

Analisis ko-ekspresi gen-gen regulasi *upstream* dari gen Dehydrin di tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) pada kondisi cekaman kekeringan

Co-expression analysis of Dehydrin upstream regulatory genes on sugarcane (Saccharum officinarum L.) under drought stress condition

Hayati MINARSIH^{1*)}, Jembar PAMBUDI²⁾, & Riza A PUTRANTO¹⁾

¹⁾Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, Jl. Taman Kencana No.1, Bogor 16128

²⁾Departemen Biokimia, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

Diterima tgl 3 September 2020 / disetujui tgl 26 Oktober 2020

Abstract

Sugarcane plantations in Indonesia have been expanded and shifted to the marginal land characterized by long drought period, therefore, an attempt has been initiated to generate drought tolerance varieties through genetic engineering. It could be conducted by inserting the gene that involve in plant adaptation response to drought stress such as dehydrin (DHN) into sugarcane genome. The promoter of sugarcane DHN gene was isolated and transformed into sugarcane in the previous research. This study aimed to demonstrate the functionality of sugarcane DHN promoter through expression analysis of DHN regulatory genes that play a role in response to drought stress. Expression analyses using RT-qPCR were also conducted on regulatory genes of sugarcane that inserted by Pr-IDHNSo construct treated with drought stress. The results showed that the expressions of SoMYB, SoWRKY, SoNAC, and SoDHN genes were escalated on sugarcane 16 days after stress treatment ranging from 353 to 4067 folds relatively to untreated samples in which SoNAC gene showed the highest expression. On the other hand, the analysis on transgenic sugarcane carrying DHN promoter construct showed SoNAC and SoDREB expression increased after 72 hours under drought stress. The expression values of SoNAC in transgenic and non-transgenic plants under drought condition were 4.79 and 4.99, respectively. Meanwhile, the expression values of SoDREB in transgenic and non-transgenic plants under drought condition were 13.2 and 13.3, respectively. The results of these experiments showed that the promoter construct of Pr-IDHNSo was induced by drought stress treatments highlighting the regulation of several upstream genes of SoDHN.

[Key words: expression analysis, transcription factors, DHN promoter]

Abstrak

Adanya perluasan dan peralihan areal pertanaman tebu ke lahan marginal yang bersifat kering dengan periode yang lama, memunculkan upaya perakitan varietas toleran terhadap kekeringan melalui rekayasa genetika. Hal tersebut dapat dilakukan dengan menyisipkan gen yang berperan dalam respons adaptasi tanaman terhadap cekaman kekeringan seperti *dehydrin* (DHN) ke dalam genom tanaman tebu. Promoter dari gen DHN telah diisolasi dan ditransformasikan ke tanaman tebu untuk mengetahui regulasinya dalam merespons cekaman kekeringan pada penelitian sebelumnya. Penelitian ini bertujuan membuktikan fungsionalitas daerah promoter DHN tebu melalui analisis ekspresi gen-gen regulator DHN yang berperan dalam respons terhadap cekaman kekeringan. Selain itu, analisis ekspresi gen regulator pada tebu yang telah disisipi konstruk Pr-IDHNSo dengan perlakuan cekaman kekeringan juga dilakukan. Analisis ekspresi menggunakan *Reverse Transcriptase*-qPCR menunjukkan bahwa gen *SoMYB*, *SoWRKY*, *SoNAC*, dan *SoDHN* mengalami peningkatan ekspresi pada tebu 16 hari setelah perlakuan cekaman berkisar dari 353 hingga 4067 kali relatif terhadap sampel tanpa perlakuan dengan *SoNAC* diketahui memiliki ekspresi yang tertinggi. Sedangkan analisis pada tebu transgenik yang membawa konstruk promoter DHN memperlihatkan ekspresi gen *SoNAC* dan *SoDREB* meningkat setelah 72 jam perlakuan cekaman. Nilai ekspresi gen *SoNAC* pada tanaman transgenik dan non-transgenik dalam cekaman kekeringan adalah 4,79 dan 4,99. Nilai ekspresi gen *SoDREB* pada tanaman transgenik dan non-transgenik dalam cekaman kekeringan adalah 13,2 dan 13,3. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konstruk promoter Pr-IDHNSo terinduksi oleh cekaman kekeringan dengan potensi regulasi melalui beberapa gen *upstream* dari gen *SoDHN*.

[Kata kunci: analisis ekspresi, faktor transkripsi, promoter DHN]

^{*)}Penulis korespondensi: hmiskan@yahoo.com

Pendahuluan

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan tanaman utama penghasil gula. Data Badan Pusat Statistik menunjukkan bahwa dalam kurun waktu lima tahun terakhir (2015-2019) nilai impor gula nasional meningkat pesat di kisaran 3 – 5 juta ton per tahun dibandingkan tahun-tahun sebelumnya (BPS, 2020). Hal tersebut disebabkan oleh konsumsi gula yang semakin meningkat seiring dengan peningkatan jumlah penduduk di Indonesia. Tanaman tebu pada umumnya dibudidayakan di lahan-lahan sawah. Meningkatnya kebutuhan gula nasional menyebabkan perlu dilakukan perluasan areal pertanaman tebu ke lahan-lahan marjinal untuk menghindari adanya kompetisi dengan tanaman pangan. Program yang dapat ditempuh dalam hal ini adalah pemuliaan tebu untuk menghasilkan varietas baru yang toleran terhadap kondisi lahan marjinal yang umumnya mengalami kekeringan. Salah satu cara dalam program pemuliaan adalah melalui rekayasa genetik yang telah terbukti manfaatnya dalam memperbaiki sifat tanaman. Rekayasa genetik dipilih karena lebih terarah dan juga karena tebu diketahui merupakan tanaman poliploidi yang lebih mudah berkembang secara vegetatif dibandingkan generatif (Shrivastava & Shrivastava, 2016). Adapun tanaman yang telah dikembangkan di Indonesia sebagai produk rekayasa genetika di antaranya adalah padi, tebu, tomat, singkong, pepaya, dan kentang (Rahayu, 2015). Saat ini tanaman tebu transgenik dengan sifat toleran kekeringan yang mengekspresikan gen NXI-4T telah dirilis (Sugiharto, 2017).

