

**Transformasi Tanaman Tebu (cv. PSJT 94-41) dengan Gen Fitase Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* GV 2260 (pBinPI-IIEC)<sup>\*1</sup>**

***Transformation of phytase gene into sugarcane (cv. PSJT 94-41) via Agrobacterium tumefaciens GV 2260 (pBinPI-IIEC)<sup>\*1</sup>***

Susiyanti<sup>1</sup>, G.A. Wattimena<sup>2</sup>, M. Surahman<sup>2</sup>, A. Purwito<sup>2</sup> dan D.A. Santosa<sup>3\*</sup>

Diterima 27 April 2007 / Disetujui 13 Agustus 2007

**ABSTRACT**

*Phosphorus is a critical nutrient for the growth and development of sugarcane in the marginal land in Indonesia. P stored in plant as phytic acid (myo-inositolhexakisphosphate). The objective of the study was to increase activity of phytases enzyme in sugarcanes (cv. PSJT 94-41) through phytase gene transformation. Detection of chimeric gene by PCR showed that the phytase gene was integrated into the genome of sugarcanes. Transformation caused some abnormality such as albino, discoloration, lack of chlorophyll in the particular spot of leaves. Putative transgenic plantlets expressed a higher levels of phytase enzyme activity (38.1 %), whereas increase in P available in plant (19.5 %) and content of chlorophyll (32.3 %).*

*Key words: Sugarcane, transformation, phytase, Agrobacterium tumefaciens*

**PENDAHULUAN**

Tanaman tebu (*Sacharum officinarum* L.) merupakan sumber utama bahan baku pembuatan gula, dimana 65% produksi gula dunia berasal dari gula tebu. Pada tanaman tebu, ketersediaan P merupakan faktor penting keberhasilan budidaya. Kebutuhan P untuk pertumbuhan optimum selama fase vegetatif adalah 0.3-0.5 % dari berat keringnya (Marshcner, 1995). Glaz *et al.* (2000) memberikan 24-48 kg P ha<sup>-1</sup> pada 12 genotipe tebu. Berdasarkan hasil penelitian Chen *et al.* (2002) rata-rata kultivar tebu dapat mengambil rata-rata 8.5 kg P ha<sup>-1</sup> di tanah EAA (*Everglades Agriculture Area*) di Florida, selain itu 30-85% P tebu diambil dari tanah dalam bentuk P organik yang dimineralisasi menjadi bentuk P tersedia bagi tanaman selama siklus pertumbuhannya. Anas *et al.* (1992) menyatakan bahwa salah satu sumber P organik dalam tanah adalah fitat.

Secara kimia, fitat merupakan bentuk penyimpanan fosfat dalam tanaman yang merupakan bentuk P terikat yang sukar untuk digunakan tanaman (Greiner, 2005). Bentuk terikat tersebut dapat dimanfaatkan oleh tanaman, terutama jika tanaman memiliki enzim fitase yang dapat menghidrolisa asam (Keruvuo *et al.*, 2000; Greiner, 2005), namun demikian, tidak semua tanaman dapat menghasilkan fitase.

Beberapa jenis tanaman yang diketahui dapat menghasilkan fitase adalah kacang hijau, kedelai, gandum, padi, dan lain-lain (Kyriakidis *et al.*, 1998). Tanaman tebu secara alami telah memiliki aktivitas fitase, tetapi aktivitasnya rendah, sebagai contoh pada tebu cv. PS 851 hanya 0.047- 0.059 U ml<sup>-1</sup> (Nurhasanah, 2007).

Ada hipotesis bahwa jika aktivitas fitase tanaman tebu dapat ditingkatkan, maka produktivitas tebu dapat ditingkatkan. Upaya peningkatan fitase dapat dilakukan dengan pemuliaan. Namun upaya perbaikan genetik secara konvensional perlu waktu yang panjang karena sebagian besar varietas tebu modern merupakan hibrida interspesifik yang memiliki tingkat ploidi tinggi, yang memiliki karakteristik genetik yang kompleks serta fertilitas rendah (Gilbert *et al.*, 2005). Rekombinasi genetik dengan teknik rekayasa genetika melalui penyisipan gen yang dikehendaki (gen fitase) ke dalam tebu, mempunyai prospek yang lebih menjanjikan. Gen fitase yang disisipkan ini diharapkan mampu menghasilkan enzim yang dapat mengubah fitat menjadi fosfat yang dapat digunakan oleh tumbuhan.

