

**DETEKSI, KARAKTERISASI MOLEKULER, DAN EKSPRESI GEN
P5CS PADA VARIETAS TEBU (*Saccharum officinarum* L.) KOMERSIAL
TOLERAN CEKAMAN KEKERINGAN**

Tesis

Oleh

HENI ERLITA SARI



**PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

ABSTRAK

DETEKSI, KARAKTERISASI MOLEKULER, DAN EKSPRESI GEN P5CS PADA VARIETAS TEBU (*Saccharum officinarum* L.) KOMERSIAL TOLERAN CEKAMAN KEKERINGAN

Oleh

HENI ERLITA SARI

Upaya yang dilakukan untuk menghasilkan varietas yang toleran terhadap cekaman kekeringan yaitu pemuliaan tebu melalui rekayasa genetika dengan mendeteksi dan mengkarakterisasi gen *Pyrroline 5-Carboxylate Synthetase* (P5CS) yang mampu mengkode sintesis prolin. Tujuan dari penelitian ini adalah mendeteksi keberadaan gen P5CS, mengkarakterisasi secara molekuler, dan menganalisis ekspresi gen P5CS pada varietas tebu komersial di PT Gunung Madu Plantations (GMP).

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium *Polymerase Chain Reaction* (PCR) PT GMP, Lampung Tengah, Laboratorium Biomolekuler, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung, serta Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung pada bulan Juni 2023 s.d Maret 2024. Penelitian menggunakan 15 varietas tebu komersial di PT GMP yang diberikan cekaman kekeringan skala *green house* selama 6 hari. Metode yang dilakukan adalah pengamatan morfologis, PCR konvensional, dan *Real-Time* PCR (qPCR). Analisis data pengamatan morfologis dilakukan secara deskriptif dan skoring melalui analisis fenetik. Analisis data PCR konvensional melalui perhitungan nilai *Polimorfisme Information Content* (PIC) dan *alignment* menggunakan *Clustal W Alignment* BioEdit, lalu divisualisasikan melalui pohon filogenetik. Analisis data qPCR menggunakan uji BNJ 5% melalui *software* IBM SPSS versi 22.0 berdasarkan data *ct-value*.

Hasil penelitian ini yaitu deteksi gen P5CS dari 15 varietas tebu komersial di PT GMP yang berpotensi toleran terhadap cekaman kekeringan melalui PCR konvensional adalah varietas RGM210. Karakterisasi molekuler ditujukan pada hasil sekuensing 6 varietas perlakuan (GMP 3 ± 471 bp, GMP 5 ± 88 bp, GP 11 ± 164 bp, RGM 1183 ± 142 bp, RGM 210 ± 120 bp, RGM 665 ± 99 bp, dan 1 varietas kontrol (PSJT 941 ± 401 bp). Ekspresi gen pada 15 varietas tebu komersial di PT GMP menunjukkan nilai *ct value* tertinggi oleh varietas RGM210 sehingga berpotensi toleran cekaman kekeringan.

Kata Kunci: Deteksi, Ekspresi Gen P5CS, Karakterisasi Molekuler, PCR Konvensional, *Real-Time* PCR

ABSTRACT

DETECTION, MOLECULAR CHARACTERIZATION, AND EXPRESSION OF THE P5CS GENE IN COMMERCIAL VARIETIES OF SUGAR CANE (*Saccharum officinarum* L.) TOLERANT TO DROUGHT STRESS

By

HENI ERLITA SARI

Efforts are being made to produce varieties that are tolerant to drought stress, namely sugar cane breeding through genetic engineering by detecting and characterizing the Pyrroline 5-Carboxylate Synthetase (P5CS) gene that can code for proline synthesis. This research aims to detect the presence of the P5CS gene, characterize it molecularly, and analyze the expression of the P5CS gene in commercial sugarcane varieties at PT Gunung Madu Plantations (GMP).

This research was carried out at the Polymerase Chain Reaction (PCR) Laboratory of PT GMP, Central Lampung, Biomolecular Laboratory, Biology Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Lampung, and Biotechnology Laboratory, Faculty of Agriculture, University of Lampung in June 2023 to March 2024. The research used 15 commercial sugarcane varieties at PT GMP subjected to greenhouse-scale drought stress for 6 days. The methods used were morphological observation, conventional PCR, and Real-Time PCR (qPCR). Morphological observation data was analyzed descriptively and scored through phenetic analysis. Analysis of conventional PCR data through calculating Polymorphism Information Content (PIC) values and alignment using Clustal W Alignment BioEdit, then visualizing via a phylogenetic tree. qPCR data analysis using the 5% BNJ test via IBM SPSS version 22.0 software based on ct-value data.

The results of this research are the detection of the P5CS gene from 15 commercial sugarcane varieties at PT GMP that have the potential to be tolerant to drought stress via conventional PCR, namely the RGM210 variety. Molecular characterization was aimed at the sequencing results of 6 treatment varieties (GMP 3 $\pm$ 471 bp, GMP 5 $\pm$ 88 bp, GP 11 $\pm$ 164 bp, RGM 1183 $\pm$ 142 bp, RGM 210 $\pm$ 120 bp, RGM 665 $\pm$ 99 bp, and 1 control variety (PSJT 941 $\pm$ 401 bp). Gene expression in 15 commercial sugarcane varieties at PT GMP showed the highest ct value by the RGM210 variety so it has the potential to be tolerant of drought stress.

Keywords: Detection, P5CS Gene Expression, Molecular Characterization,
Conventional PCR, Real-Time PCR

**DETEKSI, KARAKTERISASI MOLEKULER, DAN EKSPRESI GEN P5CS
PADA VARIETAS TEBU (*Saccharum officinarum* L.) KOMERSIAL
TOLERAN CEKAMAN KEKERINGAN**

Oleh

HENI ERLITA SARI

Tesis

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar
MAGISTER SAINS**

Pada

**Program Studi Magister Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung**



**PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

Judul Proposal Penelitian : **DETEKSI, KARAKTERISASI MOLEKULER,
DAN EKSPRESI GEN P5CS PADA VARIETAS
TEBU (*Saccharum officinarum* L.) KOMERSIAL
TOLERAN CEKAMAN KEKERINGAN**

Nama Mahasiswa : **Heni Erfita Sari**

NPM : **2227021015**

Program Studi : **S2 Biologi**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



1. Komisi Pembimbing

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Mahfut, S.Si., M.Sc.

NIP. 198109092014041001

Arya Widyawan, Ph.D.

NIP. 116851

2. Ketua Program Studi Magister Biologi

Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc.

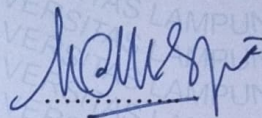
NIP. 196603051991032001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

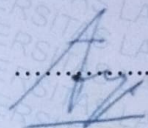
Ketua

: Dr. Mahfut, S.Si., M.Sc.



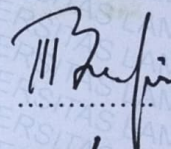
Sekretaris

: Arya Widyawan, Ph.D.

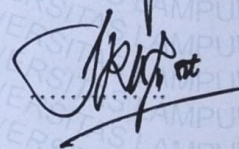


Penguji,

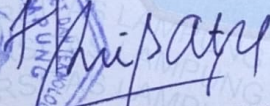
Bukan Pembimbing I : Prof. Dr. Bambang Irawan, M.Sc



Bukan Pembimbing II : Dr. Sri Wahyuningsih, M.Si.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

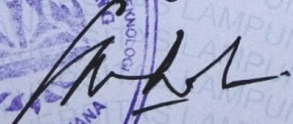


Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.

NIP. 197110012005011002



Direktor Program Pascasarjana



Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si.

NIP. 196403261989021001

Tanggal Lulus Ujian : 09 Agustus 2024

**LEMBAR PERNYATAAN
KEASLIAN TESIS**

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Heni Erlita Sari
NPM : 2227021015
Prodi : Magister Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sesungguhnya dan sejujurnya, bahwa tesis saya berjudul:

“Deteksi, Karakterisasi Molekuler, dan Ekspresi Gen P5CS Pada Varietas Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Komersial Toleran Cekaman Kekeringan”

Dengan ini menyatakan bahwa baik gagasan, tulisan, data, maupun pembahasannya adalah benar karya saya sendiri yang saya susun dengan mengikuti norma dan etika akademik yang berlaku.

Demikian pernyataan ini saya buat dan dapat dipertanggungjawabkan. Apabila dikemudian hari terbukti pernyataan saya ini tidak benar, maka saya bersedia mempertanggungjawabkannya.

Bandar Lampung, 19 Agustus 2024
Yang menyatakan,



Heni Erlita Sari
NPM: 2227021015

RIWAYAT HIDUP



Heni Erlita Sari, atau akrab disapa Heni, lahir di desa Muara Tenang 27 April 2000. Penulis merupakan putri pertama dari empat bersaudara pasangan Bapak Haryono dan Ibu Riki Nilasari.

Penulis menempuh pendidikan pertamanya di Taman Kanak-Kanak Darma Wanita Muara Tenang pada tahun 2005, pendidikan dasar di SDN01 Muara Tenang tahun 2006-2012. Selanjutnya, penulis melanjutkan jenjang pendidikan di Madrasah Tsanawiyah Diniyyah Putri Lampung dan lulus pada tahun 2015, di tahun yang sama penulis tercatat sebagai siswa Madrasah Aliyah Diniyyah Putri Lampung dan selesai pada tahun 2018. Setelah itu penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN) angkatan 2018 dan meraih gelar Sarjana Sains (S.Si) pada tahun 2022. Pada tahun 2022, penulis tercatat sebagai mahasiswa Program Studi Magister Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam di Universitas Lampung.

Selama menempuh pendidikan magister, penulis pernah menjadi presenter pada konferensi internasional, yaitu *The 4th International Conference on Applied Sciences, Mathematics, and Informatics (ICASMI)* tahun 2022 dan *1st International Conference on Medical Science and Health (1st ICOMESH)* tahun 2023. Penulis menjadi salah satu anggota penelitian yang didanai oleh PT Gunung Madu Plantations pada bulan Juni s.d Oktober 2024.

PERSEMBAHAN

Dengan mengucapkan syukur kehadirat Allah SWT yang maha kuasa, saya persembahkan karya kecil ini dengan kesungguhan hati sebagai tanda cinta kepada:

Dua orang yang paling berharga bagi hidup saya, Bapak Haryono dan Ibu Riki Nilasari yang telah memberikan kasih sayang, dukungan, motivasi, serta melindungi saya dengan do'a yang ibu dan bapak panjatkan setiap saat hingga langkah saya selalu di ringankan dan dimudahkan hingga saat ini;

Adik-adikku tersayang, Bella, Ghani, dan Zeline serta seluruh keluarga besar yang senantiasa memberikan dukungan selama saya menempuh pendidikan hingga sampai di tahap ini;

Dosen-dosen yang telah menjadi orang tua kedua di kampus yang tak jemu mengajarkan saya ilmu serta bimbingan dengan tulus dan ikhlas hingga saya berhasil mendapatkan gelar master;

Sahabat dan teman-teman yang telah berjuang bersama dari awal sampai saat ini dan seterusnya serta selalu mendukung saya dalam setiap perjalanan hidup saya;

Almamater tercinta yang menjadi kebanggan saya dimanapun saya berada,
Universitas Lampung

MOTTO

Genggam dunia sebelum dunia menggenggammu
(Penulis)

*Tujuan pendidikan itu mempertajam kecerdasan dan
memperkuat kemauan serta memperhalus perasaan.*
(Tan Malaka)

*“Janganlah kamu bersikap lemah, dan janganlah kamu
bersemedi hati, padahal kamu adalah orang-orang yang
paling tinggi derajatnya, jika kamu orang-orang yang
beriman”*
(Q.S. Ali-Imran: 139)

*Semakin lama proses penyerahan draft, semakin
memperlambat untuk proses ACC*
(Penulis)

SANWACANA

Assalamu 'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Puji syukur saya haturkan ke hadirat Allah azza wajalla yang telah melimpahkan nikmat, rahmat, hidayah, serta pertolongan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **“Deteksi, Karakterisasi Molekuler, dan Ekspresi Gen P5CS Pada Varietas Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Komersial Toleran Cekaman Kekeringan”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Lampung.

Penghargaan dan ucapan terima kasih penulis haturkan kepada semua pihak atas arahan, bimbingan, semangat, ilmu, ide, saran, kritik, dan nasehat sehingga tesis ini dapat terselesaikan. Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan rasa hormat dan ucapan terima kasih kepada:

- 1 Kedua orang tua, Bapak Haryono dan Ibu Riki Nilasari, adik-adik tersayang Bella, Ghani, dan Zeline yang senantiasa memberikan dukungan, semangat, motivasi, serta do'a yang tulus, ikhlas, dan tak pernah putus di setiap sujud sehingga menemani perjalanan hidup penulis hingga saat ini;
- 2 Bapak Dr. Mahfut, S.Si., M.Sc., selaku Pembimbing I dan Pembimbing Akademik atas waktu dan tenaganya yang telah sabar memberikan bimbingan, arahan, serta masukan kepada penulis dalam proses penelitian dan penyusunan tesis ini;

- 3 Bapak Arya Widyawan, Ph,D selaku Pembimbing II yang telah memberikan arahan, masukan, kritik, dan saran kepada penulis dalam penyusunan tesis ini;
- 4 Bapak Prof. Bambang Irawan, M.Si., selaku dosen Pembahas I yang telah memberikan kritik, saran, dan masukan yang sangat membantu penulis dalam kesempurnaan penyusunan tesis ini;
- 5 Ibu Dr. Sri Wahyuningsih, M.Si., selaku dosen Pembahas II yang telah memberikan motivasi, kritik, saran, dan masukan yang sangat membantu penulis dalam kesempurnaan penyusunan tesis ini;
- 6 Ibu Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc., selaku Ketua Program Studi Magister Biologi FMIPA Universitas Lampung;
- 7 Bapak Dr. Jani Master, M.Si., selaku Ketua Program Studi Magister Biologi FMIPA Universitas Lampung;
- 8 Bapak dan Ibu Dosen, serta seluruh staf Program Studi Magister Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung, terima kasih atas ilmu, dukungan, dan pengalaman yang telah banyak diberikan kepada penulis;
- 9 Bapak Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung;
- 10 Bapak Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si., selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Lampung;
- 11 Ibu Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani .E.A., IPM., ASEAN Eng., selaku Rektor Universitas Lampung;
- 12 PT. Gunung Madu Plantations yang telah memberikan kesempatan penelitian kepada penulis;
- 13 Teman penelitian V. Dwi Anggita Sari, S.Si., M.Si., dan Helmi Setiani, S.Si., terima kasih telah memberikan semangat dan motivasi untuk terus berjuang sampai saat ini;
- 14 Ibu Yanti, mba Yuli, Lifta, serta keluarga besar Dinas Tanaman Pangan, Hortikultura, dan Perkebunan (TPHBun) Lampung Selatan yang telah memberikan dukungan kepada penulis;

- 15 Partner terbaik Syarifah Nur'aini dan Fajar Dwi yang telah memberikan dukungan, meluangkan waktu, tenaga, pikiran, serta senantiasa kebersamai penulis hingga saat ini.
- 16 Sahabat seperjuangan, mba Nurul, mba Fatina, Ibu Arni, mba Aisyah, mba Agista, mba Dellya, mba Annisa, serta teman-teman angkatan 2022 yang tidak dapat disebutkan satu per satu, terima kasih atas kebersamaan dan persaudaraannya;

Semoga Allah senantiasa memberikan rahmat, kasih sayang, kebahagiaan, dan membalas kebaikan kalian semua. Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam penulisan tesis ini, namun penulis berharap semoga skripsi ini dapat berguna dan bermanfaat bagi pembaca. Semoga kebaikan selalumenyertai kita semua.