Gen penyandi protein dehydrin (*DHN*) merupakan salah satu gen yang berperan dalam sifat toleransi terhadap cekaman kekeringan (Santana *et al.*, 2017). *DHN* merupakan protein yang berperan dalam respons adaptasi berbagai tanaman seperti padi, sorgum, jagung, dan tanaman lain terhadap cekaman abiotik seperti kekeringan, temperatur ekstrim, salinitas tinggi, dan lain-lain (Hanin *et al.*, 2011; Santana *et al.*, 2017). Ekspresi gen penyandi protein *DHN* pada batang tebu diketahui meningkat pesat saat tanaman diberi cekaman kekeringan pada penelitian Iskandar *et al.* (2011). Diperkirakan hal tersebut juga dipengaruhi oleh gen regulator promoter *DHN* yang terinduksi oleh cekaman kekeringan. Promoter gen *DHN* pada gandum (*Triticum* sp.) dilaporkan telah berhasil diisolasi (Pr*DHN*-5) dan terbukti merupakan promoter yang sangat terinduksi oleh cekaman abiotik (Amar *et al.*, 2013). Promoter *DHN* yang merupakan fragmen genomik dari gen *DHN* (Pr-1*DHN*So) telah diisolasi dan dikonstruksikan dengan gen β -glucuronidase (*GUS*) ke dalam vektor ekspresi (Minarsih *et al.*, 2020). Gen *GUS* merupakan indikator atau *reporter gene* untuk menentukan regulasi dari promoter *DHN* di dalam konstruk yang telah dibuat. Konstruk gen ini telah ditransformasi ke dalam tanaman tebu untuk

mengetahui lebih lanjut regulasinya oleh gen lain yang berperan dalam respons cekaman kekeringan.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa promoter gen *DHN* yang telah diisolasi dari tebu varietas PSJT 941 memiliki beberapa *cis-regulating element* yang diantaranya adalah gen-gen faktor transkripsi yaitu *NAC*, *MYB*, dan *DREB* (Minarsih *et al.*, 2020). Faktor transkripsi tersebut diketahui ikut berperan dalam respons terhadap cekaman kekeringan (Mizoi *et al.*, 2012; Nakashima *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015). Gen *NAC* memiliki peran dalam respons tanaman terhadap patogen, infeksi virus, dan rangsangan lingkungan (Nuruzzaman *et al.*, 2013). Gen *DREB* (*Dehydration - Responsive - Element - Binding protein*) merupakan superfamili gen yang berperan terhadap respons cekaman kekeringan, salinitas tinggi, dan temperatur dingin. Gen *DREB* ini dapat secara spesifik berikatan dengan *cis-acting element* beberapa gen yang berhubungan langsung dengan respons tahan cekaman (Chen *et al.*, 2016).

Penelitian ini bertujuan menganalisis ekspresi gen-gen faktor transkripsi yang memiliki respons terhadap cekaman kekeringan di antaranya adalah *SoNAC*, *SoMYB*, dan *SoWRKY* dari tanaman tebu. Selain itu, dilakukan juga analisis ekspresi gen regulator pada tebu yang telah disisipi vektor konstruk promoter Pr-1*DHN*So yang diberi perlakuan cekaman kekeringan. Data yang diperoleh dapat digunakan untuk menjawab hipotesis bahwa konstruk promoter gen yang digunakan terinduksi oleh cekaman kekeringan. Dengan demikian konstruk gen tersebut dapat digunakan dalam rekayasa genetik tanaman tebu toleran kekeringan yang diharapkan dapat berproduksi dengan baik di lahan marjinal.

Bahan dan Metode

Bahan tanam dan perlakuan cekaman kekeringan

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler, Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, Bogor. Bahan tanam yang digunakan untuk analisis awal ekspresi gen-gen faktor transkripsi adalah daun tebu varietas PSJT 941 yang diberi perlakuan cekaman kekeringan selama 0 dan 16 hari dari hasil penelitian Minarsih *et al.* (2018). Sedangkan bahan tanam yang digunakan untuk analisis ekspresi gen-gen *SoNAC*, *SoDREB*, dan *GUS* adalah tanaman tebu transgenik varietas Kidang Kencana yang membawa konstruk promoter *DHN* dari hasil penelitian sebelumnya (Minarsih *et al.*, 2020). Induksi dan pembesaran tunas dari kalus tebu transgenik dilakukan di media MS2 yang mengandung IAA (2 mg L⁻¹) dan BAP (0,2 mg L⁻¹), selama 2-3 bulan. Untuk induksi perakaran, planlet disubkultur ke media MS3 selama 2-3 bulan sebelum siap untuk diaklimatisasi.

Perlakuan kekeringan mengacu pada metode Iskandar *et al.* (2014). Tanaman tebu varietas

Kidang Kencana baik transgenik maupun non-transgenik (*wild type*) diberi cekaman kekeringan secara *in vitro* dengan diinkubasi dalam media Murashige Skoog (MS) + PEG 6000 dengan konsentrasi 40% b/v. Inkubasi dilakukan selama 0, 12, 24, 48, dan 72 jam. Sebagai kontrol tanaman tebu transgenik diinkubasi dalam media MS tanpa PEG 6000.

Desain primer

Pasangan primer untuk analisis ekspresi gen didesain dua macam yaitu di daerah (1) mendekati sisi 5' dan (2) mendekati sisi 3' dari tiap sekuen untuk mengurangi risiko gagal amplifikasi akibat dari sintesis cDNA terjadi secara parsial menggunakan modul Primer3 dari piranti lunak Geneious (Biomatters Ltd., New Zealand). Sekuen primer diverifikasi kembali menggunakan analisis short BLAST-N untuk memastikan spesifisitas primer (Putranto *et al.*, 2012).

Primer *SoMYB*, *SoWRKY* dan *SoNAC* yang telah didesain dikonfirmasi dengan PCR. Program PCR mengikuti prosedur Yu *et al.* (2014) dengan sedikit modifikasi, yaitu pra-denaturasi 94 °C selama 3 menit, dilanjutkan 35 siklus meliputi denaturasi 94 °C selama 45 detik, *annealing* 58-66 °C 45 detik pada proses yang berbeda, *extension* 72 °C selama 1 menit, dan terakhir *post extension* 72 °C selama 5 menit.

Isolasi RNA

Peralatan yang akan dipergunakan didalam isolasi RNA diberi perlakuan dengan larutan DEPC (*diethylpyrocarbonat*) dan disterilkan sesuai dengan metode Chang *et al.* (1993). Sampel tanaman tebu yang telah diberi perlakuan cekaman dicuci bersih kemudian dikeringkan dengan kertas tisu. Sampel yang telah kering dipotong kecil-kecil dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus yang telah direndam dalam nitrogen cair atau dimasukkan ke dalam *freezer*. Sampel planlet tebu (daun, batang, dan akar) dihaluskan menggunakan mortar dan ditambahkan dengan nitrogen cair. Setelah itu, sebanyak 0.1 g *poly 1-ethenylpyrrolidin-2-one* (PVP) dan nitrogen cair ditambahkan secara perlahan sampai sampel halus.

Isolasi RNA total dari planlet tebu dilakukan menggunakan kit *GenAll Ribospin™ Plant* mengikuti protokol dari manufaktur. Untai pertama cDNA disintesis dari 2 µg RNA total pada reaksi final 20 µL menggunakan *RT-PCR Kit AccuPower CycleScript* sesuai petunjuk yang tersedia (Bioneer, USA). Validasi cDNA hasil sintesis untuk setiap sampel dilakukan dengan PCR menggunakan primer Actin.

Elektroforesis gel agarose

Metode elektroforesis mengacu pada Sambrook *et al.* (1989) dengan menggunakan gel agarose 1% dan buffer TBE 0,5X. Untuk visualisasi larutan tersebut ditambahkan 2 µL Peq Green (Peqlab, USA). Agarose yang telah

mengeras kemudian dipindahkan ke dalam *chamber* elektroforesis yang telah berisi buffer TBE 0,5x. *Running* untuk RNA dilakukan dengan memasukkan sampel sebanyak 250 ng RNA dengan tambahan *loading dye* sebanyak 1 x volume RNA. Proses *running* dilakukan selama 75 menit dengan tegangan listrik 25 volt. Proses *running* untuk DNA hasil PCR dilakukan dengan memasukkan 5 µL hasil PCR tanpa tambahan *loading dye*. Proses *running* dilakukan selama 30 menit dengan tegangan listrik 70 volt.

