

Nomer Reg. PST/32/2015

**LAPORAN AKHIR  
PENELITIAN KOMPETITIF KOLEKTIF  
DIREKTORAT PENDIDIKAN TINGGI ISLAM  
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN ISLAM  
KEMENTERIAN AGAMA RI  
TAHUN 2015**



**KARAKTER MOLEKULER KEDELAI (*Glycine max*) TOLERAN  
KEKERINGAN HASIL INDUKSI MUTASI DENGAN MUTAGEN  
EMS (*ETHYL METHANE SULFONATE*)**

**Oleh:**

Dr. Evika Sandi Savitri, MP  
Dr. Eko Budi Minarno, MP.d  
Ruri Siti Resmisari, M.Si

UIN Maulana Malik Ibrahim Malang  
UIN Maulana Malik Ibrahim Malang  
UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

## HALAMAN PENGESAHAN

### KARAKTER MOLEKULER KEDELAI (*Glycine max*) TOLERAN KEKERINGAN HASIL INDUKSI MUTASI DENGAN MUTAGEN EMS (*ETHYL METHANE SULFONATE*)

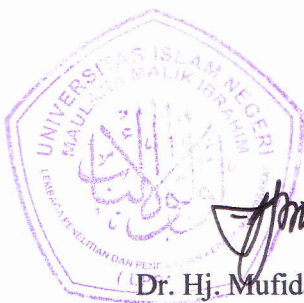
Oleh:

Dr. Evika Sandi Savitri, MP  
Dr. Eko Budi Minarno, MP.d  
Ruri Siti Resmisari, M.Si

UIN Maulana Malik Ibrahim Malang  
UIN Maulana Malik Ibrahim Malang  
UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

Ketua LP2M  
UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

Ketua Peneliti



  
Dr. Hj. Mufidah Ch., M.Ag  
NIP 1960091019899032001



Dr. Evika Sandi Savitri, MP  
NIP 197410182003122002

## DAFTAR ISI

### KATA PENGANTAR

#### I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang .....	1
1.2. Tujuan Penelitian .....	3
1.3. Manfaat Penelitian .....	4
1.4. Hipotesis .....	4

#### II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Deskripsi Varietas Dering-1 .....	5
2.2. Respon Pertumbuhan Tanaman Kedelai pada Kondisi Kekeringan.....	7
2.3. Mutasi dan Perubahan Ekspresi Gen karena Mutagen EMS .....	9
2.4. Respon Biokimiawi dan Molekuler Tanaman terhadap Kekeringan .....	15
2.5. Road Map Penelitian .....	19

#### III. METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian .....	20
3.2. Alat dan Bahan .....	20
3.3. Prosedur Penelitian .....	20
3.4. Analisis Data .....	25

#### IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Data Morfologi Pengaruh Konsentrasi dan Lama Perendaman dalam EMS....	27
4.2. Profil Protein Kedelai Varietas Dering-1 pada Kondisi Kekeringan .....	32
4.3. Ekspresi Gen <i>DREB</i> hasil induksi mutasi MS dengan metode PCR-real time..	36
4.4. Identifikasi gen <i>DREB</i> hasil induksi mutasi MS dengan metode PCR.....	44

#### V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan .....	49
5.2. Saran .....	49

<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	50
-----------------------------	----

#### LAMPIRAN

## DAFTAR TABEL

4.1. Data Morfologi Pertumbuhan Varietas Dering-1 .....	28
4.2. Data Konsentrasi RNA total varietas Dering-1 .....	37
4.3. Data Konsentrasi DNA total varietas Dering-1 .....	44

## DAFTAR GAMBAR

2.1. Biji varietas Dering-1 .....	6
2.2. Keragaan Polong dan Biji .....	7
2.3. Skema Perubahan BAsa DNA yang disebabkan oleh EMS .....	11
2.4. Pengamatan Morfologi Mutant .....	13
2.5. Pengamatan Mutant Klorofil .....	14
2.6. Produk Gen yang Terinduksi oleh Respon Kekeringan .....	17
2.7. Mekanisme Toleransi oleh Respond an Toleransi Kekeringan .....	18
3.1. Kerangka Operasional Penelitian .....	26
4.1. Profil Protein Varietas Dering-1 pada Kondisi Kekeringan .....	32
4.2. Ekspresi gen DREB pada Perlakuan Induksi Mutasi EMS .....	38
4.3. Ekspresi gen DREB pada Perlakuan Induksi Mutasi EMS .....	39
4.4. Ekspresi gen DREB pada Perlakuan EMS Lama Perendaman 4 jam .....	40
4.5. Ekspresi gen DREB pada Perlakuan EMS Lama Perendaman 6 jam.....	41
4.6. Ekspresi gen DREB pada Perlakuan EMS Lama Perendaman 8 jam .....	41
4.7. Ekspresi gen DREB pada Perlakuan Konsentrasi EMS 0,03% .....	42
4.8. Ekspresi gen DREB pada Perlakuan Konsentrasi EMS 0,05% .....	43
4.9. Ekspresi gen DREB pada Perlakuan Konsentrasi EMS 0,07% .....	43
4.10. Hasil Amplifikasi gen DREB .....	45

## KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat Allah swt atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan tulisan peneltiian yang berjudul : **Karakter Molekuler Kedelai (*Glycine Max*) Toleran Kekeringan Hasil Induksi Mutasi Dengan Mutagen Ems (*Ethyl Methane Sulfonate*)**

. Dalam tulisan ini disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi karakter-karakter molekuler tanaman kedehas hasil mutasi menggunakan mutagen kimia untuk mendapatkan kedelai toleran kekeringan dengan potensi hasil tinggi. Penelitian untuk mengidentifikasi karakter morfologi dan molekuler pada tanaman kedelai dan memberikan informasi yang penting untuk program pemuliaan tanaman karena merupakan dasar untuk pengembangan tanaman selanjutnya.

Penulis mengucapkan terimakasih atas dukungan pendanaan dari Direktorat Pendidikan Tinggi Islam – Direktorat Jenderal Pendidikan Islam Kementerian Agama RI. Penulis menyadari adanya keterbatasan pengetahuan dan kekurangan, maka dirasakan masih ada kekurangan dalam penelitian ini. Oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik untuk perbaikan laporan ini.

Malang, Desember 2015

Penulis

## **BAB I. PENDAHULUAN**

### **1.1. Latar Belakang**

Kedelai merupakan komoditas yang penting di Indonesia karena merupakan sumber protein yang paling murah. Kedelai memiliki nilai nutrisi yang tinggi dengan kandungan protein sekitar 35%. Indonesia memiliki ketergantungan yang tinggi pada import kedelai, dikarenakan produksi kedelai 700.000 – 800.000 ton/tahun sedangkan kebutuhan kedelai di Indonesia per tahun mencapai 2,2 juta ton – 2,3 juta ton. Kebutuhan kedelai dipenuhi 1,4 juta – 1,5 juta ton dipenuhi dari import. Import terbesar dari Amerika Serikat dan Brazilia ( Setiawan, 2013).

Saat ini produktivitas mengalami kenaikan cukup signifikan hingga mencapai 1.500 kg/ha, namun angka tersebut masih tergolong rendah. Rendahnya produktivitas kedelai tersebut disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain: (1) Kedelai berasal dari daerah subtropis, sehingga jika ditanam di daerah tropis seperti Indonesia, hasilnya lebih rendah dibanding di daerah asalnya; (2) Penggunaan input belum optimal; (3) Teknologi budidaya kedelai di lahan sub-optimal/lahan marginal masih terbatas; (4) Penguasaan teknik pengendalian organisme pengganggu tanaman masih terbatas; dan (5) Cekaman kekeringan karena kedelai umumnya ditanam di musim kering (Anonymous, 2013)

Untuk meningkatkan produksi kedelai menjadi 1,28 juta ton dalam waktu 3 tahun, pemerintah membagi tahapan kerja menjadi tiga tahun yaitu: tahun pertama pada tahun 2015 menambah luas areal penanaman menjadi 380.000 hektar, kemudian pada tahun 2016 menambah areal penanaman menjadi 500.000 hektar dan pada tahun 2017 menambah areal penanaman 500.000 hektar (Suherman, 2014), untuk menambah areal penanaman kedelai pemerintah menggunakan lahan sub optimal dan lahan kering.

Di Indonesia lahan kering merupakan area yang sangat luas dan berpotensi dalam upaya peningkatan produksi pertanian. Menurut Abdurachman *et al* (1997) dalam Subandi (2007), dewasa ini terdapat ±13 juta Ha lahan yang dimanfaatkan untuk pengembangan kedelai, baik lahan sawah maupun lahan kering. Di Sumatera, luas lahan kering sekitar 5 juta ha dan lahan terlantar sekitar 2,5 juta ha, dan di Sumatera Barat sendiri potensi lahan kering untuk pengembangan tanaman pangan (termasuk kedelai) cukup luas, sekitar 590.450 Ha yang didominasi oleh tanah masam (Atman dan Hosen, 2008).

Pemuliaan tanaman dengan metode mutasi genetic menggunakan perlakuan bahan kimia dan fisik diikuti dengan seleksi untuk sifat genotype yang spesifik, metode ini telah

berhasil untuk pengembangan genetic tanaman pangan (Mick *et al.*, 1985). Mutagenesis secara luas digunakan dan merupakan metode yang berpotensi meningkatkan variabilitas untuk pengembangan tanaman (Subuthi *et al.*, 1991). Pemuliaan mutasi pada tanaman kedelai diidentifikasi pada beberapa galur mutant yang menunjukkan persentase perkecambahan dan daya hidup yang tinggi (Rehman *et al.* 1994).

Tujuan utama pemuliaan tanaman pangan khususnya kedelai ialah untuk mengembangkan varietas yang memiliki potensi hasil tinggi yang ditunjukkan oleh karakter morfologi dan agronomi. Sifat unggul kedelai ini ditunjukkan juga dengan ketahanan terhadap hama dan penyakit, kuantitas dan kualitas biji. Usaha pemuliaan lebih terfokus pada meminimalkan kehilangan hasil pada kondisi kurang menguntungkan yaitu kekeringan dan memaksimalkan hasil panen pada kondisi yang menguntungkan.

Mutagenik menggunakan EMS (*Ethyl Methane Sulfonate*) menunjukkan hasil yang lebih efektif dibandingkan menggunakan mutagen yang lain, berdasarkan pada beberapa penelitian sebelumnya, salah satunya pada tanaman mutant berdasarkan karakter kandungan klorofil. Berikut urutan mutagenik yang lebih efektif ; EMS > sinar gamma + EMS > sinar gamma. EMS diketahui lebih kuat dalam menghasilkan mutasi yang bermanfaat dibandingkan sinar gamma pada padi (Kaul and Bhan, 1977), lentil (Solanki and Sharma, 1994), kacang hijau (Singh, 2007), kacang kapri (Shah *et al.*, 2008), urdbean (Thilagavathi and Mullainathan, 2009). Perlakuan EMS pada kacang kapri (Girija and Dhanavel, 2009) dan kedelai (Khan and Tyagi, 2010) menunjukkan lebih efektif dan efisien menyebabkan mutasi dibandingkan dengan sinar gamma dan kombinasi keduanya.

Deteksi mutasi secara morfologi ialah metode yang umum digunakan oleh pemulia tanaman. Seleksi yang berdasarkan pada karakter tertentu pada beberapa generasi untuk mendapatkan sifat yang stabil. Kelemahan dari metode ini tidak mampu mendeteksi adanya sifat epigenetic. Seleksi secara morfologi dilakukan pada mutant 1 (M1). Pendekatan secara molekuler secara luas telah digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan gen dan adanya polimorfisme antara gen yang satu dan gen yang lain. Beberapa metode yang digunakan untuk mendeteksi adanya mutasi dan polimorfisme gen yaitu RFLP, RAPD, AFLP, SSR, PCR *Real Time*. PCR *real time* memiliki kelebihan dapat mendeteksi ekspresi relatif gen yang diakibatkan adanya mutasi secara kualitatif dan kuantitatif secara cepat dan akurat. Identifikasi gen lebih lanjut menggunakan metode PCR sekuensing untuk mengetahui sekuens basa yang berubah akibat adanya mutasi. PCR sekuensing didasarkan pada gen *DREB (drought responsive binding protein)*.

Dehydration responsive element (*DRE*) dengan inti sekuens A/GCCGAC diidentifikasi merupakan elemen cis-acting dalam pengaturan ekspresi gen pada kondisi kekeringan, kadar garam tinggi dan stress dingin pada Arabidopsis (Yamaguchi-Shinozaki, 1994). Overekspresi gen *DREB* telah diisolasi pada beberapa tanaman transgenik seperti Arabidopsis, padi (*Oryza sativa*) dan jagung (*Zea mays*) (Liu, 1998; Dobouzet 2003; Qin, 2004).

Identifikasi gen tahan kering *DREB1* dan *P5CS* telah dilakukan pada beberapa varian tanaman kedelai. Hasil amplifikasi menunjukkan bahwa semua varian kedelai baik tanpa atau dengan perlakuan cekaman kekeringan dapat mengidentifikasi gen tahan kering *DREB1* dan *P5CS*. Teramplifikasinya semua varian kedelai menunjukkan bahwa semua varian mempunyai gen *DREB1* dan *P5CS* yang sama. Berdasarkan dari hasil pita amplifikasi juga diketahui bahwa semua varian kedelai baik yang peka, medium maupun toleran sama-sama mempunyai gen *DREB1* dan *P5CS*, tetapi memiliki sekuens basa yang berbeda (Mahmudah, 2009). Pada varietas tanaman kedelai yang peka maupun toleran kekeringan terdapat gen terkait dengan ketahanan kekeringan. Gen ketahanan kekeringan tersebut yaitu *DREB1*, *GmDREB2*, *PIP* dan *LEA* (Pahlevi, 2010). Pertumbuhan dan hasil tanaman ditentukan sifat genetic dan lingkungan, sehingga dalam penelitian ini dilakukan karakterisasi secara morfologi dan molekuler untuk mendeteksi adanya mutasi dan fenotipe tanaman hasil mutasi. Seleksi dilakukan pada mutant untuk mendapatkan karakter genotype kedelai yang tahan kekeringan dan produksi hasil tinggi.

## **1.2. Tujuan Penelitian**

### **Tujuan Umum**

Untuk mendapatkan mutant pada beberapa varietas kedelai toleran kekeringan yang memiliki hasil biji tinggi

### **Tujuan Khusus**

1. Untuk menentukan konsentrasi EMS yang mampu menghasilkan mutan
2. Untuk mengidentifikasi morfologi mutan 1(M1)
3. Deteksi ekspresi mutasi gen berdasarkan dan PCR *real time*

4. Untuk mendeteksi perbedaan sekuens basa penyusun mutan beberapa varietas kedelai berdasarkan marker RAPD dan gen *DREB (drought responsive element binding protein)*

### **1.3. Manfaat Penelitian**

Terdapat beberapa varietas kedelai yang tahan terhadap kondisi lahan yang kering, diantaranya adalah Tidar, Tanggamus, dan Dering 1. Kekurangan dari varietas tersebut adalah ukuran biji yang tergolong kecil dibandingkan dengan varietas kedelai produktivitas tinggi. Varietas kedelai yang memiliki produktivitas tinggi, seperti Burangrang dan Grobogan memiliki ukuran biji yang lebih besar dibandingkan dengan varietas kedelai yang tahan kering. Namun, varietas kedelai produktivitas tinggi tidak dapat tumbuh dengan baik dalam kondisi lingkungan yang kering, sehingga hal tersebut berdampak pada berkurangnya hasil produksi yang diperoleh. Oleh sebab itu diperlukan juga upaya peningkatan adaptasi ekofisiologis varietas kedelai produktivitas tinggi terhadap kondisi lahan yang kering agar keterbatasan tersebut tidak menjadi masalah dan produksi dapat berjalan optimal. Kendala tersebut dapat diatasi salah satunya dengan cara mengembangkan varietas kedelai tahan kering yang memiliki produktivitas tinggi melalui mutagenesis. Hasil dari studi ini akan didapatkan kandidat varietas baru kedelai yang tahan kekeringan dan memiliki potensi hasil tinggi yang diharapkan mampu memenuhi kebutuhan kedelai di Indonesia.

### **1.4. Hipotesis**

1. Terdapat konsentrasi EMS yang mampu menghasilkan mutan
2. Terdapat perbedaan morfologi mutan 1(M1)
3. Terdapat perbedaan ekspresi gen hasil mutasi gen berdasarkan PCR *real time*
5. Terdapat perbedaan sekuens basa penyusun mutan beberapa varietas kedelai berdasarkan gen gen *DREB (drought responsive element binding protein)*

## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Deskripsi Varietas Dering 1

Varietas Dering 1 dilepas pada tahun 2012. Varietas tersebut mempunyai rata-rata hasil 1,95 t/ha, potensi hasil 2,83 t/ha, umur masak 81 hari (sedang), dan ukuran biji sedang (10,7 g/100 biji). Keunggulan lain dari Dering 1 adalah tahan terhadap hama penggerek polong *Etiella zinckenella* dan tahan penyakit karat daun *Phakopsora pachyrizi*. Varietas Dering 1 adaptif pada lahan sawah dengan pengairan terbatas pada Musim Kemarau (MK) II (Juli-Oktober), lahan sawah tadah hujan pada MK I (Maret-Juni), dan lahan kering (tegal) pada Musim Hujan (MH) II (Februari-April). (Balitkabi, 2015).

Agroekosistem utama produksi kedelai di Indonesia adalah lahan sawah. Peluang terbesar penanaman kedelai di lahan sawah jatuh pada musim kemarau 1 (MK 1) dan MK 2. Pada kondisi demikian, budidaya kedelai seringkali menghadapi risiko gagal panen karena faktor kekeringan. Pemanasan global yang menyebabkan peningkatan intensitas kekeringan yang ekstrim, turut meningkatkan risiko kegagalan tersebut. Padahal hingga saat ini di Indonesia belum tersedia varietas kedelai yang khusus dilepas untuk tujuan toleran kekeringan. Varietas Dering 1 (galur DV/2984-330) merupakan varietas kedelai yang dirakit untuk menjawab masalah tersebut.

Varietas Dering 1 berasal dari persilangan tunggal antara varietas unggul lama Davros dengan MLG 2984 (genotipe toleran kekeringan). Melalui seleksi pedigri, dilakukan penggaluran hingga diperoleh galur harapan DV/2984-330. Seleksi toleransi kekeringan dilakukan pada generasi F4 – F5 hingga uji daya hasil pendahuluan (UDHP) pada MK II 2007 dan uji daya hasil lanjutan (UDHL) pada MK II 2008 di Kebun Percobaan (KP) Muneng dan KP Jambegede. Galur kedelai ditanam pada lingkungan yang tercekam kekeringan selama fase reproduktif (pengairan hanya dilakukan antara saat tanam sampai 50% berbunga). Pemilihan galur pada generasi F4 berdasarkan pada keragaan tanaman, jumlah polong, berat biji dan warna biji kuning. Pada generasi F5 pemilihan galur berdasarkan pada skor tingkat kelayuan (skor < 3 berdasarkan metode Del Rosario *et al.*, 1993) dan dilakukan pada saat tanaman berumur 50 dan 65 hari setelah tanam. Biji varietas Dering 1 disajikan pada Gambar 2.1.



**Gambar 2.1. Biji varietas Dering 1**

Keragaan beberapa varietas dan galur kedelai tahan kekeringan disajikan pada Gambar 2.2.





**Gambar 2.2. . Keragaan polong dan biji galur DV/2984-330, Wilis dan Tidar pada kondisi kekeringan selama fase reproduktif**

## **2.2. Respon Pertumbuhan Tanaman Kedelai pada Kondisi Cekaman Kekeringan**

Penelitian tentang respon fisiologis dan biokimiawi tanaman kedelai pada kondisi cekaman kekeringan telah diteliti (Oya *et al.*, 2004; Michalek & Borowski, 2005; Benjamin & Nielsen, 2006; Lobato *et al.*, 2008), bahwa cekaman kekeringan secara nyata menurunkan konduktivitas stomata dan transpirasi pada semua kultivar kedelai yang diamati. Pada kondisi cekaman kekeringan ada beberapa kultivar yang memiliki luas daun yang paling tinggi, batang dan bobot kering akar yang tinggi, hal ini menunjukkan toleransi pada cekaman kekeringan diantara kultivar yang diuji.

Cekaman kekeringan yang diperlakukan pada kedelai kultivar Sambaibaba mengalami penurunan kandungan air relatif daun meskipun total karbohidrat terlarut dan sukrosa meningkat. Cekaman kekeringan berpengaruh pada fotosintesis kedelai (Lei *et al.*, 2006). Hasil studi menunjukkan bahwa penurunan kadar air 47% di bawah kapasitas lapang menyebabkan penurunan potensial air daun secara cepat dengan nilai sekitar -1,02 MPa. Pada kondisi tersebut rasio laju fotosintesis menurun dengan cepat. Berat kering polong secara langsung dipengaruhi oleh cekaman kekeringan selama pemanjangan polong. Cekaman pada awal pengisian biji mengurangi jumlah biji per polong, sedangkan cekaman di akhir pengisian polong mengurangi berat biji (Descaloux *et al.*, 2000).

Toleransi cekaman kekeringan berdasarkan hasil biji pada saat panen pada beberapa kultivar telah dilakukan oleh Oya *et al.*, (2004), kultivar dengan toleransi yang

tinggi pada cekaman kekeringan menunjukkan laju pertumbuhan tanaman (*crop growth rate*) dan luas daun yang lebih tinggi dibandingkan dengan kultivar yang lain. Kultivar yang dipertimbangkan toleran kekeringan memiliki hasil panen relatif lebih tinggi dibandingkan dengan kultivar yang peka kekeringan.

Suhartina (2001), varietas Tidar dan Wilis masuk dalam kelompok toleran kekeringan dan berdaya hasil tinggi baik pada kondisi cekaman sedang (70% LT) maupun cekaman berat (40% LT). Faktor umur pendek pada varietas Tidar mungkin salah satu penyebab varietas tersebut memiliki Indeks Toleransi Cekaman (ITC) yang tinggi, sehingga dapat dikategorikan *escape* dari pengaruh cekaman kekeringan.