Introduksi gen fitase dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 (pBin1-ECS) telah berhasil dilakukan oleh Wulandari (2005) pada varietas tebu PSJT 9443, PA 183 dan Triton. Penyisipan gen

<sup>\*1</sup>Merupakan bagian dari disertasi Sekolah Pascasarjana IPB

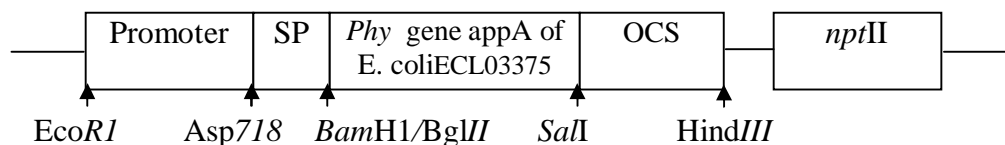
<sup>1</sup> Mahasiswa S3 Program Studi Agronomi, Sekolah Pascasarjana IPB, Bogor

<sup>2</sup> Staf Pengajar Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian IPB, Bogor

<sup>3</sup> Staf Pengajar Departemen Ilmu Tanah dan Sumber Daya Lahan, Fakultas Pertanian IPB, Bogor, Telp: 0251-422372; Fax: 0251-629358; E-mail: dsantosa@indo.net.id (\* Penulis untuk korespondensi)

fitase melalui *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 dengan konstruksi *gene cassette* berbeda yaitu *pBinPI-IIEC* juga telah dilakukan oleh Ananda (2004) pada varietas PSJT 94-33 dan BR 194; serta oleh Nurhasanah

(2007) pada varietas PS 851 yang dapat dideteksi dengan PCR pita ukuran 900 bp. Konstruksi *gene cassette pBinPI-IIEC* dapat dilihat pada Gambar 1.



Keterangan:

- SP = Proteinase inhibitor II signal peptide
- OCS = Enhancer

Gambar 1. Konstruksi *gene cassette pBinPI-IIEC* (Santosa *et al.*, 2005)

Saat ini, ekspresi gen fitase pada tanaman tebu yang telah disisipi gen fitase belum banyak diketahui, termasuk pertanyaan apakah peningkatan pengaruh peningkatan aktivitas fitase juga akan berpengaruh terhadap P yang terdapat dalam jaringan dan kadar klorofil dalam tanaman. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keberhasilan transformasi gen fitase pada tanaman tebu (*cv.* PSJT 94-41) dan ekspresinya.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan pada bulan September 2004 sampai dengan Maret 2007 di Laboratorium Bioteknologi-Kultur Jaringan-Departemen Agronomi dan Hortikultura, IPB; Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi PPLH, IPB; Laboratorium *Saraswanti Indo-Genetech* (SIG), Bogor; serta Laboratorium *Indonesia Center for Biodiversity and Biotechnology* (ICBB), Situgede- Bogor.

### Transformasi gen fitase

Bahan-bahan yang digunakan antara lain pucuk tebu (*cv.* PSJT 94-41) yang dikulturkan menjadi kalus embriogenik pada media MS + 3 mg/l 2,4 D selama 6 minggu. Transformasi pada kalus tebu dilakukan berdasarkan metode modifikasi Santosa *et al.* (2004, 2005). Kalus yang ditransformasi (sebanyak 6 petridish, masing-masing petridish berisi 20 kalus) selanjutnya dikulturkan pada media MS + kanamisin 150 ppm selama 4 minggu dengan penyinaran 3000 lux. Kalus yang lolos pada media seleksi kanamisin selanjutnya dipindahkan pada media inisiasi tunas (MS + 0.1 mg/l kinetin + 1.0 mg/l BAP). Peubah yang diamati adalah persentase keberhasilan transformasi yang disajikan dalam bentuk tabulasi data.