Analisis ekspresi gen-gen regulator promoter *SoDHN*

Analisis ekspresi gen dilakukan menggunakan teknik *Reverse-Transcriptase Quantitative PCR* (RT-qPCR) pada alat *Real-Time StepOne Plus* (Applied Biosystems, USA). Campuran reaksi untuk PCR terdiri dari 2 µL produk cDNA, 0,6 µL primer dengan konsentrasi 5 µM dan 3 µL 2x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) dalam volume akhir 5 µL. Kondisi PCR terdiri dari satu siklus denaturasi pada 95°C selama 5 menit, diikuti dengan 45 siklus amplifikasi (95°C selama 20 detik, 60°C selama 15 detik, dan 72°C selama 20 detik).

Relative water content (RWC)

Perhitungan nilai RWC mengacu pada Sade *et al.* (2015). Sampel yang telah diberi cekaman kekeringan diambil sebagian daunnya dan ditimbang mengikuti metode *turgidity*. Daun ditimbang dengan tiga kondisi yaitu saat keadaan masih segar (Berat segar), setelah direndam dalam air selama 4 jam (Berat basah), dan setelah dikeringkan dalam oven suhu 60 °C selama 18 jam (Berat kering). Sampel yang telah dikeringkan dalam oven ditimbang setiap 18 jam sekali sampai bobotnya stabil. Nilai RWC ditetapkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\frac{(\text{Berat segar} - \text{Berat kering})}{(\text{Berat basah} - \text{Berat kering})} \times 100\% = \text{RWC}$$

Sintesis cDNA

Sintesis cDNA diawali dengan pemurnian RNA menggunakan Kit *Invitrogen* dengan mengikuti protokol yang diberikan oleh manufaktur. Sebanyak 1000 ng RNA ditambahkan DNase sebanyak 1 µL dan 10x buffer DNase sebanyak 1 µL. RNA kemudian diinkubasi selama 15 menit pada temperatur ruang (25 °C). Selanjutnya ditambahkan EDTA 10 mM sebanyak 1 µL dan diinkubasi selama 10 menit pada temperatur 65 °C.

Sintesis cDNA dilakukan menggunakan kit RT-PCR Premix (*Bioneer*) mengikuti protokol yang diberikan oleh manufaktur. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR (Biometra) dengan program mengikuti prosedur Iskandar *et al.* (2014) dengan sedikit modifikasi, yaitu pra-denaturasi 95 °C selama 3 menit, dilanjutkan

12 siklus meliputi denaturasi 95 °C selama 5 menit, *annealing* 58 °C 1 menit, *extension* 72 °C selama 10 menit, dan terakhir *post extension* 72 °C selama 5 menit serta penurunan temperatur sampai 10 °C. Konsentrasi cDNA diukur menggunakan spektrofotometer Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Analisis ekspresi gen menggunakan Reverse-Transcriptase Quantitative PCR

Larutan *master mix* untuk satu kali reaksi dibuat dari campuran *nuclease free water* (NFW) 1,8 µL dan *Power Syber Green* (PSG) 2,5 µL, primer dengan konsentrasi 10,0 pmol L⁻¹ sebanyak 0,1 µL forward dan 0,1 µL primer reverse. Setelah itu, *master mix* dimasukkan ke dalam *plate* dan ditambahkan 0,5 µL cDNA. Proses amplifikasi dilakukan menggunakan mesin *Real time-quantitative PCR Step One Plus* (Applied Biosystem). Program *running PCR* mengikuti prosedur Iskandar *et al.* (2004) dengan modifikasi, yaitu pra-denaturasi 95 °C selama 10 menit, dilanjutkan 40 siklus meliputi denaturasi 95 °C selama 15 detik, dan *annealing* 60 °C selama 1 menit pada proses yang berbeda. Proses disosiasi atau *melt curve analysis* dilakukan pada temperatur 95 °C selama 2 menit, dilanjutkan 60 °C selama 15 detik, dan 95 °C selama 15 detik berikutnya. Nilai ekspresi dihitung menggunakan rumus ekspresi relatif terhadap gen referensi yaitu *Actin* yang mengacu pada Pfaffl (2004).

Hasil dan Pembahasan

Analisis ko-ekspresi gen-gen upstream regulator dari gen SoDHN

Gen-gen *SoMYB*, *SoNAC*, dan *SoWRKY* berada pada tingkat regulasi di atas *SoDHN*. Pada penelitian sebelumnya, elemen pengatur *cis* telah

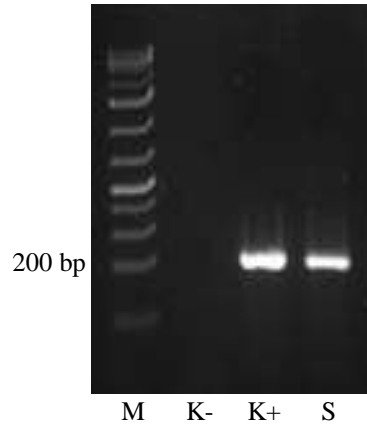
diidentifikasi pada daerah promoter gen *SoDHN* yang menunjukkan potensi regulasi ekspresi *SoDHN* oleh gen-gen *SoMYB*, *SoNAC*, dan *SoWRKY* (Minarsih *et al.*, 2020). Pasangan primer untuk analisis ekspresi gen telah didesain dan sekuen-sekuennya ditampilkan pada Tabel 1.

Sintesis cDNA tebu telah berhasil dilakukan yang ditunjukkan dengan hasil amplifikasi PCR menggunakan primer Actin (Gambar 1). Ukuran DNA yang diperoleh menggunakan primer aktin sesuai dengan primer yang didesain yaitu sekitar 200 bp. Hasil amplifikasi PCR untuk uji konfirmasi primer-primer dari gen *SoMYB*, *SoWRKY*, dan *SoNAC* ditunjukkan pada Gambar 2. Optimasi temperatur *annealing* telah dilakukan dengan beberapa temperatur antara 58-66 °C. Berdasarkan percobaan tersebut diperoleh bahwa temperatur *annealing* optimal adalah 60 °C. Gambar 2 juga menunjukkan bahwa ada dua primer yang memberikan hasil yang kurang baik pada suhu 60°C yaitu *SoMYB-2* dan *SoWRKY-2* sehingga tidak digunakan pada pengujian selanjutnya.