Penelitian bertujuan untuk mempelajari respon fisiologis kedelai toleran dan peka kekeringan pada cekaman kekeringan telah dilakukan oleh Hamim *et al.*, (2008). Kekeringan menyebabkan penurunan kadar air relatif hingga kurang dari 43%, sedangkan kadar air relatif kontrol mendekati 80%. Akumulasi prolin meningkat pada akhir periode cekaman kekeringan. Kandungan prolin pada varietas yang peka jauh lebih besar dibandingkan varietas yang toleran, yang menandakan bahwa varietas peka mengalami cekaman yang lebih besar daripada varietas yang toleran. Tidak ada pola yang khas dari peningkatan aktivitas enzim-enzim antioksidan pada akhir periode cekaman, namun aktivitas enzim meningkat lebih tinggi pada kedelai liar dibandingkan dengan kedelai budidaya.

Penelitian pada tanaman kedelai membandingkan tanaman kedelai transgenik yang mengandung gen *Δ-1-pyroline-5-carboxylate-reductase* dengan tanaman tipe liar (*wild type*). Tanaman diperlakukan dengan cekaman kekeringan dan cekaman panas selama 2 hari, selama penelitian tanaman transgenik menunjukkan gejala tercekam yang ringan dibandingkan dengan tanaman non transgenik. Tanaman transgenik menunjukkan kemampuan yang tinggi untuk mengakumulasi prolin selama cekaman (Ronde *et al.*, 2010).

### **2.3. Mutasi dan Perubahan Ekspresi Gen karena Mutagen EMS (*Ethyl Methane Sulfonate*)**

Berdasarkan penyebabnya mutasi dapat dibedakan menjadi mutasi spontan dan mutasi buatan. Mutasi buatan biasanya diinduksi dengan dua kelompok mutagen yaitu radiasi (sinar UV, sinar X, sinar gamma dan beta) dan mutagen kimia (EMS = ethyl methanesulfonate, AFB1 = aflatoxin B1, DSEDES = diethyl sulfate, -BU = 5-bromouracil, NG = nitrosoguanin, HA = hidroxyamine, NaN<sub>3</sub> = sodium azida). Gen berdasarkan fungsinya adalah pembawa sifat yang diturunkan. Secara molekuler, gen adalah sekuen asam nukleat (DNA) yang membawa informasi yang menentukan polipeptida tertentu (Lewin, 1987). Meskipun gen bersifat stabil, tidak mudah berubah, tetapi merupakan entitas yang menjadi sasaran perubahan pada waktu-waktu tertentu, perubahan seperti itu disebut mutasi. Menurut Lewin (1987) gen adalah unit yang dapat bermutasi (*mutable unit*). Mutasi adalah proses yang menyebabkan pasangan DNA atau kromosom (Parker, 1995). Organisma yang membawa gen yang telah mengalami perubahan disebut mutan, sedangkan yang membawa gen yang normal disebut tipe liar (*wild type*).

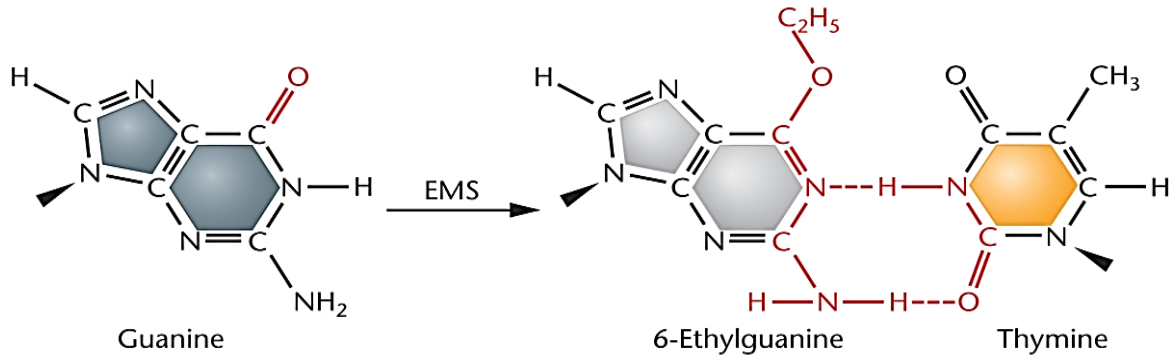
Mutasi dapat terjadi secara spontan di alam (*spontaneous mutation*) dan dapat terjadi melalui induksi (*induced mutation*). Secara mendasar tidak terdapat perbedaan antara mutasi yang terjadi secara alami dan mutasi hasil induksi. Keduanya dapat menimbulkan variasi genetik untuk dijadikan dasar seleksi tanaman. Mutasi induksi dapat dilakukan pada tanaman dengan perlakuan bahan mutagen tertentu terhadap organ reproduksi tanaman seperti biji, stek batang, serbuk sari, akar rizome, kalus dan sebagainya (Soeranto, 2003). Aplikasi mutagen secara *in vitro* telah lazim digunakan dalam metode mutasi buatan seiring dengan keberhasilan aplikasi teknik perbanyakan *in vitro* pada berbagai jenis tanaman. Prinsip dasar mutasi *in vitro* adalah meningkatkan frekuensi variasi somaklonal dan meningkatkan efektifitas variasi somaklonal sehingga keragaman genetik tanaman diharapkan akan meningkat (Priyono *et al.*, 2002).

Mutagen yang sering digunakan dalam pemuliaan tanaman yaitu mutagen kimia dan mutagen fisik. Mutagen kimia pada umumnya berasal dari senyawa alkyl seperti ethyl methana sulphonate (EMS), diethyl sulphonate (DES), methyl methana sulphonate (MMS), hydroxylamine, nitrous acid dan sebagainya. Salah satu mutagen kimia yang secara bersama-sama dapat digunakan dalam kultur *in vitro* adalah ethyl methana sulphonate (Soeranto, 2003).

*Ethyl methane sulfonate* merupakan senyawa kimia yang dapat menyebabkan mutasi pada tingkat DNA dengan mengubah basa-basa DNA. EMS memiliki rumus kimia  $C_3H_8SO_3$  (Russell, 1992). Mutagen kimia EMS merupakan salah satu zat kimia yang termasuk dalam golongan agen alkilasi yang dapat menyebabkan mutasi titik. Mutasi titik terjadi pada sebuah basa yang dapat berupa insersi, delesi, transversi, atau transisi basa. Insersi dan delesi pada satu atau lebih basa dapat menyebabkan perubahan urutan pembacaan sehingga mengubah susunan asam amino. Transisi dan transversi menyebabkan perubahan ekspresi asam amino. EMS akan mengikatkan gugus etilnya pada DNA guanin (G) pada posisi 7-N dan 6-O yang akan membentuk gugus O6-etilguanin. Terjadinya etilasi ini menyebabkan kesalahan pemasangan basa ketika replikasi, sehingga menyebabkan mutasi acak pada rantai DNA (Sambrook dan Russell, 2001).

*Ethyl Methana Sulphonate* (EMS) merupakan sejenis mutagen kimiawi yang dapat menyebabkan proses alkilasi yang efektif dalam menginduksi permutasian berbagai jenis organisme (Priyono et al., 2002). Mutasi dengan menggunakan mutagen kimia EMS telah banyak dilakukan pada berbagai spesies tanaman. EMS merupakan kelompok alkil yang dapat mengubah basa-basa DNA (guanine dan timin) menjadi basa lain dan akan berpasangan dengan basa yang berbeda sehingga terjadi transisi (Purwati *et al.*, 2008).

Perlakuan menggunakan EMS menyebabkan alkilasi basa guanine (G) menyebabkan kesalahan berpasangan atau ketidakcocokan pasangan pada DNA organism yang mendapat perlakuan. Pada kondisi ini, alkilasi pasangan G dengan T (thymine) pada tempat C (cytosine) menyebabkan pasangan G/C menjadi transisi A/T pada rantai DNA. Perlakuan EMS dapat menyebabkan mutasi alel, kelesi dan penyusunan ulang kromosom. Mutasi ini dapat digunakan untuk mengaktifkan morfometri dan perubahan reproduktif tanaman. Pada seleksi lebih jauh pada tanaman mutant akan menghasilkan sejumlah generasi yang dapat digunakan untuk mengurangi mutasi yang tidak diharapkan, dan menghasilkan sejumlah karakter baru pada populasi (Acharya *et al.*, 2007). Skema perubahan basa pada DNA disajikan pada Gambar 2.1.



**Gambar 2.3. Skema perubahan basa DNA yang disebabkan oleh EMS**

Agen alkilasi seperti EMS memiliki keefektifan yang tinggi, menghasilkan berbagai macam tipe mutan. Agen mutasi ini menyebabkan salah berpasangan dengan basa pasangannya dan menghasilkan perubahan replikasi basa (Haughn and Somerville 1987; Ashburner 1990).

Berdasarkan hasil yang penelitian yang telah diperoleh, diduga bahwa mutagenesis menggunakan perlakuan EMS lebih menguntungkan dibandingkan dengan sinar gamma atau kombinasi EMS dan sinar gammadalam pengembangan kultivar dengan perubahan alel menuju pengembangan karakter komponen hasil biji pada kedelai (*Glycine max* L. Merr) (Khan & Tyagi, 2006). Zakri and Jalani (1986) memperlakukan dua kultivar kedelai (Palmetto dan Acadian) dengan EMS dan sinar gamma dan mendapatkan hasil mutan P630-2 memiliki jumlah polong 86/tanaman dibandingkan dengan pada control jumlah polong 22/tanaman. Skorupska (1984) memperlakukan biji 14 varietas kedelai dengan 10kR sinar gamma yang diberikan terpisah dan juga gabungan dengan larutan NaNO<sub>3</sub>, melaporkan abnormalitas morfologi pada semua perlakuan pada generasi M2 (mutan turunan ke-2), sedangkan pada M3 (mutan turunan ke-3) perlakuan memberikan hasil variasi yang besar pada hasil biji/tanaman. Krausse (1989) mengembangkan 6 galur mutan, Dorado ialah galur mutan terbaik yang memiliki hasil panen tertinggi yaitu 1320-1560 kh/ha dibandingkan dengan galur control 120 kg/ha.

Pengamatan persentase perkecambahan, persentase abnormalitas daun, persentase daya hidup, tinggi tanaman, jumlah polong/tanaman, jumlah biji/tanaman, berat biji/tanaman, dan hasil panen kg/ha diamatai pada generasi M1. Pengembangan varietas kapri CO-7 memiliki respon yang lebih dan jumlah viabilitas dan mutan yang efisien dengan produktivitas yang tinggi pada 25 mM EMS dibandingkan mutagenic pada semua

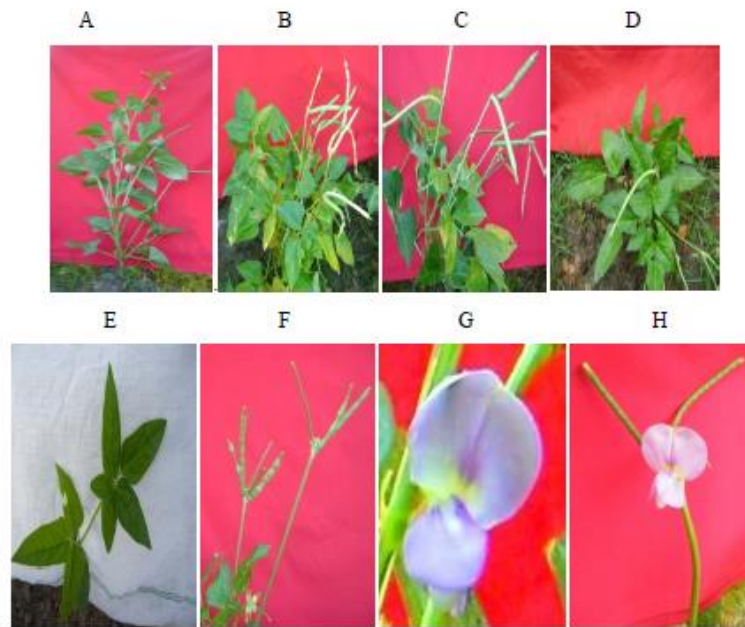
generasi. Karakter morfologi mutan yang dipelajari dan berguna untuk identifikasi dan karakterisasi genotype kapri (Girija *et al.*, 2013)

Jabeen dan Mirza (2004) yang melakukan induksi mutasi pada cabai besar dengan EMS, menghasilkan mutan kerdil dengan tingkat dewasa bervariasi dari lambat ke cepat yaitu pada konsentrasi 0,5% dengan lama perendaman 6 jam. Konsentrasi 1% dengan lama perendaman 6 jam pada cabai besar menghasilkan 11,2% bibit cabai yang memiliki daun yang menyatu (Pharmawati *et al.*, 2013). Mutagen EMS bisa digunakan dengan konsentrasi 0,05% sampai 2,5% dengan lama perendaman antara 3 sampai 24 jam (Alcantara *et al.*, 1996; Jabeen dan Mirza, 2002; Jabeen dan Mirza, 2004; Khan *et al.*, 2009; Priyono dan Susilo, 2002).

Pada cowpea (*Vigna unguiculata*) perlakuan EMS dengan dosis 10 mM selama 6 jam perkecambahan dan variasi morfologi yang baik. Dari 2 varietas (IT84E dan Vita7) menunjukkan hasil yang serupa tetapi pengaruh yang lebih nyata ditunjukkan oleh IT84E-124. Perubahan yang teramati pada M2 adalah tanaman dengan tangkai buah yang bercabang, pigmentasi antosianin pada polong dan batang, perubahan pada bentuk dan warna daun dan bunga, sterilitas jantan, pemasakan awal dan ketahanan terhadap aphids dan bruchid (Odeigah *et al.*, 1998). Untuk varietas IT84E-124 perlakuan EMS tidak meningkatkan parameter hasil, sedangkan pada Vita7 EMS menyebabkan peningkatan berat 100 biji dan jumlah biji per polong secara nyata.

Khan (2011) melakukan induksi mutasi pada gandum (*Triticum aestivum* L.) dengan menggunakan EMS dengan konsentrasi 0,1 sampai 0,2% selama 6 jam. Pada generasi M2 didapatkan bahwa panjang malai, jumlah bulir per malai, jumlah anakan per tanaman dan hasil tanaman meningkat.

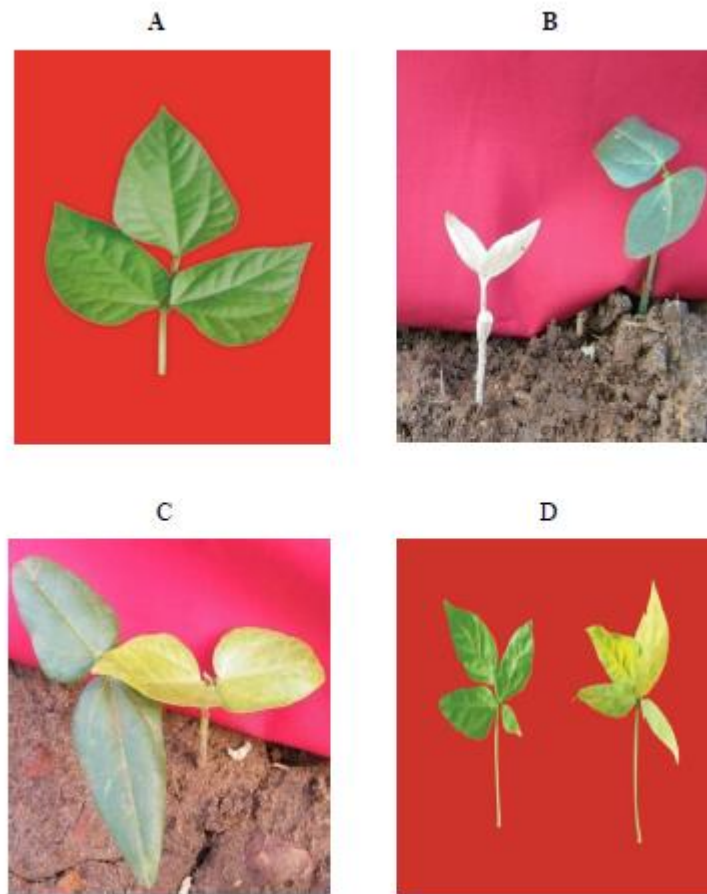
Hasil penelitian Ginamurti (2012) pada tanaman kacang kapri yang diperlakukan dengan mutagen EMS disajikan pada Gambar 2.2.



**Gambar 2.4. Pengamatan Morfologi Mutan pada kacang kapri Morphological (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) Viable Mutants pada berbagai perlakuan konsentrasi EMS**

- a) Tanaman tinggi (20 mM EMS)
- b) Tanaman pendek (30 mM EMS)
- c) Kematangan awal (25 mM EMS)
- d) Kematangan akhir (30 mM EMS)
- e) Mutan daun (25 mM EMS)
- f) Mutan polong (25 mM EMS)
- g) Bunga warna pink (25 mM EMS)
- h) Bunga warna pink muda (20 mM EMS) (Gnanamurthy, 2014)

Pada Gambar 2.2. perlakuan EMS menunjukkan adanya perbedaan pada karakter morfologi fase vegetative dan generative kacang kapri pada berbagai konsentrasi EMS. Perlakuan EMS 20 mM menunjukkan adanya perbedaan pada tinggi tanaman, kematangan, polong dan warna bunga.



**Gambar 2.5. Pengamatan mutan klorofil (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) Viable Mutants pada berbagai perlakuan konsentrasi EMS**

- a) Control Plant
- b) Albino (25 mM EMS)
- c) Xantha (20 mM EMS)
- d) Xantha (30 mM Ems) (Gnanamurthy, 2014)

Pada gambar 2.5. menunjukkan adanya mutant klorofil yaitu daun albino dan xantha yang merugikan pada konsentrasi EMS 20 mM, 25 mM dan 30 mM.

#### **2.4. Respon biokimiawi dan molekuler tanaman terhadap cekaman kekeringan**

Cekaman kekeringan ialah proses biokimia yang kompleks, melibatkan beberapa makromolekul dan mikromolekul biologi seperti asam nukleat (DNA, RNA), protein, karbohidrat, lemak, hormon, ion, radikal bebas dan elemen mineral (Kasuga *et al.*, 1999; Terzi and Kadioglu, 2006; Shinozaki *et al.*, 2007; Bakalova *et al.*, 2008). Beberapa perubahan yang diakibatkan oleh cekaman kekeringan akan menginduksi ekspresi gen dan sejumlah gen yang terlibat dalam mekanisme ketahanan terhadap kekeringan telah teridentifikasi (Bartels and Nelson, 1994; Rodriguez *et al.*, 2005; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007)

Perubahan biokimia yang terjadi antara lain perubahan baik tingkat seluler maupun molekuler, misalnya akumulasi osmolit dan protein spesifik yang terlibat dalam toleransi cekaman (Shinozaki dan Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Respon tanaman terhadap kekeringan sebagai hasil beberapa mekanisme fisiologis dan biokimiawi merupakan kejadian yang terintegrasi mulai dari sinyal persepsi, transduksi dan pengaturan ekspresi gen yang mengarah pada perubahan adaptif pertumbuhan tanaman seperti: perubahan laju pertumbuhan, potensial osmotik jaringan, dan pertahanan antioksidan (Kozlowski dan Pallardy, 2002; Zhang & Kirkham, 2005; Lei *et al.*, 2006, Lobato, *et al.*, 2008).

Pengaruh cekaman kekeringan terhadap aktifitas biokimia tanaman adalah mencakup perubahan konsentrasi hormon, misalnya kandungan asam absisat (Cellier *et al.*, 1998; Shiver & Mundy, 1990) dan kandungan prolin (Vajrabaya *et al.*, 2001; Avilla *et al.*, 2006). Pada kondisi kekeringan, sel-sel tanaman mengalami kehilangan air, sehingga berpengaruh terhadap metabolisme dalam sel.

Nguyen dan Joshi (1992), Mohammadkhani dan Heidari (2008) pada kondisi cekaman kekeringan selain terjadi penurunan protein juga terjadi sintesis protein baru. Terdapat ratusan protein yang diinduksi oleh cekaman lingkungan sebagai respon ketahanan tanaman terhadap cekaman, tetapi mekanisme ketahanan tanaman dengan disintesisnya protein baru ini belum diketahui. Bakalova *et al.*, 2008; Bibi *et al.*, 2009 melaporkan bahwa konsentrasi protein tertentu (protein 10-70 kD) meningkat pada kondisi kekeringan, selain itu terjadi penurunan konsentrasi beberapa protein lainnya dan juga disintesisnya beberapa protein baru yang khas, yang disintesis oleh cekaman kekeringan. Protein *late embryogenesis abundant* (LEA) terutama dengan berat molekul 10-30 kDa terlibat dalam perlindungan tanaman tingkat tinggi dari kerusakan yang disebabkan oleh

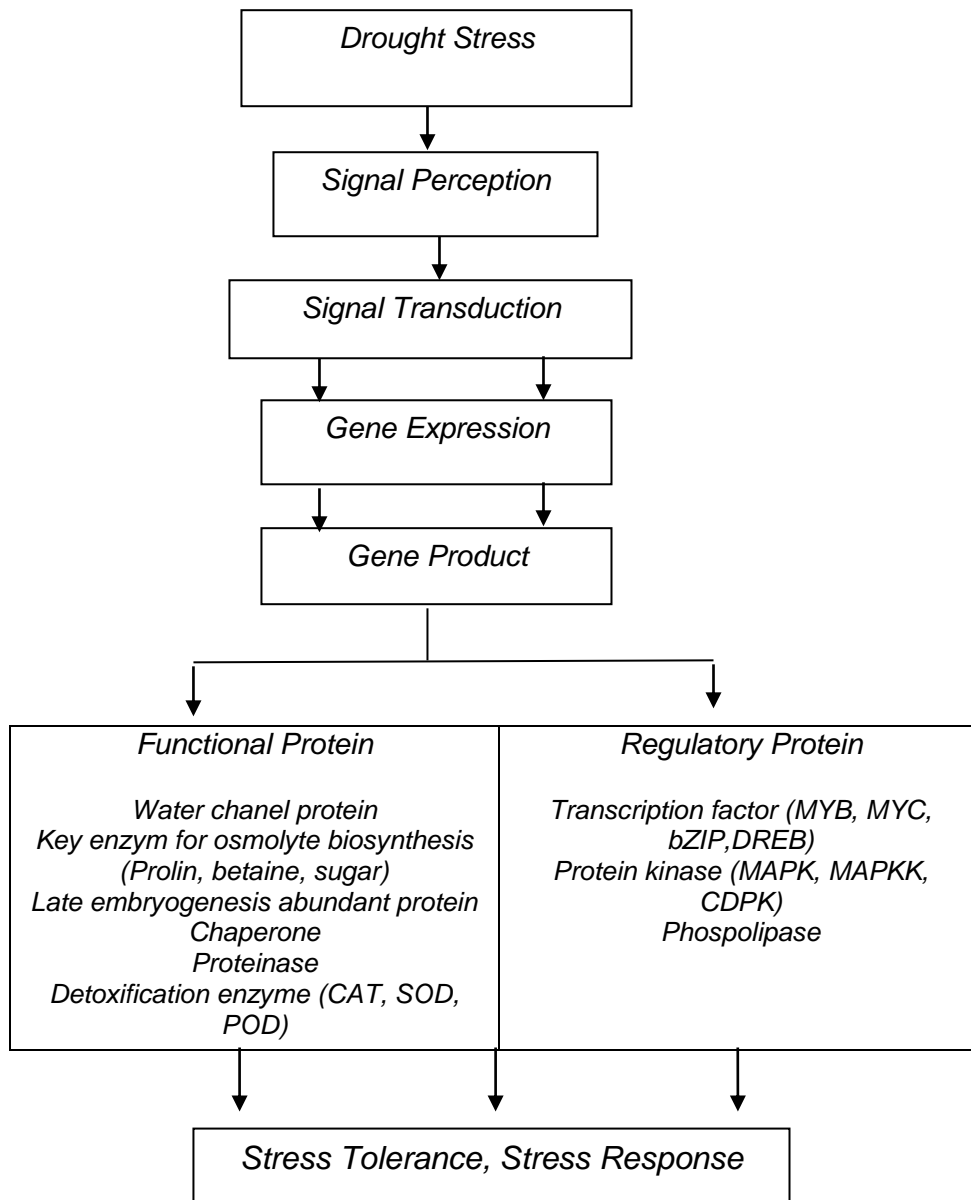
cekaman lingkungan khususnya kekeringan (Hong-Bo *et al.*, 2005; Samarah *et al.*, 2006; Demirevska *et al.*, 2008).