### Analisis integrasi gen fitase hasil transformasi dengan teknik PCR

Sampel yang diambil untuk analisis integrasi gen fitase hanya pada plantlet yang memiliki klorofil. DNA total tanaman diisolasi dengan metoda Santosa *et al.* (2004, 2005). Primer spesifik gen fitase yang digunakan untuk PCR adalah EC1 dan EC3 (EC1: 5' CGA TTA GCG GAT AGA GCC TG3'; dan EC3: 5'GAT TAT TGC CCC ACC GCG CC3'). Campuran reaksi sebanyak 20 µL yang terdiri atas 10 µL Master mix; 1 µL masing-masing primer spesifik untuk gen fitase (1µL EC1 dan 1µL EC 3); 2 µL DNA dari tanaman transgenik dan kontrol dan 6 µL ddH<sub>2</sub>O. Reaksi dijalankan sebanyak 35 siklus pada mesin PCR merk Eppendorf. Reaksi PCR diatur sebagai berikut: denaturasi pada 94°C selama 30 detik, *annealing* pada 60°C selama 1 menit, *extension* pada 72°C selama 3 menit, *final extension* 72°C selama 10 menit.

Sebanyak 5 µL DNA hasil amplifikasi dielektroforesis pada gel agarose 2% selama 30 menit menggunakan buffer 1X TAE pada tegangan listrik 100 volt. Hasil elektroforesis diamati dengan merendam gel pada larutan *ethidium bromida* 10 µg/ml selama 10 menit dan diekspose di bawah sinar UV menggunakan UV transiluminator. Keberhasilan transformasi ditunjukkan oleh adanya pita DNA hasil amplifikasi dengan primer spesifik gen fitase.

### Ekspresi (aktivitas enzim fitase, kadar klorofil, P total jaringan)

Aktivitas enzim fitase pada plantlet tebu dilakukan berdasarkan prosedur Greiner *et al.* (1997). Besarnya aktivitas enzim fitase diketahui dengan mengkonversikan hasil spektrofotometri pada λ 355 nm dengan rumus:

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta E}{\Sigma t} \times \frac{\text{Volume total}}{\text{Volume enzim}}$$

Keterangan:

- $\Delta E$  = E sampel – E blanko
- $\Sigma$  =  $8,7 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$
- t = 30 menit
- Volume total = 2000  $\mu\text{l}$
- E blanko = larutan tanpa enzim
- Volume enzim = 50  $\mu\text{l}$

Analisis kandungan klorofil dilakukan berdasarkan metode Wintermans, and De Mots (1965). Hasil spektrofotometri pada  $\lambda$  665 dan 649 nm yang didapat dikonversikan dengan rumus:

$$\text{Klorofil a} = (13,7 \times \lambda 665) - (5,76 \times \lambda 649) = \mu\text{g klorofil ml}^{-1}$$

$$\text{Klorofil b} = (25,8 \times \lambda 649) - (7,60 \times \lambda 665) = \mu\text{g klorofil ml}^{-1}$$

$$\text{Total klorofil} = \text{Klorofil a} + \text{klorofil b.}$$

Uji P total pada plantlet dilakukan dengan menggunakan metode pengabuan kering (IITA, 1983).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Transformasi gen fitase

Kalus yang berhasil ditransformasi dapat bertahan dalam media seleksi kanamisin 150 ppm (rata-rata 75%). Ketahanan tersebut diperoleh karena pada *gene cassette* yang sisipkan mengandung gen *neomycin phosphotransferase (nptII)* yang merupakan kelompok antibiotik aminoglycoside, yaitu kanamisin. Bila kalus tebu yang telah ditransformasi memiliki gen ini, maka gen tersebut akan menyebabkan terjadinya transfer gugus fosfat dari ATP ke molekul antibiotik yang mengakibatkan detoksifikasi antibiotik. Kondisi ini menyebabkan fungsi ribosom tidak terhambat, karena dicegah reaksinya dengan ribosom.