Analisis ekspresi gen dilakukan secara kuantitatif dengan teknik *Reverse-Transcriptase Quantitative PCR* (RT-qPCR). Primer gen-gen *upregulator* yang digunakan dalam RT-qPCR adalah *SoMYB*, *SoWRKY*, *SoNAC*, dan *SoDHN* dengan sampel cDNA tebu yang diberi cekaman kekeringan selama 16 hari (S16) dan tidak diberi cekaman (S0). Nilai ekspresi setiap gen menunjukkan hasil yang meningkat signifikan tetapi juga variatif untuk setiap gen dari sampel yang diberi perlakuan cekaman kekeringan dengan peningkatan berkisar dari 353 hingga 4067 kali relatif terhadap sampel yang tidak diberi perlakuan (Tabel 2). Nilai ekspresi tertinggi terdapat pada gen *SoDHN* yaitu 1,03 pada sampel S16 sedangkan nilai ekspresi terendah adalah gen *WRKY-1* yaitu 6,87 x 10⁻⁵.

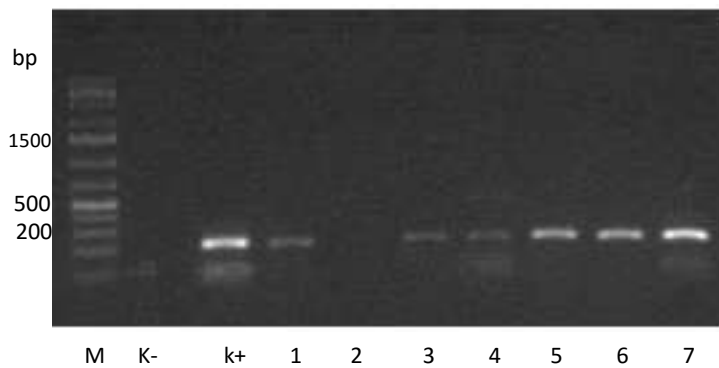
Tabel 1. Analisis *in silico* terhadap pasangan primer untuk uji ko-ekspresi
 Table 1. *In-silico analysis of primer pairs for co-expression analysis*

Primer Primer	Sekuen Sequence	Panjang (pb) Length (bp)	Tm (°C) Tm (°C)	Komposisi GC (%) GC content (%)	BLAST-n BLAST-n	Kesamaan (%) Identity (%)	No aksesori Accession number
<i>SoMYB-F1</i>	CTGCGGTGGATGAACTACCT	20	60,13	55,00	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar	100	HF679438.1
<i>SoMYB-R1</i>	AGGAGCTTGCGCTTGATGT	19	61,10	52,63	ScMYB32 protein		
<i>SoMYB-F2</i>	AGCAGCAGCGGCAGTAGTAG	20	60,89	60,00	<i>Saccharum officinarum</i>	100	EF372521.1
<i>SoMYB-R2</i>	GCCCGAAATCAATAAAACCA	20	59,77	40,00	MYB protein		
<i>SoWRKY-F1</i>	CCTCCTCGTACTTCCCATCA	20	60,07	55,00	<i>Saccharum officinarum</i>	100	GQ246458.1
<i>SoWRKY-R1</i>	AGGAGGTTTCATGCCATTGTC	20	59,93	50,00	WRKY transcription factor		
<i>SoWRKY-F2</i>	CCCAACCCGAGGAAGTACTA	20	59,05	55,00	<i>Saccharum officinarum</i>	100	GQ246458.1
<i>SoWRKY-R2</i>	AGTATGGAGGCGAGAAGCAG	20	59,60	55,00	WRKY transcription factor		
<i>SoNAC-F1</i>	TACGGCGAGAAGGAGTGGTA	20	60,79	55,00	<i>Saccharum officinarum</i>	100	AY742218.1
<i>SoNAC-R1</i>	ACTCGTGCATGATCCAGTTG	20	59,71	50,00	NAC23 protein		
<i>SoNAC-F2</i>	ACAGCCTCAGGTTGGATGAC	20	60,12	55,00	<i>Saccharum officinarum</i>	100	AY742218.1
<i>SoNAC-R2</i>	GTAGTACGCCGCCAGGTC	18	59,27	66,67	NAC23 protein		
<i>SoDHN-F1</i>	GACCAGTACGGCAATCCAGT	20	60,00	55,00	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar	100	KF184715.1
<i>SoDHN-R1</i>	TGATTCCTTCTTCTCCTTC	21	59,64	47,62	R570 LEA gene		



Gambar 1. Hasil amplifikasi cDNA tebu menggunakan primer Actin. (M) Marka DNA 1 Kb Plus Ladder, (K-) kontrol negatif air, (K+) kontrol positif cDNA tebu, (S) cDNA tebu

Figure 1. Amplification result of sugarcane cDNA using Actin primer. (M) DNA Marker 1 Kb Plus Ladder, (K-) negative control (H₂O), (K+) positive control, sugarcane cDNA, (S) sugarcane cDNA



Gambar 2. Hasil amplifikasi cDNA tebu menggunakan primer *SoMYB-1* (lajur 1), *SoMYB-2* (lajur 2), *SoWRKY-1* (lajur 3), *SoWRKY-2* (lajur 4), *SoNAC-1* (lajur 5), *SoNAC-2* (lajur 6), *SoDHN* (lajur 7). (M) Marka DNA 1 Kb Plus Ladder, (K-) kontrol negatif (H₂O), (K+) kontrol positif, primer Actin

Figure 2. Amplification of sugarcane cDNA using primers: *SoMYB-1* (lane 1), *SoMYB-2* (lane 2), *SoWRKY-1* (lane 3), *SoWRKY-2* (lane 4), *SoNAC-1* (lane 5), *SoNAC-2* (lane 6), *SoDHN* (lane 7), (M) DNA Marker 1 Kb Plus Ladder, (K-) negative control (H₂O), (K+) positive control, Actin primer

Tabel 2. Ekspresi relatif gen-gen regulator promotor DHN tebu

Table 2. Relative expression of sugarcane DHN promoter regulator genes

Gen Gene	S0 (kontrol) S0 (control)	S16 (perlakuan) S16 (treated)	Kelipatan (perlakuan/kontrol) Fold change (treated/control)
<i>SoMYB</i>	1,15x 10 ⁻⁴ ±4,267x 10 ⁻⁶ b	3,50x10 ⁻¹ ±0,0291 a	3043
<i>SoWRKY</i>	6,87x10 ⁻⁵ ±2,98x10 ⁻⁵ b	5,40x10 ⁻² ±0,0067 a	786
<i>SoNAC</i>	2,39x10 ⁻⁴ ±3,04x10 ⁻⁵ b	9,72x10 ⁻¹ ±0,0045 a	4067
<i>SoDHN</i>	2,92x10 ⁻³ ±6,42x10 ⁻⁴ b	1,03x10±0,0789 a	353

Keterangan : Angka pada kolom yang sama diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji *student T-test* pada $\alpha=0,05$

Note: Numbers in the same column followed by the same letters are not significantly different according to student T-test at P= 0.05

Peningkatan ekspresi gen-gen regulator menunjukkan bahwa ekspresi gen *SoDHN* berpotensi di bawah regulasi ketiga gen tersebut. Gen *SoNAC* memiliki nilai ekspresi tertinggi di antara ketiga gen regulator lainnya yaitu sebesar 0,972 dan peningkatan ekspresi sebesar 4067 kali dibandingkan kontrol (S0). Gen-gen regulator yang meningkat ekspresinya di bawah cekaman

kekeringan mengindikasikan potensi regulasi positif gen *SoDHN* oleh ketiga gen tersebut. Keempat gen yaitu *SoMYBI*, *SoWRKYI*, *SoNACI*, dan *SoDHN* diketahui termasuk dalam gen *late response to drought* (Iskandar *et al.*, 2011). Hasil ekspresi yang diperoleh dalam percobaan ini membuktikan hal tersebut.