Tanaman merespon dan beradaptasi pada cekaman kekeringan baik pada tingkat seluler dan molekuler, sebagai contoh akumulasi osmolit dan protein yang terlibat dalam toleransi cekaman. Berbagai macam gen dengan fungsi yang berbeda dirangsang atau ditekan oleh cekaman tersebut (Shinozaki *et al.*, 2003; Bartels dan Sunkar, 2005; dan Shinozaki dan Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Kebanyakan produk gen tersebut berfungsi dalam respon dan toleransi cekaman pada tingkat seluler. Saat ini sejumlah gen yang terkait dengan cekaman kekeringan telah teridentifikasi menggunakan analisis *microarray* pada berbagai spesies taaman seperti pada Arabidopsis dan padi.

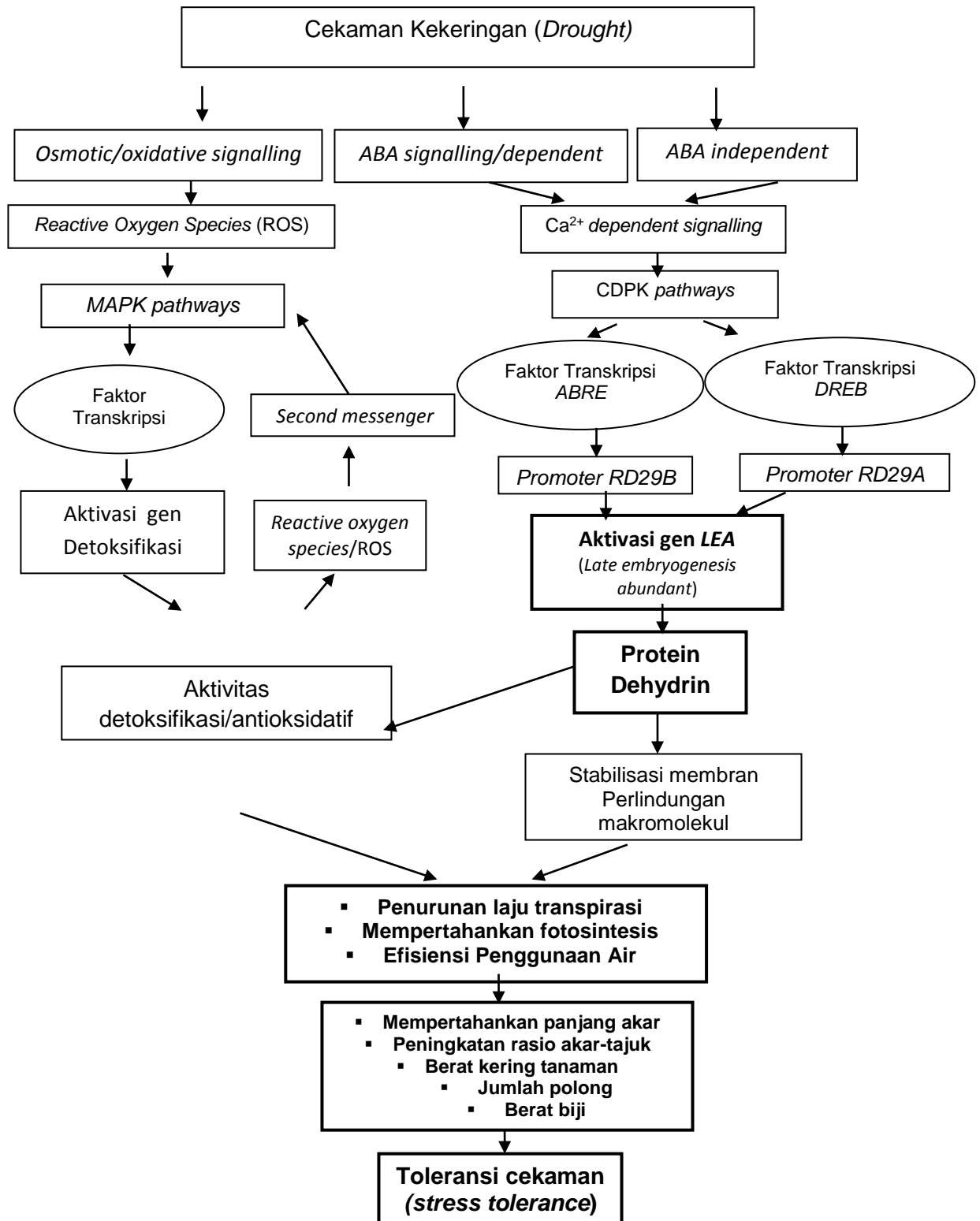
Induksi gen kekeringan yang diidentifikasi dengan analisis *microarray* pada Arabidopsis dapat diklasifikasikan menjadi 2 kelompok (Gambar 1) yaitu gen yang terlibat pada penjagaan sel selama cekaman kekeringan dan gen yang terlibat pada regulasi gen lain yang terlibat saat merespon kekeringan. Kelompok pertama mencakup protein fungsional yang berfungsi ketika terjadi ketahanan terhadap stress abiotik yaitu protein yang melindungi makromolekul dan membran (protein LEA, chaperones, mRNA binding protein), gen yang mengatur pergerakan air melalui membran (protein saluran air dan transporter membran), enzim pada biosintesis osmoregulator (prolin, betain, gula), enzim detoksifikasi yang ada pada metabolisme fisiologis dan biokimia (*glutathione S-transferase*, *soluble epoxide*, *hydrolase*, *catalase*, *superoxide dismutase* dan *ascorbic peroxidase*). Kelompok kedua mencakup protein regulator yang ikut dalam pengaturan transduksi sinyal dan ekspresi gen yang berfungsi dalam respon cekaman yaitu faktor transkripsi (bZIP, MYC, MYB, DREB, NAC, HB), protein kinase, faktor transkripsi dan fosfolipase (Shinozaki dan Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

*Water channel protein/aquaporin* di dalam membran dapat meningkatkan konduktivitas hidraulik osmotik membran. Pada kondisi cekaman kekeringan ekspresi gen aquaporin meningkatkan pergerakan air dari membran (Martre *et al.*, 2003). Senyawa prolin berfungsi untuk keseimbangan osmotik dan berfungsi juga sebagai respon terhadap cekaman lingkungan yaitu kekeringan (Parvanova *et al.*, 2004). Chaperon termasuk dalam *family heat shock* protein (HSP). Molekul chaperon berfungsi dalam pengikatan protein yang sesuai untuk transport membran, protein ini mencegah denaturasi protein yang disebabkan oleh cekaman kekeringan, panas dan cekaman lain (Iba, 2002). Protein LEA (*Late embryogenesis abundant*) memiliki beberapa fungsi untuk meminimalkan

kehilangan air dan stabilisasi membran, perlindungan dan penangkal *reactive oxygen species* (ROS) (Nylander *et al.*, 2001). Enzim detoksifikasi yang meliputi catalase (CAT), peroksidase (POD), superoksida dismutase (SOD) merupakan enzim yang berperan dalam mengontrol tingkat oksidasi dan berhubungan dengan toleransi pada cekaman abiotik. Produk gen dan mekanisme ketahanan kekeringan disajikan pada gambar 2.6. dan 2.7.



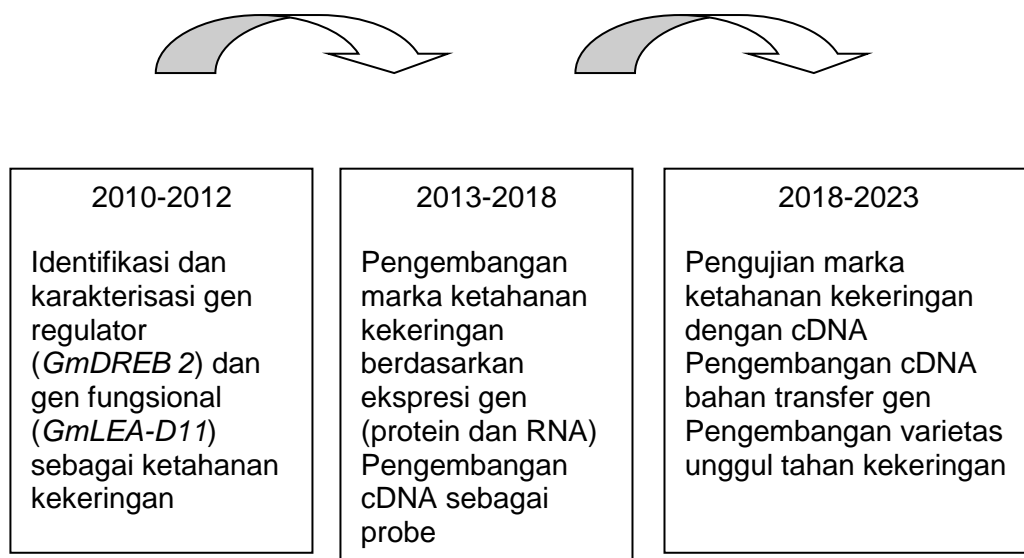
**Gambar 2.6. Produk gen yang terinduksi oleh respon dan toleransi cekaman kekeringan: protein fungsional dan protein regulator (Shinozaki dan Yamaguchi-Shinozaki, 2007)**



Keterangan : ABA : Absisic acid; CDPK : Calcium dependent protein kinase; MAPK : Mitogen activated phosphokinase; ABRE : Absisic acid binding respon element; DREB : Dehydration responsive element binding; RD : Responsive to dehydration;

**Gambar 2.7. Mekanisme Toleransi Tanaman Kedelai pada Kondisi Cekaman Kekeringan**

## 2.4. Road Map Penelitian



Penjabaran	2010-2012	2013-2015	2015-2020
Target	Ditemukannya gen yang bertanggung jawab pada ketahanan kekeringan	Penemuan probe untuk ketahanan kekeringan	Pengembangan probe dan bahan transfer gen Pengembangan varietas unggul tahan kekeringan
Sasaran	Gen ketahanan kekeringan	Probe ketahanan kekeringan untuk seleksi varietas	Pengujian probe dan transfer gen Varietas unggul tahan kekeringan
Rincian program	Riset sekuens gen yang terlibat dalam mekanisme ketahanan kekeringan baik gen regulator maupun gen fungsional	Riset ekspresi gen (protein dan RNA) yang akan didesain untuk probe ketahanan kekeringan	Pengujian probe ketahanan kekeringan dan pengujian sebagai bahan transfer gen Rekayasa genetic varietas unggul Induksi mutasi genetic untuk varietas unggul

## **BAB III. METODE PENELITIAN**

### **3.1. Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) Faktorial dengan menggunakan 2 faktor, 9 kombinasi perlakuan dan 3 kali ulangan, sebagai berikut: Faktor pertama adalah konsentrasi EMS yang terdiri dari 3 taraf, yaitu:  $K_1 = 0,05\%$ ,  $K_2 = 0,5\%$ ,  $K_3 = 1\%$ . Faktor kedua adalah lama perendaman dalam EMS yang terdiri dari 3 taraf, yaitu:  $L_1 = 4$  jam,  $L_2 = 6$  jam,  $L_3 = 8$  jam

### **3.2. Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas ukur, labu ukur, gelas beaker, pinset, tabung reaksi, penggaris, alat tulis, pipet tetes, mikropipet, pipet tip, pH meter, kamera, mortar dan pestle, tip berukuran 1000  $\mu$ l dan 200  $\mu$ l, mikropipet, mikro 22 R *Hettich sentrifuge*, *waterbath*, *refrigerator*, *autoclave*, *microwave*, *plate chamber electrophoresis*, sisir pembentuk sumur gel, *power supply*, *vortex*, *spindown*, Genesys 10 UV Spektrofotometer, Macro Vue-20 Hoefer UV transiluminator, kamera Polaroid, PCR (*Master Cycler Gradient Eppendorf*). *Real time PCR Roche LightCycler Fast Start*, Genetic Analyzer ABI PRISM® 3100-Avant.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah biji kedelai varietas Burangrang, Grobogan dan Dering 1 yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi (BALITKABI), Ethyl methanesulfonate (EMS), aquades, media tanam, kertas label. Bahan untuk isolasi DNA ialah kit isolation, primer RAPD, primer specific PCR real time, primer gen gen *DREB* (*drought responsive element binding protein*)

### **3.3. Prosedur Penelitian**

#### **3.3.1. Induksi Mutasi dengan EMS**

Bahan yang digunakan ialah benih kedelai varietas Dering-1 (tahan kekeringan hasil sedang). Perlakuan terdiri dari 3 tahap :

1. Perendaman benih dengan aquadest selama 1 jam
2. Perendaman benih dalam EMS dengan konsentrasi : 0%; 0,05%; 0,5% dan 1% selama 4,6 dan 8 jam pada suhu kamar

3. Pembilasan/pencucian benih yang telah diperlakukan pada air mengalir selama 2 jam

### **3.3.2. Identifikasi Morfologi Tanaman terhadap M1**

Pengairan disesuaikan dengan perlakuan cekaman kekeringan, yaitu pada kondisi control diberikan pengairan sesuai kapasitas lapang, sedangkan pada kondisi cekaman pengairan hanya diberikan 25% kapasitas lapang dan diperlakukan mulai masa vegetative aktif sampai panen.

#### **Pengamatan morfologi meliputi :**

Jumlah daun diamati pada saat tanaman memasuki stadia pertumbuhan V-6 yaitu pada saat daun berangkai 3 pada buku ke-6 telah membuka sempurna. Tinggi tanaman, tinggi tanaman diukur dari buku akar sampai titik tumbuh tertinggi menggunakan meteran. Bentuk daun, bentuk daun diamati berdasarkan ukuran daun dan warna daun. Waktu berbunga, diamati waktu berbunga pada 50% total populasi membentuk bunga. Pembentukan polong, diamati waktu pembentukan polong pada 50% total populasi membentuk polong. Waktu panen, diamati waktu pemasakan polong yang matang secara fisiologis pada 50% total populasi layak panen. Jumlah polong/tanaman, jumlah polong dihitung per tanaman pada saat panen. Berat biji/ tanaman, dihitung hasil total biji per tanaman pada saat panen. Pengamatan ketahanan tanaman terhadap cekaman kekeringan, meliputi persentase kelayuan, nekrosis dan abnormalitas lainnya.

### **3.3.3. Teknik Analisis Data**

Data yang telah diperoleh dari hasil perlakuan dianalisis dengan teknik analisis variansi (ANOVA) dua jalur untuk mengetahui pengaruh konsentrasi EMS dan lama perendaman dalam EMS terhadap perubahan morfologi kedelai. Apabila terdapat pengaruh yang signifikan antar perlakuan, maka perlu dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji perbandingan UJD (DMRT) pada taraf 5% untuk mengetahui perlakuan yang paling baik.

### **3.3.4. Identifikasi protein pada kondisi kekeringan**

Isolasi protein daun dilakukan dua kali yaitu pada saat umur tanaman 45 hst. Isolasi protein total daun kedelai menggunakan metode Stacy and Aland (2003). Cara kerja isolasi protein sebagai berikut : daun kedelai ditimbang sebesar 0,1 g dihomogenasi

dalam 500  $\mu$ L ekstrak buffer dalam keadaan dingin. Homogenat yang dihasilkan dipindahkan ke dalam eppendorf yang telah diisi dengan 250  $\mu$ L ekstrak buffer, dicampur hingga homogenat. Ke dalam homogenate ditambahkan 25  $\mu$ L PMSF 40 mM, diinkubasi selama 1 jam di dalam refrigerator sambil sesekali di vortex setiap 15 menit sekali, selanjutnya disentrifugasi pada 13.000 rpm, suhu 4°C selama 5 menit. Supernatant yang didapatkan dipindahkan ke dalam tabung eppendorf. Penentuan konsentrasi protein menggunakan alat Nanodrop.

### . Pengujian Mutasi Gen pada Kedelai dengan marker RAPD

#### 1. Amplifikasi dan Visualisasi Pola Pita DNA

Primer mikrosatelit yang digunakan sebanyak 10 primer (*forward* dan *reverse*), diperoleh dari *Research Genetik, Inc*, dan dari Invitrogen. Primer-primer tersebut diseleksi berdasarkan tingkat polimorfisme. Proses amplifikasi, pemisahan DNA pada PAGE (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), juga mengikuti prosedur George *et al.* (2004) dengan beberapa modifikasi. Modifikasi dilakukan sesuai dengan kondisi laboratorium karena penggunaan enzim dari sumber yang berbeda dan juga untuk efisiensi penggunaan bahan tanpa mengurangi kualitas visualisasi DNA.

#### 2. Pengamatan Data Molekular

Analisis data molekuler dilakukan berdasarkan hasil skoring pita DNA yang muncul pada *plate*. Pita DNA diberi skor berdasarkan penampilan pita DNA ditransformasikan ke dalam kode data biner dengan cara: jika ada pita diberi skor satu (1) dan tidak ada pita diberi skoring nol (0). Pita yang tidak sempurna dan tidak jelas diberi skor 9 (missing data). Jika ada galur yang menghasilkan banyak pita, maka pita yang paling jelas diberi skor '1' sedangkan yang lainnya diberi skor '9'. Data pada kolom menunjukkan inbrida sedangkan baris menunjukkan lokus SSRs.

#### 3. Analisis data

Analisis data molekuler dilakukan berdasarkan hasil skoring pita DNA yang muncul pada *plate*, hasil skoring dalam bentuk data biner. Tingkat polimorfisme (PIC = *Polimorphism Information Content*) dari primer yang digunakan dihitung untuk masing-masing marka SSRs (Smith *et al.* 1997), koefisien korelasi kofenitik ( $r$ ) dihitung dengan menggunakan program NTSYS 2.1.

Penggunaan *real-time* PCR dilakukan dengan membuat master mix terlebih dahulu kemudian diamplifikasi dengan memasukkan master mix tersebut ke dalam alat *real-time* PCR

### **3.3.6. Pengujian Mutasi Gen pada Kedelai dengan Real Time PCR**

Protokol 1: Synthesis of cDNA oleh Reverse Transcription

Protokol berikut ini menjelaskan sintesis cDNA dari RNA total dimurnikan dari sel atau jaringan-jaringan menggunakan fenol-guanidium teknik ekstraksi tiosianat-kloroform asam single-langkah (UNIT 5.2; Chomczynski dan Sacchi, 1987). Protokol Berikut ini adalah reaksi yang khas dirancang untuk mengkonversi 1 pg sampai 5 mg RNA total menjadi cDNA. Priming pertama sintesis reaksi untai cDNA dapat dicapai dengan menggunakan hexamers acak, oligo (dT), atau primer-gen tertentu. Oligo (dT) adalah metode yang disukai untuk protokol ini karena selektif hybridizes ke 3' poli (A) ekor ditemukan di hampir semua mRNA eukariotik. beberapa protokol panggilan untuk campuran hexamers acak dan Oligo (dT) meskipun protokol ini akan menggunakan oligo (dT) di metode untai amplifikasi pertama.

Protocol 2: Real-Time PCR Amplification and Analysis

Protokol berikut menjelaskan cara untuk melakukan real-time PCR menggunakan SYBR Green. Ada tiga protokol dukungan yang penting untuk analisis akurat dari hasil PCR (Dukungan Protokol 1-3). Ini termasuk metodologi untuk penentuan efisiensi amplifikasi (Dukungan Protokol 1), metode Pfaffl untuk kuantifikasi relatif urutan target (Dukungan Protokol 2), dan konstruksi kurva kalibrasi standar untuk kuantifikasi mutlak (Dukungan Protokol 3). Biasanya, real-time PCR kit memberikan SYBR Hijau dan polimerase pada konsentrasi ideal untuk amplifikasi efisien dan deteksi cDNA. The Quantitect SYBR Hijau PCR kit dijual oleh Qiagen adalah contoh dari salah satu kit yang dapat digunakan dalam berbagai real-time cyclers termal. Protokol yang diadaptasi dari disarankan protokol pabrik untuk Opticon DNA Mesin dan dapat digunakan dengan protokol cDNA yang dijelaskan di atas. Setiap urutan target, termasuk gen housekeeping, akan memiliki menetapkan sendiri primer dan dapat dirakit seperti yang dijelaskan di bawah ini. Prosedur ini akan mengambil ~ 30 sampai 60 menit untuk menyiapkan, sekitar 3 jam untuk menjalankan program PCR, dan tambahan 1 sampai 2 jam untuk menganalisis hasil, tergantung pada jumlah sampel dan kemudahan menggunakan perangkat lunak.

