



**SKRINING STABILITAS GENETIK TANAMAN TEBU
(*Saccharum officinarum* L. var. Bulu Lawang) PRODUK
REKAYASA GENETIK (PRG) OVEREKSPRESI GEN *SoSPS1*
DAN *SoSUT1* MENGGUNAKAN KULTUR KALUS**

SKRIPSI

Oleh

Femin Damayanti

NIM 141810401012

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER**

2018



**SKRINING STABILITAS GENETIK TANAMAN TEBU
(*Saccharum officinarum* L. var. Bulu Lawang) PRODUK
REKAYASA GENETIK (PRG) OVEREKSPRESI GEN *SoSPS1*
DAN *SoSUT1* MENGGUNAKAN KULTUR KALUS**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

Femin Damayanti

141810401012

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER**

2018

PERSEMBAHAN

Dengan menyebut asma Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, skripsi ini penulis persembahkan kepada:

1. Ibunda Puji Astutik, Ayahanda Dardiri tercinta, kedua adikku Galuh Kusuma Wardani dan Erli Agustin terima kasih atas segala limpahan do'a, kasih sayang, materi, pengorbanan dan dukungan tanpa henti, serta kesabaran dalam mendidik;
2. keluarga besar tercinta yang telah memberi do'a, motivasi dan dukungan;
3. guru-guruku sejak Taman Kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi yang telah mendidik dan membagikan ilmunya;
4. Almamater Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

“Boleh jadi kamu membenci sesuatu, padahal ia amat baik bagi kamu. Dan boleh jadi kamu mencintai sesuatu, padahal ia amat buruk bagi kamu. Allah Maha Mengetahui sedangkan kamu tidak mengetahui”

(QS. Al-Baqarah 216)*

“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan, maka apabila kamu telah selesai (dari suatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain dan hanya kepada Allah lah hendaknya kamu berharap”

(QS. Al-Insyirah: 6-8)*

* Kementerian Agama Republik Indonesia, Yayasan Penyelenggara Penterjemah/ Pentafsir Al-Qur'an. 1971. *Mushaf Al-Qur'an dan Terjemahannya*. Jakarta: Nur Publishing.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Femin Damayanti

NIM : 141810401012

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Skrining Stabilitas Genetik Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. var. Bulu Lawang) Produk Rekayasa Genetik (PRG) Overekspresi Gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* Menggunakan Kultur Kalus” adalah benar-benar hasil karya ilmiah sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini didanai oleh Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M. Agr.Sc dan dengan sumber dana mandiri yang tidak dapat dipublikasikan tanpa ijin dari pihak yang mendanai. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 27 Juli 2018

Yang menyatakan,

Femin Damayanti

NIM 141810401012

SKRIPSI

**SKRINING STABILITAS GENETIK TANAMAN TEBU
(*Saccharum officinarum* L. var. BL) PRODUK REKAYASA
GENETIK (PRG) OVEREKSPRESI GEN *SoSPS1* DAN *SoSUT1*
MENGUNAKAN KULTUR KALUS**

Oleh

Femin Damayanti
NIM 141810401012

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M. Agr.Sc.

Dosen Pembimbing Anggota : Dra. Dwi Setyati, M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul **“Skrining Stabilitas Genetik Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. var. Bulu Lawang) Produk Rekayasa Genetik (PRG) Overekspresi Gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* Menggunakan Kultur Kalus”**, karya Femin Damayanti telah diuji dan disahkan pada:

hari :
tanggal :
tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas
Jember

Tim Penguji,

Ketua,

Anggota I,

Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc.
NIP. 195510221982121001

Dra. Dwi Setyati, M.Si.
NIP. 196404171991032001

Anggota II,

Anggota III,

Drs. Rudju Winarsa, M.Kes.
NIP. 196008161989021001

Tri Ratnasari, S.Si., M. Si.
NRP. 760016770

Mengesahkan
Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D.
NIP. 196102041987111001

RINGKASAN

Skrining Stabilitas Genetik Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. var. Bulu Lawang) Produk Rekayasa Genetik (PRG) Overekspresi Gen *SoSPSI* dan *SoSUT1* Menggunakan Kultur Kalus; Femin Damayanti, 141810401012; 2018: 48 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L. var. Bulu Lawang) produk rekayasa genetik (PRG) overekspresi gen *SoSPSI* dirancang dengan memasukkan gen *SoSPSI* kedalam genom tanaman dengan vector *Agrobacterium tumefaciens* yang telah disisipi plasmid PCL4 yang dalam konstruksinya mengandung gen *nptII* yang menyandikan ketahanan terhadap antibiotik kanamisin. Tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* ditransformasikan ke tanaman dengan plasmid pAct yang dalam konstruksinya mengandung gen *hptII* yang menyandikan ketahanan terhadap antibiotik higromisin. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa tanaman tebu hasil transformasi masih bersifat heterogen. Gen yang diinsersikan masih belum tentu dapat ditemukan pada semua sel tanaman sehingga perlu dilakukan skrining pada generasi selanjutnya untuk menyeleksi sel yang transforman dari sel yang non transforman menggunakan kanamisin dan higromisin.

Tebu memiliki biji dengan viabilitas rendah sehingga sulit berkecambah. Oleh karena itu, perbanyakan tebu umumnya dilakukan dengan bagal atau stek batang karena mempunyai tunas apikal dan tunas lateral. Skrining menggunakan eksplan tunas apikal dan tunas lateral pernah dilakukan dan diperoleh persentase keberhasilan sebesar 29,2%. Upaya perbanyakan lain yaitu menggunakan kultur kalus. Kultur kalus digunakan untuk memperoleh planlet dengan jumlah yang banyak, seragam dan membutuhkan waktu yang lebih singkat sehingga skrining menggunakan kultur kalus diharapkan lebih efektif dan menghasilkan planlet lolos skrining yang lebih banyak dibandingkan skrining dengan tunas apikal dan tunas lateral. Sebelum itu, perlu dilakukan optimasi metode skrining

menggunakan kultur kalus yang paling efektif dengan 3 perlakuan berdasarkan perbedaan waktu mulainya pemberian antibiotik pada media pengkalusan yaitu pemberian antibiotik dimulai dari awal media induksi (perlakuan 1), pemberian antibiotik dimulai dari pertengahan media induksi (perlakuan 2) dan pemberian antibiotik dimulai dari media proliferasi (perlakuan 3).

Penelitian dilakukan dengan tahap tahap sebagai berikut yaitu pengambilan eksplan. eksplan berupa *spindle leaf* tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* yang meliputi 9 event yaitu D5, D10, D12, Su2, Su3, Su5, Sp2, Sp3 dan Sp4. Ekplan ditanam pada media induksi kemudian di skrining menggunakan 3 perlakuan diatas. Skrining dilakukan 5 kali dengan interval waktu 3 minggu. Media pengkalusan berupa media induksi (MS+ 2,4D 3 ppm+ CH 300 ppm) selama 6 minggu kemudian dilanjutkan ke media proliferasi (MS+CH 300 ppm+ Prolin 560 ppm+ 2,4D 1 ppm) selama 6 minggu dan dilanjutkan pada media regenerasi (MS+ Glutamin 100 ppm) selama 6 minggu. Skrining dilakukan dengan penambahan antibiotik kanamisin 50 ppm dan higromisin 20 ppm pada media pengkalusan.

Hasil penelitian diperoleh bahwa metode skrining tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* menggunakan kultur kalus lebih efektif di mulai pada media proliferasi (perlakuan 3) dengan persentase keberhasilan 32,4% dan jumlah planlet yang dihasilkan 72 planlet. Sedangkan skrining yang dimulai dari pertengahan media induksi (perlakuan 2) memiliki persentase keberhasilan lebih rendah yaitu 0,4% dan jumlah planlet yang dihasilkan 1 planlet. Skrining yang dimulai di awal media induksi memiliki tingkat keberhasilan 0 % atau semua eksplan mati.

PRAKATA

Puji Syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul “*Skrining Stabilitas Genetik Tanaman Tebu (Saccharum officinarum L. var. Bulu Lawang) Produk Rekayasa Genetik (PRG) Overekspresi Gen SoSPS1 dan SoSUT1 Menggunakan Kultur Kalus*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dra. Dwi Setyati, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran serta perhatiannya guna memberikan bimbingan dan pengarahan demi terselesaikannya penulisan skripsi ini;
2. Drs. Rudju Winarsa, M.Kes. selaku Dosen Penguji I dan Tri Ratnasari, S.Si., M. Si., selaku Dosen Penguji II, yang telah membantu memberikan saran serta kritik dalam penulisan skripsi ini;
3. dosen-dosen Jurusan Biologi yang telah membimbing serta memberikan masukan dan saran selama penulis menjadi mahasiswa;
4. rekan kerja selama penelitian Nafisa Ria, Arina Azzahra, Suwinda Febriani, Suvia Widyaningrum, Nuriah, Rizky mulana, Nurul Mufidhah, Retno Apriliani, Weny Nailul, Intan Malika, Hika, Dayat, Irawati, Ling-ling, Ahmil Soleh dan Bagus Sudrajat terima kasih atas kerjasamanya, ilmu yang telah dibagikan serta do'a dan dukungannya;
5. sahabat-sahabatku Khilia Nisa, Anisatul Mukaromah, Arina Amalia Putri, Azizah, Fisel Koyasa, Masrurotul Hasanah, Robby Septiawan Nugroho, terima kasih atas segala bantuan, do'a, motivasi, masukan, serta semangat yang kalian berikan;

6. teman-teman tercinta angkatan 2014 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu terima kasih atas segala bantuan, do'a, masukan serta semangat yang kalian berikan kepada penulis, terima kasih untuk kalian yang rela mendengarkan keluh kesah penulis selama penyusunan skripsi;
7. semua pihak yang telah memberikan sumbangan tenaga, semangat dan pikiran yang tidak dapat disebutkan satu persatu oleh penulis dalam kelancaran penulisan skripsi ini.

Penulis juga menerima kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 27 Juli 2018

Penulis

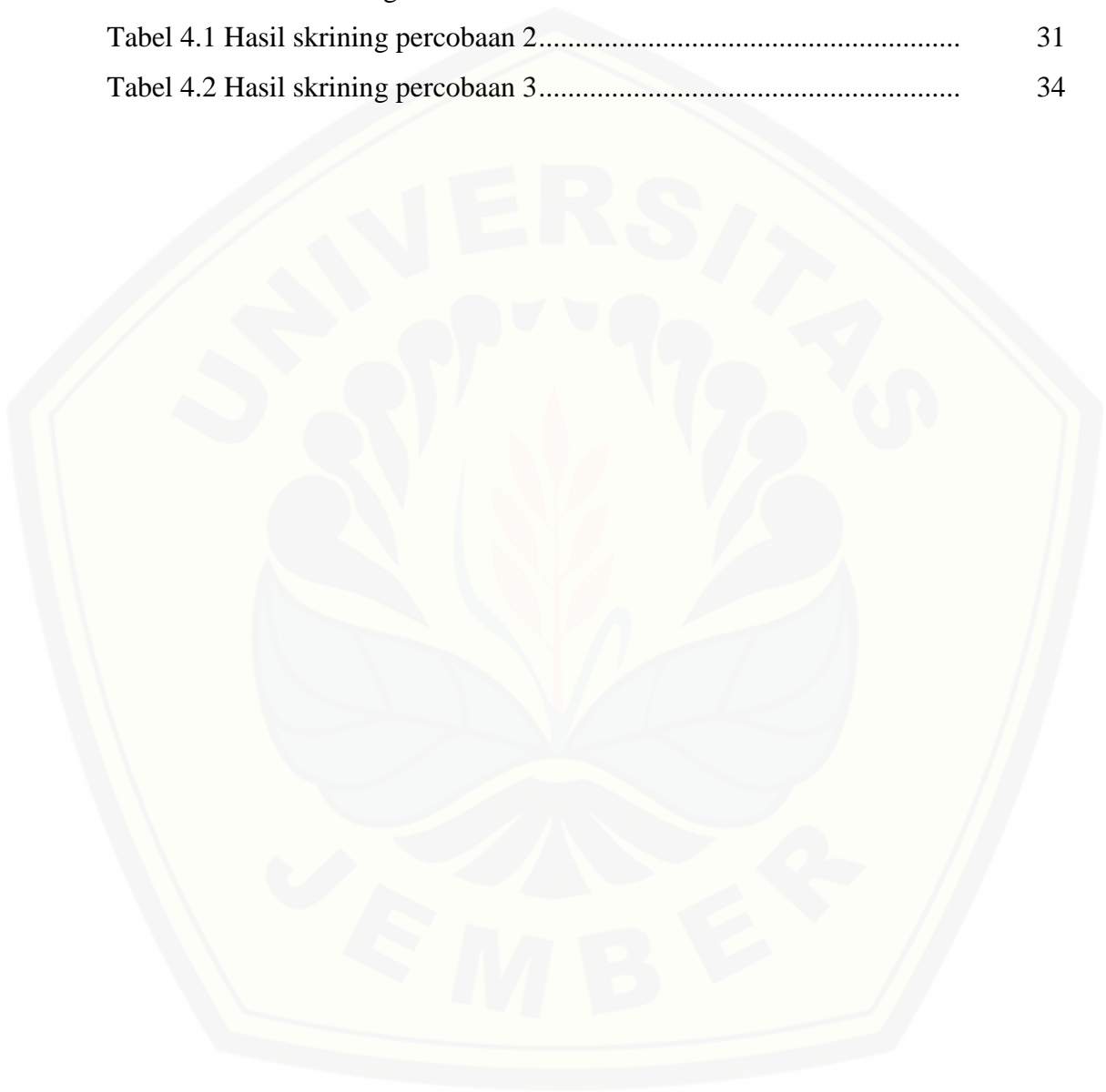
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Biologi Tanaman Tebu	4
2.1.1 Klasifikasi dan Deskripsi Tanaman Tebu	4
2.1.2 Morfologi Tanaman Tebu	4
2.2 Perbanyakkan Tanaman Tebu	6
2.3 Sintesis Sukrosa pada Tanaman	6
2.4 Transportasi Sukrosa pada Tanaman	8
2.5 Tanaman Produk Rekayasa Genetik (PRG) Overekspresi Gen <i>SoSUT1</i> dan <i>SoSPS1</i>	10