Bandar Lampung, 19 Agustus 2024

Heni Erlita Sari

DAFTAR ISI

SAMPUL DEPAN	i
ABSTRAK	ii
ABSTRACT	iii
SAMPUL DALAM.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN	v
LEMBAR PENGESAHAN	vi
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	vii
RIWAYAT HIDUP	viii
PERSEMBAHAN.....	ix
MOTTO	x
SANWACANA	xi
DAFTAR ISI.....	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.3 Manfaat Penelitian.....	5
1.4 Kerangka Pikir.....	5
1.5 Hipotesis Penelitian	7
II. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Tebu (<i>Saccharum officinarum</i> L.)	8
2.1.1. Sejarah Tebu.....	8
2.1.2. Klasifikasi Tebu	9
2.1.3. Morfologi Tebu	9
2.2 Distribusi dan Habitat.....	12
2.3 Pemuliaan Tanaman	13
2.4 Cekaman Kekeringan	14
2.5 Gen <i>Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase</i> (P5CS).....	15
2.6 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) Konvensional dan <i>Real-Time</i> PCR	17
III. METODE PENELITIAN	22
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	22

3.2	Alat dan Bahan	22
3.3	Bagan Alir Penelitian	24
3.4	Prosedur Penelitian	25
3.4.1	Pengamatan Morfologis	26
3.4.2	PCR Konvensional	27
3.4.3	<i>Real Time</i> PCR atau qPCR.....	31
3.4.4	Analisis Data	35
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	37
4.1	Pengamatan Morfologis	37
4.1.1	Kekerabatan Fenetik Tebu Komersial Karakter Morfologi	50
4.2	Persentase Kadar Lemas	56
4.3	Uji Kuantitatif dan Kualitatif Hasil Ekstraksi DNA	57
4.4	Profil Pita DNA Hasil Amplifikasi	60
4.5	Analisis Filogenetik.....	65
4.6	Uji Kuantitatif dan Kualitatif Hasil Ekstraksi RNA.....	82
4.6	Eksresi Gen P5CS dengan qPCR	84
V.	PENUTUP	88
5.1	Kesimpulan.....	88
5.2	Saran	88
	DAFTAR PUSTAKA	89
	LAMPIRAN.....	98

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Varietas Komersial Sebagai Sampel Penelitian	25
2. Karakter Morfologis Varietas Tebu	26
3. Komposisi Reagen PCR Untuk Satu Kali Reaksi	29
4. Sekuen Primer Spesifik dan Optimasi Suhu Pada Primer P5CS 1	30
5. Sekuen Primer Spesifik dan Optimasi Suhu Pada Primer P5CS 2	30
6. Sekuen Primer Spesifik dan Optimasi Suhu Pada Primer P5CS 3	30
7. Komposisi Reagen qPCR Untuk Sintesis cDNA	33
8. Optimasi Suhu untuk Proses Sintesis cDNA	34
9. Sekuen Primer Spesifik Gen P5CS	34
10. Optimasi Suhu dan Waktu untuk reaksi PCR	34
11. Komposisi Reagen qPCR Untuk Visualisasi dan Ekspresi Gen	35
12. Analisis Morfologis Daun dan Pelepah Daun Pada 15 Varietas Komersial ...	40
13. Karakter Morfologis Berdasarkan Pengamatan Daun dan Pelepah Daun	47
14. Indeks Similarity 15 Varietas Komersial Berdasarkan Karakter Morfologis .	49
15. Karakter yang Berperan dalam Pengelompokan 15 Tebu Komersial	55
16. Persentase Kadar Lengas.....	56
17. Uji Kuantitas DNA dengan Spektrofotometer NanoDrop	58
18. Pita DNA Amplifikasi PCR Pada 15 varietas Komersial di PT GMP	64
19. Persentase Kandungan Basa Nitrogen	67
20. Isolat yang Dibandingkan dengan Varietas Komersial Untuk.....	70
21. Hasil Analisis Jumlah Kejadian Mutasi Pada Sampel Penelitian	74

22. Frekuensi Kandungan Asam Amino Pada Sampel Penelitian	78
23. Nilai Jarak Genetik.....	81
24. Uji Kuantitas RNA dengan Spektrofotometer NanoDrop	83
25. Uji ANOVA Ekspresi Gen dengan qPCR.....	85
26. Uji BNJ 5% Ekspresi Gen dengan qPCR.....	86

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Akar Tebu.....	10
2. Batang Tebu	11
3. Daun Tebu	11
4. Bunga Tebu	12
5. Komponen-Komponen untuk PCR	17
6. Siklus <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	19
7. Bagan Alir Penelitian	24
8. Respon Cekaman Kekeringan Pada 15 Varietas Tebu Komersial	38
9. Dendrogram Hubungan Fenetik Pada 15 Varietas Tebu Komersial.....	51
10. Hubungan Kekerbatan Fenetik Pada 15 Varietas Komersial di PT GMP.....	53
11. Uji Kualitatif DNA dengan Elektroforesis.....	59
12. Profil Pita Primer 564 Pada 15 Varietas Komersial di PT	61
13. Profil Pita Primer 981 Pada 15 Varietas Komersial di PT	62
14. Profil Pita Primer 821 Pada 15 Varietas Komersial di PT GMP:	63
15. Sekuen Nukleotida Tebu Varietas GMP 3	65
16. Sekuen Nukleotida Tebu Varietas GMP 5	65
17. Sekuen Nukleotida Tebu Varietas GP 11.....	66
18. Sekuen Nukleotida Tebu Varietas RGM 1183.....	66
19. Sekuen Nukleotida Tebu Varietas RGM 210.....	66
20. Sekuen Nukleotida Tebu Varietas RGM 665.....	66
21. Sekuen Nukleotida Tebu Varietas PSJT 941	66

22. Hasil Pencarian Sekuen Homolog Varietas Komersial.....	68
23 Analisis <i>Alignment</i> 23 Sekuen Nukleotida Menunjukkan Mutasi Sampel	73
24. Perubahan Asam Amino Pada Sampel Penelitian.....	76
25. Rekonstruksi Pohon Filogenetik Menggunakan 1000 Kali <i>Bootstrap</i>	79
26. Uji Kualitatif RNA dengan Elektroforesis	84
27. Plot Amplifikasi	85

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tebu (*Saccharum officinarum* L.) tercatat sebagai komoditi pertanian dengan menyumbang sebesar 75% produksi pembuatan gula pasir dan bernilai ekonomis serta sebagai salah satu sumber pendapatan bagi negara (Dlamini, 2021). Selain itu, pemanfaatan tebu dilakukan secara optimal sebagai bahan bakar biofuel, pupuk kompos, pembuat kertas, pakan ternak, dan lainnya, sehingga tebu termasuk ke dalam tanaman industri yang terdaftar sebagai peringkat sepuluh teratas komoditi terbanyak dibudidayakan di dunia (Samudera dkk., 2019). Indonesia termasuk negara terbesar kedelapan di dunia dalam hal produktivitas, luas lahan, dan hasil panen tebu yang meningkat cukup signifikan setiap tahunnya (Aristya dkk., 2020).

Produksi gula yang tinggi disebabkan oleh peningkatan kebutuhan gula nasional membutuhkan pasokan air yang sesuai dengan umur tanaman dan dukungan teknologi yang diperlukan selama budidaya. Pertumbuhan tebu mengalami penurunan jika terjadi defisit air maupun kelebihan air, sehingga menyebabkan terjadinya penurunan produktivitas (Sari, 2022). Berdasarkan data Badan Pusat Statistik (2021), total produktivitas tebu di Indonesia mengalami fluktuatif. Jumlah ini lebih rendah jika ditinjau selama dua tahun ke belakang, yaitu pada tahun 2020 dan 2019. Namun pada tahun 2017 dan 2016 mengalami penurunan produktivitas tebu yang mencapai 976,87 ton

dan 1.101,68 ton. Penurunan produktivitas tebu disebabkan oleh beberapa aspek, di antaranya berkurangnya luas areal tebu, organisme pengganggu tanaman, maupun belum adanya bibit unggul kultivar tebu toleran cekaman kekeringan (Meiriani *et al.*, 2019). Sejauh ini, usaha yang ditempuh untuk menciptakan varietas toleran cekaman kekeringan yaitu pemuliaan tebu melalui rekayasa genetika.

Respon tanaman terhadap stres cekaman kekeringan dapat melalui biokimia, fisiologi, dan morfologi. Perubahan fisiologis pada tebu yang mengalami cekaman kekeringan akan mengalami penurunan laju fotosintesis, konduktansi stomata, laju transpirasi, maupun ekspresi yang dimunculkan oleh sejumlah gen (Jamsari dkk., 2019). Gen yang memiliki peranan dalam mengatasi defisit air sehingga tidak mengganggu metabolisme pada tanaman yaitu gen *Pyrroline 5-Carboxylate Synthetase* (P5CS) (Prabowo dkk., 2019). Transformasi gen P5CS yang merupakan penyandi enzim dalam biosintesis prolin secara konkret teruji mengoptimalkan produksi prolin serta mengembangkan tanaman yang toleran terhadap defisit air dengan menghasilkan tanaman transgenik (Satrio *et al.*, 2019). Ekspresi gen P5CS secara umum belum banyak diuji, sehingga perlu dilakukan pengujian terutama pada tanaman transgenik.

Pada tebu, gen P5CS memiliki ekspresi yang meningkat saat tanaman berada di bawah kondisi stres abiotik. Peningkatan ekspresi gen akan memicu akumulasi prolin, sehingga tebu toleran terhadap cekaman abiotik seperti kekeringan dan salinitas. Penelitian terdahulu terkait identifikasi gen P5CS pada tanaman tebu telah dilakukan oleh Iskandar dkk. (2014) yang menunjukkan bahwa tanaman yang diklaim toleran cekaman kekeringan akan menghasilkan kandungan prolin lebih tinggi, akar yang lebih panjang, tingkat kelangsungan hidup yang lebih tinggi dan sedikit kerusakan pada membran. Penelitian lain yang dilakukan oleh Prabowo dkk. (2019) mengemukakan bahwa penyisipan gen P5CS mampu meningkatkan efektivitas dan efisiensi organisme tersebut terhadap cekaman kekeringan.

PT Gunung Madu Plantations (GMP) merupakan salah satu perkebunan tebu terbesar di Indonesia yang berfokus pada produksi gula. Sebagai produsen utama gula, PT GMP menghadapi berbagai tantangan yang mempengaruhi produktivitas gula, diantaranya perubahan iklim dan kekeringan sehingga mempengaruhi pertumbuhan tebu serta menurunkan rendemen gula. Salah satu upaya yang dilakukan adalah perakitan varietas unggul toleran cekaman kekeringan sesuai dengan wilayah PT GMP sehingga dapat memenuhi kebutuhan akan gula. Identifikasi tanaman tebu tercekam cekaman kekeringan dapat dilakukan berdasarkan skala *in vitro*, *green house*, dan molekuler.

Skrining varietas toleran cekaman kekeringan di PT GMP sejauh ini hanya dilakukan berdasarkan skala *in vitro* dan *green house*. Hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan Sari (2021) dan Aritonang (2021) melaporkan bahwa mikropropagasi planlet tebu toleran cekaman kekeringan dari varietas komersial yang diberikan cekaman kekeringan *polyethilen glycol* (PEG) 6000 menunjukkan karakteristik pada volume akar yang besar (7,33-8,67 ml), kadar air relatif tinggi (26,00-50,33%), dan indeks sensitivitas rendah ($<0,62$). Penelitian terkait proses perakitan varietas toleran cekaman kekeringan sesuai dengan wilayah PT GMP oleh Rajaguguk (2022) menunjukkan varietas tebu sensitif cekaman kekeringan memiliki sistem perakaran yang kurang baik (volume dan panjang akar yang rendah) berdasarkan skala *green house*. Data hasil penelitian tersebut didasarkan pada karakter morfologis. Pada skala molekuler telah diperoleh hasil deteksi pita polimorfik pada 10 varietas komersial oleh Ananda (2022) yaitu GMP3, GMP5, GM 654, PS 864, GM 1026, PSJT941, GM 1834, GP11, GM 099, dan GM 108 menggunakan marka molekuler gen P5CS1 (ukuran pita 167bp) dan P5CS2 (ukuran pita 120 bp). Primer P5CS1 dan P5CS2 yang digunakan merujuk dari hasil penelitian Aristya *et al* (2020) mengenai skrining cekaman kekeringan pada 24 kultivar tebu di Indonesia .