**Bahan**, PCR master mix:, 2× reaction mix, 50 µM forward primer, 50 µM reverse primer  
 RNase-free water, cDNA (Basic Protocol 1), 1.5-ml microcentrifuge tubes for preparing master mix  
 Pembuatan Master mix

Komponen	Volume
Air, PCR grade	9 µl
Primer PCR 10x	2 µl
Master mix	4 µl
DNA Template	5 µl
<b>Volume akhir</b>	<b>20 µl</b>

Volume master mix keseluruhan yang sudah ditambahkan template DNA adalah 20 µl. Bahan-bahan untuk membuat master mix tersebut dicampur dalam satu tabung kapiler. Bahan yang sudah dicampurkan kemudian disentrifus dan dimasukkan pada alat *real-time* PCR.

#### 1. Amplifikasi dengan Real Time

Tabung kapiler yang berisi master mix yang ditambahkan template DNA dimasukkan ke dalam *real-time* PCR yang telah diatur dengan protokol PCR tertentu, kemudian dilakukan *running* dengan *real-time* PCR.

Program	Model Analisis	Siklus	Segement	Suhu	Waktu	Fluorescenes Acquisition Mode
Pre-incubation	None	1	1	95°C	10 menit	None
Amplification	Qualification	45	Denaturation	95	10 detik	-
			Annealing	Tergantung dari primer	5-20 detik	-
			Extension	72	25 detik	Single
Melting Curve Analysis	Melting Curve	1	Denaturation	95	0 detik	-
			Annealing	65	15 detik	
			Melting	95	0 detik	Cont
Cooling	None	1	1	40	30 detik	-

### 3.3.7. Identifikasi Gen DREB (Drought responsive element binding protein) pada Mutan Kedelai

#### Polymerase Chain Reaction

Dalam penelitian ini digunakan dua pasang primer, yang pertama ialah degenerate primer yang didesain berdasarkan sekuens asam amino yang terkonservasi pada kedelai (*Glycine max*). Urutan primer tersebut adalah :

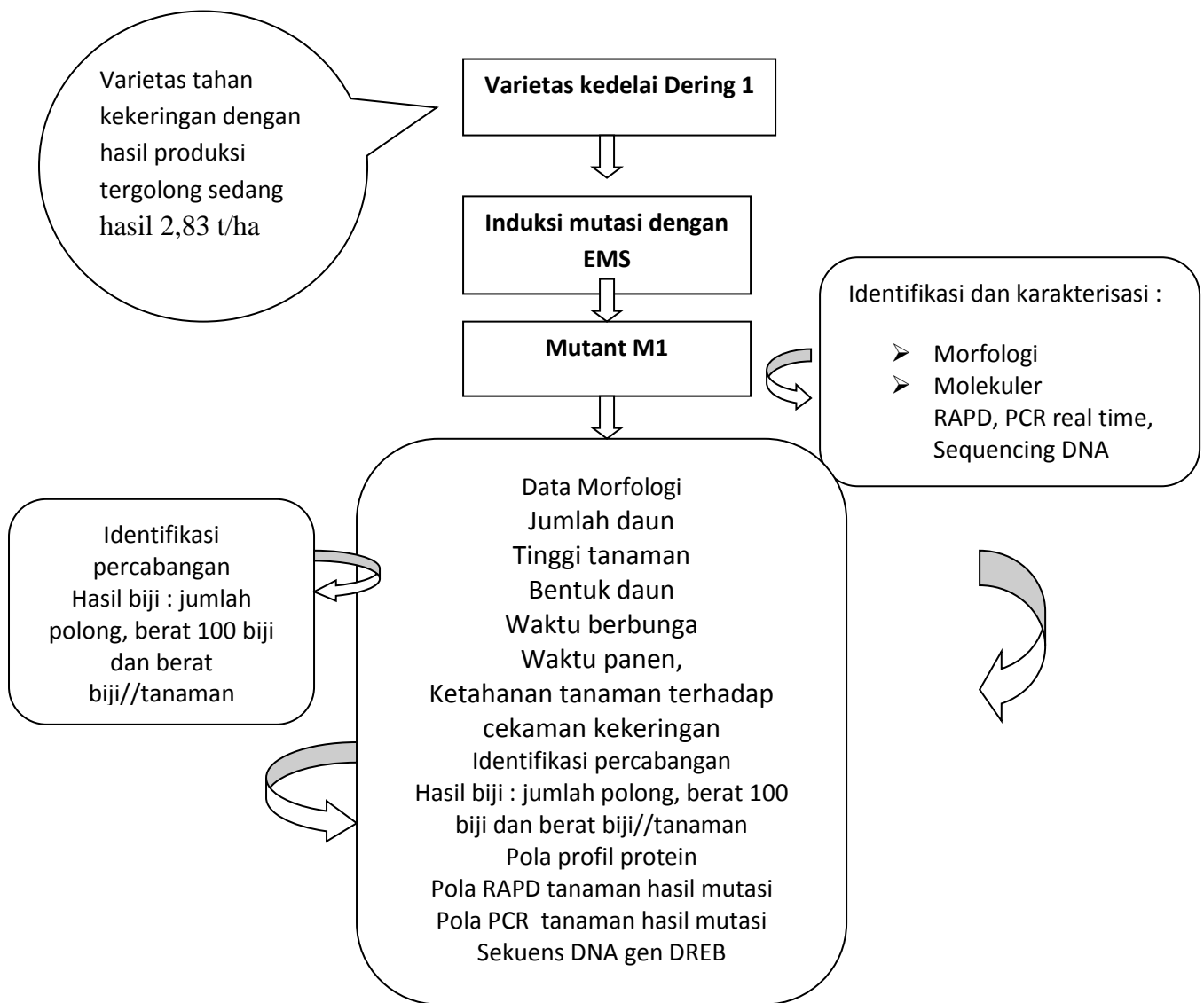
- Forward : 5'' – GGG GAA TTC ATG GAA GAA GCG GGT TTA – 3''
- Reverse : 5'' – GGG CTC ATC TTC AGG TTT GGG ATA– 3''

### **Sekuensing hasil PCR**

Hasil PCR dielektroforesis pada agarosa 0,8%, buffer TBE selanjutnya dilakukan ekstraksi DNA dari low melting agarose 0,7% DNA hasil ekstraksi diligasi pada plasmid pCR 21 kemudian ditransformasi pada E.coli strain XL-1 Blue dilanjutkan dengan cloning fragmen DNA hasil PCR tersebut. Sekuensing terhadap fragmen tersebut dilakukan dengan menggunakan prosedur Big Dye Terminator pada mesin Genetic Analyzer ABI PRISM® 3100-Avant.

### **Analisis Data**

Data hasil PCR dan sekuensing dianalisis secara deskriptif. Data hasil sekuens masing-masing sampel dilacak dan dikonfirmasi antara hasil sekuen forward dan reverse dengan menggunakan software Sequence Scanner v1 dan Bioedit, kemudian data disejajarkan dengan ClustalW menggunakan software Bioedit dan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang terdapat pada NCBI.



**Gambar 3.1. Kerangka operasional penelitian**

## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Data Morfologi Pengaruh Konsentrasi dan Lama Perendaman Dalam EMS (*Ethyl Methane Sulfonate*) Kedelai Varietas Dering-1

Varietas Dering 1 berasal dari persilangan tunggal antara varietas unggul lama Davros dengan MLG 2984 (genotipe toleran kekeringan). Melalui seleksi pedigri, dilakukan penggaluran hingga diperoleh galur harapan DV/2984-330. Seleksi toleransi kekeringan dilakukan pada generasi F4 – F5 hingga uji daya hasil pendahuluan (UDHP) pada MK II 2007 dan uji daya hasil lanjutan (UDHL) pada MK II 2008 di Kebun Percobaan (KP) Muneng dan KP Jambegede. Galur kedelai ditanam pada lingkungan yang tercekam kekeringan selama fase reproduktif (pengairan hanya dilakukan antara saat tanam sampai 50% berbunga). Pemilihan galur pada generasi F4 berdasarkan pada keragaan tanaman, jumlah polong, berat biji dan warna biji kuning. Pada generasi F5 pemilihan galur berdasarkan pada skor tingkat kelayuan (skor < 3 berdasarkan metode Del Rosario *et al.*, 1993) dan dilakukan pada saat tanaman berumur 50 dan 65 hari setelah tanam. Hasil skoring kelayuan tanaman pada seleksi F5 menunjukkan bahwa galur DV/2984-330 memiliki skor 1 (semua daun masih hijau dan segar). (Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi, 2012)..

Uji pertumbuhan tanaman kedelai dilakukan di rumah kaca pada musim kemarau dengan perlakuan kondisi cekaman yaitu 25% kapasitas lapang dan diperlakukan sepanjang hidup tanaman setelah fase perkecambahan. Pengamatan dilakukan pada masa vegetative aktif yaitu pada umur 30-60 hari setelah tanam

Pengaruh konsentrasi dan lama perendaman dalam EMS menunjukkan adanya pengaruh interaksi pada beberapa pengamatan karakter pertumbuhan pada varietas Dering ( $F_{hit} > F_{tab}$ ). (Lampiran ). Rata-rata persentase kecambah normal (%), panjang hipokotil, panjang akar dan berat kecambah disajikan pada Tabel 4.1.1

**4.1. Data morfologi pertumbuhan Varietas Dering-1 pada berbagai perlakuan konsentrasi dan lama perendaman dalam EMS**

<b>Perlakuan</b>	<b>Tinggi Tanaman (cm)</b>	<b>Jumlah Daun (helai)</b>	<b>Luas Daun (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Jumlah Cabang</b>	<b>Panjang Akar (cm)</b>
Kontrol	81.67 ab	12.67 abc	486,7 ab	5,67 bcd	25,99 abc
Konsentrasi 0,03% + 4 jam	<b>110.33 c</b>	<b>11.67 abc</b>	<b>406,7 ab</b>	<b>6,33 d</b>	25,24 ab
Konsentrasi 0,03% + 6 jam	91.67 abc	14,33 abc	353,3 ab	6,00 cd	26,75 abc
Konsentrasi 0,03% + 8 jam	75.33 ab	16.00 bc	270,0 a	4,67 ab	<b>31,88 bc</b>
Konsentrasi 0,05% + 4 jam	81.00 ab	11,67 bc	266,7 a	4,67 ab	26,27 abc
Konsentrasi 0,05% + 6 jam	83.33 ab	16,67 c	283,3 a	5,00 abc	27,21 abc
Konsentrasi 0,05% + 8 jam	77.33 ab	14,00 abc	243, 3 a	4,33 a	22,59
Konsentrasi 0,07% + 4 jam	83.00 ab	11.33 ab	333,3 ab	5,33 abcd	25,94 abc
Konsentrasi 0,07% + 6 jam	87.67 ab	13.33 abc	476,7 ab	<b>6,33 d</b>	28,66 abc
Konsentrasi 0,07% + 8 jam	73.33 a	11.33 ab	330,0 ab	5,00 abc	24,54 ab

Keterangan : angka angka pada kolom yang sama yang didampingi dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata

Pengaruh konsentrasi dan lama perendaman pada beberapa karakter pertumbuhan menunjukkan bahwa secara umum semakin tinggi konsentrasi EMS maka akan menurunkan karakter pertumbuhan. Perlakuan EMS menunjukkan pengaruh pada tinggi tanaman, perlakuan konsentrasi 0,03% dengan lama perendaman 4 jam menunjukkan tinggi tanaman yang lebih tinggi dibandingkan control. Pada pengamatan jumlah daun, luas daun, jumlah cabang perlakuan EMS pada konsentrasi 0,03% dengan lama perendaman 4 jam menunjukkan perlakuan yang tidak berbeda nyata dengan control. Peningkatan konsentrasi EMS menunjukkan kecenderungan penurunan parameter pertumbuhan. Mutagen EMS memiliki sifat acak dalam menimbulkan mutasi, sehingga perubahan yang muncul bisa bersifat menguntungkan ataupun merugikan.

.Perlakuan mutasi secara menggunakan EMS secara umum menunjukkan bahwa konsentrasi 0,03% dengan lama perendaman 4 jam menunjukkan perlakuan yang tidak berbeda nyata dengan control, pada parameter tinggi tanaman dan jumlah cabang lebih tinggi daripada control. Sifat penting dari karakter pertumbuhan yaitu jumlah cabang, karena parameter ini identik dengan jumlah bunga dan polong yang ada pada ketiak daun/cabang. Sedangkan parameter panjang akar menunjukkan salah satu indikasi ketahanan terhadap cekaman kekeringan karena panjang akar yang lebih panjang akan mampu beradaptasi pada kondisi kekeringan. Perlakuan mutasi yang terpilih untuk mutasi ialah perlakuan EMS dengan konsentrasi 0,03% selama 4 jam dan konsentrasi 0,07% selama 6 jam.

Menurut Harten (1998), pada sel yang aktif membelah diri pengaruh EMS dapat terjadi pada tahap sintesis DNA, , dan mitosis. Jika mutagen EMS mengenai sel pada tahap di mana kromatin DNA belum disintesis, maka sel mengalami duplikasi dan terjadi pemotongan kromosom, sedangkan pada tahap di mana kromatin DNA sudah disintesis, maka sebagian kromosom terpotong. Tahap sintesis DNA dan merupakan target untuk perlakuan mutagen, karena pada tahap ini sel mengalami penggandaan kromosom. Frekuensi mutasi pada pemuliaan umumnya meningkat dengan meningkatnya konsentrasi mutagen kimia, meskipun survival dan kemampuan eksplan untuk beregenerasi menurun (Bhagwat & Duncan 1998). Harten (1998) menyatakan konsentrasi rendah dapat menstimulasi perubahan fisiologi tanaman dan pada saat ini perlakuan dosis/konsentrasi rendah banyak digunakan untuk peningkatan perkecambahan dan peningkatan hasil tanaman.

Selain itu, pemberian EMS walau tidak nyata yang menunjukkan kecenderungan menghasilkan tanaman varian dengan sifat kuantitatif yang semakin menurun dibandingkan dengan populasi kontrol. Penurunan sifat kuantitatif tanaman diduga disebabkan oleh mutasi acak (*random mutation*) yang terjadi akibat perlakuan mutagen.. Meskipun tidak bersifat lethal, mutasi yang terjadi dapat menonaktifkan sejumlah gen yang mengendalikan sifat kualitatif maupun kuantitatif di dalam genom sel tanaman varian garut. (Nurmayulis, 2010)

Hasil menunjukkan dosis efek terkait perawatan mutagenik pada sifat kuantitatif. 20 sampai 25 rays Kr dosis dan 0,10-0,20% dosis EMS mungkin optimal untuk mendapatkan variasi maksimum dalam kualitatif serta sifat kuantitatif dalam populasi M2. Variasi dalam generasi M1, meskipun kurang penting mengingat memperoleh mutasi gen

yang stabil, sering dianggap sebagai indikator dalam mengukur efisiensi perawatan mutagen (Plesnik, 1993).

Analisis M2 dan M3 galur kedelai disebabkan oleh fisik dan mutagen kimia (Borejko, 1970; Lee *et al*, 1968;. Raut *et al*, 1982;. Patil *et al*, 1985;. Bohmova *et al*, 1999). Studi ini telah dimulai untuk mendorong variabilitas untuk sifat kuantitatif dengan memberikan fisik (rays), kimia (EMS) dan pengobatan mutagenik dikombinasikan dengan dosis yang berbeda pada kedelai [*Glycine max* (L.) Merrill].

Para peneliti telah mengembangkan sumber daya mutan nasional untuk genomik fungsional beras melalui EMS mutagenesis dari genotipe padi gogo Nagina22. Sejumlah mutan berguna telah diidentifikasi untuk berbagai sifat seperti Fosfor efisiensi penggunaan toleransi terhadap kekeringan, salinitas, semprot herbisida dan resistensi terhadap bakteri hawar daun. Sumber daya ini diharapkan untuk melayani sebagai dasar untuk menemukan gen yang berguna, alel dan mengungkap genomik fungsional tanaman model ini. (Mohapatra, 2014).

Perbedaan potensial air di dalam sel dan di luar sel dapat menghambat perkecambahan benih karena adanya hambatan penyerapan air. Loveless (1991) menegaskan bahwa semakin besar konsentrasi partikel atau zat, makin rendah nilai potensial air. Meningkatnya potensial osmotik, EMS akan menurunkan potensial air sehingga akan menyulitkan benih mendapatkan air. Konsentrasi EMS yang lebih tinggi dapat menurunkan potensial air di luar benih dan oleh karena itu benih tidak dapat melakukan imbibisi air yang cukup untuk perkecambahan (Singh dan Kole, 2005). Jayakumar dan Selvaraj (2003) menyatakan bahwa tingginya konsentrasi EMS dapat menghancurkan promotor pertumbuhan, meningkatkan penghambat pertumbuhan dan metabolisme benih, dan menyebabkan berbagai penyimpangan kromosom. EMS merupakan senyawa yang beracun, sehingga menghambat pertumbuhan, tetapi akhirnya benih dapat beradaptasi dan mampu muncul ke permukaan tanah. Hasil yang sama diperoleh dari penelitian Pharmawati *et al.*, (2013) pada cabai besar dimana EMS 1% dengan lama perendaman 6 jam menghambat perkecambahan dan hanya mencapai tingkat perkecambahan  $96 \pm 4.4\%$  pada 10 HSS.

Pemuliaan mutasi telah menjadi alternatif untuk pemuliaan konvensional dan itu digunakan untuk perbaikan tanaman dari sifat tradisional misalnya, hasil, ketahanan terhadap penyakit dan hama, tetapi lebih sering untuk keperluan diversifikasi akhir

tanaman - produk, meningkatkan kualitas dan nilai gizi dan toleransi untuk cekaman biotik (Savant, 2011). Umumnya, EMS (*Ethyl Methane Sulfonat*) adalah mutagenik, senyawa organik karsinogenik kuat. Ini menghasilkan mutasi acak dalam bahan genetik oleh substitusi nukleotida, terutama oleh guanine alkilasi dan diproduksi hanya mutasi titik (Okagaki *et al.*, 1991).

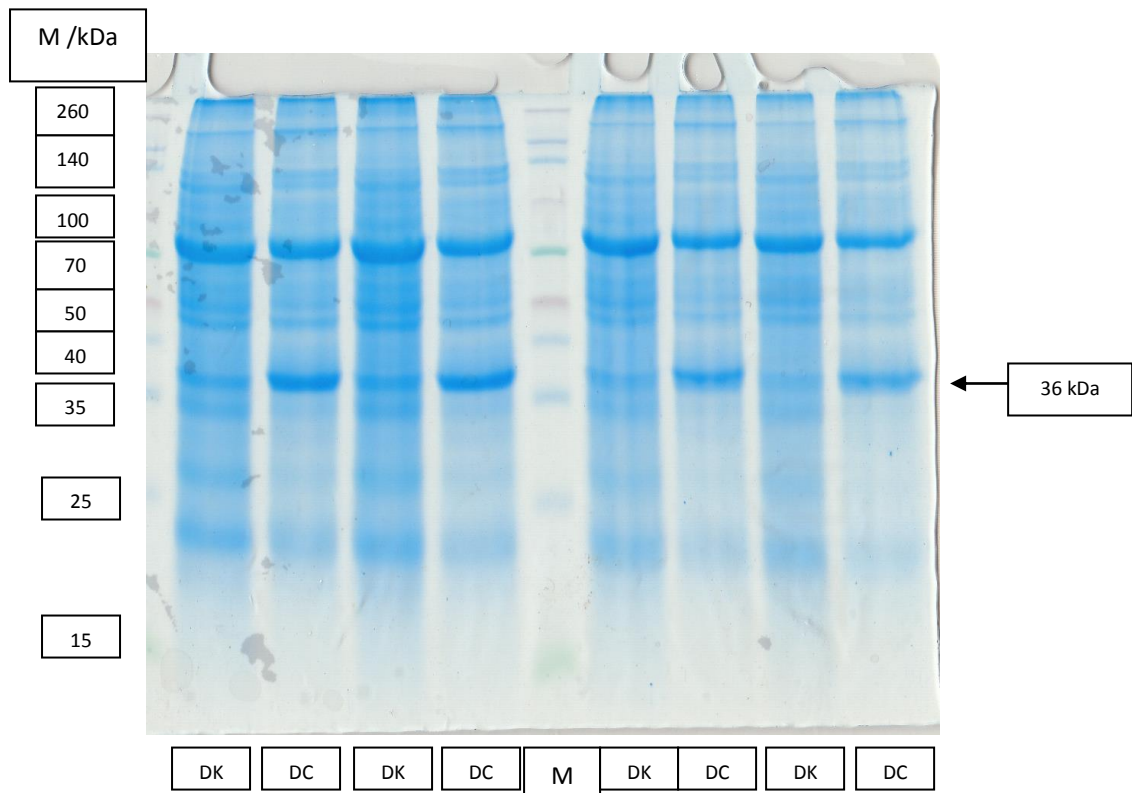
Penyelidikan ini mengungkapkan bahwa persentase perkecambahan biji menurun secara progresif sebagai konsentrasi perlakuan kimia yang meningkat. Penurunan maksimum diamati pada konsentrasi yang lebih tinggi dan nilai LD50 diamati pada 1,0% dari EMS dan 0,6% dari colchicine. Dalam studi lapangan, pengurangan yang signifikan diamati di semua sifat kuantitatif bila dibandingkan dengan kontrol (Anbarasan, 2014).

Pada varietas yang toleran kekeringan diduga lebih mampu mempertahankan fungsi fisiologisnya pada kondisi kekeringan dibandingkan varietas yang moderat dan peka kekeringan. Proses fisiologis ini akan berpengaruh pada karakter morfologi tanaman. Pada kondisi cekaman kekeringan umumnya tanaman akan mengalami hambatan pertumbuhan yang lebih besar pada bagian tajuk dan lebih banyak biomassa yang diarahkan ke bagian perakaran. Banyaknya biomassa yang diarahkan ke bagian perakaran akan berbeda antara varietas yang toleran dengan peka kekeringan. Pada varietas yang toleran diduga berhasil mempertahankan fungsi fisiologisnya sampai akumulasi dan pembagiannya untuk mempertahankan perakaran dibandingkan varietas yang peka. Hubungan karakter morfologi perakaran ini merupakan hubungan timbal balik dengan karakter fisiologis yaitu fotosintesis, dimana sistem perakaran yang luas dan ekstensif menyebabkan pengambilan air dan unsur hara yang lebih besar dan akan berpengaruh pada proses fotosintesis dan pembentukan biomassa.