Analisis ekspresi gen-gen regulator terpilih menggunakan RT-qPCR pada tebu transgenik yang diberi cekaman kekeringan

Untuk mengetahui kandungan kadar air planlet tanaman tebu yang diberikan perlakuan cekaman kekeringan secara *in vitro* dilakukan perhitungan *Relative Water Content* (RWC) (Tabel 3). Hasil perhitungan RWC menunjukkan bahwa semakin lama perlakuan cekaman kekeringan nilai RWC juga menurun. Nilai RWC terendah untuk sampel transgenik dengan cekaman yaitu 66% pada perlakuan 72 jam, sedangkan sampel non-transgenik yaitu 64% pada perlakuan 48 jam. Nilai RWC sampel transgenik dengan cekaman mengalami penurunan di setiap penambahan jam perlakuannya mulai dari 94% sampai 66%. Nilai RWC berkisar pada angka 60% dapat dikatakan bahwa tanaman mengalami cekaman kekeringan moderat (Giday *et al.*, 2014). Pada tanaman tebu dengan nilai RWC di bawah 76% sudah diindikasikan kekurangan air (Graca *et al.*, 2010). Nilai RWC sampel transgenik tanpa cekaman cenderung stabil dan memiliki nilai di atas 90%. Nilai RWC sampel non-transgenik dengan cekaman mengalami penurunan sampai perlakuan 48 jam dan naik kembali pada perlakuan 72 jam. Nilai RWC yang diperoleh berfungsi untuk mengindikasikan bahwa tanaman mengalami kekurangan air.

Metode RWC ini memiliki kesamaan fungsi dengan pengukuran potensial air. Namun demikian, nilai RWC memberikan indikasi lebih kuat dari respons tanaman terhadap berbagai kondisi lingkungan dibandingkan potensial air. RWC diketahui telah terbukti menjadi parameter yang lebih stabil dibandingkan potensial air daun (Sade *et al.*, 2009, 2012).

Hasil isolasi RNA sampel tebu menunjukkan hasil yang baik dengan terbentuknya dua pita sub unit rRNA yaitu 28S dan 18S secara utuh. Konsentrasi RNA yang diperoleh berbeda-beda setiap sampel dengan konsentrasi tertinggi adalah 823,5 ng μL^{-1} yaitu sampel B72.3 dan yang terendah adalah sampel A48.1 yaitu 73,5 ng μL^{-1} (data tidak ditampilkan). Sampel tebu yang diberi cekaman kekeringan dan kontrol kemudian diisolasi total RNA dan dilanjutkan dengan sintesis cDNA ditunjukkan dengan hasil amplifikasi PCR menggunakan primer Actin yang membentuk pita dengan ukuran 200 bp (Gambar 3).

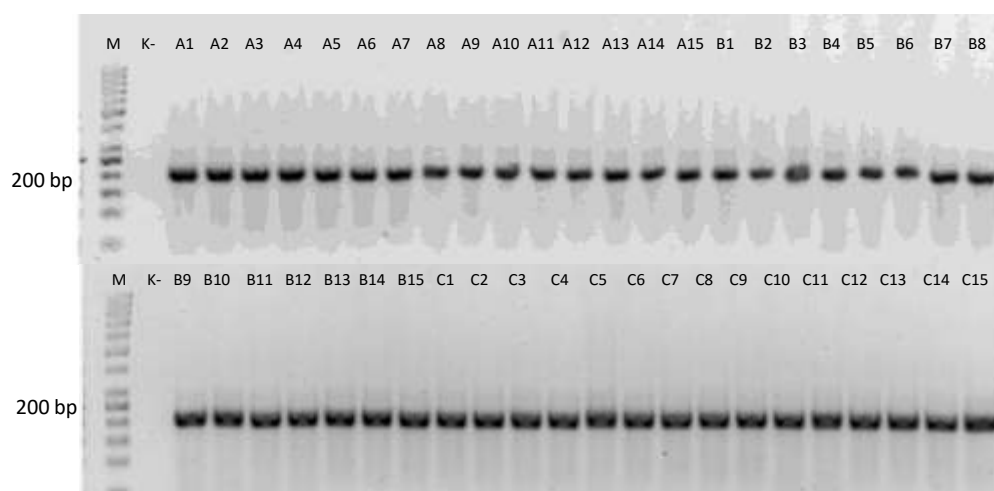
Selanjutnya dilakukan analisis ekspresi gen dengan teknik RT-qPCR menggunakan primer *SoNAC*, *SoDREB*, *GUS*, dan *Actin* (Tabel 4) dengan sampel cDNA tebu transgenik yang diberi cekaman kekeringan selama 0, 12, 24, 48, 72 jam dan tidak diberi cekaman. Nilai ekspresi setiap gen menunjukkan hasil yang meningkat dan bervariasi untuk setiap gen antar sampel yang diberi perlakuan cekaman kekeringan dengan sampel yang tidak diberi perlakuan.

Uji analisis ekspresi RT-qPCR dilakukan menggunakan gen *Actin* sebagai kontrol internal. Uji ini dilakukan untuk membuktikan bahwa gen *SoNAC*, *SoDREB*, dan promoter DHN (Pr-1DHNSo) terinduksi oleh cekaman kekeringan. *SoNAC* dipilih berdasarkan hasil percobaan sebelumnya dimana ekspresinya meningkat lebih tinggi dibandingkan faktor transkripsi lainnya yaitu *SoMYB* dan *SoWRKY*. Gen *SoNAC* dan *SoDREB* juga merupakan gen regulator yang mempengaruhi ekspresi gen *SoDHN* dan diujikan menggunakan gen *GUS* sebagai gen reporter yang telah dikonstruksi dengan Pr-1DHNSo (Minarsih *et al.*, 2020). Hasil yang diperoleh digunakan untuk mengetahui pola ekspresi gen *SoNAC*, *SoDREB*, dan *GUS* yang telah dikonstruksi dengan Pr-1DHNSo akibat cekaman kekeringan.

Nilai ekspresi setiap gen menunjukkan hasil yang meningkat dan bervariasi pada setiap sampel yang diberikan perlakuan cekaman kekeringan (Tabel 5-7). Nilai ekspresi cenderung meningkat dan nilai ekspresi tertinggi terdapat pada sampel yang diberikan perlakuan cekaman kekeringan sampai 72 jam untuk gen *SoNAC* dan *SoDREB* baik pada tanaman transgenik maupun non-transgenik (Tabel 5-6). Nilai ekspresi gen *SoNAC* pada tanaman transgenik dan non-transgenik pada perlakuan cekaman kekeringan adalah masing-masing 4,79 dan 4,99. Nilai ekspresi gen *SoDREB* pada tanaman transgenik dan non-transgenik dalam cekaman kekeringan adalah masing-masing 13,2 dan 13,3. Namun demikian, gen *GUS* mengalami pola ekspresi yang berbeda. Gen *GUS* memiliki nilai ekspresi yang tinggi dan cenderung stabil di setiap tanaman transgenik dengan dan tanpa perlakuan cekaman kekeringan dan berbeda nyata pada taraf kepercayaan 5% menggunakan uji *student T-test* (Tabel 7). Hal ini membuktikan bahwa gen *GUS* yang digunakan sebagai marka dari tanaman transgenik terdeteksi di dalam sampel tanaman tebu transgenik.

