



**TUGAS AKHIR - SB141510**

**SELEKSI *IN VITRO* TANAMAN JAGUNG (*Zea mays* L.) VARIETAS TALANGO DAN MANDING TERHADAP CEKAMAN SALINITAS**

**FATHIN FINARIYAH  
1511100012**

**Dosen Pembimbing:  
Triono Bagus Saputro, S.Si., M.Biotech.**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA 2015**





**FINAL PROJECT - SB141510**

***IN VITRO* SELECTION OF MAIZE (*Zea mays*  
L.) TALANGO AND MANDING VARIETIES TO  
SALINITY STRESS**

**FATHIN FINARIYAH  
1511100012**

**Advisor Lecturer:  
Triono Bagus Saputro, S.Si., M.Biotech.**

**DEPARTMENT OF BIOLOGY  
MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCE FACULTY  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA 2015**



## LEMBAR PENGESAHAN

### SELEKSI *IN VITRO* TANAMAN JAGUNG (*Zea mays* L.) VARIETAS TALANGO DAN MANDING TERHADAP CEKAMAN SALINITAS

#### TUGAS AKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh  
Gelara Sarjana Sains  
Pada  
Jurusan S-1 Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh :

**FATHIN FINARIYAH**  
**NRP. 1511 100 012**

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir :

Triono Bagus Saputro, S.Si., M.Biotech.  (Pembimbing)

Surabaya, 27 Juli 2015

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi

  
Ir. Maya Shovitri, M.Si  
NIP. 19690907 199803 2 001

***IN VITRO* SELECTION OF MAIZE (*Zea mays* L.)  
TALANGO AND MANDING VARIETIES TO SALINITY  
STRESS**

**Student Name** : Fathin Finariyah  
**NRP** : 1511 100 012  
**Department** : Biologi  
**Advisor Lecturer** : Triono Bagus Saputro, S.Si.,  
M.Biotech.

**Abstract**

In Indonesia, needs for *Zea mays* annually increased. It is inversely proportional to fewer agricultural land that can be used. The solution that is utilizing marginal land with high salt content. The aim of this study are to test the effect of resistance level Talango and Manding varieties to salinity and to know the genetic diversity of *in vitro* selection yield strains.

In this study, to obtain salinity tolerant *Z. mays* varieties, used *in vitro* techniques. First, callus was induced (MS0+4ppm 2,4-D), then subcultured on selection medium (MS0+4ppm 2,4-D+NaCl concentration (0, 2500, 5000, and 7500 ppm)). Then analysis of genetic diversity used RAPD.

Callus resistance parameter on treatment could be seen by the callus morphological change of color, alive callus percentage, callus weight gain decreasing with increasing salinity concentration. Analysis RAPD showed that polymorphism occurs in both varieties with primer OPA 13, OPB 07, OPC 02, OPK 20, and OPU 19. This proves the existence of genetic differences between control and tolerant callus.

**Keywords** : Salinity Stress, RAPD, *In vitro* Selection, *Z. mays*.



**SELEKSI *IN VITRO* TANAMAN JAGUNG (*Zea mays* L.)  
VARIETAS TALANGO DAN MANDING TERHADAP  
CEKAMAN SALINITAS**

**Nama Mahasiswa** : Fathin Finariyah  
**NRP** : 1511 100 012  
**Jurusan** : Biologi  
**Dosen Pembimbing** : Triono Bagus Saputro, S.Si.,  
M.Biotech.

Abstrak

*Di Indonesia, kebutuhan akan Zea mays tiap tahunnya meningkat. Hal ini berbanding terbalik dengan sedikitnya lahan pertanian yang digunakan. Solusinya yakni memanfaatkan lahan marginal dengan kandungan garam tinggi. Tujuannya adalah untuk menguji pengaruh tingkat ketahanan varietas Talango dan Manding terhadap salinitas serta melihat adanya keragaman genetik galur hasil seleksi in vitro.*

*Pada penelitian ini, untuk mendapatkan varietas Z. mays yang toleran terhadap salinitas dilakukan dengan menggunakan teknik in vitro. Pertama dilakukan induksi kalus (MS0+4ppm 2,4-D), kemudian kalus disubkultur pada medium seleksi (MS0+4ppm 2,4-D+konsentrasi NaCl (0, 2500, 5000, dan 7500 ppm)). Selanjutnya dilakukan analisis keragaman genetik dengan RAPD.*

*Parameter ketahanan kalus pada perlakuan dapat dilihat dari perubahan morfologi warna kalus, persentase kalus hidup, penambahan berat kalus yang semakin menurun. Analisis RAPD menunjukkan hasil bahwa terjadi polimorfisme pada kedua varietas dengan primer OPA 13, OPB 07, OPC 02, OPK 20, dan OPU 19. Hal ini membuktikan adanya perbedaan genetik antara kalus kontrol dan toleran.*

*Kata kunci: Cekaman Salinitas, RAPD, Seleksi In vitro, Z. mays.*



## KATA PENGANTAR

Segala puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya yang tak terhingga sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul **Seleksi *In Vitro* Tanaman Jagung (*Zea mays* L.) Varietas Talango dan Manding Terhadap Cekaman Salinitas**. Penyusunan Tugas Akhir ini merupakan suatu syarat untuk memperoleh gelar kesarjanaan strata 1 (S1) pada Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

Pada proses penyusunan Tugas Akhir, penulis telah mendapatkan banyak masukan, bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak yang sangat berguna dan bermanfaat baik secara langsung maupun tidak langsung. Penulis mengucapkan terima kasih kepada para dosen yaitu Bapak Triono Bagus Saputro, S.Si., M.Biotech. selaku dosen pembimbing dan penguji, Bapak Aunurohim, S.Si., DEA. dan Ibu Wirdatul Muslihatin, S.Si., M.Si selaku dosen penguji I dan II. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada kedua orang tua khususnya Ibu, teman-teman angkatan 2011, dan seluruh pihak yang telah membantu dalam penyusunan Tugas Akhir ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan proposal ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat berarti untuk penulis dan semoga dapat bermanfaat untuk penulis sendiri maupun pembaca.