Cekaman kekeringan menyebabkan rangkaian perubahan biokimia molekuler, fisiologi dan morfologi tanaman. Perubahan biokimia yang terjadi antara lain, misalnya akumulasi osmolit dan protein spesifik yang terlibat dalam toleransi cekaman (Shinozaki & Shinozaki., 2007). Penelitian lanjutan untuk mengetahui mekanisme ketahanan tanaman pada kondisi cekaman kekeringan ialah perubahan molekuler meliputi profil protein dan gen yang terlibat dalam toleransi cekaman kekeringan.

#### 4.2. Profil Protein Kedelai Varietas Dering-1 pada Kondisi Cekaman Kekeringan

Hasil elektroforesis protein pada umur pengamatan 35 hst pada varietas Dering 1 pada kondisi kontrol dan cekaman disajikan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1. Profil pita protein varietas Dering pada kondisi cekaman kekeringan

Profil pita protein pada varietas Dering 1 pada pengamatan 35 hst menunjukkan ada perbedaan antara kondisi kontrol dan kondisi cekaman kekeringan. Pada kondisi kontrol terdapat 12 pita protein dengan berat molekul 15- 250 kDa. Pada kondisi cekaman kekeringan teramati lebih tebalnya pita protein yaitu pada berat 36 kDa. Nguyen dan Joshi (1992), pada kondisi cekaman lingkungan selain terjadi penurunan sintesis protein juga terjadi sintesis protein baru. Terdapat ratusan protein yang diinduksi oleh cekaman lingkungan sebagai respon ketahanan tanaman terhadap cekaman, akan tetapi mekanisme ketahanan tanaman dengan disintesisnya protein baru ini belum diketahui.

Profil protein daun dengan elektroforesis SDS-PAGE dilakukan pada hari ke 45 dan 65 hst. Hasil elektroforesis pada pengamatan 45 hst berbeda dengan hasil elektroforesis pada pengamatan 65 hst. Pada pengamatan 65 hst menunjukkan adanya protein baru yang terinduksi khususnya pada varietas-varietas yang toleran kekeringan. Perlakuan cekaman kekeringan dalam penelitian ini dimulai awal vegetatif aktif sampai pada pengisian biji. Perlakuan cekaman kekeringan yang dilakukan berdasarkan pada penelitian Haryati *et al.*, (2001), tentang pola pita protein kedelai pada kondisi kekurangan air, perlakuan cekaman dimulai 30 hari setelah tanam. Dari hasil penelitian disarankan bahwa untuk memastikan kestabilan munculnya pita protein baru maka perlu pemanjangan periode cekaman

Protein ialah senyawa dasar yang penting untuk semua fungsi sel (Dose, 1980). Telah diketahui bahwa perubahan ekspresi gen selalu terlibat dalam ketahanan tanaman menghadapi cekaman. Variasi protein ialah bagian penting respon tanaman pada kondisi cekaman lingkungan dan untuk adaptasi pada kondisi lingkungan tertentu (Viestra, 1993; Hieng, 2004). Pada kondisi cekaman kekeringan sejumlah proses mengalami perubahan, termasuk cekaman kekeringan memberikan pengaruh tingkat protein pada tanaman. Beberapa peneliti menunjukkan bahwa kandungan protein menurun pada kondisi cekaman kekeringan (Pierre & Savoure, 1990; Roy-Macauley *et al.*, 1992), penelitian yang lain menunjukkan peningkatan kadar protein pada kondisi cekaman kekeringan (Singh & Rai, 1992).

Perubahan ekspresi protein, akumulasi dan sintesisnya telah diamati pada beberapa spesies tanaman pada kondisi cekaman kekeringan selama pertumbuhan (Chen *et al.*, 1992 & Cheng *et al.*, 1993). Perubahan protein yang terjadi baik secara kualitatif dan kuantitatif terdeteksi selama cekaman kekeringan (Riccardi *et al.*, 1998), hasil pengamatan cekaman kekeringan meningkatkan ekspresi sejumlah 50 protein, penurunan 23 protein dan induksi 10 protein yang terdeteksi dengan gel elektroforesis 2 dimensi.

Hasil elektroforesis protein pada protein biji tidak menunjukkan adanya perbedaan antara profil protein pada kondisi kontrol dibandingkan pada kondisi cekaman. Tetapi konsentrasi protein total pada kondisi cekaman lebih tinggi jika dibandingkan pada kondisi control. Hal ini bertentangan dengan penelitian (Gumilevskaya *et al.*, 1993; Riley, 1991) yang menyatakan terjadi penurunan yang nyata dari kandungan total protein pada kondisi cekaman pada biji. Hal ini terjadi karena penundaan mobilitas protein cadangan pada biji

jagung dan kacang, dan disebabkan oleh cekaman yang menghambat ekspresi, transkripsi gen dan translasinya (Vorob'eva, 2004).

Marian *et al.*, 2003, mengamati pada spesies *Rhododendron* sejumlah protein dehidrin dengan berat molekul antara 25 - 73 kDa, hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yaitu pada tanaman *blueberry* dan gandum (Arora *et al.*, 1997; Danyluk *et al.*, 1993). Bayoumi *et al.*, (2002), menguji pengaruh PEG pada pola protein genotipe gandum, menemukan adanya induksi protein baru pada berat molekul 40 kDa pada kultivar Refum-5 pada kondisi cekaman kekeringan yang berat. Sehingga pita protein pada berat molekul 40 kDa tersebut dapat digunakan sebagai marka molekuler untuk mengkarakterisasi toleransi ketahanan tanaman pada kekeringan.

Mohammadkhani & Heidari (2008), mempelajari efek cekaman kekeringan pada protein terlarut pada dua varietas jagung, induksi cekaman kekeringan menggunakan PEG 6000. Total kandungan protein terlarut ditentukan dengan gel elektroforesis SDS-PAGE, penurunan potensial air menyebabkan protein terlarut mengalami peningkatan, tetapi kemudian mengalami penurunan pada akar dan daun kedua varietas. Pada kondisi potensial air -1,76 MPa akumulasi *protein like dehydrin* pada berat molekul 38, 50, 57, dan 65 kDa dari organ akar dan pada organ daun ditemukan protein dengan berat molekul 15, 17, 20, 27, 10, 37, 54 dan 59 kDa mengalami peningkatan. Ekspresi 15, 19 dan 27 kDa protein akar dan 22 kDa protein daun terinduksi pada kedua varietas. Akumulasi *dehydrin like-protein* pada akar dan daun kultivar 704 lebih tinggi daripada kultivar 301, hasil penelitian tidak ada hubungan antara perbedaan protein dengan toleransi cekaman kekeringan.

Samarah & Mullen, (2006), melakukan percobaan di rumah kaca untuk mempelajari akumulasi total protein terlarut, protein *heat stable* dan *dehydrin-like protein* pada biji. Perlakuan meliputi cekaman kekeringan berat, pengairan cukup dan cekaman kekeringan secara bertahap. Analisis Westernblotting menunjukkan bahwa dehidrin-like protein terakumulasi pada biji yang besar dan biji kecil pada semua perlakuan baik pada kondisi cukup air maupun cekaman kekeringan. Samarah *et al.*, (2006), mempelajari akumulasi *dehydrin-like protein* dalam perkembangan biji kedelai sebagai respon pada cekaman kekeringan. Hasil penelitian di rumah kaca. menunjukkan *dehydrin-like protein* pada berat molekul 28 kDa dan 32 kDa terdeteksi pada perkembangan biji pada tanaman yang mengalami cekaman kekeringan tetapi tidak ditemukan pada tanaman dengan pengairan yang cukup. Pada penelitian di lapang, *dehydrin like protein* terakumulasi baik

pada kondisi kecukupan air dan kondisi tanpa pengairan. Perbedaan ekspresi protein *heat stable* dan *dehydrin-like protein* pada biji antara percobaan rumah kaca dan percobaan lapang kemungkinan disebabkan perbedaan tingkat cekaman dan tahap perkembangan organ pada saat pengambilan sampel.

Mohammadkhani & Heidari (2008), akumulasi *dehydrin-like protein* terdeteksi dengan SDS-PAGE, dimana terjadi peningkatan pada protein akar dan daun pada kedua varietas jagung yang diuji, tetapi beberapa protein tidak terdeteksi pada kondisi cekaman berat. Hal ini berarti pada cekaman kekeringan meningkatkan beberapa protein dan menurunkan protein yang lain. Pada kondisi potensial air -1,03 dan -1,76 MPa, protein dengan berat molekul 38, 50, 57 dan 65 kDa meningkat secara signifikan dibandingkan dengan kontrol. Pada potensial air -1,76 MPa akumulasi protein dengan berat molekul 20 kDa meningkat pada kedua varietas yang diuji. Hasil ini mengindikasikan bahwa akumulasi *protein like-dehydrin* terinduksi pada kondisi cekaman kekeringan. Pada potensial air -1,76 MPa, protein daun dengan berat molekul 69 kDa menunjukkan penurunan pada semua varietas, protein dengan berat molekul 83 dan 115 kDa protein daun mengalami penurunan pada kultivar 704 tetapi tidak ditemukan pada kultivar 301. Pada kondisi cekaman air yang berat (potensial air -1,76 MPa), akumulasi protein dengan berat molekul 205 kDa mengalami penurunan.

Penelitian pada kelapa sawit menunjukkan hasil yang serupa yaitu pada genotipe yang toleran terjadi induksi protein baru sekitar 60 kDa dengan konsentrasi yang sangat tinggi setelah tanaman dicekam kekeringan, sedangkan pada tanaman kontrol protein tersebut tidak ditemukan (Mathius *et al.*, 2001). Umumnya ditemukan adanya peningkatan akumulasi protein dengan bobot molekul rendah apabila tanaman mengalami cekaman kekeringan (Sabehat *et al.*, 1998; dan Pelah *et al.*, 1997), namun secara umum protein total mengalami penurunan.

Mathius *et al.*, (2001) meneliti pada kelapa sawit hibrida berpotensi toleran memberikan respon terhadap cekaman kekeringan dengan menginduksi protein baru pI 4,7-36 kDa, pI 5,3-34 kDa, pI 4,6-32 kDa dan pI 5,3-36 kDa, sedangkan pada hibrida yang peka tidak ditemukan adanya induksi protein baru. Widyasari *et al.*, (2004), melakukan isolasi dan karakterisasi gen yang responsif terhadap cekaman kekeringan pada tebu varietas M 442-51 yang merupakan varietas toleran cekaman kekeringan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nampak protein yang spesifik yaitu protein dengan berat molekul 22 kDa dan titik isoelektrik 6,0 terakumulasi pada saat tebu mengalami cekaman kekeringan.

Hasil karakterisasi protein pada beberapa varietas kedelai ini bisa digunakan sebagai marka molekuler dalam studi variasi genetik dan klasifikasi untuk sifat ketahanan kekeringan pada tanaman kedelai. Sintesis protein baru kemungkinan menunjukkan cekaman kekeringan menginduksi gen yang terkait toleransi cekaman untuk memproduksi induksi protein ketahanan kekeringan.

Penelitian ini berupaya untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi protein pada suatu spesies dan interaksinya dengan lingkungan. Protein-protein yang dihasilkan tanaman pada kondisi cekaman kekeringan kemudian dianalisis dan dikarakterisasi. Pendekatan ini memungkinkan untuk diketahuinya protein-protein yang bertanggung jawab pada kondisi cekaman, pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Usaha untuk memperbaiki sifat ketahanan tanaman terhadap cekaman kekeringan ini ialah dengan mempelajari fungsi dari protein yang terlibat dalam mekanisme pertahanan terhadap cekaman tersebut. Protein-protein tersebut dihasilkan dari ekspresi gen yang diinduksi oleh cekaman lingkungan. Beberapa protein memiliki fungsi sebagai pengantar sinyal dari permukaan sel tanaman ke dalam sel, enzim yang berperan dalam biosintesis molekul-molekul yang berpengaruh dalam mekanisme pertahanan (seperti prolin, beberapa jenis karbohidrat serta poliamin), atau faktor transkripsi yang mengaktifkan ekspresi dari gen-gen yang berperan dalam mekanisme pertahanan tanaman terhadap cekaman tersebut.

#### **4.3. Ekspresi Gen *DREB* pada kedelai hasil induksi mutasi dengan EMS (*Ethyl Methane Sulfonate*) dengan metode PCR real time**

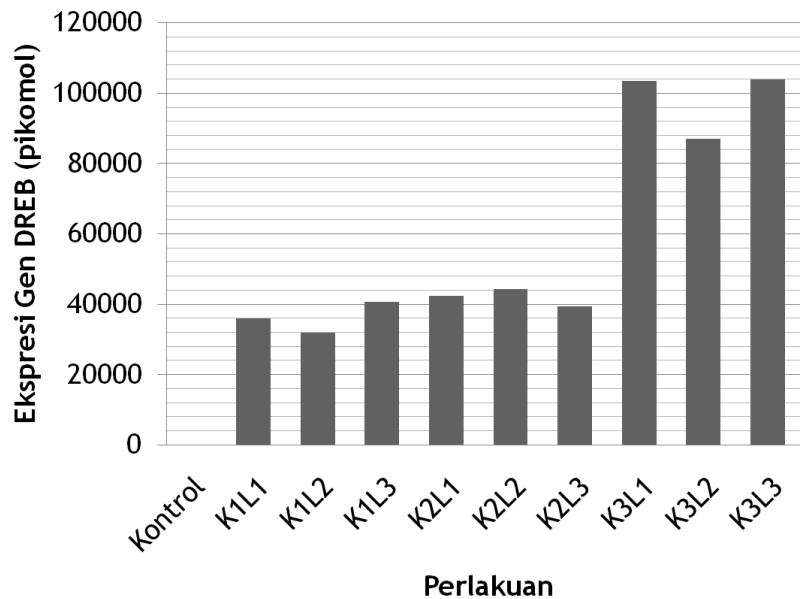
Real time-PCR merupakan metode untuk kuantifikasi ekspresi gen. Kuantifikasi tingkat ekspresi gen dapat dinilai tentang fungsi gen. Sebagai contoh pengukuran ekspresi gen dapat diidentifikasi tipe sel atau jaringan dimana gen terekspresi. Ekspresi gen pada tingkat individu ekspresi gen pada tingkat biologi tertentu sebagai contoh perkembangan penyakit, perkembangan dan deteksi perubahan ekspresi gen sebagai respon pada stimulus biologi spesifik (zat pengatur tumbuh). Penggunaan real-time PCR memiliki beberapa keuntungan dibanding metode lain termasuk membutuhkan sejumlah kecil sampel untuk analisis, kemampuan untuk mereproduksi data yang akurat, dan kapasitas untuk menganalisa lebih dari satu gen pada waktu yang sama. (Fraga, *et al.*, 2004).

Isolasi RNA dilakukan pada umur tanaman 35 hst pada daun tanaman yang diperlakukan dengan berbagai konsentrasi mutagen dan pada kondisi tanam yang berbeda yaitu kondisi kecukupan air dan kekeringan. Berikut adalah tabel hasil isolasi RNA.

**Tabel 4.2. Data konsentrasi RNA total Varietas Dering-1 pada berbagai perlakuan konsentrasi dan lama perendaman dalam EMS**

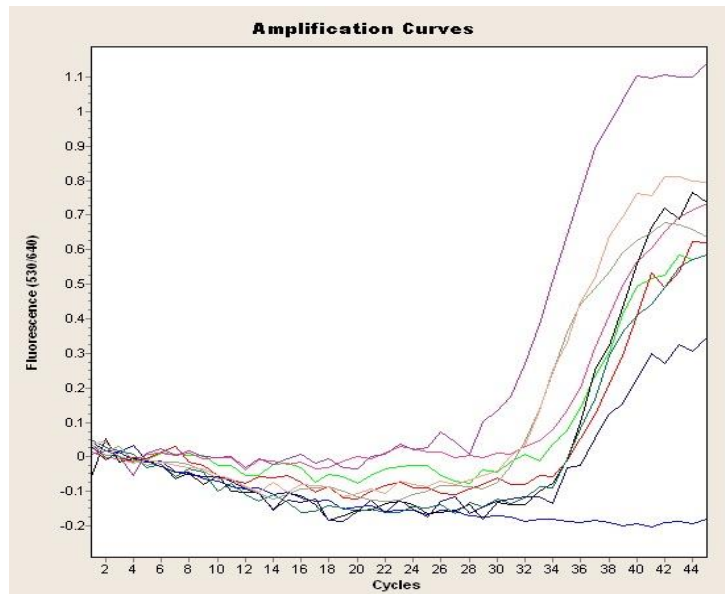
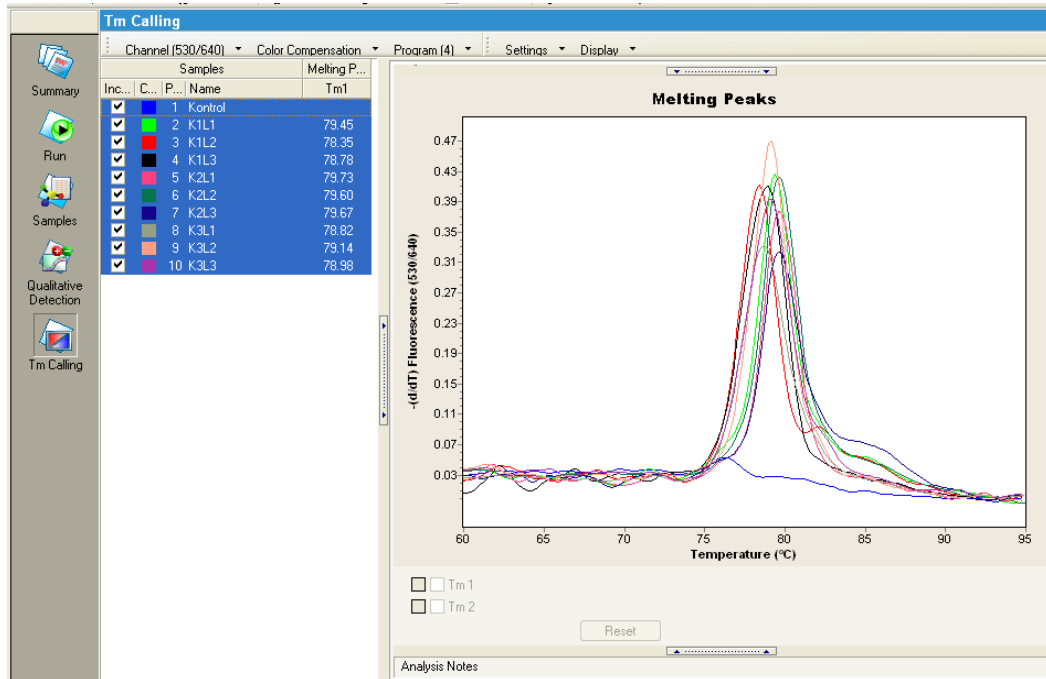
Perlakuan	Konsentrasi (ng/ $\mu$ L)	A260	A280	260/280	260/230
Kontrol	180,03	3,606	2,437	1,47	0,43
Konsentrasi 0,03% + 4 jam	5,3	11,107	7,28	1,2	0,72
Konsentrasi 0,03% + 6 jam	1509,06	30,192	19,56	1,54	0,97
Konsentrasi 0,03% + 8 jam	588,1	11,76	7,15	1,64	0,98
Konsentrasi 0,05% + 4 jam	1260,0	25,201	14,269	1,77	1,20
Konsentrasi 0,05% + 6 jam	757,7	15,154	9,656	1,7	0,71
Konsentrasi 0,05% + 8 jam	1001,2	20,024	12,376	1,62	0,93
Konsentrasi 0,07% + 4 jam	561,5	11,230	6,665	1,68	1,11
Konsentrasi 0,07% + 6 jam	662,9	13,258	7,249	1,83	0,86
Konsentrasi 0,07% + 8 jam	695,9	13,918	7,84	1,77	0,82

Ekspresi Gen *DREB* pada kedelai hasil induksi mutasi dengan EMS (*Ethyl Methane Sulfonate*) dengan metode PCR real time secara kuantitatif disajikan pada gambar 4.2. dan secara kualitatif ditunjukkan pada gambar 4.3 – 4.9



**Gambar 4.2.** Ekspresi gen *DREB* (pikomol) pada perlakuan induksi mutasi EMS dengan metode PCR-real time. Keterangan K1L1 =konsentrasi 0,03% +4 jam, K1L2 : konsentrasi 0,03% +6 jam, K1L3 : konsentrasi 0,03% +8 jam, K2L1 : konsentrasi 0,05% +4 jam, K2L2 : konsentrasi 0,05% +6 jam, K2L3 : konsentrasi 0,05% +8 jam, K3L1 : konsentrasi 0,07% +4 jam, K3L2 : konsentrasi 0,07% +6 jam, K3L3 : konsentrasi 0,07% +8 jam

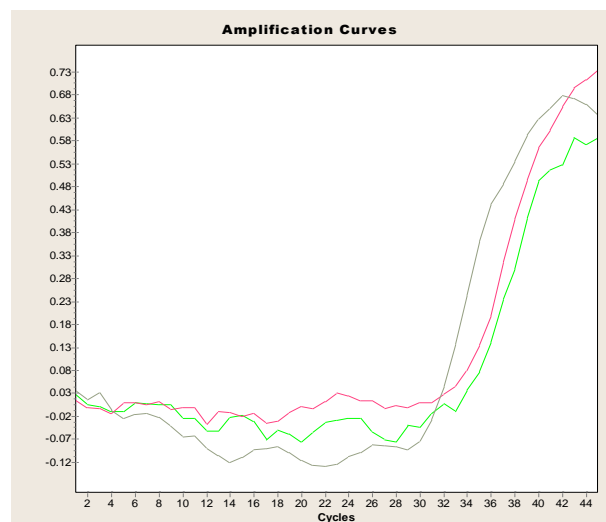
Ekspresi gen *DREB* (*drought responsive binding protein*) yang terukur secara kuantitatif menunjukkan bahwa perlakuan mutasi pada konsentrasi 0,07% ekspresi gen lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain.