Penelitian terkait karakterisasi molekuler dan ekspresi gen P5CS pada varietas komersial PT GMP yang berpotensi toleran terhadap cekaman kekeringan sejauh ini belum pernah dilakukan. Karakterisasi molekuler dapat dilakukan dengan cara mengamplifikasi atau mendeteksi gen spesifik pada tebu toleran cekaman kekeringan, yaitu gen P5CS. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu kajian lebih dalam mengenai karakteristik tebu toleran cekaman kekeringan menggunakan marka molekuler dan ekspresi gen P5CS yang berada pada tebu.

Berbagai uraian dalam latar belakang tersebut menjadi dasar penulis tertarik dalam mengkaji “Deteksi, Karakterisasi Molekuler, dan Ekspresi Gen P5CS Pada Varietas Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Komersial Toleran Cekaman Kekeringan” dengan harapan memperoleh tebu unggul yang toleran cekaman kekeringan secara molekuler sehingga mampu meningkatkan kualitas dan produksi gula di Lampung secara akurat dan lengkap.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukan penelitian ini antara lain:

1. Mengidentifikasi eksistensi gen P5CS pada varietas tebu (*Saccharum officinarum* L.) komersial di PT GMP yang berpotensi toleran terhadap cekaman kekeringan.
2. Menganalisis karakter molekuler gen P5CS pada varietas tebu (*Saccharum officinarum* L.) komersial di PT GMP yang berpotensi toleran terhadap cekaman kekeringan.
3. Mengidentifikasi ekspresi gen pada varietas tebu (*Saccharum officinarum* L.) komersial toleran cekaman kekeringan dengan nilai ct.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dilakukannya penelitian ini yaitu:

1. Mengetahui hasil deteksi dan karakterisasi varietas tebu (*Saccharum officinarum* L.) toleran cekaman kekeringan di PT GMP secara molekuler sebagai referensi dasar dalam meningkatkan budidaya dan plasma nutfah unggul sehingga akan menunjang perakitan dan penyediaan varietas baru berdasarkan sifat unggul yang diharapkan.
2. Merekomendasikan beberapa varietas toleran cekaman kekeringan sebagai tahap awal penyediaan varietas unggul tebu sehingga ketersediaannya dapat dipenuhi sepanjang tahun.
3. Menyajikan informasi ilmiah yang menunjang perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya mengenai gen P5CS tanaman tebu dan aplikasi pada tanaman lainnya.

1.4 Kerangka Pikir

Permintaan gula setiap tahunnya selalu mengalami peningkatan, namun produksi gula beberapa tahun terakhir terjadi penurunan yang diakibatkan oleh adanya perubahan iklim sehingga menyebabkan produktivitas tanaman tebu tidak optimal. Salah satu penyebab penurunan produktivitas tebu yaitu adanya cekaman kekeringan, sehingga diperlukan tindakan yang tepat untuk menanggulangi masalah tersebut dengan menyeleksi varietas unggul yang toleran terhadap cekaman kekeringan melalui pemuliaan tanaman.

Identifikasi tanaman tebu tercekam kekeringan di PT GMP sejauh ini telah dilakukan secara bertahap dari skala *in vitro* melalui agen selektif berupa PEG 6000, *green house* dengan perlakuan tidak disiram dalam kurun waktu yang variatif, serta molekuler melalui deteksi gen P5CS pada 10 varietas komersial yang direkomendasikan berdasarkan hasil penelitian skala *in vitro* maupun *green house*.

Bibit unggul yang toleran terhadap kekeringan menghasilkan respon baik secara morfologi maupun fisiologi yaitu dapat dilakukan dengan menggunakan gen *Pyrroline 5-Carboxylate Synthetase* (P5CS) yang dapat mengkode pembentukan prolin. Akumulasi prolin menunjukkan respons adaptif ketika tanaman terpapar cekaman abiotik. Prolin diperlukan untuk penyesuaian osmotik dan osmoprotektan yang berfungsi untuk menjaga kondisi homeostatis, menstabilkan struktur sel, dan mencegah degradasi protein.

Salah satu perusahaan yang mengembangkan varietas unggul dan pemasok gula nasional yaitu PT Gunung Madu Plantations (GMP). Beberapa varietas tebu komersial di PT GMP perlu diidentifikasi untuk mengetahui keberadaan gen P5CS. Hal tersebut dilandasi penelitian pada tahun-tahun sebelumnya berdasarkan skala *in vitro* dan *green house*. Penelitian skala molekuler juga telah dilakukan dengan mendeteksi pita polimorfik terhadap 10 varietas komersial. Untuk merekomendasikan serta menunjang data penelitian skala molekuler perlu dilakukan kajian mendalam mengenai karakterisasi dan ekspresi gen P5CS. Karakterisasi molekuler diperoleh dari proses sekuensing yang menunjukkan frekuensi asam amino, perubahan asam amino, khususnya kandungan prolin, mutasi, indeks similaritas antar varietas tebu, serta kekerabatan sampel penelitian dengan isolat pembandingnya melalui analisis filogenetik. Ekspresi gen P5CS ditunjukkan melalui *ct-value* yang berbanding lurus dengan produksi prolin, semakin tinggi *ct-value* pada suatu varietas, semakin banyak mensintesis prolin sehingga tanaman dikategorikan toleran cekaman kekeringan. Karena keterbatasan informasi tanaman tebu toleran cekaman kekeringan yang ada di Lampung, maka harapan dari penelitian ini dapat diperoleh varietas tebu yang unggul guna mempertahankan produktivitas gula di PT GMP melalui gen P5CS yang terekspresi pada masing-masing varietas.

1.5 Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian antara lain:

1. Gen P5CS pada varietas tebu (*Saccharum officinarum* L.) komersial di PT GMP yang toleran cekaman kekeringan menunjukkan pita spesifik.
2. Karakter molekuler gen P5CS pada varietas tebu (*Saccharum officinarum* L.) komersial di PT GMP memiliki hubungan kekerabatan dengan isolat dari daerah dan negara lain.
3. Ekspresi gen pada varietas tebu (*Saccharum officinarum* L.) komersial di PT GMP ditunjukkan dengan Ct value dimana terdapat variasi tingkat ketahanan toleran cekaman kekeringan.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tebu (*Saccharum officinarum* L.)

2.1.1. Sejarah Tebu

Tebu (*Saccharum officinarum* L.) pertama kali dibudidayakan di Nusantara pada tahun 895 M melalui Itsing, seorang perantau dari Cina dan diperjualbelikan di sekitar Batavia. Pembangunan pabrik gula pada zaman Hindia-Belanda merupakan awal mula industrialisasi gula di Indonesia, yaitu pada pertengahan abad ke-17. Sejarah perkembangan tebu tercatat pada tahun 1963-1710 sebanyak 130 pabrik gula mengalami perkembangan yang pesat. Namun karena keadaan sosial-politik dan kemunduran internal *Vereenigde Oostindische Compagnie* (VOC), banyak pabrik gula yang berhenti beroperasi. Hingga tahun 1775, pabrik gula di Jawa yang masih beroperasi hanya 55 pabrik (Evizal, 2018).

Pada masa tanam paksa tebu (tahun 1830-1870), industri tebu kembali meningkat pesat dan berangsur menempati posisi yang sangat penting dalam perekonomian Indonesia (Perdana dkk., 2019). Pada masa liberal kolonial (1870-1945), dibentuk Undang-Undang Agraria pada tahun 1870 menandai dimulainya ekonomi liberal masa Hindia Belanda, dengan memberi kesempatan kepada swasta untuk memiliki Hak Guna Usaha (HGU) selama 75 tahun. Liberalisasi di bidang industri tebu dimulai dengan pemberlakuan Undang-Undang Budidaya Tebu pada tahun 1878 (Abidah, 2018).

Setelah ditetapkan Undang-Undang Budidaya Tebu tersebut, pemerintah Hindia Belanda mengusulkan dilaksanakannya reorganisasi agraria guna mengintegrasikan tanah-tanah yang terpecah dan terpotong-potong menjadi sebuah areal perkebunan yang luas (Arsiansyah dan Aji, 2022). Prakarsa pengembangan industri gula ke luar Jawa oleh perusahaan swasta dan BUMN sudah dimulai sejak kebijakan nasionalisasi perkebunan dalam rangka memenuhi kebutuhan rakyat. Hingga kini, industri tebu telah tersebar luas di Indonesia, salah satunya di Lampung (Evizal, 2018).

2.1.2. Klasifikasi Tebu

Tebu tergolong tanaman perkebunan semusim yang dipanen satu kali pada satu siklus hidupnya. Menurut Cronquist (1981) tebu diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Magnoliophyta
Classis	: Liliopsida
Ordo	: Poales
Familia	: Poaceae
Genus	: <i>Saccharum</i>
Species	: <i>Saccharum officinarum</i> L.

2.1.3. Morfologi Tebu

Karakteristik morfologi tebu terdiri dari akar, batang, daun, dan bunga yang secara rinci sebagai berikut:

1. Akar

Tebu mempunyai akar serabut dengan panjang ± 1 meter. Tanaman tebu yang masih berbentuk biji mempunyai dua jenis akar yaitu akar potong dan akar pucuk. Stek batang akan membentuk cincin akar dan menghasilkan akar potong (stek) yang relatif berumur pendek serta berfungsi hanya pada fase vegetatif tanaman. Akar pucuk berasal dari

tunas dan memiliki umur relatif panjang, karena akar tersebut berfungsi selama tanaman hidup. Peran akar tunas tebu yaitu untuk menyangga batang tebu dengan morfologi tebal, sedikit bercabang, dan permanen (Kendari, 2022).



Gambar 1. Akar Tebu
(Iskandar dkk., 2014)

2. Batang

Batang tebu berbentuk silinder tegak dan ramping, tidak mempunyai cabang dengan tinggi mencapai 3-5 meter atau bahkan lebih, sedangkan diameternya berkisar antara 2,5-5 cm. Pada bagian penampang terdapat lingkaran yang disebut ruas dan disekat oleh buku-buku. Masing-masing buku mempunyai mata tunas (*budchips*) dan cincin akar. Perbedaan bentuk dan warna ruas batang tebu menjadi salah satu ciri khas yang membedakan varietas tebu. Batang tebu yang masih muda mengandung lapisan lilin berwarna putih pucat. Warna dan kekakuan batang ditentukan oleh varietasnya. Kulit batang tebu mempunyai struktur yang keras dengan warna yang variatif, diantaranya hijau, kuning, ungu, maupun merah tua (Andeva dkk., 2018).



Gambar 2. Batang Tebu
(Iskandar dkk., 2014)

3. Daun

Daun tebu diklasifikasikan sebagai daun tidak lengkap karena hanya memiliki upih/pelepah dan helai daun yang menempel pada batang pada tiap ruas, berselang-seling dalam dua baris pada sisi yang berlawanan. Fungsi pelepah daun adalah untuk menutupi ruas daun dan batang muda. Daunnya berbentuk pita, panjang mencapai 1- 2m dan lebar 2-7cm, tergantung varietas dan kondisi lingkungan. Daunnya memiliki tepi dan permukaan yang kasar. Daun pertama yang tumbuh dari pucuk mempunyai daun kecil dengan pelepah yang melingkari batang hingga berumur 5-6 bulan (Yuliani dan Mayangsari, 2022).



Gambar 3. Daun Tebu
(Iskandar dkk., 2014)

4. Bunga

Bunga tebu akan muncul pada saat berumur 10-12 bulan yang berupa malai bercabang terbuka seperti anak panah dengan panjang antara 70-90 cm. Tiap bunga mempunyai 1 *corolla*, 2 antera, 3 *calyx*, dan 3 stamen. Cabang bunga pertama berbentuk karangan bunga, dan cabang bunga

berikutnya membentuk untai yang dilengkapi paku dua buah sepanjang 3-4 mm. Bunga tebu mengandung benang sari, putik dan bakal biji dan dapat digunakan dalam proses pemuliaan tanaman dan penyilangan sehingga menghasilkan varietas unggul (Ardiansyah dan Purwono, 2015).



Gambar 4. Bunga Tebu
(Iskandar dkk., 2014)

2.2 Distribusi dan Habitat

Salah satu tanaman budidaya di pulau Jawa dan Sumatera yang banyak ditanam adalah tebu. Habitat tebu secara umum di daerah dataran rendah dan dataran tinggi (maksimum 1.400 mdpl) dengan kapasitas air hujan mencapai 1.500-2.500 mm/tahun. Temperatur optimum pada fase vegetatif tebu yaitu 24-30°C pada kelembaban 65-70%, dan pH tanah mencapai 5,5-7,0. Kondisi tanah yang dibutuhkan untuk pertumbuhan tebu adalah tanah dengan kelembaban sedang (90% RH) atau mesic dimana kondisi tanah tidak kering dan tidak basah serta tumbuh subur pada daerah tropis (Kendari, 2022). Budidaya tebu di Indoneia banyak ditemukan pada pulau Jawa dan Sumatera dengan fase pertumbuhan yaitu fase perkecambahan (umur 0-5 minggu), pertunasan (umur 5 minggu-3,5 bulan), pertumbuhan cepat (umur 3,5-9 bulan), dan pemasakan batang (umur ≥ 9 bulan) (Putra, 2020). Beberapa aspek lingkungan yang berperan penting dalam proses pertumbuhan tanaman tebu diantaranya ketersediaan substrat, ketersediaan oksigen, serta suhu (Sari, 2022).

Lahan yang digunakan untuk budidaya tebu di Indonesia diklasifikasikan menjadi dua jenis, yaitu sawah dan kering. Kedua jenis areal ini mempunyai potensi produktivitas yang relatif tidak sama atau bervariasi. Secara umum, lahan sawah mempunyai potensi produktivitas lebih besar daripada lahan kering. Ketersediaan air dan iklim mempengaruhi produksi tebu, terutama pada fase vegetatif awal dan tengah (Ardiansyah dan Purwono, 2015).

2.3 Pemuliaan Tanaman

Pemuliaan tanaman adalah upaya yang dilakukan guna memperoleh varietas/kultivar unggul yang diinginkan atau mempertahankan keunggulan yang telah ada melalui perubahan susunan genetik (Aristya dan Taryono, 2019). Pemuliaan tanaman terbagi menjadi dua, yaitu pemuliaan tanaman secara konvensional dan pemuliaan tanaman non konvensional (menggunakan marka molekuler). Pemuliaan tanaman secara konvensional umumnya dilakukan melalui seleksi terhadap karakter-karakter morfologi maupun fenotip. Tahapan terhadap pemuliaan tebu berkesinambungan terhadap rencana pengendalian plasma nutfah. Hal ini karena plasma nutfah mengandung berbagai keanekaragaman genetik tingkat spesies dengan karakteristik yang berbeda-beda (Chidambaram and Sivasubramaniam, 2017).