2.6 Skrining Stabilitas Genetik Tanaman Produk Rekayasa Genetik (PRG) Overekspresi Gen <i>SoSUT1</i> dan <i>SoSPS</i>	11
2.7 Kultur Jaringan dan Embriogenesis Somatik.....	12
BAB 3. METODE PENELITIAN	19
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	19
3.2 Alat dan Bahan	19
3.2.1 Alat	19
3.2.2 Bahan	19
3.3 Alur Penelitian	20
3.4 Prosedur Penelitian	21
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	24
4.1 Induksi Kalus dari <i>Spindle Leaf</i> Tebu Produk Rekayasa Genetik (PRG) Overekspresi Gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i>	24
4.2 Efek Pemberian Antibiotik Kanamisin dan Higromisin dimulai pada Awal Media Induksi Kalus Tebu PRG Overekspresi Gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i> (Perlakuan 1)	25
4.3 Efek Pemberian Antibiotik Kanamisin dan Higromisin dimulai pada Pertengahan Media Induksi Kalus Tebu PRG Overekspresi Gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i> (Perlakuan 2).....	28
4.4 Efek Pemberian Antibiotik Kanamisin dan Higromisin dimulai pada Media Proliferasi Kalus Tebu PRG Overekspresi Gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i> (Perlakuan 3).....	32
4.5 <i>Chimera</i>	36
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	38
5.1 Kesimpulan.....	38
5.2 Saran.....	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	48

DAFTAR TABEL

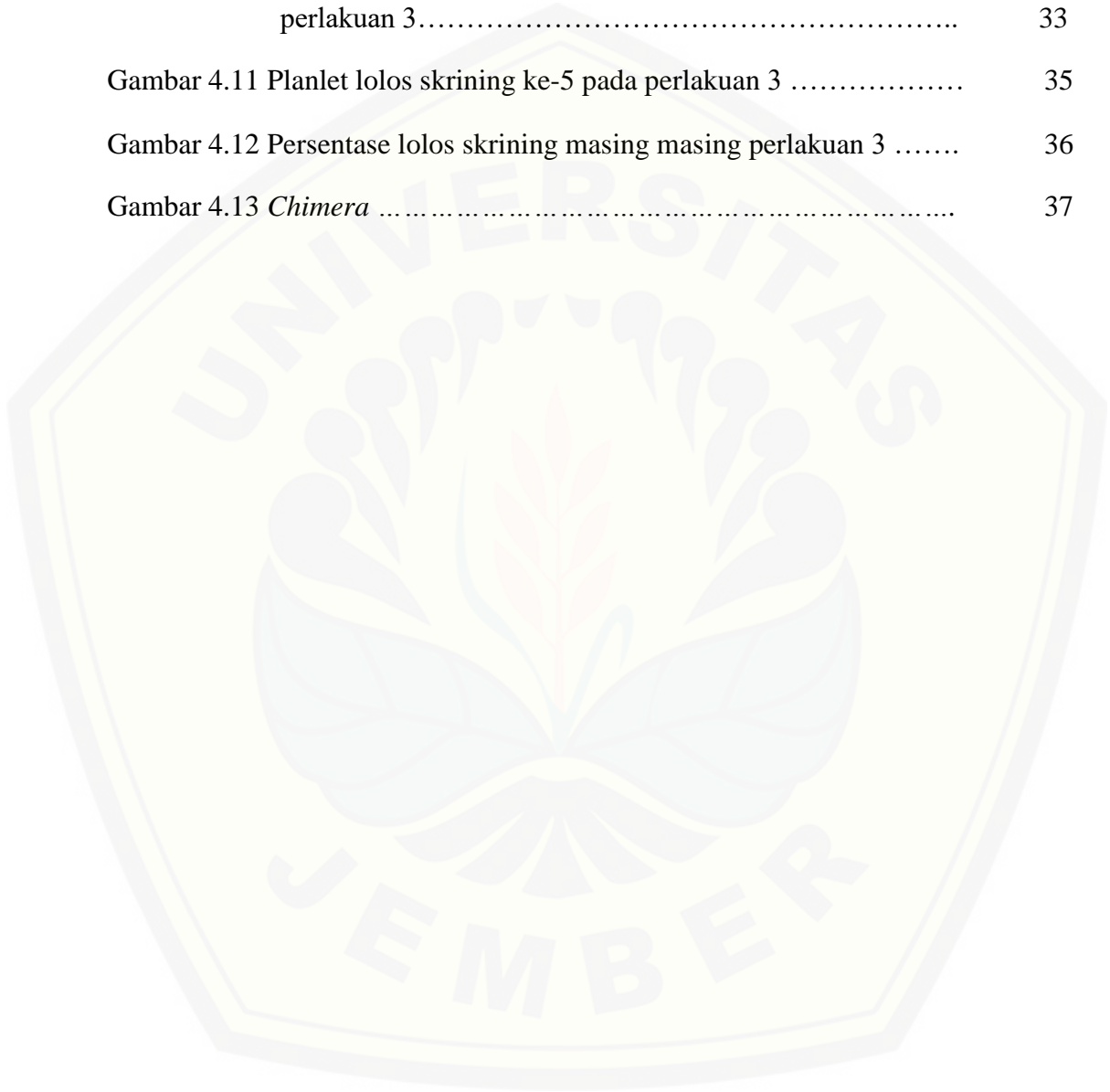
	Halaman
Tabel 3.1 Tabel Skrining.....	22
Tabel 4.1 Hasil skrining percobaan 2.....	31
Tabel 4.2 Hasil skrining percobaan 3.....	34



DAFTAR GAMBAR

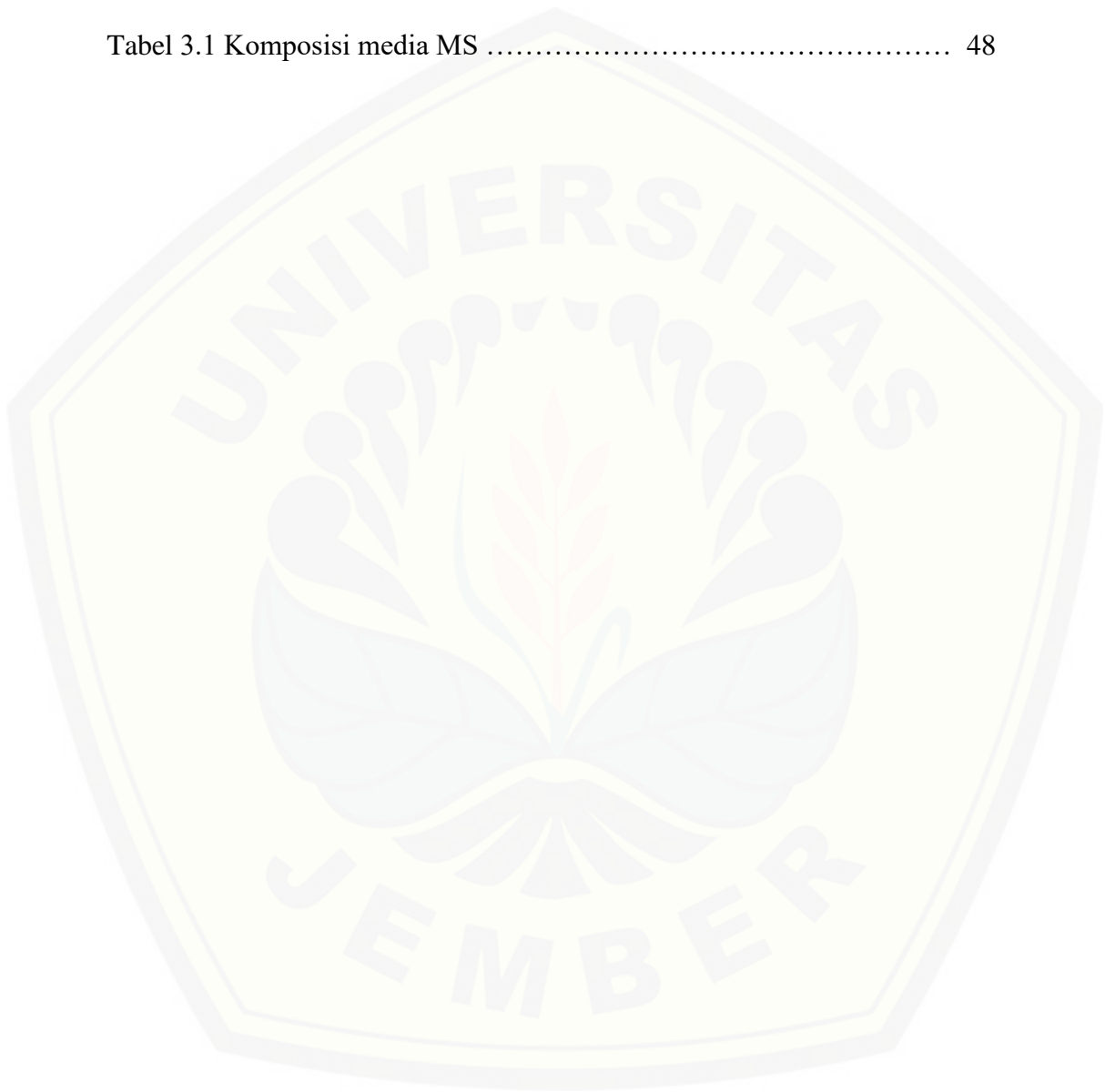
	Halaman
Gambar 2.1 Morfologi tebu varietas Bulu Lawang	5
Gambar 2.2 Biosintesis sukrosa pada tanaman	7
Gambar 2.3 Transportasi sukrosa	9
Gambar 2.4 Peta plasmid pAct- <i>SoSUTI</i>	11
Gambar 2.5 Peta plasmid pCl4- <i>SoSPSI</i>	11
Gambar 2.6 <i>Spindle leaf</i>	14
Gambar 2.7 Morfologi kalus embriogenik dan non embriogenik	15
Gambar 2.8 Histologi kalus embriogenik dan non embriogenik	15
Gambar 2.9 Massa proembrionik kalus nodular	16
Gambar 2.10 Struktur kalus globular, skutelar dan koleoptilar	18
Gambar 3.1 Alur penelitian	20
Gambar 4.1 Pucukan dan <i>spindle leaf</i>	24
Gambar 4.2 <i>Spindle leaf</i> ditanam pada media induksi dengan antibiotik kanamisin dan higromisin selama 3 minggu	26
Gambar 4.3 <i>Spindle leaf wildtype</i> ditanam pada media induksi dengan antibiotik kanamisin dan higromisin selama 3 minggu	27
Gambar 4.4 <i>Spindle leaf</i> setelah ditanam pada media induksi tanpa antibiotik kanamisin dan higromisin selama 3 minggu.....	28
Gambar 4.5 Kalus dan planlet tebu overekspresi <i>SoSPSI</i> dengan penambahan antibiotik kanamisin.....	29
Gambar 4.6 Kalus dan planlet tebu overekspresi <i>SoSUTI</i> dengan antibiotik higromisin	29
Gambar 4.7 Kalus tebu <i>wildtype</i> dengan antibiotik kanamisin dan higromisin	30

Gambar 4.8 Proses skrining event SU3 perlakuan 2	32
Gambar 4.9 <i>Spindle leaf</i> setelah ditanam pada media tanpa antibiotik selama 6 minggu	33
Gambar 4.10 Perbandingan kalus wildtype dan PRG pada skrining perlakuan 3.....	33
Gambar 4.11 Planlet lolos skrining ke-5 pada perlakuan 3	35
Gambar 4.12 Persentase lolos skrining masing masing perlakuan 3	36
Gambar 4.13 <i>Chimera</i>	37



DAFTAR LAMPIRAN

	halaman
Tabel 3.1 Komposisi media MS	48



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Produktivitas gula nasional dalam 15 tahun terakhir menunjukkan kecenderungan kinerja yang merosot. Hal ini terlihat dari beberapa indikator, diantaranya adalah menurunnya produksi gula sampai 45 % dan mutu rendemen tanaman tebu sebesar 10 %. Keadaan ini semakin diperburuk dengan menurunnya luas areal tebu sebesar 37 % (Mulyono, 2011). Kemampuan produksi gula Indonesia hanya sekitar 2,1 juta ton gula kristal putih per tahun. Angka ini belum mampu memenuhi kebutuhan gula dalam negeri yang hampir berada di angka 3 juta ton/tahun (Ernawati & Suryani, 2013). Guna memenuhi kebutuhan dalam negeri maka pemerintah melakukan impor gula. Periode tahun 1980- 2015, impor gula Indonesia meningkat rata-rata 163,09 % pertahun atau setara dengan 63.889 ton per tahun (Kementerian Pertanian, 2016).

Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan produksi gula nasional yakni dengan meningkatkan rendemen gula tanaman tebu salah satunya melalui teknik rekayasa genetik pada tanaman tebu. Seiring dengan kemajuan bioteknologi, saat ini telah didapatkan tanaman tebu produk rekayasa genetik (PRG). Salah satunya adalah tanaman tebu produk rekayasa genetik (PRG) overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI*. Tanaman tersebut merupakan hasil transformasi dengan menyisipkan gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* pada tanaman tebu. Pada dasarnya, tanaman tebu sudah memiliki gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* endogen. Transformasi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* diharapkan meningkatkan aktivitas enzim *Sucrose Phosphate Syntase* (SPS) dan *Sucrose Transporter* (SUT) sehingga terjadi peningkatan biosintesis sukrosa dan translokasi sukrosa dari *source* ke *sink* dan diperoleh tanaman tebu yang memiliki rendemen gula yang tinggi (Sugiharto *et al.*, 2008).

Keberhasilan suatu proses transfer gen dalam pembuatan tanaman transgenik tercapai jika diperoleh tanaman transgenik yang stabil, yaitu gen yang diinsersikan telah terintegrasi ke dalam genom dan diwariskan ke generasi

berikutnya (Christou *et al.*, 1992). Beberapa penelitian menyebutkan bahwa tanaman tebu hasil transformasi masih bersifat heterogen. Gen yang diinsersikan masih belum tentu dapat ditemukan pada semua sel tanaman (Dewi, 2001). Seperti penelitian yang dilakukan Mufithah *et al.*, (2015) menyebutkan stabilitas genetik tebu overekspresi gen *SoSUT1* pada generasi kedua tidak mencapai 100 % namun hanya 92,5 %.

Stabilitas genetik pada tanaman transgenik yang mampu melakukan persilangan sendiri dapat dicapai pada turunan ke-4, sedangkan tanaman transgenik yang membutuhkan perantara dalam melakukan penyerbukan akan mencapai kestabilan genetik pada turunan ke-8 (Sutini, 2008). Tarique *et al.*, (2010) menyatakan bahwa untuk melakukan skrining tanaman tebu dengan metode konvensional membutuhkan waktu 10-15 tahun. Hal tersebut karena tanaman tebu termasuk dalam tanaman yang memiliki waktu pembungaan yang lama (Lahay, 2009). Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan dilakukan kultur kalus tebu untuk mendapatkan tanaman dalam jumlah banyak dengan waktu singkat.

Paradisa (2015) menyatakan skrining tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* secara *in vitro* menggunakan eksplan tunas apikal dan lateral memiliki tingkat keberhasilan 29,2% pada skrining ke 3. Kalus merupakan massa sel *amorfo* yang mampu beregenerasi menjadi planlet dalam jumlah banyak (Lakshmanan, 2006) sehingga planlet yang lolos skrining diharapkan diperoleh dalam jumlah banyak sehingga perlu dilakukan optimasi metode skrining untuk memperoleh metode yang sesuai. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui metode skrining paling efektif menggunakan kultur kalus melalui 3 perlakuan berdasarkan perbedaan waktu mulainya pemberian antibiotik pada media pengkalusan yaitu skrining dimulai diawal media induksi, skrining dimulai dipertengahan media induksi dan skrining dimulai dimedia proliferasi.

1.2 Perumusan Masalah

Skринing dengan kultur kalus diharapkan lebih efektif dan menghasilkan planlet lolos krining yang lebih banyak dibandingkan skринing dengan tunas apikal dan tunas lateral. Sebelum itu, perlu dilakukan optimasi metode skринing yang paling efektif menggunakan kultur kalus dengan 3 perlakuan yaitu pemberian antibiotik dimulai dari awal media induksi (perlakuan 1), pemberian antibiotik dimulai dari pertengahan media induksi (perlakuan 2) dan pemberian antibiotik dimulai dari media proliferasi (perlakuan 3). Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu, manakah metode yang paling efektif untuk skринing tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* menggunakan kultur kalus ?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui metode paling efektif untuk skринing tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* menggunakan kultur kalus.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang pengaruh pemberian antibiotik kanamisin dan higromisin pada kultur kalus tanaman tebu produk rekayasa genetik overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* dan dapat memberikan informasi tentang metode skринing dengan kultur kalus yang paling efektif berdasarkan perbedaan waktu mulainya pemberian antibiotik pada media pengkalusan.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Tanaman Tebu

2.1.1 Klasifikasi dan Deskripsi Tanaman Tebu

Klasifikasi dari tumbuhan *Saccharum officinarum* adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Superdivisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Liliopsida
Subkelas : Commelinidae
Ordo : Poales
Famili : Poaceae
Genus : *Saccharum*
Spesies : *Saccharum officinarum* L.

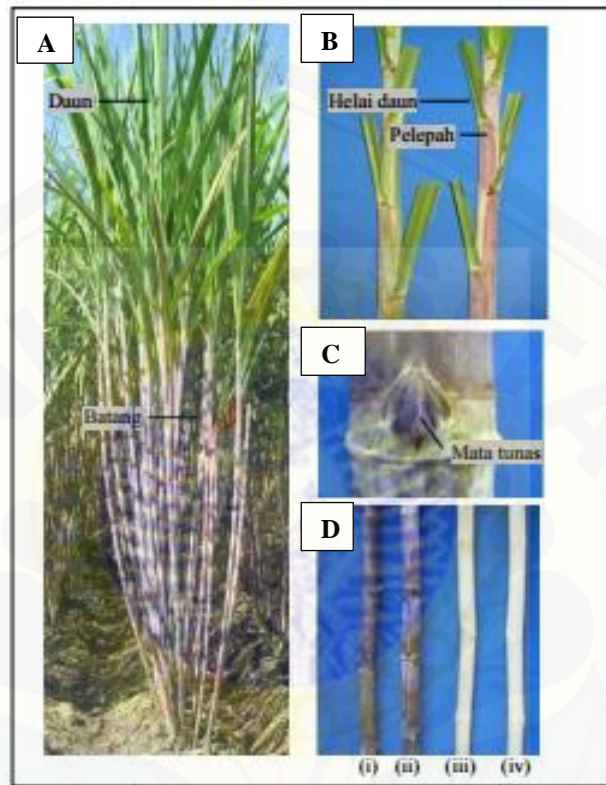
(Plantamor, 2016)

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum*) termasuk tanaman perdu. Tebu merupakan tumbuhan monokotil dari famili rumput-rumputan (*Poaceae*). Batang tanaman tebu memiliki tunas lateral dan pangkal batang yang membentuk rumpun. Tanaman ini memerlukan waktu tanam 11-12 bulan (Kementrian Pertanian, 2014).

2.1.2 Morfologi Tanaman Tebu

Batang tanaman tebu tegak dan beruas-ruas yang dibatasi dengan buku-buku. Pada setiap buku terdapat mata tunas. Diameter batang berkisar 3-5 cm dengan tinggi 2-5 m dan tidak bercabang. Akar tanaman tebu termasuk akar serabut. Daun tebu berbentuk seperti pita, berseling kanan dan kiri, berpelepah seperti daun jagung dan tak bertangkai. Tulang daun sejajar. Bunga tebu berupa malai dengan panjang antara 50-80 cm. Cabang bunga pada tahap pertama berupa

karangan bunga dan pada tahap selanjutnya berupa tandan dengan dua bulir panjang 3-4 mm (Kementrian Pertanian, 2014).



Keterangan Gambar: (a) morfologi tanaman tebu utuh; (b) pelepah, helaian daun dan kedudukan helaian daun pada batang tebu; (c) mata tunas pada batang tebu; (d) i dan ii ruas batang tebu utuh, iii dan iv potongan membujur ruas batang tebu.

Gambar 2.1 Morfologi tebu varietas Bulu Lawang (Sumber: Prabawanti, 2012)

Varietas tebu yang digunakan dalam penelitian ini adalah varietas Bulu Lawang (BL). Tanaman tebu jenis ini memiliki karakter khusus warna batang dominan ungu, arah tumbuh batang tegak, kedudukan nodus datar, bentuk mata tunas bulat dengan bagian terlebar dibawah, warna batang bagian dalam adalah kuning muda, bangun daun berbentuk pita dengan panjang maksimal 157–160 cm dan lebar maksimal 4,8–5,4 cm. Warna permukaan daun bagian atas adalah hijau pupus dan warna permukaan bawah daun lebih pucat, memiliki lapisan lilin yang tebal ($4 \mu\text{m}$), ukuran trikoma panjang ($82\text{--}102 \mu\text{m}$), trikoma lentur dan tidak

mudah patah. Tebu varietas Bulu Lawang dapat tumbuh hingga tinggi 213-260 cm (Prabawanti, 2012). Morfologi tanaman tebu varietas Bulu Lawang dapat dilihat pada Gambar 2.1.

2.2 Perbanyakan Tanaman Tebu

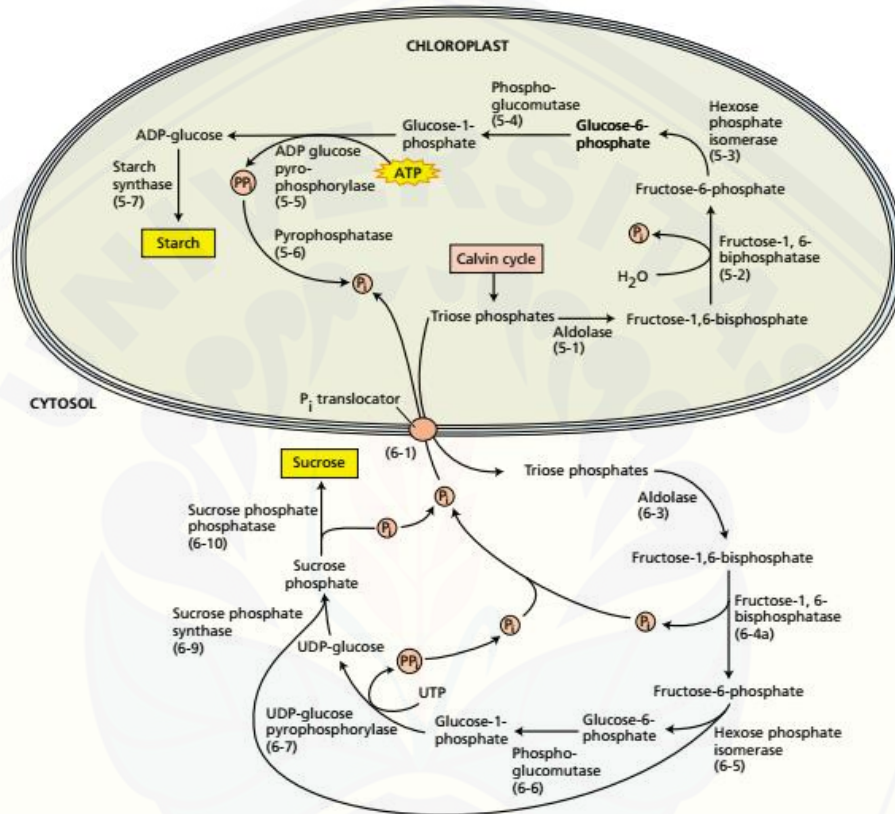
Tebu secara umum, diperbanyak secara vegetatif dan generatif. Perbanyakan generatif jarang digunakan karena berbagai faktor diantaranya prosesnya lambat dan dibutuhkan waktu sekitar 10-15 tahun untuk memperoleh varietas baru (Ramanand *et al.*, 2006). Proses pembungaan tebu merupakan proses rumit, karena tebu berbunga pada malam hari dan penyerbukan silang terjadi menggunakan media angin sedangkan *pollen* tebu hanya mampu bertahan beberapa menit sehingga peluang terjadinya penyerbukan sangat kecil. Apabila penyerbukannya berhasil dibutuhkan waktu 20–25 hari untuk pembentukan dan pematangan biji. Biji tanaman tebu berukuran sangat kecil yaitu sekitar 1 mm sehingga dapat dengan cepat kehilangan viabilitasnya (Lahay, 2009).