**Gambar 4.3. Ekspresi gen DREB pada berbagai perlakuan induksi mutasi menggunakan PCR real time**

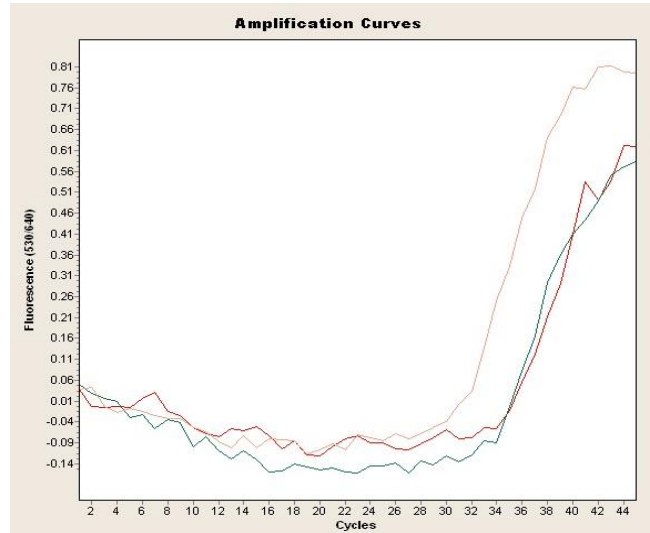
Pada PCR-real time sejumlah produk terbentuk dan dimonitor oleh reaksi monitoring oleh probe fluorescence dan sejumlah siklus amplifikasi dibutuhkan untuk mendapatkan molekul DNA spesifik . Hal ini memungkinkan untuk menghitung sejumlah molekul DNA yang teramplifikasi pada sampel. Penggunaan real time PCR termasuk deteksi pathogen, analisis ekspresi gen, SNP (*single nucleotide polymorphism*) dan juga deteksi protein (Kubista *et al.*, 2006).

Pada gambar 4.3. menunjukkan grafik ekspresi gen beberapa perlakuan mutagen dengan melihat pada fase eskponensial yang ditunjukkan grafik mulai meningkat pada siklus tertentu. Pada perlakuan konsentrasi 0,07% selama 4 jam menunjukkan ekspresi gen yang tertinggi ditunjukkan pada siklus ke 28 grafik telah meningkat dan masuk fase eksponensial. Begitu juga puncak grafik tertinggi didapatkan pada perlakuan EMS konsentrasi 0,07% selama 4 jam. Sedangkan pada perlakuan control ekspresi gen *DREB* negative dan tidak membentuk puncak. Hal ini dikarenakan pada kondisi control tidak ada perlakuan induksi mutasi dan tidak ada perlakuan cekaman kekeringan, sehingga diduga tidak ada ekpresi gen *DREB* yang berhasil diamplifikasi.



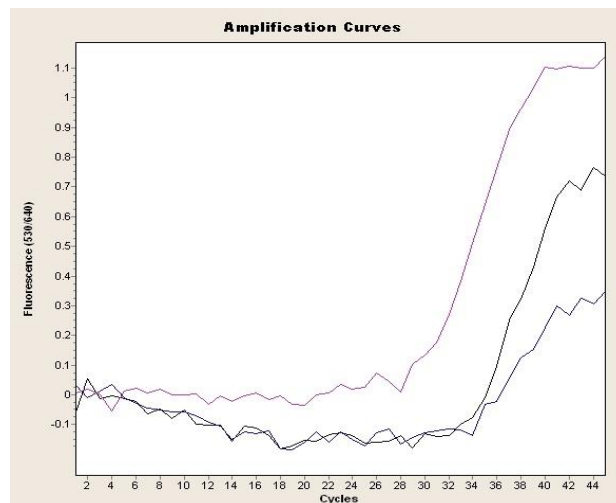
**Gambar 4.4. Ekspresi gen DREB pada lama perendaman 4 jam pada berbagai konsentrasi EMS (*Ethyl methane sulfonate*) menggunakan PCR real time**

Pada gambar 4.4. ekspresi gen DREB pada berbagai perlakuan mutagen EMS dengan lama perendaman 4 jam pada berbagai konsentrasi yaitu 0,03%, 0,05% dan 0,07%. Dari grafik menunjukkan bahwa perlakuan mutagen EMS memiliki puncak tertinggi pada konsentrasi 0,03%. Hasil ini mendukung pengamatan karakter morfologi yang menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi 0,03% tidak berbeda dengan control dan pada parameter cabang menunjukkan lebih tinggi dari kontrol



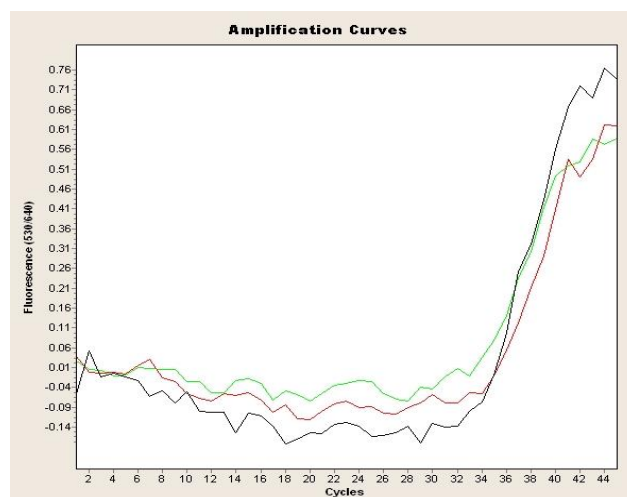
**Gambar 4.5. Ekspresi gen DREB pada lama perendaman 6 jam pada berbagai konsentrasi dalam EMS (*Ethyl methane sulfonate*) menggunakan PCR real time**

Pada gambar 4.5. menunjukkan perbandingan berbagai konsentrasi pada lama perendaman 6 jam. Dari hasil pengamatan menunjukkan bahwa puncak tertinggi ialah pada perlakuan mutagen dengan konsentrasi 0,07%, sehingga dugaan sementara bahwa perlakuan ini yang terbaik karena dari berbagai perlakuan dan didukung dengan pengamatan morfologi perlakuan ini yang menunjukkan jumlah cabang yang sama dengan perlakuan EMS pada konsentrasi 0,03%.

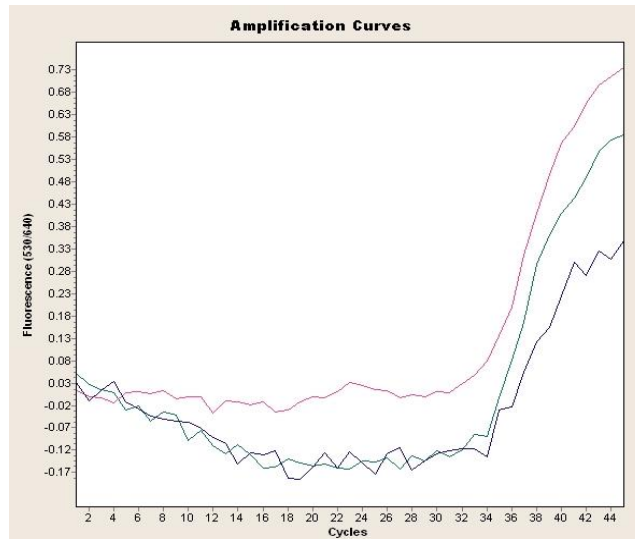


**Gambar 4.6. Ekspresi gen DREB pada lama perendaman 8 jam pada berbagai konsentrasi dalam EMS (*Ethyl methane sulfonate*) menggunakan PCR real time**

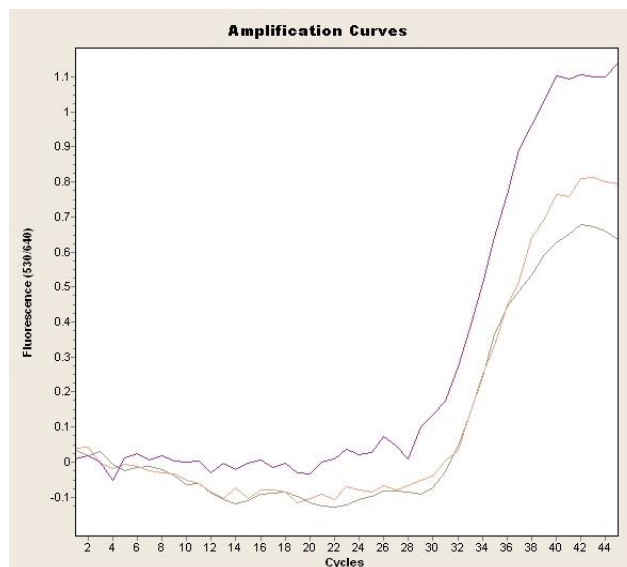
Pada gambar 4.6. menunjukkan perbandingan berbagai konsentrasi pada lama perendaman 6 jam. Dari hasil pengamatan menunjukkan bahwa puncak tertinggi ialah pada perlakuan mutagen dengan konsentrasi 0,07%, sehingga dugaan sementara bahwa perlakuan ini yang terbaik karena dari berbagai perlakuan dan didukung dengan pengamatan morfologi perlakuan ini yang menunjukkan jumlah cabang yang sama dengan perlakuan EMS pada konsentrasi 0,03%.



**Gambar 4.7. Ekspresi gen DREB perlakuan konsentrasi EMS (*Ethyl methane sulfonate*) 0,03% pada berbagai lama perendaman menggunakan PCR real time**



**Gambar 4.8.** Ekspresi gen DREB perlakuan konsentrasi EMS (*Ethyl methane sulfonate*) 0,05% pada berbagai lama perendaman menggunakan PCR real time



**Gambar 4.9.** Ekspresi gen DREB perlakuan konsentrasi EMS (*Ethyl methane sulfonate*) 0,07% pada berbagai lama perendaman menggunakan PCR real time

Ketahanan kekeringan ialah sifat yang dikendalikan oleh banyak gen (poligenik). Luasnya respon tanaman terhadap cekaman kekeringan memperlihatkan bahwa toleransi terhadap cekaman kekeringan dikendalikan secara poligenik dan tereskpresi secara fenotipik melalui adaptasi morfologis dan fisik. Berbagai respon tanaman terhadap

cekaman kekeringan seringkali kontradiktif, sulit diintegrasikan dan tidak praktis untuk program pemuliaan tanaman. (Gupta, 2007). Program perbaikan varietas tahan kekeringan perlu mendapatkan perhatian besar karena karakter tersebut disandi oleh suatu kompleks gen yang terlibat dalam jejaring lintasan biokimia tanaman (Bohnert and Jensen, 1996; Ingram and Bartels, 1996).

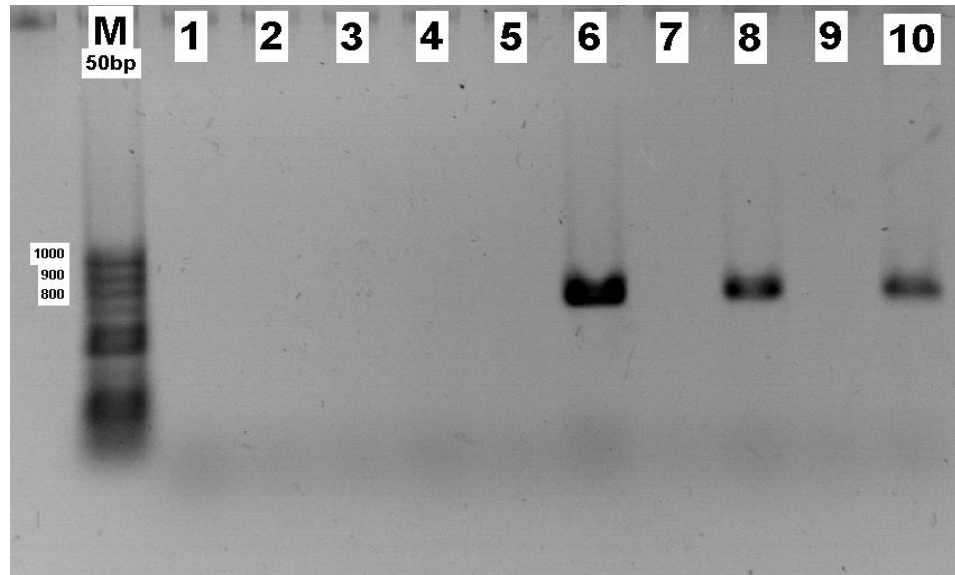
#### 4.4. Identifikasi Gen *DREB* pada kedelai hasil induksi mutasi dengan EMS (*Ethyl Methane Sulfonate*) dengan metode PCR

Identifikasi gen *DREB* dilakukan melalui isolasi DNA daun tanaman kedelai pada berbagai perlakuan mutagen. Hasil isolasi dan amplifikasi DNA disajikan pada gambar berikut.

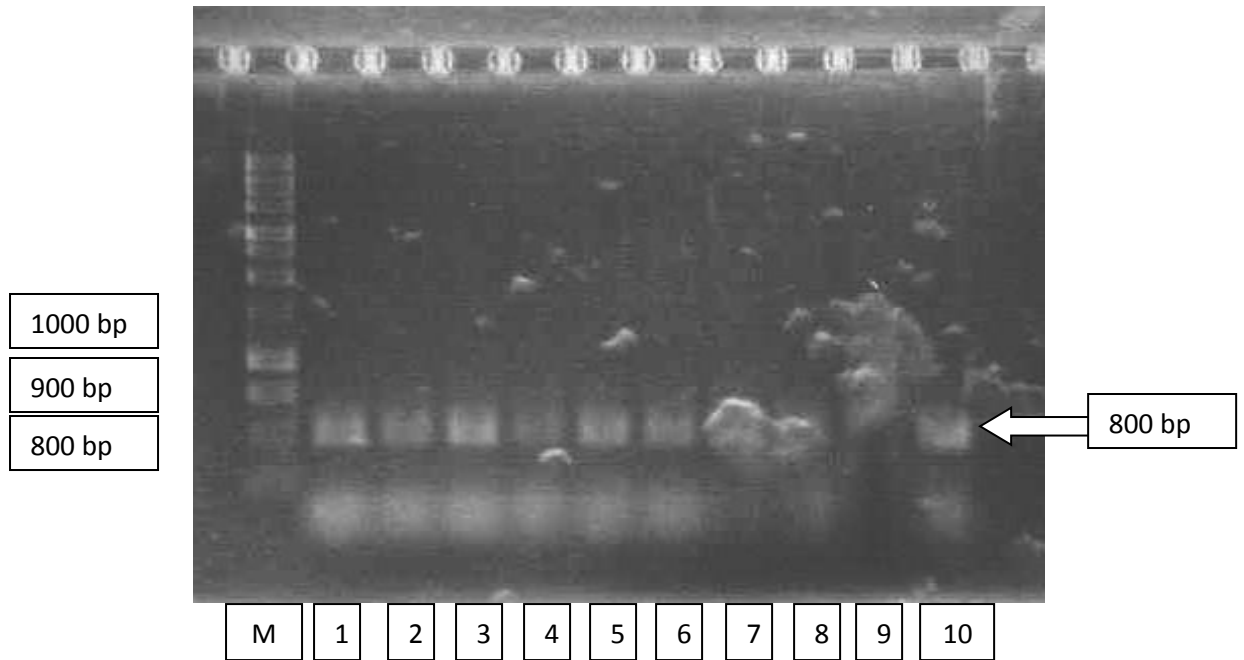
**Tabel 4.2. Data konsentrasi DNA total Varietas Dering-1 pada berbagai perlakuan konsentrasi dan lama perendaman dalam EMS**

Perlakuan	Konsentrasi (ng/ $\mu$ L)	A260	A280	260/280	260/230
Kontrol	180,03	3,606	2,437	1,47	0,43
Konsentrasi 0,03% + 4 jam	5,3	11,107	7,28	1,2	0,72
Konsentrasi 0,03% + 6 jam	1509,06	30,192	19,56	1,54	0,97
Konsentrasi 0,03% + 8 jam	588,1	11,76	7,15	1,64	0,98
Konsentrasi 0,05% + 4 jam	1260,0	25,201	14,269	1,77	1,20
Konsentrasi 0,05% + 6 jam	757,7	15,154	9,656	1,7	0,71
Konsentrasi 0,05% + 8 jam	1001,2	20,024	12,376	1,62	0,93
Konsentrasi 0,07% + 4 jam	561,5	11,230	6,665	1,68	1,11
Konsentrasi 0,07% + 6 jam	662,9	13,258	7,249	1,83	0,86
Konsentrasi 0,07% + 8 jam	695,9	13,918	7,84	1,77	0,82

Primer gen *DREB* hasil desain dapat mengamplifikasi sekuen gen *GmDREB* pada tanaman kedelai dengan ukuran band sekitar 800 bp. Hasil amplifikasi menunjukkan bahwa semua dengan perlakuan cekaman kekeringan memiliki gen *DREB*. Hasil amplifikasi disajikan pada gambar.



**Gambar 4.10.a.** Hasil amplifikasi gen *GmDREB* pada beberapa perlakuan mutagen 1: Kontrol, 2 : konsentrasi 0,03% lama perendaman EMS 4 jam, 3 : konsentrasi 0,03% lama perendaman EMS 6 jam; 4 : 0,03% lama perendaman EMS 8 jam, 5 : konsentrasi 0,05% lama perendaman EMS 4 jam ; 6 : konsentrasi 0,05% lama perendaman EMS 6 jam ; 7: konsentrasi 0,05% lama perendaman EMS 8 jam 8: konsentrasi 0,07% lama perendaman EMS 3 jam ; 9: konsentrasi 0,07% lama perendaman EMS 6 jam ; 10 : konsentrasi 0,07% lama perendaman EMS 8 jam



**Gambar 4.10.b.** Hasil amplifikasi gen *GmDREB* pada beberapa perlakuan mutagen 1: Kontrol, 2 : konsentrasi 0,03% lama perendaman EMS 3 jam, 3 : konsentrasi 0,03% lama perendaman EMS 6 jam; 4 : 0,03% lama perendaman EMS 8 jam, 5 : konsentrasi 0,05% lama perendaman EMS 3 jam ; 6 : konsentrasi 0,05% lama perendaman EMS 6 jam ; 7: konsentrasi 0,05% lama perendaman EMS 8 jam 8: konsentrasi 0,07% lama perendaman EMS 3 jam ; 9: konsentrasi 0,07% lama perendaman EMS 6 jam ; 10 : konsentrasi 0,07% lama perendaman EMS 8 jam

Teramplifikasinya gen menggunakan primer *DREB* menunjukkan bahwa gen *GmDREB* dimiliki oleh semua mutant, sehingga perlu dilanjutkan sekuensing basa penyusun DNA dengan metode sekuensing untuk melihat mutasi yang terjadi akibat mutant.

Gen yang terinduksi pada kondisi cekaman kekeringan dikelompokkan menjadi dua kelompok sesuai dengan fungsi dan produk gen tersebut. Shinozaki (1996) menyatakan, produk gen pada kelompok yang pertama yaitu protein fungsional yang langsung melindungi makromolekul dan membran sel (protein LEA, osmotin, protein *antifreeze*, chaperones dan protein mRNA *binding*), dan protein yang berfungsi sebagai pengaturan pergerakan air melalui membran (protein *water channel* dan *membrane*

*transporter*), enzim yang mengkatalisis biosintesis beberapa osmoregulator (prolin, betaine dan gula) dan enzim detoksifikasi yang mengatur proses fisiologis sel atau metabolisme biokimia untuk mengatur air pada tingkatan yang normal (*glutathione S-transferase*, *soluble epoxide hydrolase*, *catalase*, *superoxide dismutase* dan *ascorbic peroxidase*). Produk gen yang termasuk kelompok yang kedua yaitu faktor transkripsi (bZIP, MYC, MYB dan DREB), protein kinase (MAP kinase dan CDP kinase, *receptor protein kinase*, *ribosomal protein-kinase* dan *transcription-regulation protein kinase*), proteinase, (phospoesterase dan phospholipase C) yang terlibat dalam sinyal transduksi pada kondisi cekaman dan kontrol ekspresi gen toleransi cekaman (Zhang *et al.*, 1999).

Pahlevi (2010), menyatakan bahwa hasil sekuensing gen *GmDREB2* pada berbagai varietas tanaman kedelai yang diidentifikasi memiliki perbedaan, namun perbedaan tersebut tidak mempengaruhi ekspresi sifat toleransi kekeringan sehingga sifat toleransi kekeringan tidak hanya dipengaruhi gen *GmDREB2* saja, namun oleh banyak gen yang terkait sifat ketahanan terhadap stress kekeringan. Hal yang serupa juga didapatkan oleh Mahmudah (2009), meneliti gen tahan kering *DREB1* pada beberapa varian kedelai, variasi sifat ketahanan pada beberapa varian tanaman kedelai tidak dipengaruhi oleh variasi sekuen gen *DREB1*.

Faktor transkripsi untuk gen *LEA* ialah *DREB 2* dan *DREB 1* dimana faktor transkripsi merupakan protein regulator yaitu faktor yang menginisiasi terjadinya transkripsi gen (Shinozaki & Shinozaki, 1997). Ekspresi gen tertentu dipengaruhi oleh sejumlah reaksi sejumlah gen yang bisa aktif (*on*) atau tidak aktif (*off*) karena dipengaruhi oleh waktu dan lingkungan. *DREB* merupakan faktor transkripsi dan *DRE* elemen berfungsi sebagai sinyal transduksi pada kondisi kekeringan, salinitas dan cekaman suhu dingin. Faktor transkripsi *DREB* dapat mengontrol ekspresi beberapa target fungsional gen yang terlibat dalam toleransi tanaman pada kondisi kekeringan, salinitas dan suhu dingin. Gen *rd29A* pada *Arabidopsis* mengkode *protein like dehydrin* yang terekspresi oleh cekaman kekeringan, salinitas dan cekaman suhu dingin (Qiang *et al.*, 2000).