Salah satu upaya penggalian informasi untuk meningkatkan koleksi plasma nutfah dengan mengkarakterisasi karakter agronomi dan morfologi, sehingga varietas unggul tebu dapat diklasifikasikan. Potensi sifat-sifat unggul koleksi dapat diidentifikasi melalui sifat morfologi (kuantitatif dan kualitatif) yang kemudian akan digunakan untuk mengklasifikasikan koleksi dengan potensi unggul (Hamida dan Parnidi, 2019).

Pemuliaan tanaman non konvensional yaitu mutasi melalui rekayasa genetik atau terdapat transfigurasi materi genetik dari genom, kromosom, serta DNA atau gen (Sari dkk., 2021). Pemuliaan tanaman tebu secara non

konvensional dapat dilakukan melalui poliploidisasi, variasi somaklonal, haploidisasi, serta induksi mutasi. Mutasi menggunakan mutagen dilakukan untuk memperoleh keragaman genetik untuk memperbaiki sifat potensial dan stabilitas yang tinggi. Mutasi berlangsung secara spontan dan acak, dengan sifatnya yang dapat diwariskan. Proses mutasi terbagi menjadi dua, yaitu secara spontan (alami) dan melalui induksi mutagen (Faesol dkk., 2022).

2.4 Cekaman Kekeringan

Faktor utama yang mempengaruhi produktivitas tebu adalah cekaman kekeringan. Dewasa ini, kasus cekaman kekeringan menjadi salah satu fokus penelitian yang diterapkan pada berbagai negara (Minarsih dkk., 2018). Kondisi kekurangan air pada tumbuhan dapat mengakibatkan dehidrasi sel karena air berpindah dari bagian dalam sel, khususnya sitoplasma, ke bagian luar sel dalam bentuk eksosom sitoplasma tumbuhan. Tanaman sering kali mengembangkan strategi untuk menghindari kekeringan (*drought avoidance*) ketika fase awal adanya cekaman kekeringan. Salah satu proses adaptasi tanaman adalah menjaga stabilitas air (*water content*) dalam kondisi defisit air di lingkungan hidupnya (Rini dkk., 2020).

Deteksi cekaman kekeringan meliputi morofologi, anatomi, dan fisiologi yang dapat dilakukan melalui kultur *in vitro* maupun menggunakan marka molekuler (Minarsih dkk., 2020). Tanaman memiliki mekanisme khusus dalam menunjukkan resistensi terhadap cekaman kekeringan sehingga dapat bertahan hidup, diantaranya menunjukkan respon unik yang diawali melalui identifikasi gen target pada membran plasma kemudian menyebarkan informasi yang ditangkap dari satu sel ke sel lain pada masing-masing bagian tanaman (Zhu, 2016).

Berdasarkan hasil penelitian Singh *et al.*, (2019) melaporkan bahwa tanaman yang mengalami over ekspresi protein kinase (CIPK11 atau CIPK11OE) berbanding lurus dengan hipersensitivitas terhadap cekaman kekeringan yang ditunjukkan melalui proses kehilangan air dari daun dan akumulasi spesies oksigen reaktif (*reaktive oxygen species/ ROS*). Pada tingkat sel, cekaman kekeringan menginduksi kelebihan spesies oksigen reaktif sehingga mempengaruhi homeostasis redoks dan stres oksidatif dengan menurunkan potensi efisiensi fotosintesis, kerusakan sel akut akibat peroksidase, dan menurunkan stabilitas membran sel sehingga menyebabkan layu daun (Zannati, 2021). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Matin *et al.* (2014) diketahui tanaman yang mengalami cekaman kekeringan mampu mengakumulasi prolin dengan jumlah yang tinggi daripada tanaman tanpa cekaman kekeringan (kontrol).

Berdasarkan sudut pandang molekuler, respons tanaman terhadap cekaman kekeringan bervariasi, termasuk akumulasi senyawa osmoprotektif dan protein yang terkait dengan kemampuan beradaptasi terhadap kondisi defisit air (Pereira *et al.*, 2019). Dewasa ini, banyak gen pada tanaman yang diberikan perlakuan cekaman osmotik dan telah diidentifikasi maupun dikarakterisasi. Peran dari gen yang digunakan dalam identifikasi melalui analisa ekspresi dan variasi genetik tanaman transgenik guna mengetahui perannya terhadap cekaman stres (Ferreira *et al.*, 2020). Gen yang menunjukkan ekspresi toleran cekaman kekeringan diantaranya gen *pyrroline-5-carboxylate synthetase* (P5CS) dan gen *dehydrin* (DHN), dimana gen tersebut menunjukkan peningkatan ekspresi yang sehingga terbukti meningkatkan toleransi terhadap cekaman kekeringan (Iskandar *et al.*, 2011).

2.5 Gen *Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase* (P5CS)

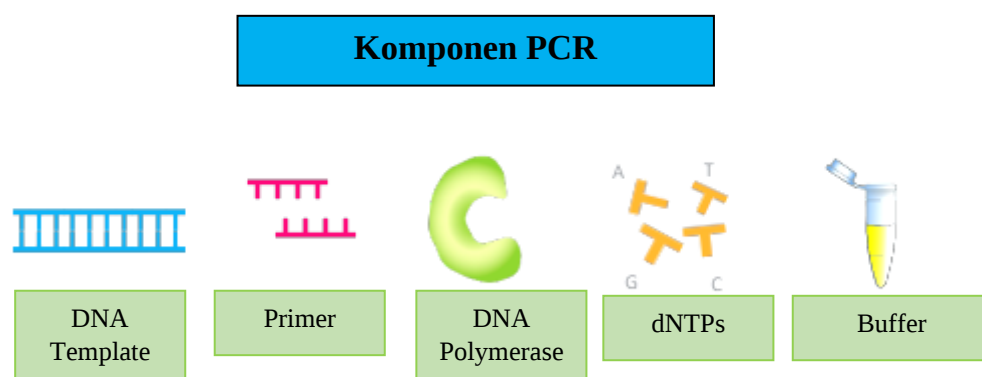
Gen *pyrroline-5-carboxylate synthetase* (P5CS) merupakan salah satu gen yang memiliki peran menjaga kekebalan tanaman terhadap cekaman

kekeringan. Gen P5CS digunakan sebagai biosintesis prolin. Prolin adalah asam amino esensial tanaman yang dikenal dengan senyawa osmoprotektif dan berperan penting dalam menjaga homeostatis, stabilitas struktur sel, dan mencegah degradasi protein. Prolin juga merupakan senyawa yang terakumulasi pada saat tanaman menghadapi cekaman kekeringan atau cekaman osmotik akibat faktor abiotik maupun biotik (Aristya *et al.*, 2020). Studi yang menggunakan gen P5CS untuk merekayasa genetik tebu agar tahan terhadap kekeringan telah menunjukkan bahwa di bawah tekanan garam dan kekeringan, peningkatan ekspresi gen P5CS menyebabkan peningkatan prolin total tanaman tersebut. Dilaporkan bahwa, selain peningkatan aktivitas P5CS dan kandungan prolin, biomassa tanaman transgenik yang ditransformasikan melalui gen pengkode P5CS juga mengalami kenaikan pada saat tercekam kekeringan yang ditandai dengan bertambahnya panjang akar, bobot tunas, maupun bobot akar (Yang *et al.*, 2021).

Ekspresi gen P5CS menunjukkan kenaikan yang signifikan pada tanaman padi saat mengalami cekaman kekeringan. Hal ini mengindikasikan bahwa ekspresi gen P5CS berbanding lurus dengan kenaikan prolin sehingga tanaman tersebut dapat dikategorikan toleran cekaman kekeringan (Liu *et al.*, 2016). Hasil penelitian Aristya *et al* (2020) menunjukkan bahwa kultivar tebu BL, PSBM 901, PS 80.1649, PS 41, PS 864, PS 58, PS 384, PS 891, PS 851, PS 865, PS 881, PS 882, PS 921, PS 951, PS 80.910, PS CO 902, PSJT 941, BZ 132, KK, TLH 2, PSDK 923, PS 862, Kentung, dan VMC 76-16 berpotensi toleran cekaman kekeringan, salinitas, dan tekanan oksidatif yang ditunjukkan oleh adanya gen P5CS. Gen P5CS meningkat saat tebu mengalami cekaman kekeringan sehingga tebu akan mengurangi produktivitas sukrosa. Penelitian ini juga didukung oleh penelitian Prabowo dkk (2019), yaitu kultivar PSDK 923 dan VMC 76-16 memiliki urutan gen P5CS sebesar 61.2%.

2.6 Polymerase Chain Reaction (PCR) Konvensional dan Real-Time PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan prosedur yang dilakukan pada proses amplifikasi segmen DNA maupun RNA spesifik melalui *in vitro* dan dilakukan penggandaan melalui penambahan enzim maupun oligogonukleotida sebagai primer. PCR pertama kali dipelopori oleh Kary Banks Mullis tahun 1985. Teknik PCR menggabungkan siklus yang berulang. Pada masing-masing siklus mampu menduplikasi target DNA utas ganda dengan jumlah yang diharapkan (Widayat dkk., 2019). Secara umum, komponen-komponen yang dibutuhkan untuk proses PCR terbagi menjadi 5 bagian (Ruiz *et al.*, 2022) yang ditunjukkan pada Gambar 5 dan dideskripsikan sebagai berikut:



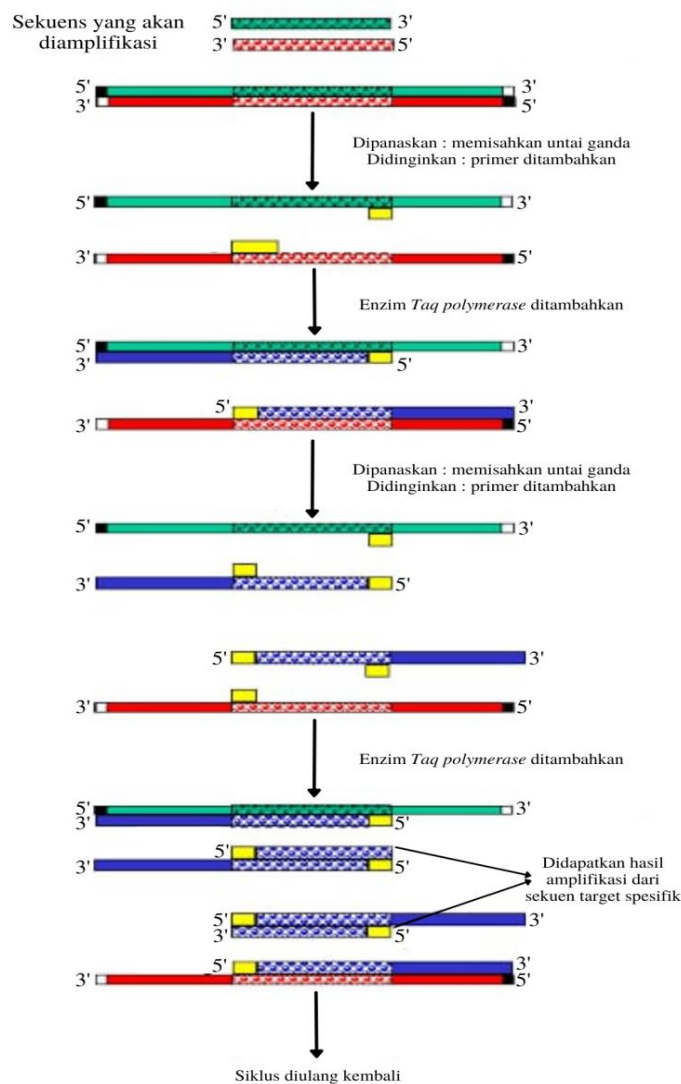
Gambar 5. Komponen-Komponen untuk PCR
(Ruiz *et al.*, 2022)

- a. *Template DNA* atau RNA yaitu asam nukleat yang berisi urutan target yang diinginkan, berasal dari darah, saliva, kulit, rambut, maupun sel dari mikroorganisme. Jumlah *template* yang optimal akan bergantung pada komposisi DNA dan enzim polymerase yang digunakan.
- b. Primer memegang peranan penting pada proses PCR karena mengandung gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang dibutuhkan sebagai penghalang amplifikasi fragmen DNA target dan dibutuhkan untuk mekanisme kehadiran DNA. Primer berperan dalam penentuan spesifitas dan sensitivitas proses PCR. Primer terdiri dari 2 oligonukleotida atau satu pasang dengan kandungan nukleotida

mencapai 18-28bp. Spesifitas PCR dipengaruhi oleh *temperature melting* (TM) berkisar antara 56-62°C dan GC *content* $\pm$ 50%. Suhu *melting* pada primer berkorelasi positif dengan nilai GC, jika TM yang dihasilkan rendah, maka akan menghasilkan produk yang tidak spesifik.

- c. *Deoxynucleotide triphosphates* (dNTPs) yang terdiri dari deoksiadenosin trifosfat (dATP), deoksisitidin trifosfat (dCTP), deoksitimidin trifosfat (dTTP), dan deoksiguanosin trifosfat (dGTP). dNTPS berperan dalam proses sintesis untai cDNA (DNA komplementer). Konsentrasi pada tiap dNTPS harus proporsional (20-200 μ M). Hal ini meminimalkan kekeliruan pada tahap fusi dan mengoptimalkan spesifisitas PCR.
- d. DNA polymerase yang berperan sebagai enzim termostabil dan mensintesis replikasi DNA pada proses PCR secara berturut-turut. Enzim ini memiliki aktivitas eksonuklease dari 5' ke 3' dan aktivitas eksonuklease dari 3' ke 5'. Konsentrasi yang umumnya digunakan pada setiap 50 μ L yaitu 0,5-2,5 unit. DNA polymerase yang digunakan harus mematuhi konsentrasi tersebut, karena dapat menyebabkan produk yang dihasilkan. Jika enzim yang digunakan terlalu banyak akan menyebabkan produk PCR yang dihasilkan bersifat non-spesifik. Jika enzim yang digunakan terlalu sedikit, maka akurasi produk PCR yang dihasilkan sangat kecil.
- e. Kofaktor ($MgCl_2$) dan *Buffer* PCR, dimana kofaktor berperan penting dalam proses pembentukan ikatan fosfodiester dengan konsentrasi yang lebih tinggi dari dNTPS dan primer. *Buffer* digunakan untuk menjaga pH sehingga proses amplifikasi akan stabil. Umumnya, *buffer* yang digunakan untuk proses PCR yaitu Tris atau HCl.