Petani lebih banyak menggunakan perbanyakan vegetatif menggunakan stek batang. Bibit tebu diambil dari batang tebu dengan 2-3 mata tunas yang belum tumbuh. Bibit ini disebut juga dengan bibit stek batang/bagal. Selain itu, dapat digunakan bibit stek pucuk/top stek, yaitu bibit yang berasal pucuk batang tebu dengan 2 mata atau lebih (Kementerian Pertanian, 2014). Perbanyakan menggunakan stek ini membutuhkan waktu yang lama. Kekurangan lain yakni berbagai penyakit dapat membuat tebu tersebut memiliki pertumbuhan yang terbatas bahkan mati (Baksha *et al.*, 2003). Oleh karena itu, diperlukan metode perbanyakan vegetatif lain yang lebih efisien salah satunya adalah kultur jaringan.

2.3 Sintesis Sukrosa pada Tanaman

Pada tumbuhan, gula tidak hanya berfungsi sebagai substrat untuk pertumbuhan tetapi berperan juga dalam menginisiasi perubahan ekspresi gen (Verma *et al.*, 2011). Sukrosa merupakan hasil akhir dari proses fotosintesis yang

ditranslokasi dari daun (*source*) ke organ yang membutuhkan (*sink*) seperti batang, buah, akar, bunga dan jaringan meristem (Ward, 2000). Sukrosa memiliki fungsi sebagai penyediaan energi dan kerangka karbon, pengaturan ekspresi gen lainnya, partisi karbon asimilat serta pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Koch, 1996).



Gambar 2.2 Biosintesis sukrosa pada tanaman (Sumber: Taiz & Zeiger, 2002)

Sukrosa disintesis pada sitosol tanaman, Subtrat pembentukan sukrosa adalah *triosa phosphat* yang merupakan produk hasil siklus calvin di kloroplas. *Triosa phosphat* bereaksi dengan enzim aldolase membentuk *fruktosa-1,6-biphosphat* yang kemudian bereaksi dengan enzim *fruktosa-1,6-biohosphate* membentuk *fruktosa-6-phosphate*, sebagian *fruktosa-6-phosphate* akan mengalami reaksi isomerisasi dengan enzim *hexosa phosphate isomerase* membentuk *glukosa-6-phosphate*. *Glukosa-6-phosphate* akan bereaksi dengan enzim *phosphoglukomutase* membentuk *glukosa-1-phosphate*. *Glukosa-1-*

phosphate akan berikatan dengan UTP menjadi UDP-glukosa. Reaksi penggabungan UDP-glukosa dengan *fruktosa-6-phosphate* dikatalisis oleh enzim *sukrosa phosphate synthase* (SPS) membentuk *sukrosa phosphate* yang bereaksi dengan enzim *sukrose phosphate phosphatase* membentuk sukrosa (Taiz & Zeiger, 2002). Biosintesis sukrosa dapat dilihat pada Gambar 2.2.

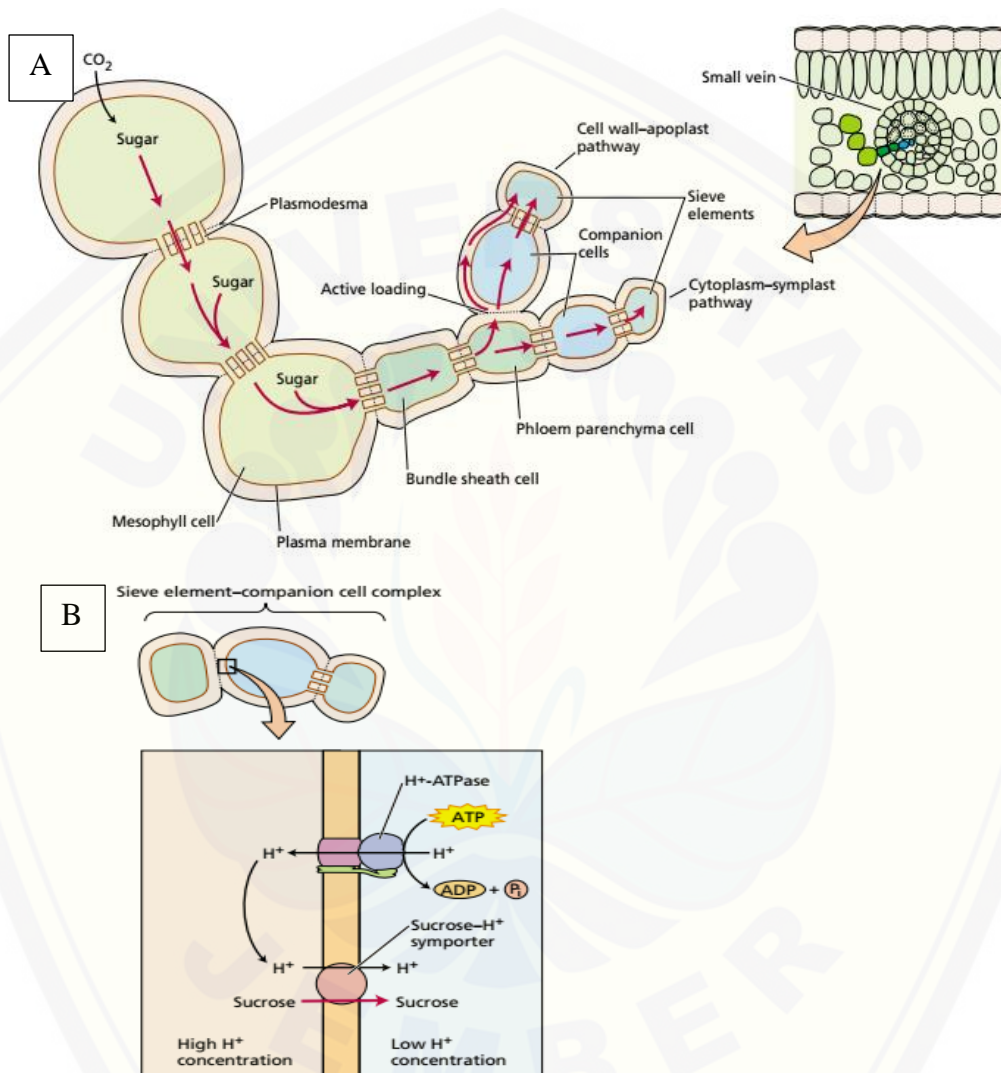
2.4 Transportasi Sukrosa pada Tanaman

Tebu adalah tanaman C4 yang bisa mengakumulasikan sukrosa di batang melebihi 50 % dari berat keringnya. Sukrosa disintesis di sel mesofil daun, dan diangkut secara simplastik ke sel pembuluh berkas pengangkut dan secara apoplas ke sel penggiring floem dengan melibatkan transporter membran. Pada tanaman tebu, jaringan parenkim di batang merupakan tempat penyimpanan sukrosa. Beberapa bukti menunjukkan bahwa zat terlarut dapat bergerak secara simplas dari floem ke sel parenkim penyimpanan (Rae *et al.*, 2004).

Protein SUT terdapat di sel-sel yang mengelilingi pembuluh berkas pengangkut pada daun dan batang termasuk sel parenkim dan sel sklerenchyma berdinding tebal. Meski sel-sel berdinding tebal mungkin hidup, kehadiran suberin di dinding sel dan sambungan *pit-field* yang melimpah menunjukkan bahwa transportasi apoplas ke sel-sel ini terbatas. Hasilnya menunjukkan bahwa transporter ini mungkin berperan dalam pembagian sukrosa antara jaringan transport dan jaringan penyimpanan tebu (Rae *et al.*, 2004).

Proses translokasi sukrosa berasal dari *source* ke *sink* atau yang disebut dengan *long distance transport* secara umum digolongkan menjadi dua tahapan yaitu *loading* dan *unloading* sukrosa. Proses *loading* dan *unloading* sukrosa menuju batang difasilitasi oleh protein SUT (Truernit, 2001). Translokasi sukrosa oleh protein SUT merupakan bentuk pengangkutan aktif yang disebut sebagai sukrosa H⁺ *symporter* (*sucrose proton symport*) (Reismier *et al.*, 1993). Pada sebagian besar tanaman, translokasi hasil fotosintesis dari jaringan fotosintetik ke jaringan penyimpan terjadi secara simplas dan apoplas. Secara simplas yaitu translokasi sukrosa terjadi dari sel melalui plasmodesmata. Translokasi sukrosa

secara apoplas melewati ruang interseluler, proses ini terjadi dalam SE/CC (*sieve element/companion cell*) (Lalonde *et al.*, 2003). Proses transport sukrosa dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Keterangan Gambar: (A) transport sukrosa secara simplas; (B) transport sukrosa secara apoplas

Gambar 2.3 Transporasi sukrosa (Sumber: Taiz & Zeiger, 2002)

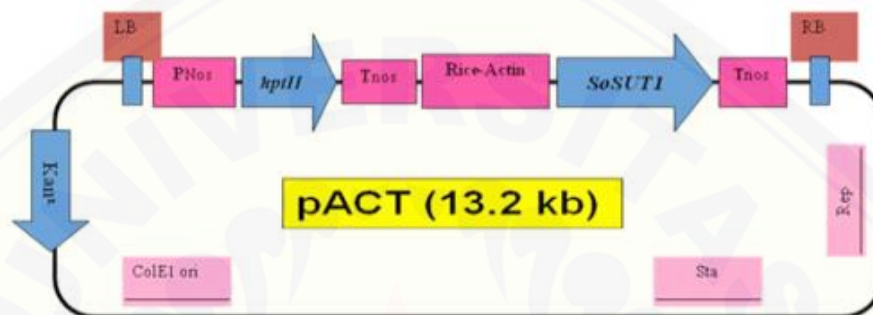
2.5 Tanaman Produk Rekayasa Genetik (PRG) Overekspresi Gen *SoSUT1* dan *SoSPS1*

Pada tanaman tebu biosintesis sukrosa dikatalisis oleh enzim *sucrose-phosphate synthase* (SPS) yang berperan dalam proses sintesis sukrosa yang mengkatalis reaksi penggabungan UDP-glucose dan Fruktosa-6-Phospat menjadi $\text{sucrose-6'-P} + \text{UDP} + \text{H}^+$ (Huber & Huber, 1996). Serta peningkatan aktivitas SPS berkorelasi positif meningkatkan kandungan sukrosa (Sugiharto *et al.*, 1997). Gen *SPS* tebu telah berhasil diisolasi (Sugiharto *et al.*, 1997) dan overekspresi gen *SPS* ini dapat meningkatkan aktivitas SPS dan kandungan sukrosa pada daun tanaman tebu transgenik (Sugiharto *et al.*, 2003). Namun peningkatan kandungan gula sukrosa di batang kurang sepadan dengan peningkatannya di daun tebu (Miswar *et al.*, 2007). Hal ini diduga karena tidak adanya peningkatan translokasi sukrosa dari daun sebagai tempat sintesis ke batang sebagai organ penyimpanan.