Kalus tebu yang ditransformasi mencapai 120, dan kalus yang resisten terhadap kanamisin adalah 90 kalus. Jumlah ini menunjukkan 75% kalus dapat bertahan hidup dalam media kanamisin. Dari 90 kalus, hanya 18 kalus yang dapat diregenerasikan (efisiensi regenerasi = 20%). Dari 18 kalus tersebut diregenerasi menjadi 364 tunas. Beberapa tunas pada awalnya dapat tumbuh baik, tetapi setelah disubkulturkan beberapa kali ada yang bertahan hidup dan ada yang mati. Dari 364 tunas tersebut yang dapat tumbuh berkembang menjadi plantlet sebanyak 95 plantlet.



Gambar 2. Variasi warna plantlet tebu putatif transforman

Efisiensi transformasi yang didapat pada penelitian ini adalah 15%. Efisiensi transformasi oleh *Agrobacterium tumefaciens* ditentukan oleh beberapa faktor, seperti jenis jaringan yang diinfeksi, vektor yang digunakan, serta kondisi kultur. Sistem regenerasi yang tepat dari jaringan tanaman yang ditransformasi membuka peluang untuk memperoleh tanaman transgenik.

Plantlet putatif transgenik yang dihasilkan menunjukkan variasi warna yaitu albino, kuning hijau muda, belang hijau dan putih, hijau pada cv. PSJT 94-41 (Tabel 1 dan Gambar 2). Naik (2001), menyatakan bahwa variasi pada tanaman tebu dapat disebabkan adanya perubahan sekuen nukleotida dan struktur kromosom. Pada transformasi yang menggunakan *A. tumefaciens*, gen-gen baru secara normal tergabung dalam genom inti, walaupun terdapat pengecualian gen-gen tersebut dapat juga terjadi penyisipan dalam genom kloroplas (Nasir, 2001). Di inti, DNA tersisipi secara acak dengan potensi penyisipan yang berbeda yang dapat saja terjadi pada inti yang sama. Penyisipan ini terjadi dalam urutan berpasangan dan dapat mengganggu DNA inti (Naik, 2001; Nasir, 2001).

Tabel 1. Data tebu (cv. PSJT 94-41) hasil transformasi

Peubah yang diamati	Jumlah
Jumlah kalus yang diinfeksi	120
Jumlah kalus yang resisten terhadap kanamisin <sup>*)</sup>	90
Persentase kalus resisten (%)	75%
Jumlah kalus T0 beregenerasi <sup>**)</sup>	18
Jumlah tunas T1 <sup>**)</sup>	360
Tunas T1 albino <sup>**) :</sup>	54
Tunas T1 yang berwarna kuning dan hijau muda <sup>**) :</sup>	256
Tunas T1 belang putih <sup>**) :</sup>	18
Tunas T1 berwarna hijau <sup>**) :</sup>	36
Efisiensi regenerasi (%)	20%
Plantlet putatif transgenik	95
Efisiensi transformasi	15%

Keterangan:

<sup>\*)</sup> Dalam media seleksi kanamisin 150  $\text{mg l}^{-1}$

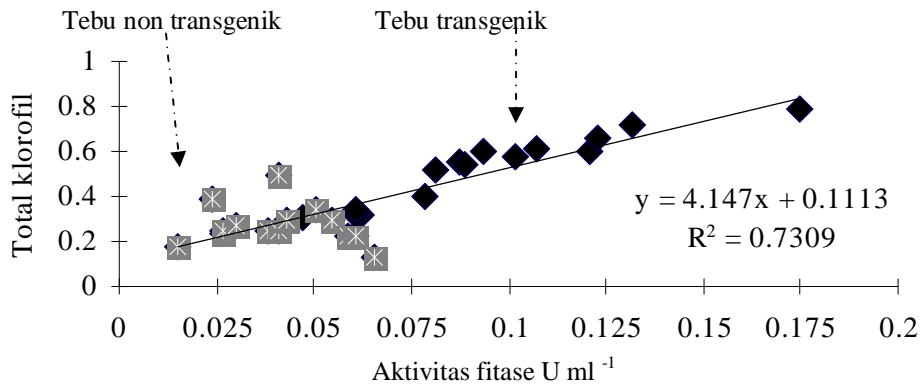
<sup>\*\*)</sup> Putatif transgenik hasil multiplikasi