Terdapat tiga aspek krusial pada proses PCR yang terjadi secara berulang sebanyak 30-40 siklus dan berlangsung singkat yang diilustrasikan melalui Gambar 6, yaitu sebagai berikut:



Gambar 6. Siklus *Polymerase Chain Reaction* (PCR)
(Balitkabi, 2020)

- a. Denaturasi (*denaturation*) adalah tahap awal perubahan DNA *double strain* menjadi DNA *single strain*. Pada tahap ini suhu yang digunakan sebesar $\geq 95^{\circ}\text{C}$ yang terjadi selama ± 3 menit dan terdenaturasi sempurna. Denaturasi yang tidak sempurna dapat menyebabkan pembentukan DNA *double strain* lagi dalam waktu yang relatif singkat dan menyebabkan kegagalan proses PCR. Optimasi waktu denaturasi akan mempengaruhi aktivitas enzim Taq polymerase, dimana durasi yang diperlukan berkisar 2 jam, 40 menit, dan 5 menit pada suhu $92,5^{\circ}\text{C}$; 95°C ; dan $97,5^{\circ}\text{C}$.

- b. Pelekatan (*annealing*) merupakan proses penempelan primer dengan suhu $\geq 35-65^{\circ}\text{C}$, tergantung pada ukuran oligonukleotida primer yang digunakan. Syarat umum yang diperlukan dalam mendesain primer yang spesifik dan berkualitas mengandung 18-25 basa, memiliki nilai GC sebesar 50-60%. Urutan DNA pada setiap primer tidak boleh saling komplemen, karena akan menghasilkan materi sekunder pada primer dan menurunkan efisiensi PCR. Optimasi waktu pada tahap *annealing* untuk PCR yaitu 30-45 detik. Semakin panjang dimensi primernya, maka suhu yang digunakan relatif meningkat.
- c. Pemanjangan (*extention*) atau elongasi primer terjadi sebagai hasil aktifitas polimerisasi oleh enzim Taq polimerase yang pada umumnya menggunakan suhu 70°C . Selama proses Taq polimerase berlangsung aktivitasnya akan memanjangkan DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan perakitan nukleotida enzim diperkirakan 35-100 nukleotida/detik, tergantung pada *buffer*, pH, konsentrasi NaCl, dan molekul DNA target. Oleh karena itu, panjang produk PCR yang mencapai 2000 pasangan basa, 1 menit untuk fase ekstensi primer sudah cukup. Umumnya pada akhir siklus PCR, fase ini mengalami pemanjangan hingga 5 menit, oleh karenanya semua produk PCR diharapkan membentuk DNA beruntai ganda.

Real-Time PCR atau *quantitative* PCR (qPCR) berperan sebagai *monitoring* terhadap perkembangan reaksi PCR secara bersamaan dan dapat melakukan penghitungan kuantitatif. Analisis qPCR memiliki sensitivitas yang tinggi, spesifisitas yang lebih kuat, dan menggunakan biomarker *fluorescent* sehingga dapat menunjukkan hasil yang lebih realistis melalui pewarnaan, serta memiliki sensitivitas yang tinggi dan linearitas yang cukup lebar. Oleh karena itu, hasil qPCR dalam penentuan kandungan sampel memiliki akurasi yang tinggi. Banyaknya DNA yang terbentuk, maka meningkatkan intensitas *fluorescent* yang dihasilkan (Kurniawati dkk., 2019). Kenaikan intensitas *fluorescent* divisualisasikan dengan kurva amplifikasi yang menggambarkan tiga fase, diantaranya fase awal, eksponensial, dan stabil.

Metode qPCR juga umumnya digunakan untuk penelitian terkait dengan virus, RNA, kanker, maupun penyisipan gen.

Ada dua jenis *probe* yang biasa digunakan dalam real-time PCR, yaitu probe TaqMan dan probe *fluorescent dye*. Probe TaqMan terdiri dari oligonukleotida pendek yang mengandung *fluorofor* dan *quencher* pada ujung 5' dan 3'. Ketika probe TaqMan berikatan dengan target DNA atau RNA, Taq polymerase memperpanjang primer dan memecah *probe* TaqMan, melepaskan *fluorofor* dari *quencher*. Fluorofor kemudian menghasilkan fluoresensi yang dapat diukur selama reaksi PCR. *Probe fluorescent dye* di sisi lain tidak memiliki *quencher* dan *fluoresensi* hanya terjadi ketika probe berikatan dengan target (Ruiz *et al.*, 2022).

Real-time PCR memiliki beberapa keuntungan dibandingkan dengan teknik PCR konvensional. Pertama, *real-time* PCR memungkinkan deteksi DNA atau RNA target secara kuantitatif dalam waktu nyata selama reaksi PCR. Kedua, teknik ini lebih sensitif dan spesifik daripada PCR konvensional karena penggunaan *probe* spesifik. Ketiga, *real-time* PCR memungkinkan penggunaan sampel yang lebih sedikit dan mempercepat proses analisis. Namun, kekurangan pengaplikasian *real-time* PCR menggunakan *probe* sebagai fluoresen yaitu terjadinya *miss preaming* sehingga menghasilkan produk non-spesifik dan informasi *false-positive*. Salah satu hal yang perlu dilakukan pada *real-time* PCR yaitu dilakukan penganalisisan formasi dari *melting curve* (Prasetyo dkk., 2021).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2023 s.d Maret 2024 di Laboratorium PCR, *Departement Research and Development*, PT Gunung Madu Plantations (GMP) di KM 90 Terbanggi Besar, Gunung Batin Udik, Terusan Nunyai, Kabupaten Lampung Tengah, Provinsi Lampung, Laboratorium Biomolekuler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung, serta Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Alat dan bahan pada penelitian ini dibedakan menjadi 2 jenis, yaitu alat dan bahan yang digunakan untuk PCR konvensional dan qPCR, diantaranya:

1. PCR Konvensional

Alat-alat yang digunakan meliputi mesin PCR, *gel doc UV*, *fumehood*, elektroforator, *waterbath*, *centrifuge*, *tissuelyser*, *vortex mixer*, neraca analitik, mikropipet 0,5–10 μL , mikropipet 10–100 μL , mikropipet 100–1000 μL , erlenmeyer (50, 100, dan 250 ml), *tube centrifuge* (1,5 ml dan 2 ml), *microtube* (0,2 ml), *refrigerator*, *autoclave*, oven, *microwave*, *ice box*, gelas ukur, gunting, alat tulis, *zip lock*, kain hitam, dan kamera.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain sampel daun tanaman tebu (**Tabel 1**), primer untuk deteksi gen P5CS (*forward-reverse*), CTAB 3%, PVP 1%, NaCl, Tris-HCl, 2 β -mercaptoethanol, nitrogen cair (N₂), proteinase-K, TE buffer, aquades, pipet tip (*blue, yellow, and white tip*), *loading dye*, *DNA ladder* (marker) 1 kB dan 100bp, serbuk agarose, Tris-Borate EDTA (TBE), *gel red staining*, *nuclease free water*, *master mix*, kertas label, parafilm, aluminium foil, gloves, tisu, *chloroform and isoamyl alcohol*, isopropanol, natrium acetate, dan etanol 70%.

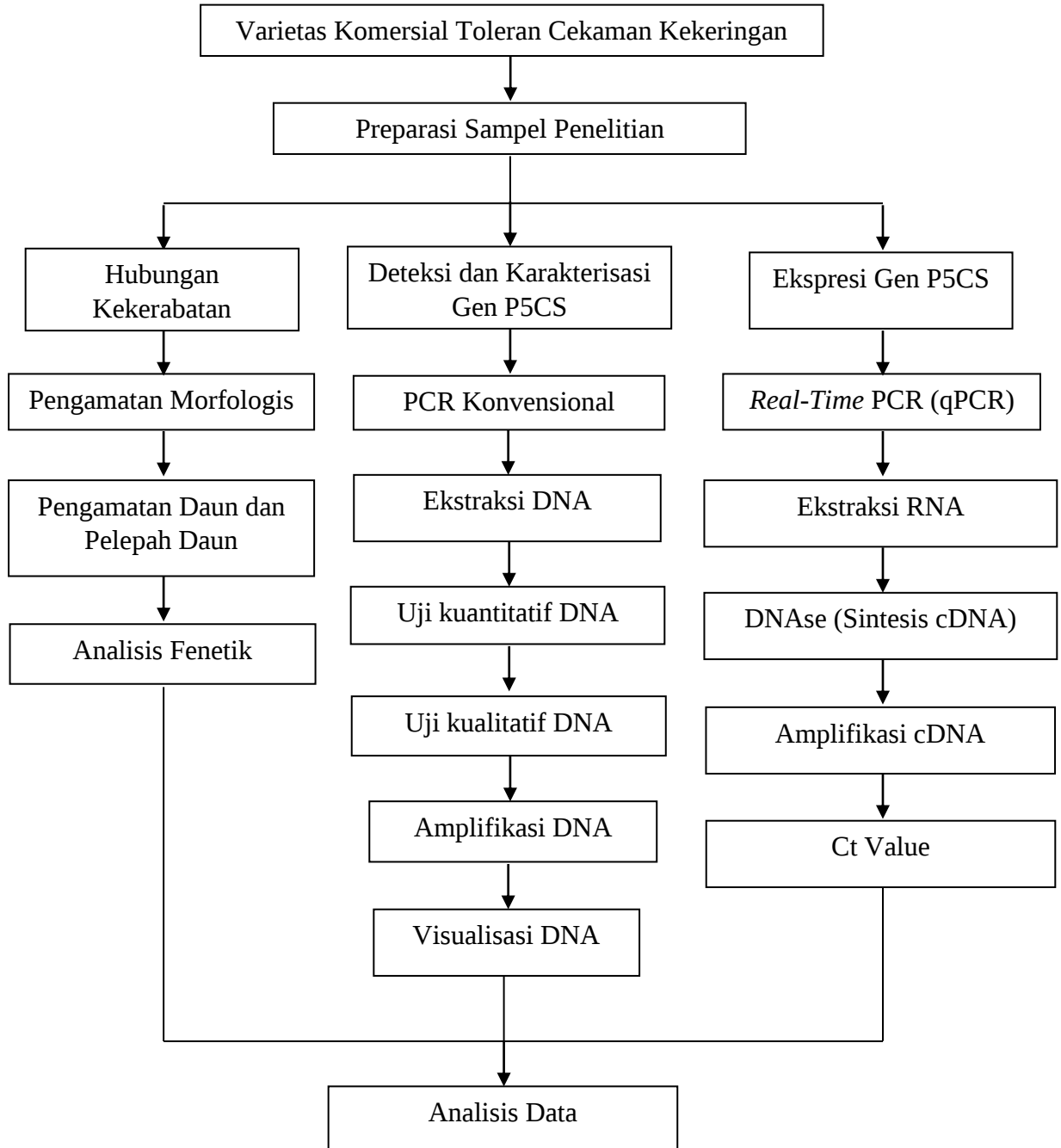
2. **Quantitative PCR (qPCR)**

Alat-alat yang digunakan diantaranya mesin qPCR, *gel doc* UV, *fumehood*, *elektroforator*, *waterbath*, *centrifuge*, *tissuelyser*, *vortex mixer*, neraca analitik, mikropipet 0,5–10 μ L, mikropipet 10–100 μ L, mikropipet 100–1000 μ L, erlenmeyer (50 ml), *tube centrifuge* (1,5 ml dan 2 ml), *microtube* (0,2 ml), *tube strip* Agilent Aria, *refrigerator*, *autoclave*, oven, *microwave*, *ice box*, gelas ukur, gunting, alat tulis, *ziplock*, dan kamera.

Bahan yang digunakan diantaranya TRIzol *reagent*, 2 β -mercaptoethanol, nitrogen cair (N₂), TE buffer pH 7,5, *water purification*, pipet tip (*blue, yellow, and white tip*), *loading dye*, *DNA ladder* (marker) 1 kB dan 100bp, serbuk agarose, Tris-Borate EDTA (TBE), *gel red staining*, *nuclease free water*, *master mix*, kertas label, parafilm, aluminium foil, *gloves*, tisu, kloroform, isopropanol, etanol 70%, ROX, enzim *Reverse Transcriptase*, *EVA Green*, dan Kit Genesig Real-Time PCR Coronavirus COVID-19.

3.3 Bagan Alir Penelitian

Tahap penelitian ditunjukkan pada bagan alir berikut:



Gambar 7. Bagan Alir Penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

Preparasi sampel dilakukan pada skala *green house* berupa *budchips* yang diperoleh dari tanaman berumur 4-6 bulan diambil pada ruas ke 6-9 atau bagian tengah. Varietas yang digunakan pada penelitian ini ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Varietas Komersial Sebagai Sampel Penelitian

No	Varietas
1.	GMP 3
2.	GMP 5
3.	GMP 6
4.	GMP 7
5.	GP 11
6.	SS 57
7.	RGM047
8.	RGM061
9.	RGM1120
10.	RGM1168
11.	RGM1183
12.	RGM186
13.	RGM210
14.	RGM225
15.	RGM665

Selanjutnya *budchips* ditanam pada *polybag* berukuran 10 x 15 cm dan dilakukan penyiraman setiap hari hingga 3 minggu setelah tanam (MST), lalu dilakukan pengamatan morfologis selama 1 hari. Varietas komersial tersebut diberikan perlakuan cekaman kekeringan dengan tidak disiram selama 6 hari berikutnya. Sampel daun diambil untuk tahap isolasi DNA dan RNA.