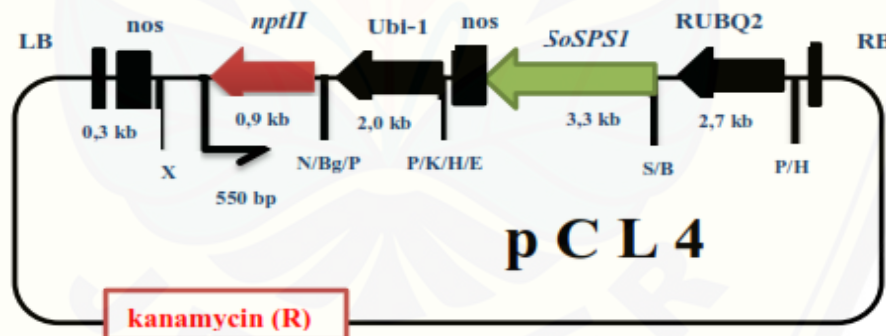
Beberapa penelitian melaporkan bahwa translokasi sukrosa difasilitasi oleh protein *sucrose transporter* (SUT) dan overekspresi gen *SUT* dapat meningkatkan translokasi sukrosa dan produksi tanaman kentang (Lamoine *et al.*, 1999). Terdapat 3 jenis SUT pada tanaman, *SUT1* mempunyai afinitas tinggi, *SUT2* mempunyai afinitas menengah dan *SUT3* mempunyai afinitas rendah (Taiz & Zeiger, 2002). Saat ini kloning dan konstruk gen *SoSUT1* dari tebu telah dilakukan (Sugiharto *et al.*, 2008), dan bersama-sama dengan konstruk gen *SoSPS1* (Sugiharto *et al.*, 2003) dapat digunakan untuk meningkatkan sintesis dan sekaligus transport sukrosa pada tanaman. Penelitian pada tanaman model *double* overekspresi gen *SoSPS1* bersama-sama dengan gen *SoSUT1* dapat meningkatkan kandungan dan produksi buah tomat transgenik (Dewanti *et al.*, 2011).

Tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* dan *SoSPS1* merupakan hasil dari penyisipan gen *SoSUT1* dan *SoSPS1* pada tanaman tebu dengan tujuan agar proses biosintesis dan translokasi sukrosa meningkat pada tanaman (Sugiharto & Safitri, 2011) dan diperoleh 3 macam tebu PRG. Tebu PRG *single* SUT yaitu tebu yang hanya dilakukan overekspresi gen *SoSUT1* menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens* yang telah tersisipi plasmid pActin dengan gen penanda *hptII* (Gambar 2.4) yang merupakan gen ketahanan terhadap antibiotik

higromisin (Dwiniarti, 2013). Tebu PRG *single* SPS yaitu tebu yang hanya dilakukan overekspresi gen *SoSPS1* menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens* yang telah tersisipi plasmid pCL4 dengan gen penanda *nptII* (Gambar 2.5) yang merupakan gen ketahanan terhadap antibiotik kanamisin (Baskoro, 2012), dan tebu PRG *double* SPS dan SUT yaitu tebu yang mengalami overekspresi gen *SoSPS1* dan gen *SoSUT1* (Ningtyas *et al.*, 2015).



Gambar 2.4 Peta plasmid pAct-*SoSUT1* (Sumber: Sugiharto *et al.*, 2008)



Gambar 2.5 Peta plasmid pCL4-*SoSPS1* (Sumber: Liu *et al.*, 2003)

2.6 Skrining Stabilitas Genetik Tanaman Produk Rekayasa Genetik (PRG) Overekspresi Gen *SoSUT1* dan *SoSPS1*

Skrining tanaman transgenik dilakukan dengan menumbuhkan sel, jaringan atau organ, seperti biji, pada media yang mengandung antibiotik. Sel, jaringan atau organ yang hidup atau lolos dari skrining merupakan tanaman yang berpotensi membawa gen yang ditransformasikan. Efektifitas penggunaan

antibiotik sebagai agen skrining bergantung pada jenis dan konsentrasi antibiotik serta tingkat ketahanan tanaman yang diskriminasi. Penggunaan antibiotik didasarkan pada gen ketahanan pada plasmid yang berfungsi sebagai *selectable marker*. Jenis antibiotik yang sering digunakan dalam media skrining adalah kanamisin dan higromisin (Paradisa, 2015).

Tanaman overekspresi *SoSPSI* tahan terhadap paparan antibiotik kanamisin karena adanya gen *nptII* yang mensintesa enzim neomycin phosphotransferase II. Enzim ini dapat menginaktivasi antibiotik kanamisin yang masuk ke dalam tanaman sehingga antibiotik kanamisin tidak dapat mengganggu sintesis protein tanaman. Tanaman overekspresi *SoSUTI* tahan dengan paparan antibiotik higromisin karena adanya gen *hptII* mensintesis enzim higromycin phosphotransferase yang dikembangkan untuk resistensi terhadap antibiotik higromisin (Matthews *et al.*, 2006). Sehingga tanaman yang tidak terinsersi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* tidak akan bertahan dalam media skrining.

2.7 Kultur Jaringan dan Embriogenesis Somatik

Semakin majunya ilmu pengetahuan dan teknologi saat ini memungkinkan adanya kemajuan pula dalam metode budidaya tanaman tebu. Metode kultur jaringan merupakan metode budidaya tanaman yang banyak digunakan saat ini. Metode perbanyakan ini bekerja dalam tingkat sel maupun jaringan. Prinsip metode ini yaitu dengan memperbanyak atau menumbuhkan sel dalam kondisi lingkungan yang aseptik dan terkontrol. Metode ini semakin berkembang sejak diketahuinya teori bahwa tanaman memiliki totipotensi sel, yaitu kemampuan setiap sel tanaman untuk dapat tumbuh dan berkembang menjadi satu tanaman baru yang utuh dalam kondisi lingkungan yang mendukung. Kultur jaringan akan lebih besar persentase keberhasilannya bila menggunakan jaringan meristem. Jaringan meristem adalah jaringan muda, yaitu jaringan yang terdiri dari sel-sel yang selalu membelah, dinding selnya tipis, belum mempunyai penebalan dari zat pektin, plasmanya penuh dan vakuolanya kecil. Jaringan meristem dipilih untuk kultur jaringan karena jaringan meristem keadaannya selalu membelah, sehingga

diperkirakan mempunyai zat yang mengatur pembelahan (Makziah, 2011). Metode kultur jaringan dipercaya dapat menghasilkan tanaman baru termasuk dalam bentuk bibit menghasilkan tanaman yang terbebas dari hama dan penyakit, serta mampu mengembangkan tanaman dengan sifat baru (Alfian *et al.*, 2015).

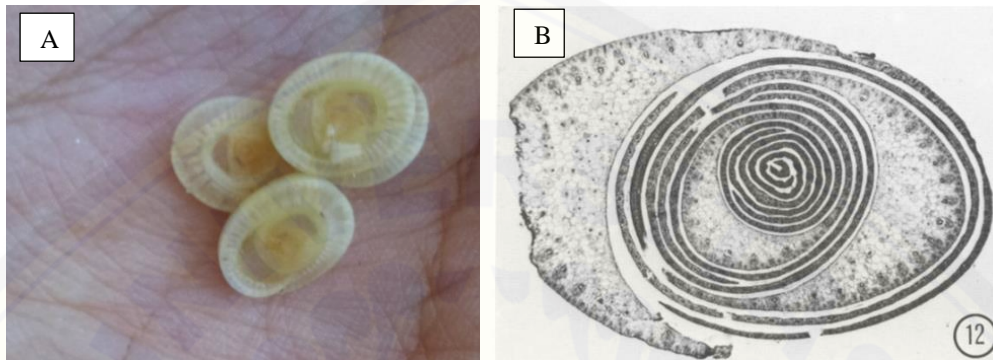
Salah satu metode kultur jaringan yang saat ini banyak digunakan yaitu dengan menginduksi embriogenesis somatik. Metode embriogenesis somatik telah banyak dilaporkan keberhasilannya pada beberapa tanaman seperti tebu (Silva *et al.*, 2014). Embriogenesis somatik merupakan perkembangan sel-sel somatik (yaitu sel-sel tubuh seperti batang, daun dan lainnya baik haploid maupun diploid) menjadi tumbuhan dengan membentuk embrio namun tanpa melalui fase menyatunya gamet (Gill *et al.*, 2004). Embriogenesis somatik terbagi menjadi dua jalur yaitu secara langsung dan tidak langsung. Embriogenesis somatik secara langsung terbentuk tanpa melewati fase pengkalusan, sedangkan embriogenesis somatik secara tidak langsung terbentuk melalui fase pengkalusan (Percy & Klimaszweska, 2000).

Williams dan Maheswaran (1986) menyebutkan, bahwa biasanya hanya sejumlah kecil embrio somatik yang berhasil didapatkan melalui embriogenesis somatik secara langsung. Namun hasil embrio somatik yang lebih tinggi terdapat pada embriogenesis somatik secara tidak langsung. Perkembangan embriogenesis somatik terbagi menjadi dua tahap utama, yaitu diferensiasi sel somatik menjadi sel kompeten embriogenik kemudian berproliferasi sebagai sel embriogenik. Fase selanjutnya yaitu sel embriogenik tersebut menunjukkan adanya kompetensi dan berdiferensiasi menjadi embrio somatik (Jimenez, 2001).

2.7.1 Tipe-Tipe Kalus

Embriogenesis somatic merupakan upaya menginduksi sel somatik yang bersifat totipoten dengan stimulus misalnya dengan pemberian hormon 2,4D sehingga sel akan terprogram ulang dan berdiferensiasi menjadi tanaman yang utuh (Silveira *et al.*, 2013). Embriogenesis somatik dapat diinduksi melalui 5-6 gulungan daun termuda tebu atau disebut *spindle leaf* karena jaringan tersebut

masih bersifat meristematik. Tebu yang baik digunakan adalah yang berumur 4–8 tahun, gulungan daun terdalam dengan diameter 1 cm dan terdiri dari 5–6 *spindle leaf*, dipotong dengan lebar 1 atau 2 mm (Lakshmanan, 2006). Gambar *spindle leaf* dapat dilihat pada Gambar 2.6.

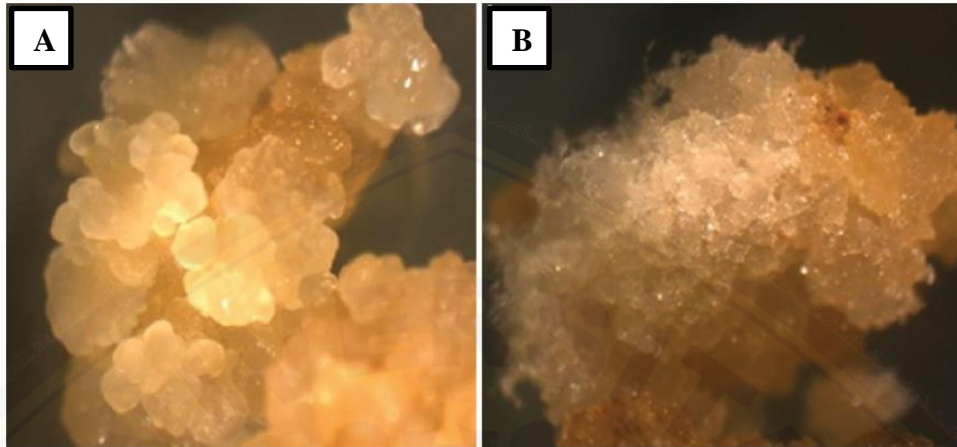


Gambar 2.6 *Spindle leaf* (Sumber: A: Dokumentasi pribadi., 2017, B: Ho & Vasil, 1983)

Spindle leaf dipotong potong, kemudian ditanam pada media MS, kalus akan muncul 14–21 hari setelah kultur (Brisibe *et al.*, 1993). Kalus yang dihasilkan kemudian dipisahkan menjadi 2 tipe berdasarkan daya regenerasinya yaitu kalus embriogenik dan non embriogenik. Morfologi kalus embriogenik antara lain berwarna putih bening hingga bening kekuningan, tampak mengkilap atau *glossy*, serta mempunyai struktur remah. Kalus non embriogenik memiliki morfologi berwarna putih susu hingga kuning kecokelatan, tampak basah dan lembek, serta memiliki struktur kalus yang kompak sehingga sulit untuk berdiferensiasi (Alfian *et al.*, 2015).

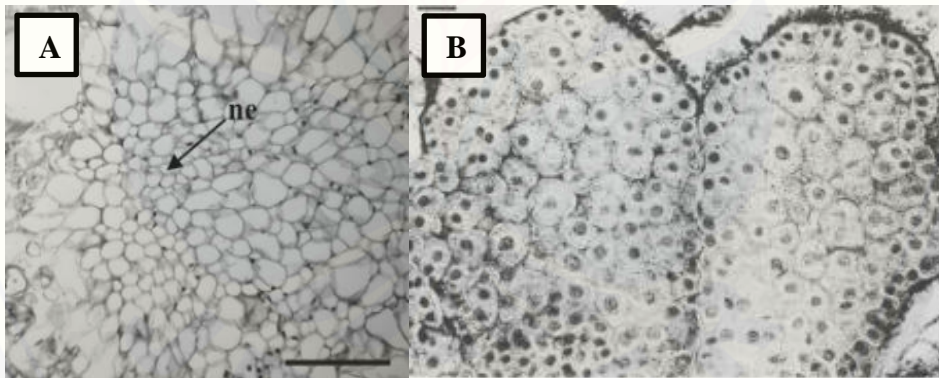
Histologi kalus embriogenik terbentuk oleh kumpulan sel kecil yang membulat dan isodiametrik yang mengandung nukleus yang menonjol dan sitoplasma yang padat yang mengindikasikan sel tersebut adalah sel meristematik yang mampu membentuk embrio somatik. Histologi kalus non embriogenik yaitu tersusun oleh sel yang besar, vakuola besar, sel memanjang dengan nukleus kecil dan rasio sitoplasma yang lebih sedikit dibanding kalus embriogenik (Silveira *et al.*, 2013). Kalus embriogenik akan lebih mudah diregenerasikan melalui

embriogenesis somatik (Alfian *et al.*, 2015). Morfologi dan histologi macam-macam kalus dapat dilihat dari Gambar 2.7 dan 2.8.