Protein dehydrin kemungkinan juga dikendalikan oleh banyak gen dalam kelompok gen dehydrin. Tipe protein LEA terdiri dari beberapa famili yang berbeda struktur dan fungsinya, berbeda dalam susunan dan sejumlah motif yang terkonservasi. Protein ini bersifat hidrofilik dan pengaturan transkripsinya diatur oleh respon terhadap ABA (*abscisic acid*) (Ingram & Bartels, 1993). Gen yang terinduksi ABA disebut ABA-responsive element (ABRE). *Basic leucine zipper factors (bZIP)* berfungsi dalam signal

transduksi dengan pengikatan elemen *ABRE* dalam induksi gen cekaman. Ketika tanaman berada pada cekaman kekeringan atau pada perkembangan biji, peningkatan ABA (*abscisic acid*) memicu ekspresi sejumlah gen (Bray, 1993), salah satu grup yang terekspresi ialah *LEA*. Gen *LEA* juga terinduksi oleh aplikasi ABA dan juga oleh cekaman suhu dingin, dehidrasi dan cekaman salinitas pada jaringan vegetatif (Choi *et al.*, 1999; Cohen & Bray, 1992; Godoy *et al.*, 1990). Giordani *et al.*, (1999), menunjukkan dua jalur pengaturan akumulasi dehidrin pada bunga matahari, yaitu *ABA-dependent* dan *ABA-independent*, yang kemungkinan merupakan efek akumulasi.

## **BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN**

### **5.1. Kesimpulan**

1. Konsentrasi EMS 0,03% dan 0,07% dengan lama perendaman 4 jam menunjukkan mutant yang memiliki karakter morfologi yang terpilih
2. Hasil ekspresi gen *DREB* pada metode PCR real time menunjukkan bahwa perlakuan EMS 0,07% dengan lama perendaman 4 jam menunjukkan ekspresi gen yang tertinggi
3. Hasil amplifikasi menggunakan gen *DREB* menunjukkan produk gen pada 800 bp

### **4.3. Saran**

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk analisa karakter molekuler yaitu sekuensing DNA dan amplifikasi perbedaan gen berdasarkan marka secara acak untuk mendeteksi adanya mutasi
2. Pengamatan hasil produksi biji untuk melihat hasil mutasi pada hasil biji kedelai

## DAFTAR PUSTAKA

- Alcantara. 1996. Breeding activity of *Scinax centralis* (Anura, Hylidae) in Central Brazil Iheringia, Sér. Zool., Porto Alegre, 97(4):406-410
- Anonymous, 2013. Studi Pendahuluan Rencana Pembangunan Jangka Menengah Nasional (RPJMN) Bidang Pangan Dan Pertanian 2015-2019 Direktorat Pangan Dan Pertanian Kementerian Perencanaan Pembangunan Nasional/ Badan Perencanaan Pembangunan Nasional 2013 Studi Pendahuluan Rencana Pembangunan Jangka Menengah Nasional (RPJMN) Bidang Pangan Dan Pertanian 2015-2019
- Anonymous, 2014. Optimis Tiga Tahun Swasembada Kedelai. <http://agroindonesia.co.id/2014/>
- Arumingtyas & Murfet, 1992. Branching I Pisum : Inheritance and allelism test with 17 ramosus mutants. *Pisum Genetic*. 24 :17-32
- Arumingtyas E., dan Indriyani, S. 2005. Induksi Viabilitas Genetika Percabangan Tanaman Kenaf (*Hibiscus cannabinus*L.) dengan Mutagen Kimia Ethyl Methane Sulfonate (EMS). *Natural Journal*.8(1):57-71
- Ashburner M. 1990. *Drosophila: A Laboratory Handbook*. ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY Naito K, Kusaba M, Shikazono N, Takano T, Tanaka A, Tanisaka
- Atman dan Hosen, 2008. *Biotechnology to Agricultural Chemistry*. American Chemical Society, Easton, OA, pp 98–107
- Bhagwat, B & Duncan, EJ 1998, ‘ Mutation breeding of highgate (*Musa acuminata*, AAA) for tolerance to *Fusarium Oxysporum* sp. cubense using gamma irradiation’, *J. Euphytica*, vol. 101, pp. 143-50
- Chen, M., Choi, Y., and Rodermel, D.F. 2000. Mutation in the Arabidosis VAR2 Locus Leaf Variegations Due to the Loss of Chloroplast FtsH protease. *Plant Journal*.22(7):303-313.
- Fachruddin, L. 2000. *Budidaya kacang-kacangan*. Kanisius. Yogyakarta.
- Girija M., Dhanavel D and Gnanamurthy S. 2013. Gamma rays and EMS induced flower color and seed mutants in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Advances in Applied Science Research*. 4(2):134-139
- Harten, V 1998, *Mutation breeding: theory and practical application*, Cambridge University Press, London

- Hidayat, E. B. 1994. *Sonchus*L. In: Siernonsma, J .S. and Piluek, K. (Ed). Plant Resources of South East Asia. Bogor Indonesia: PROSEA. p.260 -262
- Jabeen dan Mirza, 2002. Ethyl Methane Sulphonate enhances genetic variability in *Capsicum anuum*. Asian Journal of Plant Sciences. 1(4) : 425-428
- Kaul, M.L.H., Bhan, A.K.: Mutagenic effectiveness and efficiency of EMS, DES and gamma rays in rice. - Theor. appl. Genet. 50: 241-246, 1977.
- Khan and S. D. Tyagi, "Induced morphological mutants in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]," *Frontiers of Agriculture in China*, vol. 4, no. 2, pp. 175–180, 2010.
- Khan, 2011. Induced Polygenic mutation in wheat (*Triticum asetivum* L.)
- Krausse GW (1989). Early ripening, productive soybe an mutant variety suitable for combine harvesting. *Mutat. Breed. Newsletter*34:3-4.
- M. Girija and D. Dhanavel. 2009. *Global Journal of Molecular Sciences* 4 (2): 68-75. Mutagenic Effectiveness and Efficiency of Gamma Rays Ethyl Methane Sulphonate and Their Combined Treatments in Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp).
- M. H. Khan and S. D. 2006. Induced variation in quantitative traits due to physical (gamma rays), chemical (EMS) and combined mutagen treatments in soybean [*Glycine max* L.)Merrill] Tyagi Department of Plant Breeding and Genetics K.P.G. College, Simbhaoli, Gaziabad (U.P)
- Micke, A., M. Maluszynski and B. Donin. 1985. Plant cultivars derived from mutation induction or use of the induced mutants in cross breeding. *Mutation Breeding Review IAEA, Vienna*. 3: 1-92.
- Mudasir Hafiz Khan and Sunil Dutt Tyagi A review on induced mutagenesis in soybean Vol. 4(2), pp. 19-25, May 2013. *Journal of Cereal and Oil Seeds*
- Odeigah, PGC, Osanyinpeju, AO & Myers, GO. 1998. Induced Mutation in Cowpea, *Vigna anguiculata*. <http://www/ots.duke.edu/tropibiojnl/claris/46-3>.
- Parker, JR. 1995. *Genetics*. Harper Collins Pub., New York
- Rahman, S.M., Takagi,V, Kubota, K., Miyamoto, K. and Kawakita, V. 1994. The high oleic acid mutant in soybean induced by X-ray irradiation. *Biosci .Biotech .Biochem*. **58**:1070-1072.
- Russell, PJ. 1992. *Fundamental of genetics*. Harper Collins College Publisher. New York
- Setiawan, A. 2013. RI Belum Lepas Ketergantungan Impor Kedelai Tahun Ini. <http://finance.detik.com/read/>

- Shah, T.M., J.I. Mirza, M.A. Haq and B.M. Atta, 2009. Screening of chickpea (*Cicer arietinum*) induced mutants against *Fusarium* wilt. *Pakistan J. Bot.*, 41: 1945–1955
- Singh. G., Sareen, PK. Saharan, RP, & Singh, A. 2001. Induced variability in mungbean (*Vigna radiata* L). *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding.* 61 (3) : 281-282
- Skorupska H.1984. Identification and evaluation for mutation of agricultural characters in soybean. *Soybean Genet. Newsletter* 11:53- 59 Studies on effectiveness and efficiency of gamma rays, EMS and their combination in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.]
- Soeranto, H. 2003. Peran IPTEK Nuklir dalam Pemuliaan Tanaman untuk Mendukung Industri Pertanian. Jakarta: Puslitbang Teknologi Isotop dan Radiasi, Badan Tenaga Nuklir Nasional. p.308-316
- Solanki, I.S and Sharma B. 1994. Mutagenic effectiveness and efficiency of gamma rays, ethylellp. imine and Nnitroso-N-ethyl urea in mJcrosperma lentil (*Lens eulinari*' Medik.l. *Indian J. Genet.* 54: 72-76.
- Srivastava, P., and Pandey, J. 2012.LICF Spectrum as a Fast Detector of ChlorophyllDamage in Safflower Growing under Mutagenic Stress.*World Journal of Agricultural Sciences.*8 (3):322-325
- Steponkus, P. L., J. M. Cutler, and J. C. O'Toole, 1980. Adaptation of water deficit in rice. In:Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stresses. Turner, N.C. and P.J. Kramer (Eds.) Wiley Iner-Science, New York. pp.401-418.
- Subandi . 2007. Teknologi Produksi dan Strategi Pengembangan Kedelai pada Lahan Kering Masam. *Iptek Tanaman Pangan* Vol. 2 No. 1 – 2007
- Subuthi, P.K., B.K. Mohapatra and S.K. Sinha. 1991. Use of pollen traits for early detection of induced micro mutations in Wheat. *Indian J. Genet.* 5(1): 101-111
- Suherman, M. 20014. <http://agroindonesia.co.id/2014/11/18/optimis-tiga-tahun-swasembada-kedelai>
- Talebi1 A. B, Amin Benjavad Talebi2, Behzad Shahrokhifar. 2014. Ethyl Methane Sulphonate (EMS) Induced Mutagenesis in Malaysian Rice (cv. MR219) for Lethal Dose Determination. *American Journal of Plant Sciences*, 2012, 3, 1661-1665
- Thilagavathi, C. and Mullainathan, L. 2009. Isolation of Macro Mutants and Mutagenic Effectiveness, Efficiency in Black Gram (*Vigna mungo* (L.) Hepper). *Global Journal of Molecular Sciences.*4, 76-79.
- Zakri AH, Jalani BS. 1986. Improvement of soybean through mutation breeding. Improvement of grain legume production using induced mutations *Proceedings of a workshop, Pullman, Washington, USA, 1-5 July*, pp. 451-461.

**Lampiran 1. Perlakuan varietas Dering 1 pada berbagai perlakuan konsentrasi dan lama perendaman dalam EMS**



**Lampiran 2. Penanaman kedelai di greenhouse, morfologi tanaman akibat perlakuan dengan mutagen EMS**



**a. Penanaman kedelai di greenhouse**



**b. Perbedaan keragaan morfologi tanaman mutant pada kelompok konsentrasi EMS 0,03% dibandingkan dengan kontrol**



- c. Perbedaan keragaan morfologi tanaman mutant pada kelompok konsentrasi EMS 0,05% dibandingkan dengan kontrol

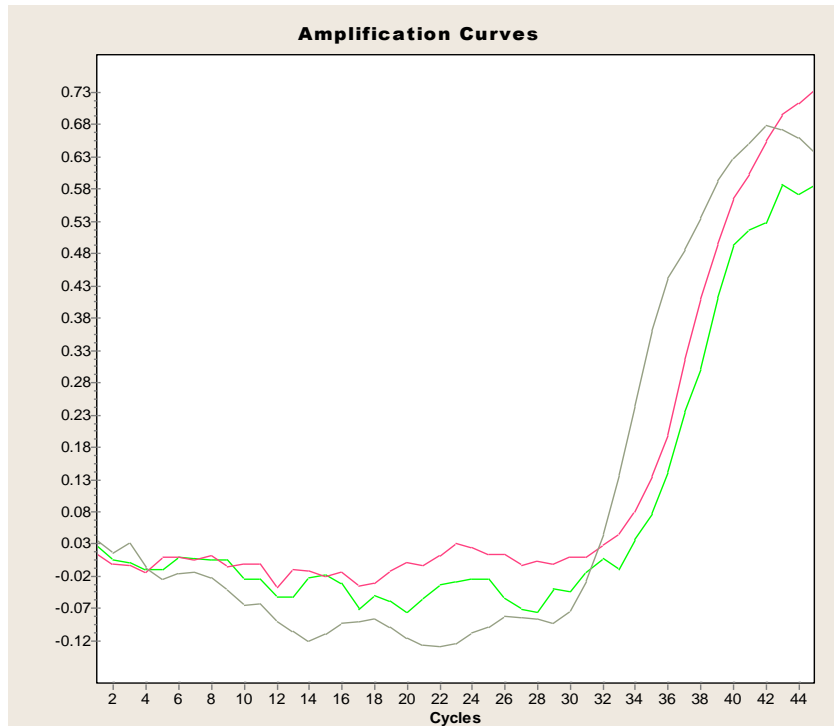


- d. Perbedaan morfologi daun tanaman mutant pada perlakuan EMS dibandingkan dengan control, pada mutant terjadi penambahan jumlah helai daun dalam 1 tangkai menjadi 4-5 helai, sedangkan pada control normal 3 helai daun (trifoliolate)

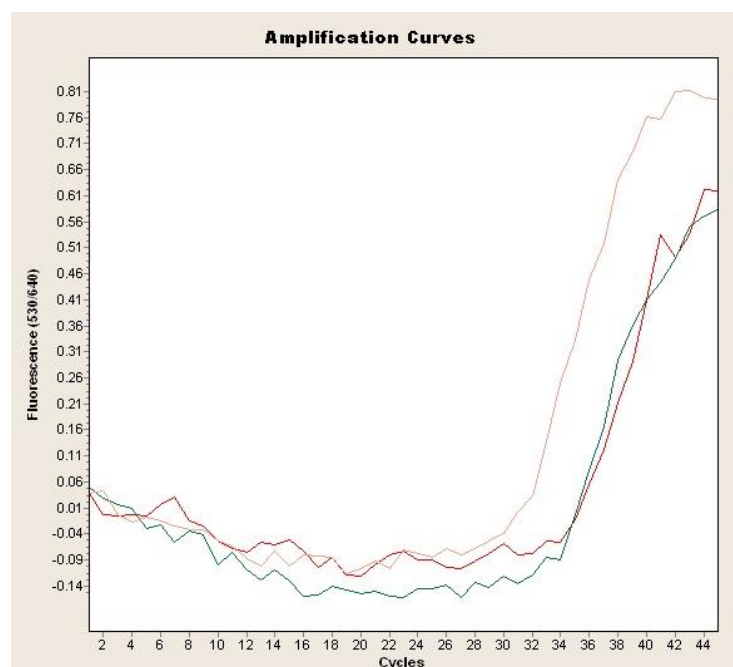
**Lampiran 3. Langkah kerja isolasi DNA daun tanaman kedelai**



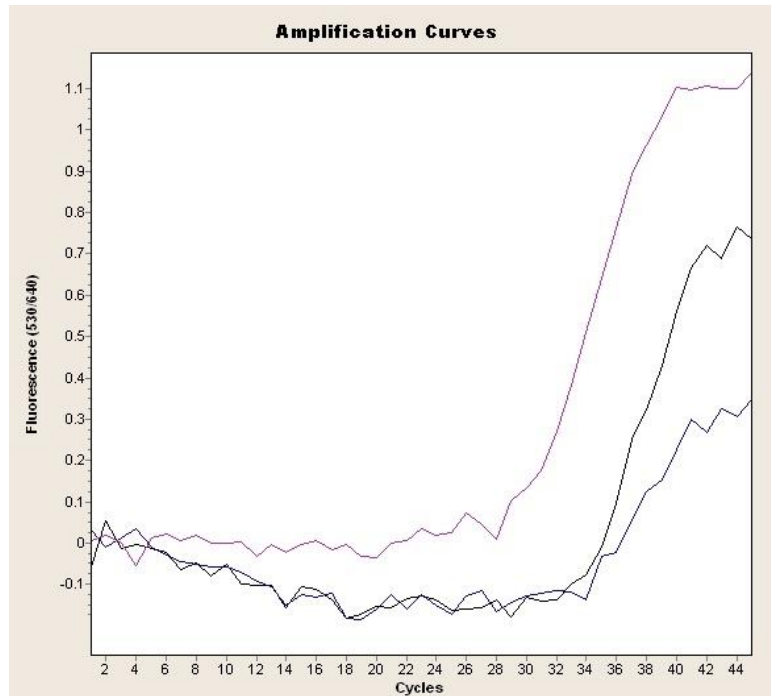
**Lampiran 3. Ekspresi gen DREB perlakuan konsentrasi EMS 0,03% pada berbagai lama perendaman menggunakan PCR real time**



**Lampiran 4. Ekspresi gen DREB perlakuan konsentrasi EMS 0,05% pada berbagai lama perendaman menggunakan PCR real time**



**Lampiran 5. Ekspresi gen DREB perlakuan konsentrasi EMS 0,07% pada berbagai lama perendaman menggunakan PCR real time**



**CURRICULUM VITAE**

**1. Ketua Peneliti**

1	Nama Lengkap (dengangelar)	Dr. Evika Sandi Savitri ,MP	L/P
2	Jabatan Fungsional	Lektor Kepala	
3	Jabatan Struktural	Penanggung Lab. Kultur Jaringan dan Fisiologi Tumbuhan	
4	NIP/NIK/ Identitaslainnya	197410182003122002	
5	NIDN	2018107401	
6	Tempat danTanggal Lahir	Malang, 18 Oktober 1974	
7	Alamat Rumah	Jl. Laksda. Adi Sucipto VIIA/45 Blimbing Malang	
8	Nomor Telepon/Faks/HP	0817531500	
9	Alamat Kantor	Jurusan Biologi, Fak. Saintek, UIN Maliki Malang, Jl. Gajayana No. 50 Malang	
10	Nomor Telepon/Faks	0341-558933	
11	Alamat e-mail	evikasandi@yahoo.com	
12	Lulusan yang TelahDihasilkan	S-1 = 25 orang S-2 = 0 orang S-3 = 0	

		orang
14	Mata Kuliah yang Diampu	1. Struktur Tumbuhan Perkembangan
		2. Kultur Jaringan Tumbuhan
		3. Pengantar Bioteknologi
		4. Fitohormon

#### A. Pengalaman Penelitian Dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul Penelitian	Pendanaan	
			Sumber*	Jml (Juta Rp)
1	2009	Penelitian bersama dosen dan mahasiswa 2009: Karakterisasi dan Seleksi In Vitro Varietas Kedelai ( <i>Glycine max</i> L. Merr) Toleran Cekaman Kekeringan dengan Media PEG (Polyethleneglikol)	DIPA	5 jt
2	2010	Penelitian bersama dosen dan mahasiswa 2010: Pengujian Kandungan Isoflavon Kultur Kalus Beberapa Varietas Kedelai ( <i>Glycine max</i> L. Merr) pada Media PEG (Polyethleneglikol) 6000	DIPA	5 jt
3	2011	Penelitian: Identifikasi Gen Tahan Kering <i>Lea</i> ( <i>Late Embryogenesis Abundant</i> ) Pada Beberapa Genotipe Kedelai ( <i>Glycine Max</i> L. Merr) Dengan Metode PCR-Sekuensing	DIPA	12 jt
4	2012	Pemodelan Produksi Biomas <i>Chlorella</i> , <i>Sp.</i> Pada Media Limbah Cair Tahu Menggunakan Sistem Flat Plate Photobioreactor Dalam Upaya Mengurangi Pencemaran Lingkungan Dan Produksi Biofuel	DIPA	50 jt
5	2013	Pengembangan Marka Ketahanan Kekeringan Pada Tanaman Kedelai ( <i>Glycine Max</i> L. Merr) Berdasarkan Sekuens Dan Ekspresi Gen <i>Lea-D11</i> ( <i>Late Embryogenesis Abundant</i> ) Pengkode Protein Dehydrin	DIKTI	50 jt
6	2014	Pengembangan Marka Ketahanan Kekeringan Pada Tanaman Kedelai ( <i>Glycine Max</i> L. Merr) Berdasarkan Sekuens Dan Ekspresi Gen <i>Lea-D11</i> ( <i>Late Embryogenesis Abundant</i> )	DIKTI	100jt

		Pengkode Protein Dehydrin		
--	--	---------------------------	--	--

### B. Pengalaman Pengabdian kepada Masyarakat Dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul Pengabdian kepada Masyarakat	Pendanaan	
			Sumber*	Jml (JutaRp)
1	2011	Pengelolaan Sampah Dan Limbah Peternakan Di Dusun Brau Desa Gunungsari Kecamatan Bumiaji Kota Batu	DIPA 2011	1 jt
2.	2012	Pertanian Organik Dan Pemeliharaan Lahan ( <i>Land Husbandry</i> ) Berbasis Prakarsa Petani Dalam Upaya Pertanian Berkelanjutan Dan Pemberdayaan Ekonomi Masyarakat	DIPA 2012	1 jt

### C. Pengalaman Penulisan Artikel Ilmiah Dalam Jurnal Selama 5 Tahun Terakhir

No	Judul Artikel Ilmiah	Volume/Nomor/Tahun	Nama Jurnal
1	Seleksi Toleransi Kekeringan Perkecambahan Beberapa Varietas Kedelai ( <i>Glycine Max L. Merr</i> ) Menggunakan PEG ( <i>Polyethylene Glycol</i> ) 6000	April 2011	Jurnal Hayati
2	Identification and characterization drought tolerance of gene <i>LEA-D11</i> soybean ( <i>glycine max L. Merr</i> ) based on PCR-sequencing	Januari 2013	American Journal of Molecular Biology, 2013, 3, 32-37
3	Protein Profiles and Dehydrin Accumulation in Some Soybean Varieties ( <i>Glycine max L. Merr</i> ) in Drought Stress Conditions	Januari 2013	American Journal of Plant Sciences, 2013, 4, 134-141
4	Identification and Characterization of Drought Stress Protein on Soybean ( <i>Glycine max L. Merr</i> )	Januari-Februari 2014	Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences RJPBCS 5(1) Page No. 789-796

**D. Pengalaman Penyampaian Makalah Secara Oral Pada Pertemuan / Seminar Ilmiah Dalam 5 Tahun Terakhir**

No	Nama Pertemuan Ilmiah/Seminar	Judul Artikel Ilmiah	Waktu dan Tempat
1	Seminar Internasional 19 Juni 2008:	Antioxidant Activity of Extract Flavonoid Sepal Rosella Flower ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> ) based Dried Technique)	Malang, 19 Juni 2008:
2.	Konferensi Nasional Green Technology for Better Future	Respon Pertumbuhan Kalus Kedelai ( <i>Glycine Max</i> L Merrill) Pada Media PEG ( <i>Polietilena Glikol</i> ) 6000 Sebagai Simulasi Cekaman Kekeringan	Malang, 15 September 2010:
3.	Seminar Nasional/Lokakarya Kedelai Nasional	Respon Varietas Kedelai ( <i>Glycine max</i> L. Merr) pada Perbedaan Kondisi Lengah Tanah	Malang, 26 – 27 Juli 2007-2008.
4.	Seminar Nasional/Lokakarya Kedelai Nasional	Karakter Fisiologi Tanaman Kedelai ( <i>Glycine max</i> L. Merr) pada Kondisi Cekaman Kekeringan	Malang, 14 September 2012
5	Malaysia International Biology Symposium	The Influence of Elicitor Cu <sup>2+</sup> and Fe <sup>2+</sup> to Asiaticoside level of Pennywort ( <i>Centella asiatica</i> L.Urban) Callus	28-29 Oktober 2014

**E. Pengalaman Penulisan Buku Dalam 5 Tahun Terakhir**

No	Judul Buku	Tahun	Jumlah Halaman	Penerbit
1	Buku Karya Ilmiah Populer : <i>Rahasia Tumbuhan Berkhasiat Obat Perspektif Islam</i>	2011	150	UIN Press

**2. Anggota Peneliti**

Nama : Dr. Eko Budi Minarno, M.Pd.  
 NIP/NIK : 196301141999031001  
 Jenis Kelamin : Laki-laki  
 Tempat dan Tanggal Lahir : Malang, 14 Januari 1963  
 Status Perkawinan : Kawin  
 Agama : Islam  
 Golongan / Pangkat : IV/a / Pembina  
 Jabatan Fungsional Akademik: Lektor Kepala  
 Perguruan Tinggi : Universitas Islam Negeri (UIN) Malang  
 Alamat : Jalan Gajayana 50 Malang 65144  
 Telp./Faks. : 0341-551354/0341-572533  
 Alamat Rumah : Perum. Tambak Asri Permai D-22, Tambakasri,  
 Tajinan, Kab. Malang

Telp./Faks. : 0341-802919  
 E-mail : budi\_minarno@yahoo.com.