Prosedur penelitian terbagi menjadi tiga macam, yaitu pengamatan morfologis, PCR konvensional, dan qPCR, sebagai berikut:

3.4.1 Pengamatan Morfologis

Parameter yang diamati pada pengamatan morfologis ditunjukkan pada **Tabel 2.**

Tabel 2. Karakter Morfologis Varietas Tebu

Kode	Karakter	Kategori
D1	Lengkung helai daun	a. <1/3 daun b. 1/3 – 1/2 daun c. 1/2 – 2/3
D2	Lebar daun	a. Sempit (<4cm) b. Sedang (4-5 cm) c. Lebar (>5 cm)
D3	Warna daun	a. Hijau Tua b. Hijau c. Hijau kekuningan
D4	Warna segitiga daun	a. Putih b. Ungu c. Hijau
D5	Telinga daun	a. Tidak bertelinga b. Panjang telinga 1 kali lebarnya (lemah) c. Panjang telinga daun 2-3 kali lebarnya (sedang) d. Bertelinga sama atau lebih dari 3 kali lebarnya (kuat)
D6	Kedudukan telinga daun	a. Tegak b. Serong c. Lengkung
P1	Kedudukan bulu bidang punggung	a. Tidak berbulu b. Tegak c. Rebah
P2	Lebar daerah bulu bidang punggung	a. Tidak berbulu b. <1/4 lebar pelepah daun c. =/> 1/4 lebar pelepah daun
P3	Jarak puncak daerah bulu bidang punggung	a. Tidak berbulu b. <1cm c. =/>1cm
P4	Kerapatan bulu bidang punggung	a. Tidak berbulu b. Jarang c. Lebat
P5	Sifat lepas pelepah daun (kering)	a. Sukar b. Sedang c. Mudah
P6	Warna pelepah daun	a. Putih b. Ungu c. Hijau

(PT GMP, 2022)

3.4.2 PCR Konvensional

1. Isolasi DNA

Protokol yang diacu untuk tahap isolasi DNA menggunakan metode *cetyl-trimetyl-monium bromide* (CTAB) oleh Doyle and Doyle (1987). Tahapan yang diterapkan untuk ekstraksi sampel antara lain:

- a. Pembuatan *buffer* CTAB dengan komposisi CTAB 3%, PVP 1%, NaCl pada konsentrasi 1,4 M, Tris-HCl pada konsentrasi 0,1 M, larutan EDTA (pH 8,0) pada konsentrasi 0,05 M, dan aquades steril.
- b. Daun tebu berumur 4 MST ditimbang sebanyak 0,07 gr, dipotong kecil-kecil di atas aluminium foil. Daun dimasukkan pada *tube* steril berukuran 2 mL yang sudah berisi gotri steril sebanyak 1 biji dan liquid nitrogen (N₂) secukupnya. Daun dihaluskan selama 3x60 detik menggunakan *tissuelyser* sampai terbentuk serbuk.
- c. Setelah dihaluskan, dimasukkan *buffer* CTAB (yang telah diinkubasi dalam *waterbath* selama 15 menit dengan temperatur 65°C) mencapai 800 µL/sampel, kemudian secara bersamaan dimasukkan 10 µL 2β-mercaptoethanol, dan 5 µL proteinase-K.
- d. Sampel dihomogenkan menggunakan vortex, lalu dimasukkan ke *waterbath* selama 3x10 menit dengan temperatur 65°C, dimana tiap 10 menit diinversi secara perlahan.
- e. Sampel disentrifugasi dalam waktu 10 menit, pada 14.000 rpm, dan suhu 25°C.
- f. Larutan stok kloroform isoamil alkohol (CI) dimasukkan dalam *tube* tersebut sebanyak 1x volume sampel yang diperoleh. Sampel dihomogenisasi menggunakan vortex. Selanjutnya disentrifugasi pada temperatur 4°C selama 5 menit pada 14.000 rpm, lalu supernatan dipisahkan. Bagian ini direpitisi sebanyak 2x.
- g. Sampel diletakkan dalam refrigerator selama ± 30 menit dengan suhu -20°C. Ditambahkan natrium asetat (NA) 0,1 M, dan isopropanol 0,6 M yang telah didinginkan. Sampel disentrifugasi

dengan estimasi waktu 5 menit, suhu 4°C, dan 14.000 rpm dan akan membentuk pellet DNA.

- h. Fase cair tersebut dibuang, kemudian pellet DNA dibersihkan menggunakan 500 µL alkohol absolut, dilakukan sentrifugasi selama 5 menit, suhu 4°C dan kecepatan 14.000 rpm. Tahap ini diulangi sebanyak 2x.
- i. Proses pengeringan pellet dapat dilakukan dengan meletakkan tabung dengan posisi terbalik di atas tisu selama 24 jam pada suhu ruang. Selain itu juga dapat menggunakan *dry bath* selama 4x10 menit pada suhu 50°C.
- j. DNA dilarutkan menggunakan 40 µL TE buffer dengan pH 8,0, dilakukan *spin down* dan disimpan dalam freezer pada temperatur -20°C hingga DNA digunakan.

2. Uji Kuantitatif dan Kualitatif DNA

Untuk mengetahui kemurnian DNA dapat diuji melalui 2 tahap, yaitu spektrofotometer dan elektroforesis. Uji kuantitas DNA dilakukan dengan spektrofotometer. Kadar kemurnian DNA ditentukan dengan membagi nilai absorbansi 260 nm dengan 280 nm. Nilai kemurnian DNA yang baik antara 1,8- 2,0. Kemurnian DNA <1,8 mengindikasikan kontaminasi protein dan UV, sedangkan kemurnian DNA > 2,0 mengindikasikan kontaminasi kloroform dan fenol.

Uji kualitas DNA dilakukan melalui proses elektroforesis dengan gel agarosa. Konsentrasi agarosa yang digunakan sebesar 1% atau sebanyak 1 gr agarosa dilarutkan dengan 100 mL buffer TBE (*Tris-Borate* EDTA) 1x, lalu dimasukkan ke *microwave* dalam kurun waktu 1 menit 40 detik hingga homogen dan tidak ada penggumpalan sama sekali. Selanjutnya dimasukkan sebanyak 10 µL *gel red staining* dan dihomogenisasi. Gel agarose dihangatkan lalu dituang ke dalam cetakan yang dilengkapi oleh sisiran sebagai pembentuk sumur untuk

proses *load* sampel dan ditunggu sampai mengeras selama ± 45 menit. Sumur gel agarosa diisi dengan DNA sampel 1 μL , *loading dye* 1 μL , dan aquades 4 μL . Marka yang digunakan yaitu 1 kb. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 60 V selama 105 menit.

3. Amplifikasi DNA

Amplifikasi diterapkan dengan menggunakan metode PCR dan pasangan primer P5CS untuk analisis ekspresi gen yang telah didesain menggunakan *software* BioEdit *Sequence Alignment* Editor. Pada tahap awal dilakukan pembuatan bahan PCR dengan total 20 μL pada tiap *microtube*. Komposisi tersebut ditunjukkan oleh Tabel 3, terdiri dari *Nuclease Free Water* (NFW), *PCR Red Mix* 2X, Primer *forward-reverse*, dan sampel DNA sebagai berikut:

Tabel 3. Komposisi Reagen PCR Untuk Satu Kali Reaksi

Komposisi	Volume (μL)
<i>Nuclease Free Water</i>	11
<i>PCR Red Mix</i>	6
Primer <i>Forward</i>	0,5
Primer <i>Reverse</i>	0,5
DNA	2
Total Volume	20

Pada PCR konvensional menggunakan 3 primer dengan pita target yang berbeda-beda. Pasangan sekuen primer yang digunakan untuk amplifikasi, optimasi suhu, dan waktu yang digunakan untuk proses PCR ditunjukkan oleh Tabel 4, 5, dan 6:

Tabel 4. Sekuen Primer Spesifik dan Optimasi Suhu Pada Primer P5CS 1

Primer	Sekuen Primer (5'-3')	Ukuran Pita	GC Content
P5CS-F	AGCTCGTTCGAATTGCCAGA	564 bp	50%
PSCS-R	AAAGAGCCATGAGGCCACTC		55%

Tahapan Reaksi	Optimasi Suhu	Waktu	Siklus
Pre-denaturasi	94°C	2 Menit	1x
Denaturasi	94°C	30 Detik	40x
<i>Annealing</i>	55°C	30 Detik	
<i>Extension</i>	72°C	45 Detik	
Pasca <i>Extension</i>	72°C	5 Menit	1x

Tabel 5. Sekuen Primer Spesifik dan Optimasi Suhu Pada Primer P5CS 2

Primer	Sekuen Primer (5'-3')	Ukuran Pita	GC Content
P5CS-F	CCGGCTGGTTCTGGAAAGAT	981 bp	55%
PSCS-R	CCTGAAGGCACTGCTCAGAA		55%

Tahapan Reaksi	Optimasi Suhu	Waktu	Siklus
Pre-denaturasi	94°C	2 Menit	1x
Denaturasi	94°C	30 Detik	40x
<i>Annealing</i>	59,2°C	30 Detik	
<i>Extension</i>	72°C	45 Detik	
Pasca <i>Extension</i>	72°C	5 Menit	1x

Tabel 6. Sekuen Primer Spesifik dan Optimasi Suhu Pada Primer P5CS 3

Primer	Sekuen Primer (5'-3')	Ukuran Pita	GC Content
P5CS-F	TCAGTATTGAAGAGCGCCCG	821 bp	55%
PSCS-R	GGCCCACGAGCTATCAATGT		55%

Tahapan Reaksi	Optimasi Suhu	Waktu	Siklus
Pre-denaturasi	94°C	2 Menit	1x
Denaturasi	94°C	30 Detik	40x
<i>Annealing</i>	60°C	30 Detik	
<i>Extension</i>	72°C	45 Detik	
Pasca <i>Extension</i>	72°C	5 Menit	1x

4. Visualisasi DNA

Kualitas fragmen-fragmen DNA yang diamplifikasi diuji menggunakan elektroforesis dengan media gel agarosa 2%. Sebanyak 2 gr agarosa dilarutkan dalam 100 mL buffer TBE 1x dan dimasukkan dalam *microwave* untuk homogenisasi dan pemanasan larutan selama ± 2 menit. Kemudian ditambahkan 10 μL *gel red staining* dan dihomogenisasi. Larutan agarose dihangatkan lalu dituang ke dalam cetakan dengan sisir, dan dibiarkan sampai mengeras dengan waktu ± 45 menit. Sumuran pada gel agarosa bagian kiri dimasukkan 3 μL marker 100 bp, sumuran selanjutnya dimasukkan DNA produk amplifikasi 1,5 μL dan *loading dye* 1 μL . Proses elektroforesis berlangsung dengan tegangan 60 V selama 105 menit dengan jarak elektroda (+) dan (-) sepanjang 19,4 cm. Tahap selanjutnya divisualisasikan dengan *Gel Doc UV*.

5. Sekuensing

Hasil amplifikasi DNA dari proses PCR yang menunjukkan pita berukuran spesifik, tebal, dan jelas dilakukan sekuensing yang bertujuan untuk pengurutan basa nukleotida menggunakan metode sanger dideoksi dengan memanfaatkan pelayanan yang diberikan PT Genetika Science Indonesia ke 1st *Base Company* di Malaysia (Anbiya, 2022).

3.4.3 Real Time PCR atau qPCR

1. Isolasi RNA

Isolasi RNA menggunakan metode TRIzol reagent yang dilakukan dengan beberapa tahap, di antaranya:

- a. Penyesuaian pH TE *buffer* dari larutan stok pH 8 menjadi 7,5.
- b. Sampel daun ditimbang sebanyak 0,07 gr, dipotong kecil-kecil diatas aluminium foil. *Tube* steril berukuran 2 mL diisi sampel

daun, dan gotri steril masing-masing *tube* sebanyak 1 biji, serta *liquid nitrogen* (N₂) secukupnya. Sampel daun dihaluskan menggunakan *tissuelyser* selama 3x 60 detik atau sampai terbentuk serbuk.

- c. Setelah dihaluskan, ditambahkan TRIzol reagent sebanyak 1000 μ L/sampel dan 5 μ L 2 β -mercaptoethanol.
- d. Sampel dihomogenisasi menggunakan vortex. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan waktu 15 menit, temperatur 4°C, dan kecepatan 14.000 rpm.
- e. Larutan kloroform ditambahkan sebanyak 200 μ L/*tube* dan dihomogenisasi menggunakan vortex. Sampel disimpan di refrigerator dengan estimasi waktu $\pm$ 5 menit.
- f. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm dengan waktu 10 menit dan temperatur 4°C untuk pemisahan fase cair (bagian yang digunakan) dan natan (yang dibuang).
- g. Sampel dimasukkan dalam refrigerator kembali selama $\pm$ 30 menit pada suhu -20°C, lalu ditambahkan 500 μ L isopropanol 0,6 M yang telah didinginkan. Sampel disentrifugasi pada 12.000 rpm dengan waktu 10 menit dan temperatur 4°C. Pada langkah ini dinyatakan berhasil jika membentuk pellet RNA.
- h. Fase cairan dibuang hingga tersisa pellet RNA dicuci dengan 1000 μ L alkohol absolut, disentrifugasi pada suhu 4°C kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit. Tahap ini diulangi sebanyak 2x.
- i. Proses pengeringan pellet dapat dilakukan dengan meletakkan tabung dengan posisi terbalik di atas tisu selama 24 jam pada suhu ruang. Selain itu juga dapat menggunakan *dry bath* dengan suhu 30°C selama 4x10 menit.
- j. RNA yang telah kering diinduksi dengan 40 μ L larutan TE buffer pH 7,5 lalu dilakukan *spin down* dan disimpan pada refrigerator dengan temperatur -20°C hingga RNA dipakai untuk proses selanjutnya.