Tabel 3. Hasil perhitungan nilai RWC tebu transgenik dengan perlakuan kekeringan
Table 3. RWC value of transgenik sugarcane treated with drought stress

Waktu (jam) Time (hours)	Transgenik dengan cekaman Drought treated transgenic	Transgenik tanpa cekaman Non-treated transgenic	Non-transgenik dengan cekaman Drought treated wild type
0	94	93	92
12	91	92	89
24	89	90	78
48	86	92	64
72	66	91	73



Gambar 3. Elektroforegram amplifikasi cDNA tebu dengan primer Actin. (M) Marka DNA 50 bp, (K-) kontrol negatif, (A) sampel transgenik dengan cekaman, (B) sampel transgenik tanpa cekaman, (C) sampel non-transgenik dengan cekaman

Figure 3. Amplification of electropherogram of sugarcane's cDNA using Actin primer. (M) DNA Marker 50 bp, (K-) negative control, (A) drought treated-transformant samples, (B) non-treated-transformant samples, (C) drought treated-wild type

Tabel 4. Pasangan primer yang digunakan untuk analisis RT-qPCR tebu transgenik

Table 4. Primer pairs used for RT-qPCR analysis in transgenic sugarcane

Jenis primer Primer type	Sekuen Forward(F) Forward Sequence (F)	Sekuen Reverse (R) Reverse sequence (R)
Actin	CTGGAATGGTCAAGGCTGGT	TCCTTCTGTCCCATCCCTACC
SoNAC	TACGGCGAGAAGGAGTGGTA	ACTCGTGCATGATCCAGTTG
SoDREB	GTCCCAGCGAGGATCTGATA	TGGATGAACTGCATCTGCTC
GUS	CTAGTGCCTTGCCAGTTGC	GAACAACGAACTGAACTGGC

Tabel 5. Ekspresi relatif gen SoNAC dari tebu yang diberi cekaman kekeringan

Table 5. Relative expression of SoNAC gene from sugarcane treated with drought stress

Waktu (jam) Time (hours)	Transgenik dengan cekaman Drought treated transgenic	Transgenik tanpa cekaman Non-treated transgenic	Non-transgenik dengan cekaman Drought treated wild type
0	3,3x10 ⁻³ ±0,002 b	5,04x10 ⁻³ ±0,002 b	2,32x10 ⁻³ ±0,001 b
12	2,41x10 ⁻³ ±0,001 b	4,01x10 ⁻³ ±0,003 b	6,97x10 ⁻³ ±0,003 b
24	7,02x10 ⁻³ ±0,006 b	3,81x10 ⁻³ ±0,001 b	5,89x10 ⁻³ ±0,001 b
48	6,6x10 ⁻³ ±0,003 b	4,72x10 ⁻³ ±0,002 b	9,85x10 ⁻³ ±0,003 b
72	4,79x10 ⁰ ±0,318 a	3,6x10 ⁻³ ±0,003 b	4,99x10 ⁰ ±0,036 a

Keterangan : Angka pada kolom yang sama diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji student T-test pada α= 0,05.

Note: Numbers in the same column followed by the same letters are not significantly different according to student T-test at α= 0.05

Tabel 6. Nilai ekspresi relatif gen SoDREB tebu dari tebu yang diberi cekaman kekeringan

Table 6. Relative expression of SoDREB gene from sugarcane treated with drought stress

Waktu (jam) Time (hours)	Transgenik dengan cekaman Drought treated transgenic	Transgenik tanpa cekaman Non-treated transgenic	Transgenik dengan cekaman Drought treated transgenic
	4,13x10 ⁻⁴ ±0,0004 ^b	6,97x10 ⁻³ ±0,119 ^b	2,51x10 ⁻³ ±0,014 ^b
12	2,13x10 ⁻³ ±0,003 ^b	4,04x10 ⁻³ ±0,005 ^b	7,82x10 ⁻⁴ ±0,002 ^b
24	1,42x10 ⁻² ±0,007 ^b	2,47x10 ⁻³ ±0,003 ^b	2,52x10 ⁻³ ±0,005 ^b
48	3,84x10 ⁻¹ ±0,184 ^b	2,72x10 ⁻³ ±0,002 ^b	6,89x10 ⁻² ±0,008 ^b
72	1,32x10 ¹ ±2,489 ^a	5,43x10 ⁻⁴ ±0,0007 ^b	1,33x10 ¹ ±2,664 ^a

Keterangan : Angka pada kolom yang sama diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji student T-test pada α= 0,05.

Note: Numbers in the same column followed by the same letters are not significantly different according to student t-Test at α= 0.05

Peningkatan ekspresi gen *SoNAC* dan *SoDREB* pada sampel dengan perlakuan cekaman kekeringan 72 jam menunjukkan bahwa gen tersebut terinduksi oleh perlakuan cekaman kekeringan (Gambar 5). Gen *NAC* diketahui memiliki peran dalam respons tanaman terhadap patogen, infeksi virus, dan cekaman lingkungan (Baillio *et al.*, 2019). Sedangkan gen *DREB* dapat secara spesifik berikatan dengan *cis-acting element* beberapa gen yang berhubungan langsung dengan respons tahan cekaman. Hal tersebut menyebabkan tanaman beradaptasi dan lebih toleran terhadap cekaman (Chen *et al.*, 2016). Hal ini juga mengindikasikan bahwa *NAC* dan *DREB* berperan sebagai regulator promoter *dehydrin* (*DHN*). Protein *dehydrin* juga diketahui terakumulasi tinggi saat tanaman seperti jagung, padi, dan sorgum mengalami cekaman kekeringan (Santana *et al.*, 2017). Selain itu, penelitian sebelumnya yang mengkonstruksikan promoter

DHN dari padi dengan gen *GUS* dan diuji aktivasinya menggunakan gen *DREB* menunjukkan bahwa promoter *DHN* tersebut terinduksi oleh *DREB* (Lee *et al.*, 2013).