Keterangan Gambar: (A) kalus embriogenik dengan ciri padat dan remah; (B) kalus non embriogenik dengan ciri berair, mengkilap dan tidak remah

Gambar 2.7 Morfologi kalus embriogenik dan non embriogenik (Sumber: Thorat *et al.*, 2017)



Keterangan Gambar: (A) histologi kalus non embriogenik dengan ciri ukuran sel besar dan nukleus tidak tampak dan histologi kalus embriogenik; (B) histologi kalus embriogenik dengan ciri sitoplasma sel padat dengan nukleus besar dan terlihat jelas terdapat banyak butiran pati

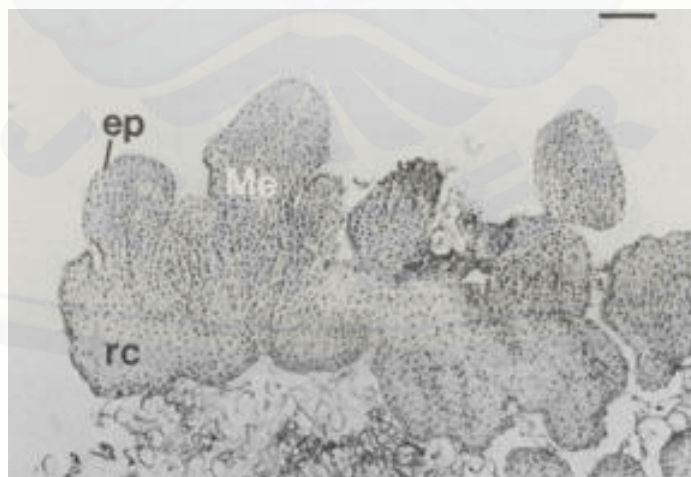
Gambar 2.8 Histologi kalus embriogenik dan non embriogenik (Sumber: Guiderdoni & Demarly, 1988)

2.7.2 Tahap-Tahap Kultur Kalus

a. Induksi Kalus

Spindle leaf ditumbuhkan pada media MS dengan 2,4D yang akan menginisiasi pertumbuhan kalus (Khan *et al.*, 2008). Pangkal daun dan tulang daun lebih cocok untuk induksi kalus karena menghasilkan lebih banyak kalus embriogenik dibanding helaian daun, gulungan daun pertama dan kedua *spindle leaf* menghasilkan lebih banyak kalus yang lembut daripada kalus yang kompak. Gulungan ke 4 dan 5 *spindle leaf* paling sesuai untuk induksi kalus embriogenik, gulungan lebih dari ke 5 akan menghasilkan kalus non embriogenik (Ho & vasil, 1983).

Pengamatan penampang melintang *spindle leaf* menunjukkan bahwa berbagai jenis sel (yaitu sel epidermis daun, mesofil, parenkim vaskular dan pembuluh angkut) berkontribusi terhadap pembentukan kalus. Sel akan tumbuh dan berkembang menjadi sel meristematik berukuran kecil dengan rasio *nukleocytoplasmic* tinggi, sitoplasma padat dan dinding sel yang menebal dan sel subepidermik berukuran besar yang memiliki sitoplasma padat dan mengandung butir tepung yang mencolok (Guiderdoni & Demarly, 1988). Massa proembriogenik pada kalus nodular dapat dilihat pada Gambar 2.9.



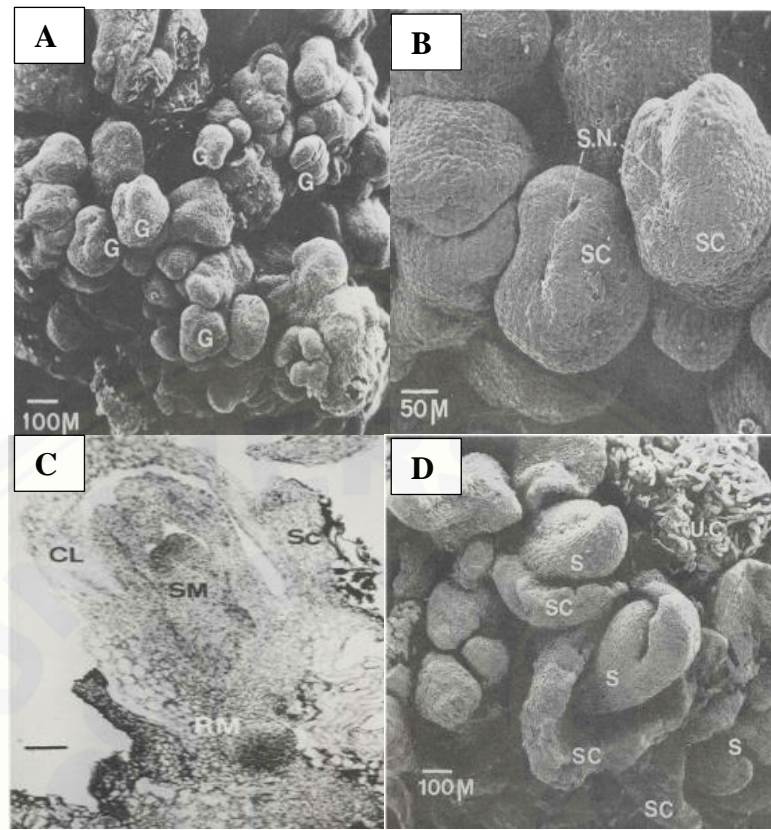
Keterangan gambar: Me: sel meristematik. Re: sel dengan sitoplasma yang kaya, Ep: sel epidermis .

Gambar 2.9 Massa proembrionik kalus nodular (Sumber: Guiderdoni & Demarly, 1988)

b. Regenerasi Kalus

Regenerasi kalus diawali dengan munculnya titik hijau pada kalus sampai terbentuk akar, batang dan daun (Khan *et al.*, 2008). Embrio somatik pada tahap globular menunjukkan pembentukan lapisan epidermis khusus yang dibentuk oleh sel perisai yang mengelilingi sel meristematik. Embrio semacam itu terbentuk setelah tahap globular mencapai pengembangan sel-sel hialin pada satu ujung. Fungsinya untuk menghasilkan suspensor pendek atau hypoblast (Johansen, 1950). Kalus globular akan membentuk kalus skutellar. Skutellum terdiri dari sel yang mengandung *tracheid prokambial* dan dibatasi oleh sel epitel khas, primordia daun muda dan koleoptil dikembangkan sepenuhnya, dapat dibedakan antara meristem akar dan batang dan sistem vaskular telah terbentuk. Perkembangan awal embrio tunas aksiler menghasilkan tunas ganda (Ahloowalia & Maretzki, 1983).

Embrio terdapat secara bebas dari massa kalus atau terhubung (tapi tanpa ikatan vaskular) dengan jaringan dibawahnya. Perkembangan meristem akar sering tertunda dan coleorhiza tidak nampak. Pemeriksaan kalus kompak nodular menunjukkan adanya lobus, kurang lebih individual dan struktur globular terorganisir. Setelah tahap skutellar, embrio adalah bipolar dan terdiri dari tunas seperti daun yang diperluas dan zona dengan inti utama jaringan vaskular, dikelilingi oleh sel-sel yang kaya plastida, kemudian membentuk struktur koleoptil atau calon daun dan membentuk struktur-struktur menyerupai miniatur planlet dengan daun dan akar (Ahloowalia & Maretzki, 1983). Struktur kalus globular, kalus skutellar dan planlet dapat dilihat pada Gambar 2.10.



Keterangan gambar: A: tonjolan nodul. B: struktur kalus skutelar yang ditandai adanya lengkungan skutelar Sn dan skutelum Sc. C: histologi embrio somatik yang terbentuk, Cl: koleoptil, Rm: meristem akar dan Sm: meristem batang. D: morfologi embrio somatik S: tunas dan Sc: scutelum.

Gambar 2.10 Struktur kalus globular, skutelar dan koleoptilar (Sumber: Guiderdoni & Demarly, 1988)

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi *Centre for Development of Advanced Sciences and Technology* (CDAST) Universitas Jember pada bulan Januari hingga Juli 2018.

3.2 Alat dan Bahan

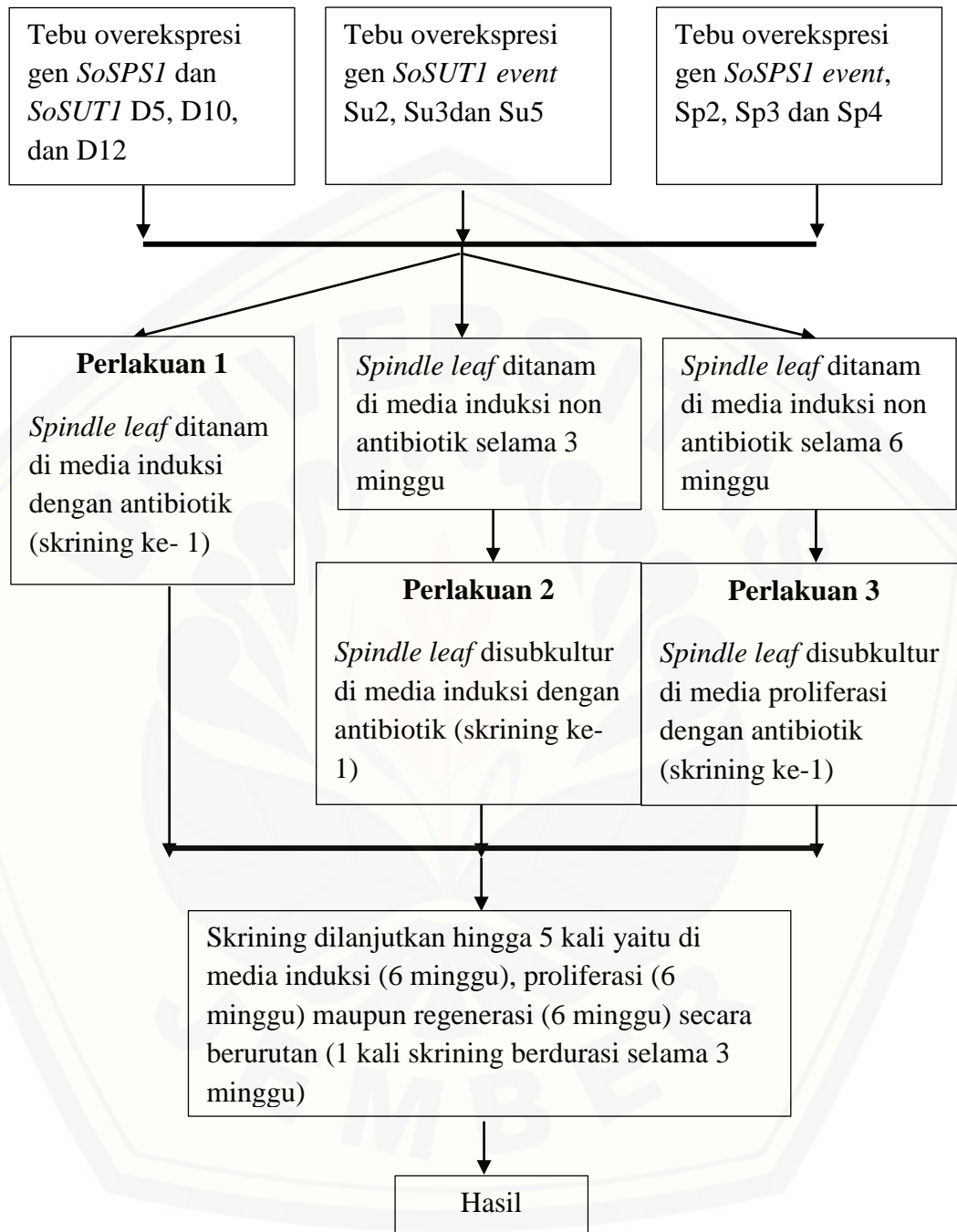
3.2.1 Alat

Alat yang digunakan adalah alat- alat kultur jaringan seperti halnya botol jam, petridish, pinset, skalpel, gunting, pH meter, stirer, mikropipet, *Beaker glass*, gelas ukur, autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF), botol jam, microwafe, oven, mikroskop stereo.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) varietas BL overekspresi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* yaitu event D5, D10, dan D12; overekspresi gen *SoSPS1* yaitu event Su2, Su3 dan Su5; serta overekspresi gen *SoSUT1* yaitu event Sp2, Sp3 dan Sp4. Bahan media MS yaitu stok A (NH_4NO_3), B (KNO_3), C (CaCl_2), D (H_3PO_4 , KH_2PO_4 , CoCl_2 , $\text{Na}_2\text{MoO}_4\text{H}_2\text{O}$, KI), E ($\text{MgSO}_4 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 7\text{H}_2\text{O}$) dan F (Na_2EDTA dan $\text{FeSO}_4 7\text{H}_2\text{O}$), vitamin (myoinositol, tyamin, pyridoxin), agar kultur jaringan dan sukrosa. Media induksi (MS + Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) berupa 2,4 D 3 ppm+ Casein Hidrolisat (CH) 300 ppm). Media Proliferasi (MS + ZPT (2,4D) 1 ppm + prolin 560 ppm+ CH 300 ppm+ kanamisin 50 ppm + higromisin 20 ppm). Media regenerasi (MS + glutamin 100 ppm)