2. Uji Kuantitatif dan Kualitatif RNA

Uji kuantitas RNA dengan menggunakan spektrofotometer. Tingkat kemurnian RNA ditentukan berdasarkan $\lambda 260\text{nm}/280\text{nm}$ pada angka kemurnian mencapai 1,8- 2,0. Selanjutnya uji kualitas RNA dengan elektroforesis dimana tahapan yang dilakukan sama dengan uji kualitas DNA. Konsentrasi agarosa yang digunakan sebesar 1% atau sebanyak 1 gr agarosa dilarutkan dengan 100 mL buffer TBE (*Tris-Borate* EDTA) 1x, lalu dimasukkan *microwave* dengan estimasi waktu 1 menit 40 detik hingga larut sempurna. Kemudian dimasukkan 10 μL *gel red staining* dan dihomogenisasi. Agarosa dihangatkan dan dituang ke dalam cetakan yang berisi sisiran untuk membentuk sumur untuk proses *load* sampel dan ditunggu sampai mengeras selama ± 45 menit. Sumur gel agarosa diisi dengan RNA sampel 1 μL , *loading dye* 1 μL , dan aquades 4 μL . Marka yang digunakan yaitu 1 kb. Elektroforesis berlangsung dengan tegangan 60 V selama 105 menit. Selanjutnya divisualisasi menggunakan *Gel Doc UV*.

3. DNase (Sintesis cDNA)

Tahap sintesis cDNA dilakukan dengan mengikuti prosedur pada Kit dari Genesig *Real-Time* PCR Coronavirus COVID-19 dengan komposisi dan optimasi suhu dtunjukkan pada Tabel 7 dan 8 berikut:

Tabel 7. Komposisi Reagen qPCR Untuk Sintesis cDNA

Komposisi	Volume (μL)
qPCR Master Mix	8
Probe	2
NFW	6
Primer <i>Forward</i>	1
Primer <i>Reverse</i>	1
RNA	2
Total	20

Tabel 8. Optimasi Suhu untuk Proses Sintesis cDNA

Tahapan Reaksi	Optimasi Suhu	Waktu
<i>Reverse Transcription</i>	95°C	30 Menit
<i>Hot Start</i>	95°C	2 Menit

4. Amplifikasi cDNA

Proses amplifikasi yang dilakukan pada PCR konvensional dengan qPCR relatif sama yang berperan dalam penggandaan materi DNA. Tahapan pada proses amplifikasi diawali dengan *Reverse transcription* dengan tujuan mengubah RNA menjadi DNA komplemen dengan 4 proses, antara lain *pre-denaturasi*, *denaturasi*, *annealing*, dan *extension*. Untuk amplifikasi menggunakan primer P5CS (gen target) dan GAPDH sebagai kontrol gen untuk membantu mengidentifikasi ekspresi gen spesifik (Roslim dkk., 2020). Berikut adalah pasangan sekuen primer yang digunakan untuk amplifikasi, optimasi suhu, dan waktu disajikan pada tabel 9 dan 10:

Tabel 9. Sekuen Primer Spesifik Gen P5CS

Primer	Sekuen Primer (5'-3')	Ukuran Pita	GC Content
P5CS-F	GCAAAAGCCACAGATGGAGC	74 bp	55%
P5CS-R	CGTAAAGAGCCATGAGGCCA		60%
GAPDH-F	TGCACCCATGTTCGTTGT	-	50
GAPDH-R	CCATCAACAGTCTTCTGGGT		50

Tabel 10. Optimasi Suhu dan Waktu untuk reaksi PCR

Tahapan Reaksi	Optimasi Suhu	Waktu	Siklus
Pre-denaturasi	94°C	5 detik	1x
Denaturasi	94°C	45 Detik	40x
<i>Annealing</i>	55°C	1 Menit	
<i>Extension</i>	72°C	1 Menit 30 Detik	
Pasca <i>Extension</i>	72°C	10 Menit	1x

5. Ct Value

Sebelum melakukan qPCR RNA yang diperoleh, maka komposisi yang diperlukan untuk tahap ekspresi gen ditunjukkan pada Tabel 11.

Tabel 11. Komposisi Reagen qPCR Untuk Visualisasi dan Ekspresi Gen

Komposisi	Volume (μL)
EvaGreen 20x	5
MyTaq HS Master Mix	5
NFW	6
ROX 10x	1
Primer <i>Forward</i>	0,5
Primer <i>Reverse</i>	0,5
cDNA	2
Total	20

3.4.4 Analisis Data

1. Pengamatan Morfologis

Data hasil pengamatan morfologis dianalisis secara deskriptif dan skoring melalui analisis fenetik untuk mengetahui hubungan kekerabatan berdasarkan kesamaan morfologi. Analisis fenetik terbagi menjadi dua macam, yaitu analisis klaster dan komponen utama.

2. PCR Konvensional

Data hasil pengamatan molekuler dianalisis secara deskriptif dan skoring melalui perhitungan nilai *Polimorfisme Information Content* (PIC) dengan rumus Mateescu (2005) sebagai berikut:

$$PIC : 2*fi*(1-fi)$$

Keterangan:

fi = frekuensi band

$(1-fi)$ = frekuensi non band

Data hasil sekuen sampel dari PCR konvensional dimasukkan dalam BLAST pada NCBI untuk dilakukan alignment menggunakan Clustal W Alignment BioEdit dan MEGA V.11.0.11 yang digunakan untuk menyajikan pohon filogenetik. Analisis filogenetik masing-masing cabang dilakukan dengan menggunakan *Unweighted Pair Group Method and Arithmetic Mean* (UPGMA) bootstrap-1000 (Mahfut dkk., 2020).

3. qPCR

Untuk memperoleh hasil yang akurat, dilakukan pengulangan sebanyak 3x. Data yang diperoleh berupa CT-Value menggunakan metode *livak* atau perbandingan delta *threshold*. Nilai CT dari uji qPCR dipindahkan ke program *Microsoft Excel* untuk menghitung tingkatan ekspresi relatif yang telah diautomatisasi. Selanjutnya diuji statistik menggunakan *one way ANOVA* taraf 5%. Jika berbeda nyata maka diuji lanjut menggunakan uji BNJ 5% melalui *software IBM SPSS* versi 22.0.

V. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Adapun kesimpulan dari penelitian ini yaitu:

1. Deteksi gen P5CS dari 15 varietas tebu komersial di PT GMP dengan menggunakan marka molekuler sebanyak 3 primer spesifik menunjukkan varietas yang berpotensi toleran terhadap cekaman kekeringan yaitu RGM210 dan kontrol positif PSJT 941.
2. Karakterisasi molekuler gen P5CS yang berpotensi toleran terhadap cekaman kekeringan ditujukan pada hasil sekuensing 6 varietas perlakuan dan 1 varietas kontrol diantaranya GMP 3 (± 471 bp), GMP 5 (± 88 bp), GP 11 (± 164 bp), RGM 1183 (± 142 bp), RGM 210 (± 120 bp), RGM 665 (± 99 bp), dan PSJT 941 (± 401 bp).
3. Ekspresi gen pada 15 varietas tebu komersial di PT GMP menunjukkan nilai *ct value* tertinggi oleh varietas RGM210 sehingga berpotensi toleran cekaman kekeringan.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai gen penyandi cekaman kekeringan selain P5CS dan asam amino yang berperan, sehingga menghasilkan varietas toleran cekaman kekeringan di Indonesia, khususnya di Lampung.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidah, S. 2018. Perkembangan Perkebunan Tebu Di Mangkunegaran Tahun 1918- 1937. *Jurnal Ilmu Sejarah*. 3(6): 829-840.
- Ananda, M. 2022. Skrining Beberapa Varietas Komersil Tebu (*Saccharum officinarum* L.) GMP Toleran Terhadap Cekaman Kekeringan dengan Gen P5CS. *Skripsi*. Universitas Lampung.
- Anbiya, L. 2022. Deteksi dan Karakterisasi Molekuler Gen TrAP dan Rep Begomovirus Pada Tanaman Solanaceae di Kotamadya Bandar Lampung, Kabupaten Pringsewu, dan Kabupaten Lampung Selatan. *Skripsi*. Universitas Lampung.
- Andeva, N., Indrawati, W., dan Kusumastuti, A. 2018. Produktivitas Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Asal Bibit *Bud Chip* (Ujung,Tengah,Pangkal) Akibat Aplikasi Mulsa *Bagasse*. *Jurnal Agro Industri Perkebunan*. 6(2): 99-112.
- Ardiansyah, B. dan Purwono. 2015. Mempelajari Pertumbuhan dan Produktivitas Tebu (*Saccharum Officinarum* L) dengan Masa Tanam Sama pada Tipologi Lahan Berbeda. *Buletin Agrohortikultura*. 3(3): 357-356.
- Aristya, V.E., dan Taryono, T. 2019. Pemuliaan Tanaman Partisipatif untuk Meningkatkan Peran Varietas Padi Unggul dalam Mendukung Swasembada Pangan Nasional. *Agrotechnology Innovation*. 2(1): 26-35.
- Aristya, G.R., Kurniawan, F.Y., Prabowo, H., and Kasiamdari, R.S. 2020. Screening of Environmental Stress-Tolerant Superior Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Second International Conference on Sustainable Agriculture*. 45(8): 1-9.

- Aritonang, L.L. 2022. Respon Cekaman Kekeringan Pada Beberapa Varietas Tebu Unggul (*Saccharum officinarum* L.) Hasil Induksi Polyethilen Glycol (PEG 6000) Secara In Vitro. *Skripsi*. Universitas Lampung.
- Arsiansyah, N.F., dan Aji, R.N.B. 2022. Perkembangan Industri Pabrik Gula Lestari di Nganjuk Pada Tahun 1910-1929. *e-Journal Pendidikan Sejarah*. 13(1): 1-8.
- Ashari, A. 2018. Analisis Kandungan Prolin Planlet Jeruk Keprok Batu 55 (*Citrus reticulate* var. *crenatihiola*) Setelah Diinduksi Larutan Atonik Dalam Kondisi Cekaman Kekeringan Secara *In vitro*. *Analytical and Environment Chemistry*. 1-10.
- Badan Pusat Statistik. 2021. *Statistik Tebu Indonesia*. Badan Pusta Statistik. Jakarta.
- Balitkabi. 2020. *Aplikasi PCR dalam Pengelolaan Plasma Nutfah dan Pemuliaan Tanaman di Era Molekuler*.
<https://balitkabi.litbang.pertanian.go.id/infotek/aplikasi-pcr-dalam-pengelolaan-plasma-nutfah-dan-pemuliaan-tanaman-di-era-molekuler>
 Diakses pada tanggal 11 September 2023, pukul 15.05 WIB.
- Bibiana, Y., Taryono., dan Wulandari, R.A. 2019. Pengembangan Metode Penyaringan Klon Tebu Tahan Kering Menggunakan Metode Pengendalian Kadar Lengas. *Vegetalika*. 8(4): 251-262.
- Cheng, W., Xia, Z.J., and Feng, X.Z. 2016. A Rapid and Nondestructive Method for Soybean DNA Extraction and its Application. *Chin Bull Bot*. 51(1): 68-73.
- Chidambaram, K. and Sivasubramaniam, K. 2017. Morphological Characterization and Identification of Morphological Markers for Selected Sugarcane (*Saccharum* spp.) Cultivars. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6(12): 509-518.
- Choudhary, M.N.K., Jani, K., Sharma, R., and Shirole, N.H. (2018). GC Content: A Marker for Gene Prediction and Transcription Regulation. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*. 16(2): 185-194.
- Cui, T., Martz, L., and Guo, X. 2017. Grassland Phenology Response to Drought in the Canadian Prairies. *Remote Sensing*. 9: 1258.

- Cronquist, A. 1981. *An Intergrated System of Classification of Flowering Plants. The New York Botanical Garden*. United States of America.
- Dlamini, P.J. 2021. Drought Stress Tolerance Mechanisms and Breeding Effort in Sugarcane: A Review of Progress and Constraints in South Africa. *Plant Stress* (2): 1-18.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19: 11-15.
- Evizal R. 2018. *Pengelolaan Perkebunan Tebu*. Graha Ilmu. Yogyakarta.
- Faesol, N., Avivi, S., dan Hartatik, S. 2022. Stabilitas Hasil Tiga Genotipe Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Hasil Mutasi *Ethyl Methane sulfonate* (EMS). *Jurnal Agrikultura*. 33(3): 312-320.
- Farikh, M., PASTHA, R.W., Nafisah, A.Z., Alridho, R.R., Ramadhan, B.F., dan Achyar, A. 2023. Multiple Alignment and Primer Design for Groups of Barnacle Organisms and Amphibalanus amphitrite as Biofouling Markers. *Bioscience*. 7(2): 126-135.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., and Basra, S.M.A. 2009. Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management. *Agronomy for Sustainable Development*. 29: 185-212.
- Ferreira, M.S., Alves, P.C., Callahan, C.M., Giska, I., Farelo, L., Jenny, H., Mills, S.L., Hacklander, K., Bagus, J.M., Ferreira, J.M. 2020. Transcriptomic Regulation of Seasonal Coat Color Change in Hares. *Ecology and Evolution*. 2(10): 1180-1192.
- Ftooh, N.A., Maaty, A., and Oraby, H.A.S. 2019. Extraction of High-Quality Genomic DNA from Different Plant Orders Applying a Modified CTAB-Based Method. *Bulletin of the National Research Centre*. 43(25): 1-10.
- Ghane, A.A., Ghorpade, B.B., Autade, R.H., Gaikwad, P.N., Chavan, R.S., and Sarode, D.K. 2017. Molecular Profiling and Genetic Diversity in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Genotypes Using RAPD Markers. *Contemporary Research in India*. 7(4): 133-138.
- Hall, B. G. 2017. *Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual*. Sinauer Associates.