T0 = Putatif transgenik sub kultur ke-0

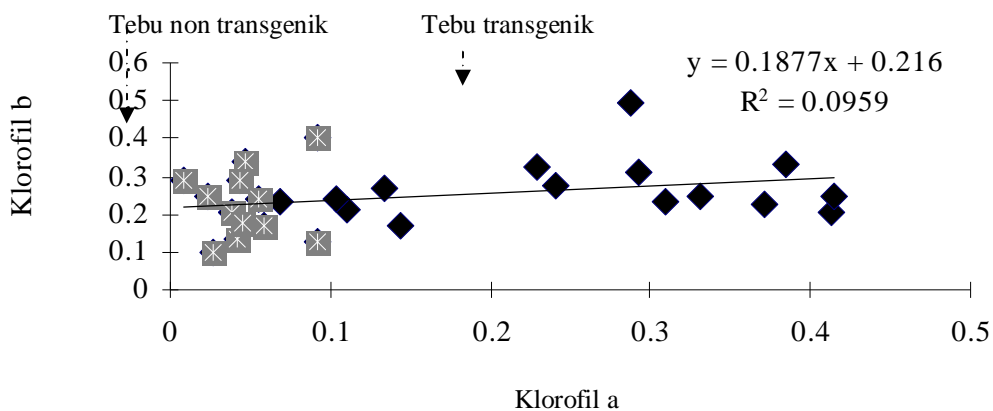
T1 = Putatif transgenik sub kultur ke-1

Berdasarkan pengamatan, sejalan dengan peningkatan aktivitas fitase pada tebu putatif transgenik, juga terjadi peningkatan total klorofil dalam jaringan tebu (Gambar 3). Total klorofil pada plantlet tebu putatif transgenik mengalami peningkatan 32.3 %

dibanding non transgenik. Klorofil a pada tanaman tebu transgenik lebih tinggi daripada non transgenik, sedangkan untuk klorofil b terjadi hal yang sebaliknya dimana klorofil b pada tanaman tebu putatif transgenik lebih rendah daripada non transgenik (Gambar 4).