3.3 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Induksi Kalus dan Skrining Kalus Tebu Overekspresi gen *SoSPSI* serta *SoSUTI*

a. Pengambilan Eksplan

Bagian pucukan pada tanaman tebu (*S. officinarum* L.) varietas Bulu Lawang overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* yaitu *event* D5, D10 dan D12. Overekspresi gen *SoSUTI* yaitu *event* Su2, Su3 dan Su5 dan overekspresi gen *SoSPSI* yaitu *event* Sp2, Sp3 dan Sp4 yang sehat diambil dari lapang kemudian pangkal daun nya dipotong hingga rata. Pucukan tebu tersebut dibersihkan dengan cara mengupas gulungan daun yang tua dan kering kemudian disemprot dengan alkohol. Pucukan dimasukkan dalam laminar dan dilakukan sterilisasi dengan dipanaskan diatas api bunsen untuk meminimalisir kontaminan. Helaian daun dikupas menggunakan skapel sampai pada gulungan *spindle leaf* (5 atau 6 gulungan termuda). Eksplan yang digunakan berupa *spindle leaf*.

b. Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan dilakukan secara aseptis. *Spindle leaf* di iris melintang dengan ketebalan ± 2 mm dan dilukai dengan cara mengiris bagian tengah eksplan selebar setengah diameter eksplan. Eksplan ditanam pada media induksi yang mengandung MS0 (Lampiran 3.1) 2,4D 3 ppm, CH 300 ppm dan ditambahkan antibiotik pada media subkultur induksi. 2,4D ditambahkan untuk menginduksi tumbuhnya kalus dan CH (Casein Hidrolisat) untuk memacu kalus berproliferasi dengan cepat. Penambahan CH menyebabkan peningkatan massa dan volume kalus (Ortunduaga *et al.*, 1989).

Skrining dilakukan di 3 tahap pembentukan kalus yaitu dimulai dari awal induksi kalus (perlakuan 1), dimulai dari pertengahan induksi kalus (perlakuan 2) dan dimulai dari tahap proliferasi kalus (perlakuan 3) untuk mengetahui tahap yang paling sesuai untuk pemberian antibiotik. Skrining tersebut dilakukan sebanyak 5 kali dengan interval waktu 3 minggu. Skrining dilakukan sebanyak 5 kali dengan durasi 3 minggu setiap skrining sehingga dilakukan pergantian media

ke media berikutnya yang mengandung antibiotik setiap 3 minggu seperti tabel 3.1

Tabel 3.1 Tabel Urutan Skrining pada Perlakuan

Tahap somatik embriogenesis	interval	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3
	Induksi	3 minggu	Skrining 1	
	3 minggu	Skrining 2	Skrining 1	
Proliferasi	3 minggu	Skrining 3	Skrining 2	Skrining 1
	3 minggu	Skrining 4	Skrining 3	Skrining 2
Regenerasi	3 minggu	Skrining 5	Skrining 4	Skrining 3
	3 minggu		Skrining 5	Skrining 4
				Skrining 5

Antibiotik kanamisin dan higromisin digunakan dengan konsentrasi masing-masing sebesar 50 ppm dan 20 ppm. Konsentrasi ini sesuai dengan konsentrasi antibiotik kanamisin dan higromisin pada media skrining eksplan *putative* transforman gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* (Sinartya, 2015). Kanamisin dan higromisin dengan konsentrasi 50 ppm dan 20 ppm juga digunakan Paradisa (2015) untuk skrining stabilitas genetik tanaman tebu PRG Overekspresi *SoSPS1* dan *SoSUT1* secara *in vitro* menggunakan eksplan tunas apikal dan lateral. Antibiotik disesuaikan dengan *event* tanaman. Tanaman tebu *event* D5, D10 dan D12 merupakan tanaman tebu overekspresi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* ditanam pada media yang mengandung antibiotik kanamisin 50 ppm dan higromisin 20 ppm. Tanaman tebu *event* Sp2, Sp3, Sp4 yang merupakan tebu overekspresi gen *SoSPS1* ditanam pada media yang mengandung antibiotik kanamisin 50 ppm serta

tanaman *event* Su2, Su3, Su5 yang merupakan tebu overekspresi gen *SoSUT1* ditanam pada media yang mengandung antibiotik higromisin 20 ppm. Eksplan selanjutnya diinkubasi pada suhu 23-25 °C di ruang gelap selama 6 minggu (Alfian *et al.*, 2015).

3.4.2 Proliferasi Kalus dan Regenerasi

Kalus dari media induksi yang lolos skrining pertama dipindah ke media proliferasi atau media perbanyakan dan pendewasaan kalus. Media tersebut tempat kalus berkembang membentuk somatik embriogenik. Media proliferasi tersusun dari media dasar MS, 2,4D 1 ppm, CH 300 ppm, prolin 560 ppm. Prolin merupakan sumber nitrogen dan sumber energi juga berperan dalam menjaga tekanan osmotik dan mencegah stress lingkungan (Khaleda & Furkan, 2006).

Kalus yang lolos skrining pada media proliferasi dipindah ke media regenerasi selama 6 minggu. Media regenerasi bertujuan untuk meregenerasikan tunas yang membentuk planlet, media ini terdiri atas media dasar MS dan glutamin 100 ppm. Glutamin penting dalam asimilasi nitrogen yaitu untuk transfer amonia menjadi asam amino (Ageel & Elmeer, 2011).

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Metode skrining tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUT1* menggunakan kultur kalus yang paling efektif adalah perlakuan 3 atau perlakuan pemberian antibiotik dimulai dari media proliferasi. Tingkat keberhasilan metode ini sebesar 32,4% dan jumlah planlet yang dihasilkan sebanyak 72 planlet.

5.2 Saran

Perlu dilakukan analisa PCR untuk membuktikan planlet yang lolos skrining memiliki gen penanda berupa *nptII* atau *hptII* dan perlu dilakukan analisis biokimia lebih lanjut seperti analisa kandungan sukrosa maupun uji aktivitas enzim pada planlet tebu PRG overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUT1* yang telah lolos skrining.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahloowalia, B. S. & A. Marezki. 1983. Plant Regeneration Via Somatic Embryogenesis in Sugarcane. *Plant Cell Report* 2(1): 21-25.
- Ageel, S. & K. Elmeer. 2011. Effect of Casein Hydrolysates and Glutamin on Callus Embryogenesis of Date Palm. *New york Science Journal* 4(7): 79–90.
- Alfian, F. N., D. P. Restanto & S. Soeparjono. 2015. Induksi Kalus Embriogenik Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Varietas Nxi 1-3. *Berkala Ilmiah Pertanian* 1(1):.78-88
- Anzidei, M., A. Bennici, & S. Schiff, 2000. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare*: histological observations of developing embryogenic callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 61(1): 69-78
- Amirhusin B. 2004. Perakitan Tanaman Transgenik Tahan Hama. *J Lit Per.* 23(1): 1-7.
- Artunduaga, I. V., C. M. Taliaferro & B. B. Johnson. 1989. Induction and Growth of Callus from Immature Inflorescences of Zebra Bermudagrass as Affected by Casein Hydrolysate and 2,4 D Concentration. *In vitro Cellular & Developmental Biology* 25(8): 112–130.
- Baskoro, A. 2012. Efektifitas Transformasi Gen SoSPS1 Menggunakan Vektor Plasmid pCL4 dan Eksplan Tunas Lateral Tebu (*Saccharum officinarum* L.). *Skripsi*. Universitas Jember
- Baksha, R., R. Alam, M. Z. Karim, S. K. A. Manan, B. P. Podder & A. B. M. M. Rahman. 2003. Effect of Auksin, Sukrose and pH Level on In vitro Rooting of Callus Induced Mikro Shoot of Sugarcane. *Journal of Biological Science* 3(10): 915-920.

- Borovinskaya, M. A., S. Shoji, K. Fredrick, J. H. Cate. 2008. Structural Basis for Hygromycin B Inhibition of Protein Biosynthesis. *RNA* 14: 1590–1599.
- Brisibe, E. A., D. Nishioka, H. Miyake, T. Taniguchi & E. Maeda. 1993. Developmental Electron Microscopy and Histochemistry of Somatic Embryo Differentiation in Sugarcane. *Plant Science* 89(2): 85-92.
- Catlin, D. W. 1990. The Effect of Antibiotics on The Inhibition of Callus Induction and Plant Regeneration from Cotyledons of Sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Cell Rep.* 9: 285-288.
- Chaudhury, D., S. Madanpotra., R. Jaiwal., R. Saini., P. A Kumar., & P. K Jaiwal. 2007. Agrobacterium tumefaciens-mediated high frequency genetic transformation of an Indian cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivar and transmission of transgenes into progeny. *Plant Science.* 172(4): 692-700.
- Chyi, Y.S. & Phillips, G. C. 1987. High efficiency Agrobacterium-mediated transformation of Lycopersicon based on conditions favorable for regeneration. *Plant Cell Rep.* 6:105-108
- Christou, P., P. Vain, A. Kohli, M. Leech, J. Oard & S. Linscombe. 1992. Introduction of Multiple Genes Into Elite Rice Varieties: Evaluation of Transgene Stability, Gene Expression, and Field Performance of Herbicideresistant Transgenic Plants. *Ann. Bot.* 77 (3): 223–235.
- Dewanti, P., M. Islahuddin, P. Okviandari, S. Waluyo, B. A. Saputra, T. Wardiyati & B. Sugiharto, 2011. Efisiensi Transformasi Tomat (*Lycopersicon esculentum*) dengan gen *SoSPS1* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. *Berk. Penel. Hayati Edisi Khusus* 4(1): 73–78.
- Dewi, I. 2001. *Evaluasi Tanaman Padi Transgenik Balitbio terhadap Hama Penggerek Batang*. Jakarta: Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian.
- Dwiniarti, E. F. 2013. Transformasi Gen *SoSUT1* pada Tanaman Tebu Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 dan Eksplan Pangkal Tunas Tebu In Vitro. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.

- Dong, J. & A. McHughen. 1993. Transgenic Flax Plants from *Agrobacterium* Mediated Transformation Incidence of Chimeric Regenerants and Inheritance of Transgenic Plants. *Plant Science* 91(3): 139-148.
- Ernawati, L. & E. Suryani. 2013. Analisis Faktor Produktivitas Gula Nasional dan Pengaruhnya Terhadap Harga Gula Domestik dan Permintaan Gula Impor dengan Menggunakan Sistem Dinamik. *Jurnal Teknik Pomits*. 1(1): 1-7.
- Elzen, V. D.P. J. M., J. Townsend., K. Y. Lee .,& Bedbrook J. R. 1985. Achimaeric resistance gene as a selectable marker in plant cells, *Plant Mol. Biol.* 5(2): 299-302.
- Gill, N. K., R. Gill & S. S. Gosal. 2004. Factors Enhancing Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Indian Journal of Biotechnology* 3(1): 119-123.
- Guiderdoni, E. & Y. Demarly. 1988. Histology of Somatic Embryogenesis in Cultured Leaf Segments of Sugarcane Plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 14(1): 71-88.
- Hagio, T., T. Hirabayashi., H. Machii., H. Tomotsune. 1995 Production of fertile transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plant using the hygromycin-resistance marker. *Plant Cell Reports*. 14: 329–334.
- Heinz, D.J. & G.W.P. Mee. 1969. Plant Differentiation from Callus Tissue Saccharum Species. *Crop Sci.* 9: 346-348.
- Ho, W. & J. Vasil. 1983. Somatic Embryogenesis In Sugarcane (*Saccharum Officinarum* L.). I. The Morphology And Physiology Of Callus Formation And The Ontogeny Of Somatic Embryos. *Protoplasma* 118(1): 169–180.
- Huber, S. C. & J. L. Huber. 1996. Role and Regulation of Sucrose-Phosphate Synthase in Higher. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47(1): 431–444.