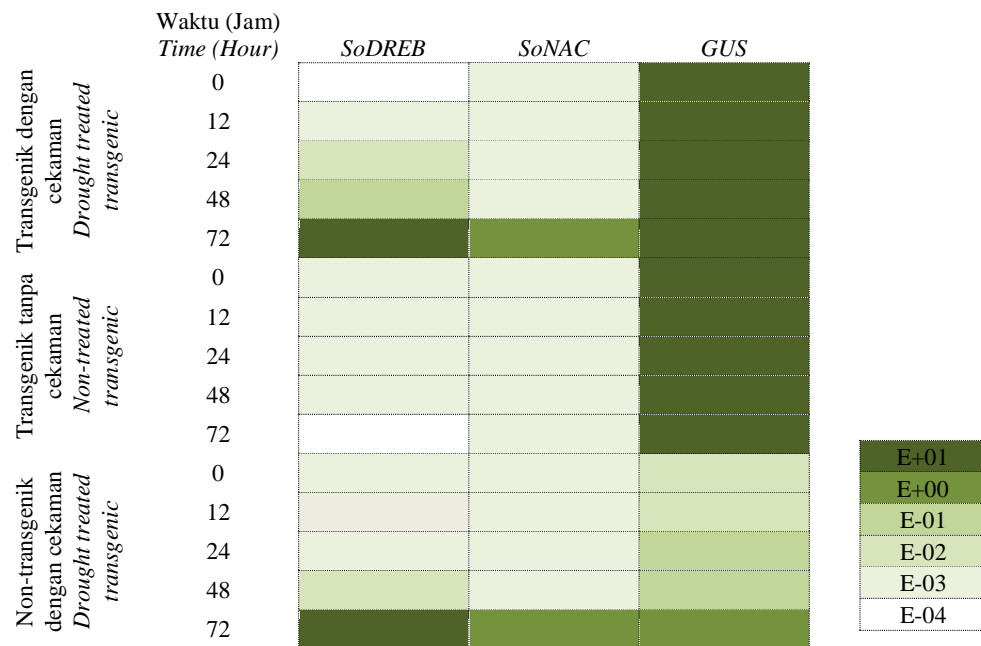
Hasil analisis ekspresi gen *GUS* dalam penelitian ini disampaikan juga dalam bentuk *heat map* (Gambar 5) dimana pola ekspresinya berbeda dengan gen *SoNAC* dan *SoDREB* pada sampel transgenik dengan dan tanpa cekaman kekeringan. Nilai ekspresi gen *SosNAC* dan *SoDREB* memiliki korelasi positif yaitu meningkat sangat tinggi diperlakukan cekaman 72 jam. Namun demikian, nilai ekspresi *GUS* tidak memiliki korelasi yang sama dengan nilai ekspresi gen *SoNAC* dan *SoDREB*. Nilai ekspresi *GUS* selalu tinggi dimulai dari perlakuan 0 sampai 72 jam untuk sampel transgenik dengan dan tanpa perlakuan cekaman, sedangkan nilai ekspresi gen *GUS* sampel non-transgenik cenderung kecil karena gen *GUS* tidak ada pada sampel tersebut.

Tabel 7. Ekspresi relatif gen *GUS* pada tebu yang diberi cekaman kekeringan
 Table 7. Relative expression of *GUS* gene from sugarcane treated with drought stress

Waktu (jam) Time (hours)	Transgenik dengan cekaman Drought treated transgenic	Transgenik tanpa cekaman Non-treated transgenic	Transgenik dengan cekaman Drought treated transgenic
0	4,02x10 ¹ ±0,330 a	4,10x10 ¹ ±0,352 a	6,33x10 ⁻² ±0,013 b
12	3,59x10 ¹ ±0,383 a	3,12x10 ¹ ±0,367 a	9,18x10 ⁻² ±0,001 b
24	3,68x10 ¹ ±0,354 a	3,98x10 ¹ ±0,368 a	2,17x10 ⁻¹ ±0,066 b
48	3,70x10 ¹ ±0,377 a	3,35x10 ¹ ±0,367 a	1,10x10 ⁻¹ ±0,014 b
72	3,54x10 ¹ ±0,490 a	4,59x10 ¹ ±0,071 a	2,50x10 ¹ ±0,428 b

Keterangan : Angka pada kolom yang sama diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji *student T-test* pada $\alpha=0,05$

Note: Numbers in the same column followed by the same letters are not significantly different according to student t-test at $\alpha=0.05$



Gambar 5. Peta perbandingan nilai analisis ekspresi gen *SoNAC*, *SoDREB*, dan *GUS* dengan perlakuan cekaman kekeringan (0-72 jam). Data ditampilkan dalam bentuk *heatmap* dengan masing-masing nilai menunjukkan rerata dari tiga ulangan biologis. Warna menunjukkan tingkat ekspresi relatif terhadap kontrol internal *Actin*

Figure 5. Comparison map of expression analyses of *SoNAC*, *SoDREB* and *GUS* genes treated with drought stress (0-72 hours). Data are shown in form of *heatmap* with each value representing the mean of three biological replicates. Colors show relative expression against internal control *Actin*

Diduga nilai ekspresi gen *GUS* yang tinggi disebabkan promotor DHN terinduksi oleh cekaman lain selain kekeringan. Cekaman lain tersebut terakumulasi dan menginduksi promotor DHN. Cekaman lain muncul disebabkan sampel yang digunakan merupakan planlet muda dan mengalami stres oksidatif. Stres oksidatif dapat dilihat dari tingginya aktivitas askorbat oksidase, guaiacol peroksidase, dan katalase. Penelitian sebelumnya menunjukkan aktivitas enzim tersebut tinggi pada planlet tebu dengan dan tanpa perlakuan cekaman kekeringan (Ramiro *et al.*, 2016). Cekaman lain yang diindikasikan terjadi pada sampel adalah stres oksidatif yang disebabkan tanaman terendam. Tanaman terindikasi mengalami stres terendam karena tanaman dipindahkan dari media agar (padat) ke media cair. Setelah tanaman dipindahkan ke media cair baru dilakukan perlakuan cekaman kekeringan. Tanaman yang terendam akan memicu terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS) seperti superoksida, hidroksil anion, dan peroksida (Bajpai & Chandra, 2015). Senyawa ROS dapat terakumulasi di akar dan daun tebu dalam kondisi tanaman kekurangan oksigen atau hipoksia akibat terendam (Ghomati *et al.* 2015).

Hasil analisis *heatmap* juga memperlihatkan bahwa secara alami tanaman tebu memiliki mekanisme respons molekuler dari *SoDREB* dan *SoNAC* terhadap cekaman kekeringan. Nilai RWC sebesar 66 dan 73% untuk tanaman transgenik dan non-transgenik pada kondisi cekaman kekeringan selaras dengan hasil analisis ekspresi setelah 72 jam saat tanaman mengalami kondisi cekaman moderat. Sebagai catatan, gen-gen regulator *SoMYB*, *SoWRKY*, dan *SoNAC* juga terinduksi hingga selama 15 hari perlakuan cekaman kekeringan. Berdasarkan hasil studi referensi diketahui bahwa gen *SoDHN* merupakan gen *downstream* dari faktor-faktor transkripsi tersebut. Transformasi promotor DHN ke dalam tanaman tebu non-transgenik tidak memperlihatkan ekspresi yang lebih tinggi dari gen-gen regulator seperti *SoDREB* dan *SoNAC* dibandingkan tanaman non-transgenik pada perlakuan cekaman kekeringan. Hal ini dapat dipahami bahwa regulasi molekuler dari faktor transkripsi tidak hanya terbatas pada level transkripsi tetapi juga pasca-transkripsi hingga translasi. Iskandar *et al.* (2011) memperlihatkan *shifting* ekspresi dari gen-gen terkait cekaman kekeringan pada tebu seperti *P5CS*, *OAT*, *Pox*, *AS*, *PST5*, *TF1*, *LEA*, dan *Dehydrin*. Dari hasil analisis tersebut dapat disimpulkan sebagai tahapan-tahapan regulasi cekaman kekeringan yang kompleks pada tanaman tebu.