Gambar 3. Regresi antara aktivitas fitase dan total klorofil plantlet tebu

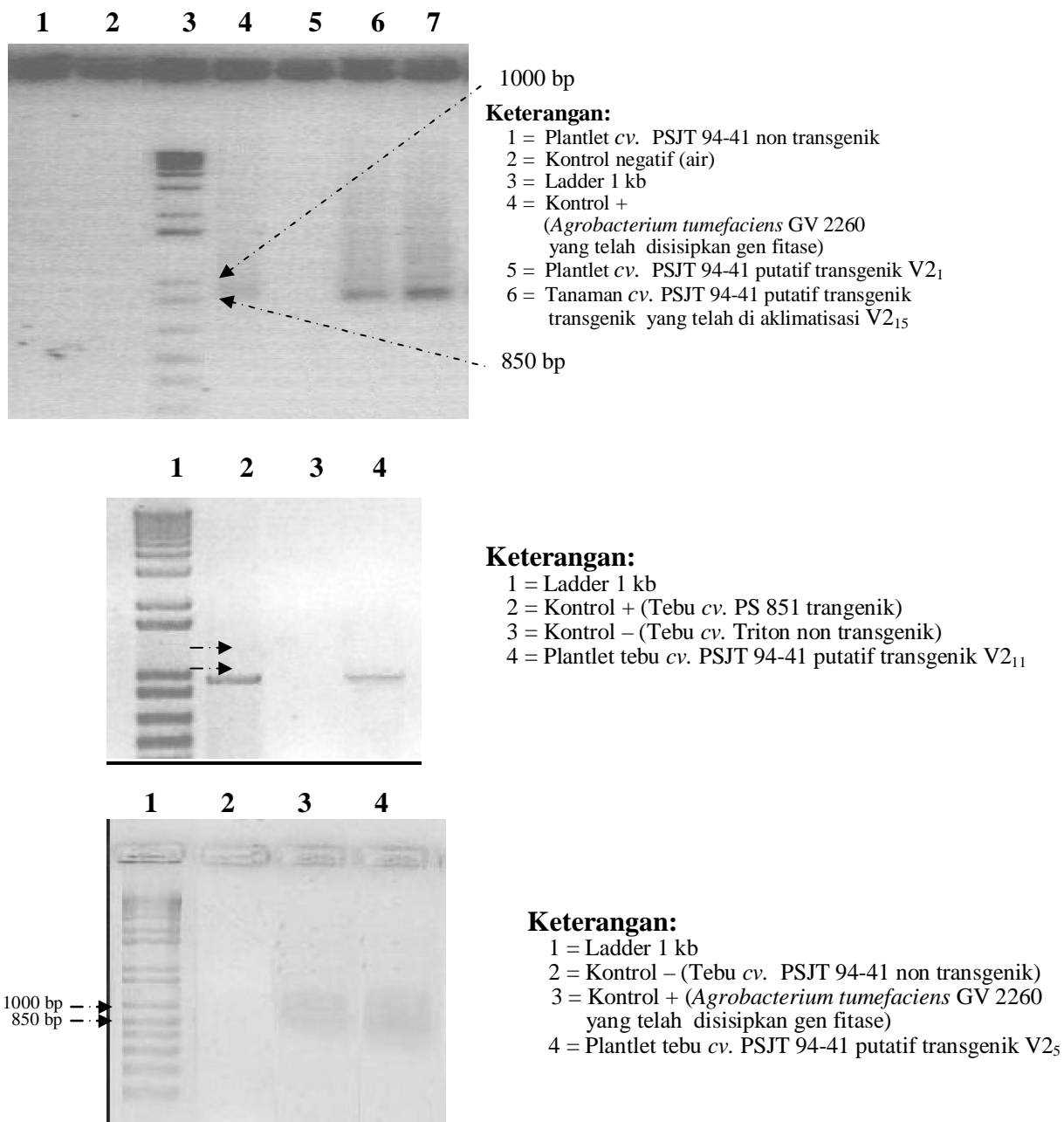


Gambar 4. Regresi antara klorofil a dan klorofil b plantlet tebu

Gen fitase secara langsung memberikan andil dalam ketersediaan P anorganik dalam tanaman. Fosfat anorganik yang dilepaskan fitase akan memberikan pengaruh yang positif dalam proses pembentukan klorofil sehingga meningkatkan fotosintesis dan metabolisme tanaman tebu (Alexander, 1972). Tanaman mengubah P menjadi sulfolipida dan galaktolipida untuk pembentukan membran kloroplas. Selain itu, P secara tidak langsung akan berdampak terhadap pembentukan porphyrin yang merupakan hasil dari siklus asam trikarboksilat (Buchanan *et al.*, 2006).

*Analisis integrasi gen fitase hasil transformasi dengan teknik PCR*

Hasil PCR dengan primer spesifik menunjukkan adanya pita ± 900 bp pada plantlet hasil transformasi (Gambar 5), sedangkan tebu non transgenik tidak menunjukkan adanya pita. Hal ini menunjukkan bahwa gen fitase yang disisipkan telah berhasil masuk ke dalam genom tanaman tebu yang ditransformasi.



Gambar 5. Hasil elektroforesis PCR tebu (cv. PSJT 944-41) dengan primer spesifik EC1 dan EC3

*Ekspresi (aktivitas enzim fitase, P dalam jaringan, kadar klorofil)*

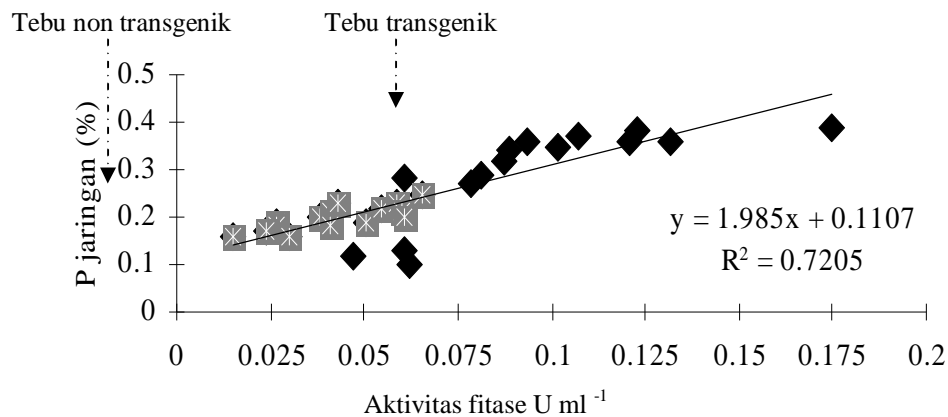
Hasil penelitian menunjukkan tanaman tebu secara alami memiliki enzim fitase yaitu rata-rata 0.051 U ml<sup>-1</sup>. Sejalan dengan peningkatan aktivitas enzim fitase pada tanaman tebu putatif transgenik juga terjadi peningkatan P dalam jaringan tanaman sebesar 19.5%. Hal ini terlihat pada data yang disajikan pada Gambar 6.

