA [9].

Penggunaan higromisin dapat menghambat pertumbuhan tanaman dengan menghambat proses sintesis protein yaitu pada proses translokasi tRNA dan mRNA dengan berikatan dengan faktor elongasi. Sehingga menyebabkan jaringan tanaman mengalami gejala *browning* dan mati [10].

Berikut Hasil skrining tebu PRG overekspresi ganda gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* dan *wildtype* menggunakan antibiotik kanamisin dan higromisin.

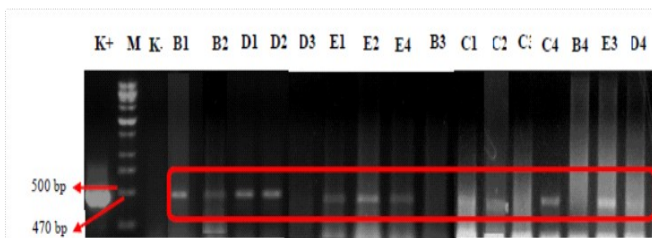
Tabel 3. Jumlah dan presentase *plantlet* tebu PRG overekspresi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* yang lolos seleksi

Event	Σ Tan. Awal	Tan. Seleksi 1	% Tan. Hidup	Seleksi 2	% Tan. Hidup	Seleksi 3	% Tan. Hidup
<i>Wildtype</i>	50	50	100	28	56	0	0
3.4	50	50	100	18	36	5	27,8
3.2A	50	50	100	20	40	8	40
3.2B	50	50	100	35	70	9	25,7
2.6B	50	50	100	28	56	10	35,7
2.12B	50	50	100	13	26	6	46,2
Erata-rata	50	50	100	23,7	47,3	6,3	29,2

Hasil seleksi dapat mengindikasikan bahwa *plantlet* tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* dan *SoSPS1* hasil transformasi masih bersifat heterogen. Hal ini dapat dilihat dari hasil seleksi yakni masih ada *plantlet* yang hidup dan tahan dalam media seleksi dan *plantlet* yang tidak tahan menunjukkan gejala albino dalam media seleksi. *Plantlet* yang lolos selanjutnya dianalisis lebih lanjut untuk mengetahui keberadaan gen target melalui analisis PCR. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro* menjadi berlipat ganda. *Plantlet* yang positif transforman selanjutnya akan diperbanyak secara *in vitro*.

**Konfirmasi Keberadaan Gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* pada *Plantlet* Tebu PRG Overekspresi Gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* dengan Analisis PCR Setelah Lolos Seleksi Secara *In Vitro***

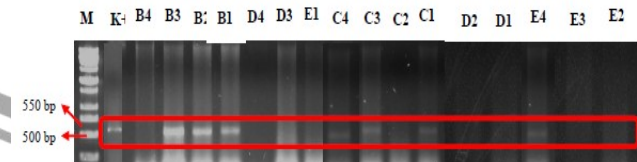
*Plantlet* yang lolos seleksi kanamisin dan higromisin pada tahap sebelumnya akan dikonfirmasi keberadaan gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* menggunakan analisis PCR. Hasil analisis DNA tampak pada gambar di bawah ini :



Gambar 1. Hasil elektroforesis 1% gel agarose DNA 5 event Tebu PRG Gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* dengan pasangan primer *hptII*-

1F/1R dan *template* sampel DNA genom *plantlet* tebu. M: Marker, K+: DNA plasmid pAct, K- : *plantlet* kontrol (*wildtype*), B : event 3.2B, C : event 2.6B, D : event 3.4, E : event 2.12B.

Pada Gambar 1. *plantlet* tebu PRG *SoSPS1* dan *SoSUT1* menunjukkan bahwa 11 *plantlet* dari 16 *plantlet* yakni event 3.2B (B1 dan B2), event 3.4 (D1 dan D2), event 2.12B (E1- E4), event 2.6B ( C1, C2 dan C4) terdapat pita / band pada ukuran 470 bp sesuai dengan kontrol positif sedangkan 6 *plantlet* yang tidak muncul pita/ band meskipun telah lolos dari seleksi ketahanan terhadap antibiotik.



Gambar 2. Hasil elektroforesis 1% gel agarose DNA 5 event Tebu PRG Gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* dengan pasangan primer *nptII*-1F/1R dan *template* sampel DNA genom *plantlet* tebu. M: Marker, K- : *plantlet* kontrol (*wildtype*). B : event 3.2B, C : event 2.6B, D : event 3.4, E : event 2.12B

Berdasarkan hasil PCR Gambar 2. menunjukkan bahwa 7 *plantlet* dari 16 *plantlet* yakni *plantlet* event 3.2B (B1-B3), event 2.6B (C1, C3 dan C4) dan event 2.12B dengan kode E4 terdapat pita / band pada ukuran 550 bp sesuai dengan pita / band dari konstruk plasmid *pCL4-SoSPS1*. Sedangkan 9 *plantlet* lainnya tidak muncul pita / band yang diharapkan.