- Hamida, R. dan Parnidi. 2019. Kekerabatan Plasma Nutfah Tebu Berdasarkan Karakter Morfologi. *Buletin Tanaman Tembakau, Serat, dan Minyak Industri*. 11(1): 24-32.
- Hoover, D.L., Pfennigwerth, A.A., and Duniway, M.C. 2021. Drought Resistance and Resilience: The Role of Soil Moisture-Plant Interactions and Legacies in a Dryland Ecosystem. *Journal of Ecology*. 109(9): 3280-3294.
- Iskandar, H.M., Casu, R.E., Fletcher, A.T., Schmidt, S., Xu, J., Maclean, D.J., Manners, J.M., and Bonnett, G.D. 2011. Identification of Drought-Response Genes and A Study of Their Expression During Sucrose Accumulation and Water Deficit in Sugarcane Culms. *BMC Plant Biology*. 11(12): 1-14.
- Iskandar, H.M., Widyaningrum, D., dan Suhandono, S. 2014. Cloning and Characterization of and Genes from P5CS1 P5CS2 *Saccharum officinarum* L. under Drought Stress. *Journal of Tropical Crop Science*. 1(1): 23-30.
- Jamsari., Danis, R., Manti, I., dan Renfiyeni. 2019. Respon Diferensial Fisiologis Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum*) Pada Kondisi Cekaman Kekurangan Air. *Jurnal Arista*. 23(2): 100-112.
- Kendari, P. 2022. Analisis Karakter Agronomis, Anatomis, dan Molekular Pada Varietas Tebu (*Saccharum officinarum* L.) GMP3 Hasil Pemuliaan Melalui Induksi Kolkisin. *Tesis*. Universitas Lampung.
- Khan, Q., Qin, Y., Guo, D.J., Zeng, X.P., Chen, J.Y., Huang, Y.Y., Ta, Q.K., Yang, L.T., Liang, Q., Song, X.P., Xing, Y.X., and Li, Y.R. 2022. Morphological, Agronomical, Physiological and Molecular Characterization of A High Sugar Mutant of Sugarcane in Comparison to Mother Variety. *Plos One*. 17(3): 1-27.
- Komari, N., Hadi, S., Suhartono, E. 2020. Pemodelan Protein dengan *Homology Modelling* Menggunakan SWISS-MODEL. *Jurnal Jejaring Matematika dan Sains*. 2(2): 65-70.
- Kurniawati, M.D., Sumaryam., Hayati, N. 2019. Aplikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Konvensional dan *Real Time-PCR* Untuk Deteksi Virus VNN (*Viral Nervous Necrosis*) Pada Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Jurnal Techno-Fish*. 3(1): 19-30.

- Kurniawati, S., Hartati, N.S., dan Sudarmonowati, E. 2020. Motif *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) Gen *Phytoene Synthase* (PSY) Penyandi Karotenoid Ubi Kayu Berumbi Kuning. *Jurnal Ilmu Dasar*. 21(1): 19-26.
- Liu, E., Liu, Y., Wu, G., Zeng, S., Thi, T.G., Liang, L., Liang, Y., Dong, Z., She, D., Wang, H., and Zaid, I.U. 2016. Identification of a Candidate Gene for Panicle Length in Rice (*Oryza sativa* L.) Via Association and Linkage Analysis. *Front Plant Science*. 3(7): 596: 574.
- Mahfut., Indrianto, A., Somowiyarjo, S., dan Daryono, B.S. 2020. Molecular Phylogeny of Orchids Mycorrhiza Isolated from Native Tropical Orchids in Indonesia. *Malaysian Journal of Microbiology*. 16(1): 68-72.
- Masti, S., Sabaruddin, L., Anzi, A., dan Febrianti, E. 2022. Pengaruh Cekaman Kekeringan Terhadap Pertumbuhan dan Hasil Dua Varietas Kedelai (*Glycine max* (L.) Merril) Pada Tanah Ultisol. *Journal of Agricultural Sciences*. 2(4): 254-263.
- Matin R., Ebrahimi, M.A., and Niazi, A. 2014 Quantitative Expression Analysis of P5CS and BADH Genes in Cultivated Wheat Plants Under Salt and ABA Treatments. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 3(1): 43-48.
- Meiriani., Sitepu, F., and Siahaan, L. 2019. The Production of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Bud Sett at The Various Ages of Planting Material and Storage Time. *International Conference on Agriculture, Environment, and Food Security*. 454: 1-5.
- Minarsih, H., Suhandono, S., Faniar., Kristianti, T., Amanah, D.M., dan Sustiprijatno. 2018. Isolasi dan Karakterisasi Gen Dehydrin dari Tebu (*Saccharum officinarum* L.) yang Terlibat dalam Respon Toleransi Cekaman Kekeringan. *Menara Perkebunan*. 86(2): 116-125.
- Minarsih, H. Suhandono, S., Fuadi, A.K., Kristianti, T., Putranto, R.A., Sukmadjaya, D., dan Sustiprijatno. 2020. Isolation and Characterization of Dehydrin Promoter Region from Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Menara Perkebunan*. 88(1): 16-28.
- Misra, V., Solomon, S., Mall, A.K., Prajapati, C.P., Hashem, A., Fathi, E., and Ansari, M.I. 2020. Morphological Assessment of Water Stressed Sugarcane: A Comparison of Waterlogged and Drought Affected Crop. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 27: 1228-1236.

- Mitsuhashi, S., Kryukov, K., Nakagawa, S., Takehisa, Y., and Yamaguchi, K.Y. 2019. The Role of GC Content in the Evolution of Ultra-Conserved Elements and Their Implications for Regulatory Regions in the Human Genome. *Frontiers in Genetics*. 10: 100.
- Mudhor, M.A., Dewanti, P., Handoyo, T., dan Ratnasari, T. 2022. Pengaruh Cekaman Kekeringan Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Tanaman Padi Hitam Varietas Jeliteng. *Jurnal Agrikultura*. 33(3): 247-256.
- Nita, I., Listyarini, E., dan Kusuma, Z. 2014. Kajian Lengas Tersedia Pada Toposekuen Lereng Utara G. Kawi Kabupaten Malang Jawa Timur. *Jurnal Tanah dan Sumber Daya Lahan*. 1(2): 53-62.
- Nur, S., Suwanto., Saporso., and Djatmiko, H.A. 2019. Pengembangan Metode Penyaringan Klon Tebu Tahan Kering Menggunakan Metode Pengendalian Kadar Lengas. *Journal of Tropical Soils*. 25(3): 157-164.
- Perdana, Y., Susanto, H., dan Ekwandari, Y.S. 2019. Dinamika Industri Gula Sejak Cultuurstelsel Hingga Krisis Malaise Tahun 1830- 1929. *Jurnal Program Studi Pendidikan Sejarah*. 7(2): 227-242.
- Pereira, L.B., Andrade, G.S., Meneghin, S.P., Vicentini, R., and Ottoboni, L.M.M. 2019. Prospecting Plant Growth-Promoting Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Sugarcane Under Drought Stress. *Springer*. 1-10.
- Polihito, R.A., Latjompoh, M., dan Kandowangko, N.Y. 2022. Hubungan Kekerabatan Fenetik Lima Anggota Familia Araceae. *Biosfer: Jurnal Biologi dan Pendidikan Biologi*. 7(2): 129-133.
- Prabowo, H., Kurniawan, F.Y., Aristya, G.R., Musthofa, A., dan Kasiamdari, R.S. 2019. Identification of SCDR 1 and P5CS Genes in Cultivar of Environmental Stress Tolerant Superior Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) *Thai Journal of Agricultural Science*. 52(2): 93-104.
- Prasetyo, A.D., Negara, S.P., Putra, R.H., Kristanto, J., Danarto, R., Haryana, S.M., dan Astuti, I. 2021. Ekspresi Hsa-miR-22-3p Pada Urin Pasien Benign Prostate Hyperplasia (BPH) Sebagai Biomarker Non Invasif. *Berita Biologi*. 20(1): 93-102.
- PT Gunung Madu Plantation. 2022. *Research and Development: Identifikasi Karakter Morfologi Varietas Tebu*. Lampung.

- Putra, R.P. 2020. Perkecambahan dan Pertumbuhan Awal Budset dan Budchip Tebu (*Saccharum officinarum* L.) yang Ditanam Pada Berbagai Posisi Mata Tunas. *Jurnal Agrotek Tropika*. 8(3): 435-444.
- Rajaguguk, P.O. 2022. Skrining Ketahanan Kekeringan Pada Beberapa Vsrietas Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Komersil Pada Skala *Green House*. *Skripsi*. Universitas Lampung.
- Rajput, M.A., Rajput, N.A., Syed, R.N., Lodhi, A.M., and Que, Y. 2021. Sugarcane Smut: Current Knowledge and the Way Forward for Management. *Journal of Fungi*. 10(95): 1-20.
- Raza, A., Charagh, S., Abbas, S., Hassan, M.U., Saeed, F., Haider, S., Sharif, R., Anand, A., Corpas, F.J., Jin, W., Varshney, R.K. 2023. Assessment of Proline Function in Higher Plants Under Extreme Temperatures. *Plant Biology*. 379-395.
- Rini, D.S., Budiarjo., Gunawan, I., Agung, R.H., dan Munazar, R. 2020. Mekanisme Respon Tanaman Terhadap Cekaman Kekeringan. *Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati*. 19(3): 373-383.
- Roslim, D.I., Asih, H., dan Herman. 2020. Sekuen DNA Parsial Dari Gen GAPDH Pada Sirsak (*Annona muricata* L.). *Al-Kauniyah: Jurnal Biologi*. 13(2): 209-217.
- Ruiz, F., Hardie, M., Kroemer, T., Richardson, A., and Martin, K. 2022. *PCR Handbook*. Gold Biotechnology. St. Louis, Missouri.
- Samudera, A.A., Hadi, R., dan Historiawati. 2019. Pengakaran In Vitro Eksplan Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Varietas Bululawang Berbagai Konsentrasi NAA dan Sukrosa Terhadap Pertumbuhan Planlet Tebu. *Jurnal Ilmu Pertanian Tropika dan Subtropika*. 4(1): 5-13.
- Sari, H.E. 2022. Uji Dosis *Polyethilen Glycol* (PEG) 6000 Untuk Skrining Ketahanan Kekeringan Pada Planlet Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Secara *In Vitro*. *Skripsi*. Universitas Lampung.
- Sari, V.K., Haryono, K., dan Basuki, B. 2021. Respon Varietas Tebu Unggul Baru Terhadap Pemberian Nano Silika dan Cekaman Kekeringan. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*. 21(2): 91-98.

- Satrio, P., Munawar, A.A., Devianti, D., and Yunus, Y. 2019. Rapid and Simultaneous Prediction of Soil Quality Attributes Using Near Infrared Technology. *International Journal of Science Technology and Research*. 8(9): 725-728.
- Singh, A., Kumar, A., Yadav, S., and Sigh, I.K. 2019. Reactive Oxygen Species-Mediated Signaling During Abiotic Stress. *Plant Gene*. 18(6): 107-113.
- Soleh, M.A., Rosniawaty, S., dan Sofiani, E.F. 2019. Respons Pertumbuhan dan Fisiologi Beberapa Varietas Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Asal Kultur Jaringan yang Diberi Cekaman Genangan Air. *Jurnal Agrikultura*. 30(3): 117-124.
- Szabados, L., and Savoure, A. 2010. Proline: A Multifunctional Amino Acid. *Trends in Plant Science* 15(2): 89-97.
- Taniguti, L.M., Schaker, P.D., Benevenuto, J., Peters, L.P., Carvalho, G., Palhares, A., Quecine, M.C., Nunes, F.R., Kmit, M.C., and Wai, A. 2015. Complete Genome Sequence of *Sporisorium scitamineum* and Biotropic Interaction Transcriptome with Sugarcane. *PLoS ONE*. 10.
- Utama, R. 2020. *Analysis of the Development of Staple Food Prices in Domestic and International Markets*. Center for the Study of Domestic Trade. Ministry of Trade of the Republic of Indonesia.
- Vinall, K., Schmidt, S., Brackin, R., Lakshmanan, P., and Robinson, N. 2012. Amino Acids are a Nitrogen Source for Sugarcane. *Functional Plant Biology*. 39: 503-511.
- Wang, Q., Shen, X., Qiu, T., Wu, W., Li, L., Wang, Z., and Shou, H. 2021. Evaluation and Application of an Efficient Plant DNA Extraction Protocol for Laboratory and Field Testing. *Journal of Zhejiang University Science B*. 22(2): 99-111.
- Wang, Q., Guo, C., Yang, S., Zhong, Q., and Tian, J. 2023. Screening and Verification of Reference Genes for Analysis of Gene Expression in Garlic (*Allium sativum* L.) under Cold and Drought Stress. *Plants*. 12(763): 1-16.
- Widayat., Agustini, T.W., Suzery, M., Baarri, A.N., Putri, S.R., dan Kurdianto. 2019. Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) sebagai Alat Deteksi DNA Babi dalam Beberapa Produk Non-Pangan. *Indonesian Journal of Halal*. 2(1): 26-33.

- Wardani, M. T., Kusdityantini, E., dan Budiharjo, A. 2011). Identifikasi Isolat *Monascus* sp. Hasil Isolasi Angkak Berdasarkan Gen *Internal Transcribed Spacer* (ITS) Dan Pengukuran Kandungan Pigmen. *Jurnal Biologi*. 6(2): 34-40.
- Windiyani, I.P., Mahfut., Purnomo., Daryono, B.S. 2022. Morphological Variations of Superior Sugarcane Cultivars (*Saccharum officinarum*) from Lampung, Indonesia. *Biodiversitas*. 23(8): 4109-4116.
- Yang, D., Ni, R., Yang, S., Pu, Y., Qian, M., Yang, Y., and Yang, Y. 2021. Functional Characterization of the *Stipa purpurea* P5CS Gene under Drought Stress Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*. 22: 1-13.
- Yanti, A. 2017. Uji Autentifikasi Daging Kambing Terhadap Cemarkan Daging Babi Menggunakan *Real-Time PCR* (*Polymerase Chain Reaction*). *Skripsi*. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Yao, Y., Hu,X., Xing,S., and Xu, L. 2016. Isolation and Expression Analysis of Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase 2 Genes in *Saccharum spontaneum* L. *Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences*. 1: 2159-2167.
- Yuliani, D., dan Mayangsari, R. 2022. Daun Tebu (*Saccharum spontaneum* L.) Sebagai Penyerap Zat Warna Tekstil *Reactive Blue*. *Biospecies*. 15(2): 19-23.
- Zaini, A.H., Baskara, M., dan Wicaksono, K.P. 2017. Uji Pertumbuhan Berbagai Jumlah Mata Tunas Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Varietas VMC 76-16 dan PSJT 941. *Jurnal Produksi Tanaman*. 5(2): 182-190.
- Zannati, A. 2021. Peran Gen Regulator Negatif Terhadap Cekaman Abiotik Kekeringan. *Biotrends*. 12(1): 16-24.
- Zhu, J.K. 2016. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Review: Cell*. 167: 313-324.