Kesimpulan

Karakterisasi promotor DHN telah dilakukan melalui analisis ko-ekspresi gen-gen *upregulator SoDHN* yang meliputi gen *SoMYB*, *SoNAC*,

SoWRKY, dan *SoDREB*. Peningkatan ekspresi dari gen-gen *upstream* tersebut menunjukkan bukti empiris potensi regulasi dari *SoDHN*. Keseluruhan hasil penelitian menunjukkan bahwa konstruk promotor Pr-1DHNSo terinduksi oleh cekaman kekeringan dengan potensi regulasi melalui beberapa gen *upstream* dari gen *SoDHN*. Promotor Pr-1DHNSo tersebut berpotensi untuk digunakan dalam rekayasa genetik tanaman tebu toleran kekeringan.

Daftar Pustaka

- Amar SB, H Safi, M Ayadi, J Azaza, H Khoudi, K Masmoudi & F Brini (2013). Analysis of the promoter activity of a wheat *dehydrin* gene (*DHN-5*) under various stress conditions. *AJCS* 7(12), 1875-1883.
- Badan Pusat Statistik (2020). Impor gula menurut negara asal utama 2010-2020. <https://www.bps.go.id/statictable/2019/02/14/2014/impor-gula-menurut-negara-asal-utama-2010-2019.html>
- Baillo EH, RN Kimoto, Z Zhang & P Xu (2019). Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement. *Genes* 10 (771), 1-23.
- Bajpai S & R Chandra (2015). Effect of waterlogging stress on growth characteristic and SOD gene expression in sugarcane. *IJSRP* 5(1), 1-8.
- Chang S, J Puryear & J Cairney (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *J Plant Mol Biol Rep* 11, 98-100.
- Chen Y, L Huang, H Yan, X Zhang, B Xu & X Ma (2016). Cloning and characterization of an ABA-independent *DREB* transcription factor gene, *HcDREB2* in *Hemarthra compressa*. *J Heredit* 153(3), 1-7.
- Farrell RE (2010). *RNA Methodologies : Laboratory Guide for Isolation and Characterization*. London, Elsevier.
- Ghomati R, PNG Rao, K Chandran & A Shelvi (2015). Adaptive responses of sugarcane to waterlogging stress: an over view. *Sugar Tech* 17(4), 325-338.
- Giday H, D Fanourakis, KH Kjaer, IS Fomsgaard & C-O Ottosen. 2014. Threshold response of stomatal closing ability to leaf abscisic acid concentration during growth. *J Exp Bot*, 65(15), 4361-4370.
- Graca JP, FA Rodrigues, JRB Farias, MCN Oliveria, CBH Campo & SM Zingaretti (2010). Physiological parameters in sugarcane cultivars submitted to water deficit. *J Plant Physiol* 22(3), 189-197.

- Hanin M, F Brini, C Ebel, Y Toda, S Takeda & K Masmoudi (2011). Plant dehydrins and stress tolerance: Versatile protein for complex mechanisms. *J Plant Signal Behav* 6(10), 1503-1509.
- Iskandar HM, RE Casu, AT Fletcher, S Schmidt, JS Xu, DJ Maclean, JM Manners & GD Bonnett (2011). Identification of drought-response genes and a study of their expression during sucrose accumulation and water deficit in sugarcane culms. *BMC Plant Biol* 11(12), 1-14.
- Iskandar HM, D Widyaningrum & S Suhandono (2014). Cloning and characterization of *P5CS1* and *P5CS2* genes from *Saccharum officinarum* L. under drought stress. *J Trop Crop Sci* 1(1), 23-30.
- Lee SC, SH Kim & SR Kim (2013). Drought inducible *OsDhn1* promoter is activated by *OsDREB1A* and *OsDREB1D*. *J Plant Biol* 56, 115-121.
- Li C, CK Y-Ng & F Liu-Min (2015). *MYB* transcription factors, active players in abiotic stress signaling. *Environ Exp Bot* 114, 80-91.
- Minarsih H, S Suhandono, AK Fuadi, T Kristianti, RA Putranto, D Sukmadjaya & Sustiprijatno (2020). Isolation and characterization of *dehydrin* promoter region from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Menara Perkebunan* 88(1), 16-28.
- Mizoi J, K Shinozaki & K Yamaguchi-Shinozaki (2012). *AP2/ERF* family transcription factors in plant abiotic stress responses. *BBA Gene Reg Mech* 1819(2), 86-96.
- Nakashima K, H Takasaki, J Mizoi, K Shinozaki & K Yamaguchi-Shinozaki (2012). *NAC* transcription factors in plant abiotic stress responses. *BBA Gene Reg Mech* 1819(2), 97-103.
- Nuruzzaman M, AM Sharoni & S Kikuchi (2013). Roles of *NAC* transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Front Microbiol* 4(248).
- Pfaffl MW (2004). *A-Z of Quantitative PCR*. California, International University Line.
- Rahayu T (2015). Indonesia agricultural biotechnology annual. Indonesia.
- Ramiro AD, DMM Pasarín, MDA Barbosa, FD Santos, SGP Gomez, MSM Junior, E Lam & H Carrer (2016). Expression of *Arabidopsis* bax inhibitor-1 in transgenic sugarcane confers drought tolerance. *J Plant Biotechnol* 14, 1826-1837.
- Sade N, E Galkin E & M Moshelion (2015). Measuring *Arabidopsis*, tomato and barley leaf relative water content (RWC). *J Bio-protocol* 5(8), 1-4.
- Sade N, A Gebremedhin & M Moshelion (2012). Risk-taking plants: anisohydric behavior as a stress-resistance trait. *J Plant Signal Behav* 7(7), 767-770.
- Sade N, BJ Vinocur, A Diber, A Shatil, G Ronen, H Nissan, R Wallach, H Karchi & M Moshelion (2009). Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin *SITIP2;2* a key to isohydric to anisohydric conversion?. *J New Phytol* 181(3), 651-661.
- Santana AP, EJA Robledo, JAZ Briseno, JTA Sumuano, VMG Mendoza, FE Gil, LD Alcaraz, E Castario, MAK Lianes, FS Teyer & LCR Zapata. (2017). Transcriptional profiling of sugarcane leaves and root under progressive osmotic stress reveals a regulated coordination of gene expression in a spatiotemporal manner. *J PLoS ONE* 12(12), 1-25.
- Shirvastava AK & S Shirvastava (2016). Diversity the germplasm of *Saccharum* species and related genera available for use in directed breeding programmes for sugarcane improvement. *J Curr Sci* 111(3), 475-483.
- Sugiharto, B. (2017). Biotechnology of drought-tolerance sugarcane. Sugarcane-Technology and Research. de Oliveira, A (ed). Intechopen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72436>.
- Suhandono S, A Apriyanto & N Ihsan (2014). Isolation and characterization of three cassava *elongation factor 1 alpha* (*MeEF1A*) promoters. *J PLoS ONE* 9(1), 1-9.