Secara umum hasil analisis PCR menunjukkan bahwa terdapat 5 *plantlet* yakni event 3.2B (B1 dan B2), event 2.6B (C1 dan C4) dan , event 2.12B (E4) yang memiliki pita / band sesuai dengan pita/ band *npt II* dan *hpt II* sehingga keberadaan fragment DNA *hptII* sebesar 470 bp dan DNA *nptII* sebesar 550 bp hasil PCR menunjukkan terintegrasinya konstruk plasmid pada genom tebu PRG sehingga dapat dikatakan sebagai tanaman tebu PRG overekspresi ganda gen *SoSUT1* dan gen *SoSPS1*.

Pita/band DNA yang tidak muncul saat analisis PCR pada beberapa event tebu PRG akibat dari gen target yang diinsersikan belum stabil pada genom tanaman. Adapun penyebab lainnya yakni adanya fenomena *escape*. Fenomena tersebut mengakibatkan jaringan pada tanaman non transforman mampu bertahan saat terpapar antibiotik dikarenakan adanya perlindungan oleh sel transforman (Amirhusin, 2004). Berdasarkan hasil yang diperoleh dari perhitungan jumlah *plantlet* yang stabil dibagi total keseluruhan *plantlet* yang lolos seleksi dikali dengan 100% maka presentase stabilitas genetik dari *plantlet* tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* dan gen *SoSPS1* yakni 13,2 %.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* generasi kedua dari 5 event yang telah lolos seleksi antibiotik kanamisin dan higromisin pada seleksi 1 sebanyak 50 *plantlet* (100%), pada seleksi 2 sebanyak 23,7 *plantlet* (47,3%) dan pada seleksi 3 sebanyak 6,3 *plantlet* (29,2%). Tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* generasi kedua yang telah stabil sebanyak 5 *plantlet* yakni event 3.2B (B1 dan B2), event 2.6B (C1 dan C4) dan event 2.12B (E4), hal ini dibuktikan dengan keberadaan pita / band *hptII* ukuran 470 bp dan *nptII* dengan ukuran 550 bp melalui analisis PCR.

### Saran

Dalam perbanyakannya menggunakan eksplan tunas apikal dan lateral harus diperhatikan proses sterilisasinya untuk mengurangi kontaminasi, selain itu juga perlu dilakukan analisis lebih lanjut kandungan sukrosa, protein, stabilitas lanjutan pada *plantlet* tebu PRG overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* yang telah stabil secara genetik.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Masterplan Percepatan dan Perkembangan Pembangunan Ekonomi Indonesia (MP3EI) dan PT. Perkebunan Nusantara XI yang telah memberikan dukungan finansial atas nama Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.,Sc. Tahun 2014

### DAFTAR PUSTAKA

- [1] Sugiharto, B., Slameto dan Dewanti, P. 2008. Peningkatan Produksi Gula Melalui Overekspresi Gen SPS dan SUT Pada Tanaman Tebu. Laporan Penelitian Hibah Kompetensi. *Unpublish*.
- [2] Dewi, I. 2001. *Evaluasi Tanaman Padi Transgenik Balitbio terhadap Hama Penggerek Batang*. Jakarta: Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian.
- [3] Sutini. 2008. *Analisis Stabilitas Inseri dan Ekspresi Fenotipik Gen Partenokarpi DefH9-iaaM pada T3 Tanaman Tomat (Lycopersicon esculentum Mill.) Transgenik Asal Varietas Opal*. FMIPA UI
- [4] Tarique, H.M., Mannan, A., Bhuiyan, S.R dan Rahman, M. 2010. Micropopagation of sugarcane through leaf sheath culture. *Int. J. Sustain. Crop Prod.* 5 (2) : 13-15.
- [5] Ningtyas, Rinda M. 2013. Transformasi Gen *Sosps1* Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. Var. B1) Overekspresi Gen *Sosut1* Event 2 Menggunakan *Agrobacterium Tumefaciens*. Skripsi (tidak dipublikasikan). Jember: Universitas Jember

- [6] Dwinianti, Edia. F. 2013. *Transformasi Gen SoSUTI Pada Tanaman Tebu (Saccharum Officinarum L Var. B1) Menggunakan Agrobacterium Tumefaciens Strain Gv 3101 Dan Eksplan Pangkal Tunas Tebu In Vitro*. Skripsi. Jember : Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember
- [7] Carrer, H., T. N. Hoeckenberry, Z. Svab dan P. Maliga. 1993. Kanamycin Resistance as a Selectable Marker for Plastid Transformation in Tobacco. *Mol Gen Genet.* Vol. 241: 49 - 56.
- [8] Duan, H., X. Ding, J. Song, Z. Duan, Y. Zhou dan C. Zhou. 2009. Effects of Kanamycin on Growth and Development of *Arabidopsis thaliana* Seedling, Cotyledon and Leaf. *Pakistan Journal. Bot.* Vol. 41(4): 1611 - 1618.
- [9] Nap, P. J., J. Bijvoet dan W. J. Stiekema. 1992. Biosafety of Kanamycin-Resistant Transgenic Plants. *Transgenic Research.* Vol. 1: 239 - 249.
- [10] Gritz, L. and Davies J. 1983. Plasmid-encoded Hygromycin B Resistance: The Sequence of Hygromycin B Phosphotransferase Gene and Its Expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* Vol. 25 (2-3): 179-188.