### 3. RIWAYAT PENDIDIKAN PERGURUAN TINGGI

Tahun Lulus	Jenjang	Perguruan Tinggi	Jurusan/ Bidang Studi
1986	S-1	IKIP Malang	Pendidikan Biologi
2002	S-2	Universitas Negeri Malang (UM)	Pendidikan Biologi
2009	S-3	Universitas Negeri Malang (UM)	Pendidikan Biologi

### 4. PELATIHAN PROFESIONAL

Tahun	Pelatihan	Penyelenggara
2006	Manajemen Perguruan Tinggi	UKM Malaysia
2008	Kultur Jaringan Tumbuhan	Unisma
2008	ISO 9001:2000 Internal Quality Audit Training	Surveyor Indonesia dan UIN Malang

5.

### 6. PENGALAMAN PENELITIAN

Tahun	Judul Penelitian	Jabatan	Sumber Dana
2002	Pengaruh Skarifikasi dan Gibberellin Kyowa terhadap Perkecambah Biji palem Putri ( <i>Veitchia merillii</i> )	Peneliti	Mandiri
2006	Pemanfaatan Daun Sirih Sebagai Zat Anti Bakteri Patogen <i>Aeromonas hydrophylla</i> Pada Ikan Mas.	Anggota	Lemlit
2007	Sistem Pakar Pendeteksi Bakteri Penyakit pada Manusia Berbasis Komputer.	Ketua	Lemlit
2007	Peningkatan Kemampuan Berpikir Ilmiah Mahasiswa melalui Penerapan Siklus Belajar dalam Perkuliahan Fisiologi Tumbuhan	Peneliti	Mandiri
2008	Pembelajaran Bioetika Islam untuk Meningkatkan Kemampuan Kognitif dan Kemampuan Pengambilan Keputusan Etik Mahasiswa Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang	Peneliti	Lemlit
2008	Perbedaan Motivasi Berprestasi, Religiusitas, dan Prestasi Akademik ditinjau dari Jalur Seleksi Penerimaan Mahasiswa Baru, Asal Sekolah, Jenis Kelamin, Asal Fakultas pada Mahasantri Baru di Ma'had Sunan Ampel Al-Aly UIN Malang	Anggota	Unit SAR

2009	Studi tentang Pembelajaran Bioetika di Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang	Peneliti	Mandiri
2010	Studi tentang Sikap dan Kemampuan Pemecahan Masalah Etik pada Mahasiswa Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maliki Malang	Peneliti	Mandiri
2010	Bioprospek Nyamplung ( <i>Callophyllum inophyllum</i> L.), Kesambi ( <i>Schleichera oleosa</i> Merr.) dan Kapuk Randu ( <i>Ceiba pentandra</i> Gaetn) yang Diambil dari Berbagai Macam Lokasi yang Berbeda sebagai Bahan Baku Biodiesel	Ketua Peneliti	Penelitian Dosen-Mahasiswa
2011	Studi Etnobotani Tumbuhan Arecaceae (Palem-paleman) oleh Masyarakat Pantura Kabupaten Gresik dan Lamongan	Ketua Peneliti	Mandiri
2012	Studi Etnobotani dan Mikrobiologi Tumbuhan Berpotensi Obat Keputihan ( <i>Flour albus</i> ) pada Masyarakat Desa Blumbungan Kecamatan Larangan Kabupaten Pamekasan Madura	Ketua Peneliti	Penelitian Dosen-Mahasiswa
2013	Studi Etnobotani, Mikrobiologi dan Fitokimia Tumbuhan Berpotensi Obat Penyakit Kulit Bisul ( <i>Furunkel</i> ) pada Masyarakat Kecamatan Jrengik Kabupaten Sampang Madura	Ketua Peneliti	Penelitian Penguatan Program Studi
2014	Skrining Fitokimia dan Kandungan Total Flavonoid pada Buah <i>Carica pubescens</i> Lenne & K. Koch di Kawasan Bromo, Cangar, dan Dataran Tinggi Dieng		

## 7. KARYA TULIS ILMIAH

### A. Buku/Bab/Jurnal

Tahun	Judul	Penerbit/Jurnal
2003	Bioteknologi Non-Konvensional yang Berlandaskan Bioetika	Jurnal Paradigma Vol.14, Nomor 18 Januari-Juni 2003
2004	Evolusi Biologis dari Sudut Pandang Biokimia	Jurnal Sainika (ISSN 1693-

		640X) Vol. 1 No. 1 Januari - April 2004
2004	Membran Spermatozoa: Aspek Molekuler dan Seluler	Jurnal Sainika (ISSN 1693-640X) Vol. 1 No. 2 Mei - Agustus 2004
2004	Pembelajaran Efisiensi Energi Melalui Pendekatan Kontekstual	Jurnal Sainika (ISSN 1693-640X) Vol. 1 No. 3 Sept. - Desember 2004
2006	Pengembangan Budaya Akademik dalam buku: Islam Sains dan Teknologi Menggagas Bangunan Keilmuan Fakultas Sains dan Teknologi, halaman 61 - 70, UIN-Malang Press, Juni 2006, ISBN: 979-24-2902-6	Penerbit: UIN Malang Press
2006	Konservasi Sumber Daya Alam dalam Pandangan Islam dalam buku: Islam Sains dan Teknologi Menggagas Bangunan Keilmuan Fakultas Sains dan Teknologi, halaman 283 - 295, UIN-Malang Press, Juni 2006, ISBN: 979-24-2902-6; sebagai penulis utama	Penerbit: UIN Malang Press
2006	Strategi Pengambilan Keputusan Etik melalui Pembelajaran Bioetika dalam rangka Menyikapi Perkembangan Biologi Modern	Jurnal Sainika (ISSN 1693-640X) Vol. 3 No. 2 Mei - Agustus 2006
2007	Bioetika dan Pembelajaran Nilai dalam Sains	Jurnal Sainika (ISSN 1693-640X) Vol. 4 No. 1 Januari - April 2007
2007	Pengaruh Skarifikasi dan Gibberellin Kyowa terhadap Perkecambahan Biji Palem Putri ( <i>Veitchia merillii</i> (Becc.) H.E. Moore)	Jurnal Sainika (ISSN 1693-640X) Vol. 4 No. 3 September - Desember 2007
2008	Peningkatan Kemampuan Berpikir Ilmiah Mahasiswa melalui Penerapan Siklus Belajar dalam Perkuliahan Fisiologi Tumbuhan	Jurnal Paradigma (ISSN 0852-3185) Tahun XIII, Nomor 25, Januari—Juni 2008
2008	Gizi dan Kesehatan Perspektif Al-Qur'an dan Sains (ISBN: 979- 24-3023-7)	Penerbit: UIN Malang Press
2009	Buku Ajar Pengantar Bioetika dalam Perspektif Sains dan Islam	Tidak diterbitkan
2009	Studi Pembelajaran Bioetika di Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang	Berkala Penelitian Hayati Terakreditasi B, Edisi Khusus No. 3E Tahun 2009
2010	Bioetika dalam Perspektif Islam sebagai Pengawal Perkembangan Biologi Modern	Jurnal Ulul Albab (ISSN 1858-439) Vol. 11, No. 2 Tahun 2010
2010	Pengantar Bioetika dalam Perspektif Sains dan Islam (ISBN: 978-602-958-301-4)	Penerbit: UIN Maliki Malang Press
2011	Peran Bioetika dalam Mengawal Perkembangan Biologi Modern (ISBN: 978-602-958-369-4)	Penerbit: UIN Maliki Malang Press
2011	Peran Manusia dalam Pelestarian Lingkungan Hidup	Jurnal Egalita (ISSN 1907-3461, Vol.VI No. 1 Tahun 2011
2011	Petunjuk Praktikum Fisiologi Tumbuhan	Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maliki Malang
2012	Learning of Bioethics as Guide for Developent of Modern Biology and	1st International Conference on Multiple-governance in Islam,

	Environmental Protection	<i>Environmental Development, and Conservation. Johor, Malaysia, Nov. 20-21, 2012, Water Research Alliance, Universiti Teknologi Malaysia. ISBN 978-983-44826-4-0.</i>
2013	Bioetika untuk Pengambilan Keputusan Etik	Materi Kuliah Bioetika
2014	Bioetika Islam dan Perbedaannya dengan Bioetika di Luar Islam	Materi Kuliah Bioetika
2014	Bioetika, Mengawal Perkembangan Biologi dan Teknologinya	Materi Kuliah Bioetika

## 8. B. Makalah

Tahun	Judul	Penyelenggara
2002	Upaya meningkatkan Kualitas Pembelajaran IPA SD/MI melalui Pendekatan Siklus Belajar	Prodi D-2 PGMI Jur. Tarbiyah STAIN Malang
2002	Identifikasi Kerang-kerangan Atas Dasar Cangkang	Prodi Biologi Jur. MIPA STAIN Malang
2002	Peranan DNA Mitokondria dalam Penuaan	Prodi Biologi Jur. MIPA STAIN Malang
2007	<i>Bioetika sebagai Bagian dari Filsafat: Sebuah Kajian dari Aspek Pembelajaran Moral</i> (disajikan dalam Forum Diskusi Ilmiah Dosen Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang, 28 Juli 2007)	Fak. Saintek UIN Malang
2007	<i>Islam dan Pelestarian Lingkungan Hidup</i> (disajikan dalam Forum Temu Kepala Dusun se Kecamatan Bumiaji Kota Batu, 15 Agustus 2007)	LPM UIN Malang
2007	<i>Pengembangan Budaya Akademik di Lingkungan Fakultas Sains &amp; Teknologi UIN Malang</i> (disajikan dalam Forum Diskusi Ilmiah Dosen Jurusan Biologi, 24 Nopember 2007)	Jurusan Biologi UIN Malang
2008	<i>Membelajarkan Bioetika Mengawal Perkembangan Biologi</i> (disajikan dalam <b>Seminar Nasional Pendidikan</b> Jurusan Biologi Fak. Saintek, 15 Nopember 2008)	Jurusan Biologi UIN Malang
2008	<i>Islam dan Pelestarian Lingkungan Hidup</i> (disajikan dalam Forum Diskusi dengan Guru dan Siswa MA "Sunan Kalijogo" Kranding Mojo Kediri, 26 Januari 2008)	Unit SAR UIN Malang
2008	<i>Mengenal Antioksidan dan Manfaatnya bagi Kesehatan</i> (disajikan kepada Ibu-ibu Anggota	PKK RT 11 RW 02 Tambakasri, Tajinan, Kab. Malang

	PKK RT 11/RW 02 Tambakasri, Tajinan, Malang, 11 Mei 2008)	
2008	<i>Masalah Ketahanan Pangan dan Ancaman Pemanasan Global (Global Warming)</i> (disajikan dalam <b>Seminar Nasional Global Warming</b> , 9 Juni 2008)	Fakultas Saintek UIN Malang
2008	<i>Memahami KBK dan KTSP</i> (disajikan dalam Pelatihan KTSP bagi Guru Madrasah kerjasama ADB dengan MEDP Depag RI dan PPSDM UIN Jakarta, 17 – 21 Nopember 2008 di Trenggalek, Jatim)	ADB/MEDP Depag/PPSDM UIN Jakarta
2008	<i>Pembelajaran Sains</i> (disajikan dalam Pelatihan KTSP bagi Guru Madrasah kerjasama ADB dengan MEDP Depag RI dan PPSDM UIN Jakarta, 17 – 21 Nopember 2008 di Trenggalek, Jatim)	ADB/MEDP Depag/PPSDM UIN Jakarta
2008	<i>Pembelajaran dengan Peta Konsep</i> (disajikan dalam Pelatihan KTSP bagi Guru Madrasah kerjasama ADB dengan MEDP Depag RI dan PPSDM UIN Jakarta, 17 – 21 Nopember 2008 di Trenggalek, Jatim)	ADB/MEDP Depag/PPSDM UIN Jakarta
2008	<i>Model Pembelajaran Konstruktivisme</i> (disajikan dalam Pelatihan KTSP bagi Guru Madrasah kerjasama ADB dengan MEDP Depag RI dan PPSDM UIN Jakarta, 17 – 21 Nopember 2008 di Trenggalek, Jatim)	ADB/MEDP Depag/PPSDM UIN Jakarta
2008	<i>Model Pembelajaran Learning Cycle</i> (disajikan dalam Pelatihan KTSP bagi Guru Madrasah kerjasama ADB dengan MEDP Depag RI dan PPSDM UIN Jakarta, 17 – 21 Nopember 2008 di Trenggalek, Jatim)	ADB/MEDP Depag/PPSDM UIN Jakarta
2008	<i>Model Pembelajaran Kooperatif (Cooperative Learning)</i> (disajikan dalam Pelatihan KTSP bagi Guru Madrasah kerjasama ADB dengan MEDP Depag RI dan PPSDM UIN Jakarta, 17 – 21 Nopember 2008 di Trenggalek, Jatim)	ADB/MEDP Depag/PPSDM UIN Jakarta
2008	<i>Contextual Teaching and Learning</i> (disajikan dalam Pelatihan KTSP bagi Guru Madrasah kerjasama ADB dengan MEDP Depag RI dan PPSDM UIN Jakarta, 17 – 21 Nopember 2008 di Trenggalek, Jatim)	ADB/MEDP Depag/PPSDM UIN Jakarta
2008	<i>Evaluasi Pembelajaran</i> (disajikan dalam Pelatihan KTSP bagi Guru Madrasah kerjasama ADB dengan MEDP Depag RI dan PPSDM UIN Jakarta, 17 – 21 Nopember 2008 di Trenggalek, Jatim)	ADB/MEDP Depag/PPSDM UIN Jakarta
2008	<i>Belajar dan Strategi Pembelajaran</i> (disajikan dalam Forum Diskusi Bidang Pendidikan dengan Dewan Guru MA Tarbiyatut Tholabah, Kranji,	Unit SAR UIN Malang

	Paciran, Lamongan, 24 Nopember 2008)	
2009	<i>Sinergi antara Kurikulum Fakultas Sains dan Teknologi dengan Dunia Kerja</i> (disajikan dalam Seminar yang diselenggarakan oleh BEM Fakultas Saintek UIN Maliki Malang, tanggal 21 November 2009	BEM-Fakultas Saintek UIN Maliki Malang
2012	Learning of Bioethics as Guide for Development of Modern Biology and Environmental Protection	<i>1st International Conference on Multiple-governance in Islam, Environmental Development, and Conservation. Johor, Malaysia, Nov. 20-21, 2012, Water Research Alliance, Universiti Teknologi Malaysia. ISBN 978-983-44826-4-0.</i>

## 9. KEGIATAN PROFESIONAL/PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

Tahun	Kegiatan
2006	Ceramah tentang makna Hijrah bagi Jamaah Tahlil Al Muhajirin Tambakasri, Tajinan, Kab. Malang
2006	Muhadhir Dzuhur Masjid At-Tarbiyah UIN Malang
2006	Ceramah & Pemutaran Film Aborsi untuk Remaja Mushola Baiturrohman, Tambakasri, Tajinan, Kab. Malang
2006	Ceramah & Pemutaran Film Nabi Ibrahim dan Nabi-nabi untuk Siswa TPQ Baiturrohman Tambakasri, Tajinan, Kab. Malang
2006	Ceramah dan Demonstrasi Pembuatan Briket Arang dari Limbah Pertanian untuk Ibu PKK RW 02 Tambakasri, Tajinan, Kabupaten Malang
2006	Ceramah tentang Halalan Thoyyiban dalam Makanan Jamaah Masjid At-Tarbiyah UIN Malang
2007	Bedah Kitab Qurratul 'Uyun untuk Mahasantri Ma'had Sunan Ampel Al-Aly UIN Malang
2007	Muhadlarah (Ceramah) Dzuhur Masjid At-Tarbiyah UIN Malang
2007	Narasumber Dialog Jelang Berbuka Puasa di ATV Kota Batu
2007	Nara Sumber Pondok Romadhon di SMAN 1 Sumberpucung Kab. Malang
2007	Dosen Pembina Bhakti Ramadhan 1428 H di SMA/SMK/SMP Kota Kabupaten Malang
2008	Ceramah Peranan Antioksidan untuk Menangkal Radikal Bebas dan Penuaan Dini
2008	Narasumber Taushiyah Ramadhan ATV Kota Batu
2008	Muhadlarah (Ceramah) Dzuhur Masjid At-Tarbiyah UIN Malang
2008	Trainer Pelatihan KTSP Kerjasama ADB-MEDP Depag RI-PPSDM UIN Syarif Hidayatullah Jakarta di Hotel Hayam Wuruk Trenggalek, Jatim
2008	Ceramah tentang Kolesterol kepada Ibu PKK RW 02 Tambakasri, Tajinan, Kabupaten Malang
2009	Instruktur Diklat Profesi Guru PAI SD
2009	Instruktur Diklat Profesi Guru PAI MI
2009	Pengolahan Sampah Bagi Masyarakat Putus Sekolah
2010	Pembuatan Pupuk Organik (Kompos) dari Sampah Rumah Tangga di Kelurahan Kedungkandang dan Arjowinangun Kecamatan Kedungkandang Kota Malang

2011	Pemanfaatan Kompos Sampah Rumah Tangga untuk Tanaman Sayuran Pekarangan Rumah di Kelurahan Kedungkandang, Kecamatan Kedungkandang, Kota Malang
2012	Pemanfaatan Tepung Ikan Tengiri sebagai Bahan Dasar Pembuatan Sate Lilit di Kelurahan Kedungkandang Kecamatan Kedungkandang Kota Malang
2013	Upaya Peningkatan Ketrampilan Penyediaan Makanan Sehat Alami bagi Keluarga sebagai Bentuk Diversifikasi Pangan oleh Kelompok PKK Kelurahan Kedungkandang Kecamatan Kedungkandang Kota Malang
2014	Pelatihan Pembelajaran IPA dan Pembuatan Alat Peraga IPA Sederhana bagi Guru IPA SD di Pondok Pesantren Al-Yasini Pasuruan

### 3. Anggota Peneliti

Nama lengkap : Ruri Siti Resmisari, M.Si  
 NIPT : 201424230201  
 TTL : Cianjur, 23 januari 1979  
 Jenis kelamin : Perempuan  
 Alamat rumah : Perum Taman Embong Anyar II Blok E No. 2  
 Dau, Malang  
 Email : ruri\_resmisari@yahoo.com  
 Contact person : 085815045444

#### Riwayat Pendidikan

1. S1 Nama Perguruan Tinggi dan Lokasi : Institut Pertanian Bogor  
 Gelar dan tahun tamat : 2002  
 Bidang studi : Konservasi Sumberdaya Hutan
2. S2 Nama Perguruan Tinggi dan Lokasi : Institut Pertanian Bogor  
 Gelar dan tahun tamat : 2006  
 Bidang studi : Ilmu Pengetahuan Kehutanan
3. S3 Nama Perguruan Tinggi dan Lokasi  
 Gelar dan tahun tamat  
 Bidang studi

#### Pengalaman Penelitian dan Profesional

1. Asisten Peneliti [Ditperta] dengan judul Pengembangan Bibit Unggul Porang (*Amorphopallus oncopilus*) melalui Kultur In Vitro untuk

Mendukung Ketahanan Pangan Nasional. diketuai oleh Dwi Suheriyanto, MP

#### Daftar Publikasi Ilmiah

1. Resmisari R.S.2006. Variasi DNA Khloroplas *Sorea leprosula* di Indonesia menggunakan PCR-RLFP. [Tesis]. Bogor: Sekolah Pascasarjana IPB Press.
2. Suheriyanto D, Romaidi, Resmisari R.S. 2012. Pengembangan Bibit Unggul Porang (*Amorphopallus oncopilus*) melalui Kultur In Vitro untuk Mendukung Ketahanan Pangan Nasional. Jurnal El Hayah volum 3 No 1 September 2012 hal 16-23
3. Resmisari R.S. 2015. Aktivitas Antioksidan Ramuan Tradisional Madura “Subur Kandungan”. Volume 5 No. 1 September 2014 Hal 23-30.