Gambaran tersebut sesuai dengan pendapat Santosa *et al.* (2004) yang menyatakan bila gen fitase dapat ditransformasikan dan terekspresi dalam tanaman tebu, maka gen ini akan menghasilkan enzim yang dapat mengubah senyawa fitat yang akan dihidrolisis menjadi ester yang berfosfat rendah dan selanjutnya akan melepaskan fosfat anorganik. Menurut Marschner (1995), kebutuhan P untuk pertumbuhan optimum selama fase vegetatif adalah 0.3-0.5% dari berat

keringnya. Plantlet tebu non transgenik yang dikulturkan pada media MS memiliki P total dalam jaringan sebesar 0.16-0.25%, sedangkan pada tebu putatif transgenik memiliki kadar P yang lebih lebar variasinya yaitu 0.12–0.39%.

Data aktivitas fitase plantlet tebu yang didapat dari penelitian ini lebih tinggi bila dibandingkan dengan kalus tebu hasil penelitian Wulandari (2005) yang hanya 0.01-0.02 U/ml. Ada dugaan bahwa plantlet tebu memiliki fitat yang tinggi bila dibandingkan dengan kalus. Semakin tinggi kadar fitat yang terdapat dalam jaringan tanaman atau media maka aktivitas fitase juga akan makin meningkat. Aktivitas enzim fitase akan

dipicu oleh ketersediaan P dalam tanaman yang kurang, sehingga tanaman akan mengaktifkan aktivitas enzim fitase untuk melepaskan P yang terikat dalam media tumbuh atau dalam jaringan. Dugaan ini sesuai dengan pendapat Konietzny dan Greiner (2002), bahwa Fitase (*Myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) merupakan enzim yang berfungsi menghidrolisis asam fitat (*myo*-inositol hexakisphosphate/InsP<sub>6</sub>) menghasilkan ortofosfat dan *myo*-inositol pentakisphosphate, bahkan pada kondisi-kondisi tertentu menjadi fosfat dan *myo*-inositol bebas dan dapat menghilangkan sifat pengkhelat dari asam fitat.



Gambar 6. Regresi antara aktivitas fitase dan P total plantlet tebu

### KESIMPULAN

Kalus tebu cv. PSJT 94-41 dapat ditransformasi dengan gen fitase melalui *Agrobacterium tumefaciens* GV 2260 (*pBinPI-IIEC*). Persentase kalus tebu transforman yang bertahan hidup dalam media kanamisin mencapai 75%, namun efisiensi regenerasinya hanya 20%, sedangkan efisiensi transformasinya adalah 15%. Keberadaan gen yang disisipkan dapat dideteksi dengan PCR yang menunjukkan adanya pita ± 900 bp. Plantlet tebu putatif transgenik memiliki aktivitas enzim fitase yang lebih tinggi dibandingkan dengan tebu non transgenik (peningkatan 38.1%), P dalam jaringan (peningkatan 19.5%), total klorofil (peningkatan 32.3%).

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh proyek RAPID (No. Kontrak: 393/P4T/DPPM/RAPID/V/2004).

### DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, A. 1972. Sugarcane Physiology: a Comprehensive Study of the Source to Sink System. Amsterdam, Elsevier Scientific Published. 752 hal.
- Ananda, Rr.W.U. 2004. Studi transformasi pada tebu dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens* GV 2260 (*pMA*) serta regenerasi kalus transgenik. (Tesis). Sekolah Pascasarjana. IPB.
- Anas, I., D.A. Santosa, Y. Fakuara. 1992. Pupuk Hayati. Ed.: S. Harran, dan N. Ansori. Biotek Pertanian 2. PAU, IPB, Bogor. 419 hal.
- Buchanan B.B., W. Gruissem, R.L. Jones. 2006. Biochemistry and Molecular Biology of Plant. American Society of Plant Physiology. Rockville, Maryland. 1367 hlm.
- Chen, M., B. Glaz, R.A. Gilbert, S.H. Daroub, F.E. Bartoon, Y. Wan. 2002. Near infra red reflectant

- spectroscopy analysis of phosphorous in sugarcane leaves. *Agron. J.* 94: 1324-1331.
- Gilbert, R.A. M.Gallo-Meagher, J.C.Comstock, J.D. Miller, M. Jain, A. Abouzid. 2005. Agronomic evaluation of sugarcane lines transformation for resistance to sugarcane mozaic virus strain E. *Crop Sci.* 45:2060-2067.
- Glaz, B.G., Powell, R. Perdomo, Modesto, F. Ulloa. 2000. Sugarcane, genotype response to phosphorus fertilizer in overglades. *Agron. J.* 92:887-894.
- Greiner, R., E. Haller, U. Konietzny, K.D. Jany. 1997. Purification and characterization of a *phytase* from *Klebsiella terrigena*. *Arch. Biochem. Biophys.* 341: 201-206.
- Greiner, R. 2005. Current biochemistry research on *phytase* genes in microorganism and plant. [http://striweb.si.edu/inositol\\_conference/program/PDFs/monday\\_afternoon/Greiner.pdf](http://striweb.si.edu/inositol_conference/program/PDFs/monday_afternoon/Greiner.pdf). [11 Maret 2006]
- IITA. 1983. Soil nutrient management for sustained food crop production in upland farming system. In: The Soil of International Institute of Tropical Agriculture. Jua A.S.R., F.R. Moorman, R. Lal (eds). Ibadan Technical Buletin.
- Keruvuo J., J. Rouvinen, F. Hatzack 2000. Analysis of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus phytase*: indication of a novel mechanism. *Biochem. J.* 352:623-628.
- Konietzny, U., R. Greiner, 2002. Molecular and catalytic properties of phytate degrading enzymes (phytases). *J. Food. Sci.* 37 : 791-812.
- Kyriakidis, N. B., M. Galtou. Payanatou, A. Stavropoulou, P. Achanasopoulous. 1998. Increase in *phytase* activity and decrease in *phytase* during germination of four common legumes. *Biotechnol. Lett.* 20 : 475-478.
- Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition in Higher Plant. Academic Press. New York. 885 hal.
- Naik, G.R. 2001. Sugarcane Biotechnology. Science Publisher, Inc. Enfield (NH), USA; Plymouth, UK. 165 hal.
- Nasir, M. 2001. Bioteknologi, potensi dan keberhasilannya dalam bidang pertanian. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta. 286 hal.
- Nurhasanah, A. 2007. Penyisipan gen fitase pada tebu (*Sacharum officinarum* L.) varietas PS 851 dan PA 198 dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens* GV 2260. (Tesis). Sekolah Pascasarjana. IPB. Bogor.
- Santosa, D.A., R. Hendroko, A. Farouk, R. Greiner. 2004. A rapid and highly efficient method for transformation of sugarcane callus. *Research protocol. Mol. Biotechnol.* 28: 113- 118.
- Santosa, D.A., R. Hendroko, A. Farouk, R. Greiner. 2005. *Agrobacterium* mediated transformation of sugarcane (*Sacharum officinarum* L.) with bacterial *phytase* gene. XXV Congress of International Society of Sugarcane Technologists, Guatemala, January 30-Februari 5, 2005.
- Wintermans, J.G.F.M., A. De Mots. 1965. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. *Biochim. Biophys. Acta.* 109: 448–453.
- Wulandari, I. 2005. Studi beberapa metode transformasi genetik tanaman tebu (*Sacharum officinarum* L.) dengan gen fitase melalui perantara *Agrobacterium tumefaciens* GV 2260. (Tesis). Sekolah Pascasarjana IPB, Bogor.