- Jimenez, V. M. 2001. Regulation of In Vitro Somatic Embryogenesis with Emphasis on The Role of Endogenous Hormones. *R.Bras. Fisiol. Veg.* 13(2): 196-223.
- Johansen, D. A. 1950. *Plant Embryology*. Canada: Chronice Botanica Company.
- Kementerian Pertanian. 2016. *Outlook Tebu Komoditas Pertanian Subsektor Perkebunan*. Jakarta: Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Sekretariat Jenderal.
- Kementerian Pertanian. 2014. *Statistik Perkebunan Indonesia: Tebu*. Jakarta: Direktorat Jenderal Perkebunan
- Khaleda, L. & M. Furkan. 2006. Stimulatory Effects of Casein Hydrolysate and Proline in Invitro Callus Induction and Plant Regeneration from Five Deepwater Rice. *Biotechnology* 5(3): 379 – 384.
- Khan, I. A., M. U. Dahot, N. Seema, S. Bibi & A. Khatri. 2008. Genetic Variability In Plantlets Derived From Callus Culture In Sugarcane. *Pak. J. Bot.* 40(2): 547-564.
- Koch, K. E. 1996. Carbohydrate Modulated Gene Expression in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47(1): 409-540
- Kotra, L.P., J. Haddad, & S. Mobashery. 2000. Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3249–3256.
- Kundu, S., A. Pal., & A. K. Dikshit. 2005. UV induced degradation of herbicide 2, 4-D: kinetics, mechanism and effect of various conditions on the degradation. *Separation and Purification Technology.* 44(2) : 121-129.
- Lahay, R. R. 2009. *Pemuliaan Tanaman Tebu*. Medan: Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara

- Lalonde, S., M. Tegeder, M. Throne-Holst, W. B. Frommer & J. W. Patrick. 2003. Phloem Loading and Unloading of Sugars and Amino Acids. *Plant, Cell and Environment* 26(3): 37–56.
- Lemoine, R., L. Burkle., S. Soulaïman., S. Kunn., M. Regnacq., C, Gailland., S, Delrot & W. B. Frommer. 1999. Identification of a Pollen-Specific Transporter-Like Protein NtSUT3 from Tobacco. *FEBS Letters*. 454 (2): 325-330.
- Lakshmanan, P. 2006. Somatic Embryogenesis In Sugarcane – An Addendum To The Invited Review Sugarcane Biotechnology: The Challenges And Opportunities. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 41(4): 345–363.
- Liu, D., S.V.Oard & J. H. Oard. 2003. High Transgene Expression Levels in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Driven by the Rice Ubiquitin Promoter RUBQ2. *Plant sci*. 165: 743-750
- Mathews, B. W. & C. J. Thurkins. 2006. Agronomic Responses In The Short Term to Some Management Options for Sugarcane Top Residues. *Journal For Hawaiian And Pacific Agriculture* 13(5): 23-34.
- Makziah, P. N. 2011. Regenerasi Eksplan Melalui Organogenesis Dan Embriogenesis Somatik. *Skripsi*. Surabaya: UPN Veteran.
- Miswar, B. Sugiharto, J. Soedarsono & S. Moeljapawiro. 2007. Transformasi Gen Sucrose Phosphate Synthase (*SoSPSI*) Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* untuk Meningkatkan Sintesis Sukrosa pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.). *Berk. Penel. Hayati*. 12 (1): 137-143.
- Moore, P. H. 1995. Temporal and Spatial Regulation of Sucrose Accumulation in The Sugarcane Stem. *Aust. J. Plant Physiol*. 22(4): 661- 791.
- Mufidhah, N. B. Sugiharto & D. P. Restanto. 2015. Karakterisasi Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* Generasi Kedua. *Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa*. Jember: Universitas Jember.

- Mullison, W. R. 1987. Environmental Fate of Phenoxy Herbicides. Fate of Pesticides in the Environment. *California Agricultural Experiment Station Publication* 3320: 121– 131.
- Mulyono, D. 2011. Kebijakan Pengembangan Industri Bibit Tebu Unggul untuk Menunjang Program Swasembada Gula Nasional. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia* 13(1): 60-64.
- Ningtyas, R. M., B. Sugiharto., & E. Utari. 2015. Transformasi Gen *SoSPS1* Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. Var. B1) Overekspresi Gen *SoSUT1 Event 2* Menggunakan *Agrobacterium Tumefaciens*. *Jurnal Berkala Sainstek*. 3(1): 20-23
- Paradisa, F. V. 2015. Uji Stabilitas Genetik Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika Overekspresi Gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* secara Invitro. *Skripsi*. Universitas Jember.
- Percy, R. E. & K. Klimaszweska. 2000. *Evaluation of Embriogenesis Somatic For Clonal Propagation of Western White Pine*. Canada: NRC Research Press.
- Peros, J. P., L. Torregrosa., & G. Berger. 1998. Variability among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity. *Journal of Experimental Botany*. 49(319): 171-179.
- Plantamor. 2016. Database-tumbuhan. http://www.plantamor.com/katalog/tanaman-industri/tebu_i413. [Diakses pada 22 November 2017].
- Prabawati, Y.B. 2012. Biosistematika Keanekaragaman Tebu Melalui Pendekatan Morfologis. *Skripsi*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Rae, A. L., J. M. Perroux & C. P. Grof. 2004. Sucrose Partitioning Between Vascular Bundles and Storage Parenchyma in The Sugarcane Stem: A Potential Role For The *ShSUT1* Sucrose Transporter. *Planta*. 220(9): 817– 825.
- Ramanand, N. Kurel, N. Subhanande, M. Lal & S. B. Singh. 2006. Planlet Regeneration Through Leaf Calus Culture in Sugarcane. *Sugar tech*. 8(1): 85-87.

- Riesmeier, W., B. Himer & W. B. Frommer. 1993. Potato Sucrose Transporter Expression In Minor Veins Indicates A Role In Phloem Loading. *The Plant Cell*. 5(2): 1591-1598.
- Sane, D, F. A. Bertossi., Y. K. Gassamadia., M. Sagna., M.F Trouslot., Y. Duval., A. Borgel. 2006. Histocytological Analysis of Callogenesis and Somatic Embryogenesis from Cell Suspensions of Date Palm (*Phoenix dactylifera*), *Annals of Botany*. 98(2): 301-308
- Sreeramanan, S., M. Maziah., M.P. Abdullah, M. Sariah and R. Xavier., 2006. Transient expression of *gusA* and *gfp* gene in *Agrobacterium* mediated banana transformation using single tiny meristematic bud. *Asian J. Plant Sci*. 1(6): 1-13.
- Silva, M. M. D. A., C. Ulisses, M. J. L. E. Medeiros, M. M. C. Granja, L. Willadino & T. Camara. 2014. Antioxidant Enzymes Activity in Embryogenic and non-embryogenic Tissue in Sugarcane. *Acta Biologica Colombiana* 19(2): 203-210.
- Silveira, V., A. M. Vita, A. F. Macedo, M. F. R. Dias, E. I. S. Floh & C. S. Catarina. 2013. Morphological And Polyamine Content Changes In Embryogenic And Non-Embryogenic Callus Of Sugarcane. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 114(1): 351–364.
- Sinatria, A. N. 2015. Transformasi Gen *SoSUT1* Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L var. BL) Transgenik Overekspresi Gen *SoSPS1* menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*. skripsi: Universitas Jember
- Sugiharto, B., H. Sakakibara, Sumadi & T. Sugiyama. 1997. Differential Expression of Two Genes for Sucrose Phosphate Synthase in Sugar Cane: Molecular Cloning of the cDNAs and Comparative Analysis of Gene Expression. *Plant Cell Physiol*. 38(5): 961-965.
- Sugiharto, B., Miswar & U. Murdiyatmo. 2003. Overekspresi gen sucrosephosphate synthase untuk peningkatan biosintesis sukrosa pada tanaman tebu. *Laporan Akhir RUT VIII*. Jember: Universitas Jember dan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.

- Sugiharto, B., Slameto & P. Dewanti. 2008. Peningkatan Produksi Gula Melalui Overekspresi Gen SPS dan SUT Pada Tanaman Tebu. Laporan Penelitian Hibah Kompetensi. *Unpublished*.
- Sugiharto, B. 2010. Peningkatan Produksi Gula Melalui Overekspresi Gen Sucrose Phosphat Synthase dan Sucrose Transporter Protein Pada Tanaman Tebu. *Laporan Penelitian Hibah Kompetensi*. Jember: Pusat Penelitian Biologi Molekuler UNEJ.
- Sugiharto, B. & H. Safitri. 2011. A Comparison Study for Agrobacterium-Mediated Transformation Method in Sugarcane (*Saccharum spp L.*). *Jurnal Ilmu Dasar* 12(2): 140–147.
- Taiz, L. & E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology*. USA: Sinauer Associates.
- Tarique, H. M., A. Mannan., S. Bhuiyan & M, Rahman. 2010. Micropopagation of Sugarcane Through Leaf Sheath Culture. *Int. J. Sustain. Crop Prod.* 5(2): 13-15.
- Thorat, A. S., N. A. Sonone., V. V Choundhari., R. M. Devarumath & K. H. Babu. 2017. Plant Regeneration From Cell Suspension Culture in *Saccharum officinarum* and Ascertaining of Genetic Fidelity Throught RAPD and ISSR Markers. *Biotech.* 7(16): 331–348.
- Truernit, E. 2001. Plant Physiology: The Importance of Sucrose Transporters. *Current Biology* 11(4): 169-171.
- Verma, A. K., S. K. Upadhyay, P. C. Verma, S. Solomon & S. B. Singh. 2011. Functional Analysis of Sucrose Phosphate Synthase (SPS) and Sucrose Synthase (SS) in Sugarcane Cultivars. *Plant Biology.* 13(6): 325–332.
- Van Boxtel, J., A. Eskes., & M. Berthouly. 1997. Glufosinate as an efficient inhibitor of callus proliferation in coffee tissue. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant.* 33(1): 6-12.

- Ward J. M. 2000. *The Role of Sucrose Transporter in Assimilate partitioning and Phloem Function*. *Plant Physiology*. Jerman: Center for Plant Molecular Biology, University of Tuebingen, Auf der Morgentelle.
- Weide, R., , M. Koornneef & P. Zabe. 1969. A simple, nondestructive spraying assay for the detection of an active kanamycin resistance gene in transgenic tomato plants. *Theoretical and Applied Genetics*. 78(2): 169-179
- Williams, E. G. & Maheswaran. 1986. Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behavior of Cells as an Embryogenic Group. *Ann Botany*. 57(1): 43-46.
- Wilmink A. & J. J. M. Dons. 1993. Selective Agents and Marker Genes for Use in Transformation of Monocotyledonous Plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 165-185.
- Yu, T. A., S.D. Yeh., & J. S. Yang. 2003. Comparison of the effects of kanamycin and geneticin on regeneration of papaya from root tissue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 74(2): 169-178.
- Zhang, B., F. Liu, Z.Liu, H.Wang & Ch.Yao. 2001. Effects of kanamycin on tissue culture and somatic embryogenesis in Cotton. *Plant Growth Regulation* 33: 137–149

LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Komposisi Media MS

STOK	Senyawa Kimia	Gram	Dilarutkan dalam (ml)	Pengambilan
A	NH ₄ NO ₃	82,5	1000	20 ml
B	KNO ₃	95	1000	20 ml
C	CaCl ₂ .2H ₂ O	22	250	5 ml
D	H ₃ BO ₃	0,31	250	5 ml
	KH ₂ PO ₄	8,50		
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0013		
	Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0,0125		
	KI	0,0415		
E	MgSO ₄ .7H ₂ O	18,5	250	5 ml
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,43		
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0013		
	MnSO ₄ .7H ₂ O	0,7525		
F	Na ₂ .EDTA	1,86	250	5 ml
	FeSO ₄ .7H ₂ O	1,39		
Vitamin	Myo-inositol	0,02	100	5 ml
	Pyridoxine-HCl	0,008	100	
	Thiamin-HCl	0,08		
Karbon	Sukrosa	-	-	30 g/l
Agar	Agar	-	-	11 g/l