Surabaya, 27 Juli 2015

Fathin Finariyah



## DAFTAR ISI

|  | Halaman |
|--|---------|
| HALAMAN JUDUL .....  | i       |
| LEMBAR PENGESAHAN .....  | v       |
| ABSTRAK .....  | vii     |
| ABSTRCT .....  | ix      |
| KATA PENGANTAR .....   | xi      |
| DAFTAR ISI .....   | xiii    |
| DAFTAR TABEL .....   | xv      |
| DAFTAR GAMBAR .....  | xvii    |
| DAFTAR LAMPIRAN .....  | xix     |
| <br>   |         |
| <b>BAB I PENDAHULUAN</b>   |         |
| 1.1 Latar Belakang .....   | 1       |
| 1.2 Rumusan Masalah .....  | 3       |
| 1.3 Batasan Masalah .....  | 3       |
| 1.4 Tujuan .....   | 4       |
| 1.5 Manfaat .....  | 4       |
| <br>   |         |
| <b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>   |         |
| 2.1 Jagung ( <i>Zea mays</i> L.) .....   | 5       |
| 2.1.1 Klasifikasi Tanaman Jagung ( <i>Zea mays</i> L.) .....                                 | 5       |
| 2.1.2 Distribusi dan Syarat Tumbuh Tanaman Jagung<br>( <i>Zea mays</i> L.) .....             | 6       |
| 2.1.3 Morfologi dan Penggolongan Tanaman Jagung<br>( <i>Zea mays</i> L.) .....               | 7       |
| 2.1.4 Karakteristik Varietas Jagung ( <i>Zea mays</i> L.) .....                              | 11      |
| 2.1.4.1 Talango .....  | 11      |
| 2.1.4.2 Manding .....  | 12      |
| 2.2 Cekaman Salinitas dan Pengaruhnya Terhadap<br>Tanaman Jagung ( <i>Zea mays</i> L.) ..... | 12      |
| 2.3 Mekanisme Toleransi Tanaman Terhadap Cekaman<br>Salinitas .....                          | 14      |
| 2.4 Seleksi <i>In Vitro</i> .....  | 16      |
| 2.5 <i>Random Amplified Polymorphism DNA</i> (RAPD) .....                                    | 17      |

|  |    |
|--|----|
| <b>BAB III METODOLOGI</b>  |    |
| 3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian .....  | 19 |
| 3.2 Metode yang Digunakan .....  | 19 |
| 3.2.1 Tahap Persiapan .....  | 19 |
| 3.2.1.1 Sterilisasi Ruangan .....  | 19 |
| 3.2.1.2 Sterilisasi Peralatan .....  | 19 |
| 3.2.1.3 Sterilisasi Medium .....   | 20 |
| 3.2.1.4 Sterilisasi Eksplan .....  | 20 |
| 3.2.2 Tahap Penelitian .....   | 21 |
| 3.2.2.1 Induksi Kalus .....  | 21 |
| 3.2.2.2 Seleksi <i>In Vitro</i> .....  | 22 |
| 3.2.2.3 Pembuatan Agarose 2% .....   | 22 |
| 3.2.2.4 Ekstraksi DNA dan Analisis RAPD .....                                      | 23 |
| 3.4 Rancangan Penelitian .....   | 25 |
| <b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASA</b>  |    |
| 4.1 Pengaruh Beberapa Konsentrasi Cekaman Salinitas terhadap Morfologi Kalus ..... | 29 |
| 4.2 Pengaruh Cekaman Salinitas terhadap Persentase Kalus Hidup .....               | 31 |
| 4.3 Pengaruh Cekaman Salinitas terhadap Pertambahan Berat Kalus .....              | 33 |
| 4.4 Analisis RAPD .....  | 35 |
| <b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b>  |    |
| 5.1 Kesimpulan .....   | 43 |
| 5.2 Saran .....  | 43 |
| DAFTAR PUSTAKA .....   | 45 |
| LAMPIRAN .....   | 55 |
| BIODATA PENULIS .....  | 67 |

## DAFTAR TABEL

|           | Halaman  |
|-----------|--|
| Tabel 3.1 | Reaksi pencampuran reagen-reagen proses PCR ..... 23   |
| Tabel 3.2 | Daftar primer dan urutan basa nitrogen yang digunakan untuk analisis RAPD . 25   |
| Tabel 3.3 | Tabel pengamatan presentase kalus hidup pada seleksi <i>in vitro</i> ..... 26  |
| Tabel 3.4 | Tabel pengamatan pertumbuhan relatif kalus pada seleksi <i>in vitro</i> ..... 26   |
| Tabel 3.5 | Tabel pengamatan hasil analisis RAPD 27  |
| Tabel 4.1 | Persentase kalus hidup pada seleksi <i>in vitro</i> ..... 32   |
| Tabel 4.2 | Pengaruh interaksi antara kalus <i>Z. mays</i> varietas Talango dan Manding dengan konsentrasi NaCl terhadap penambahan berat kalus ..... 34 |
| Tabel 4.3 | Hasil Analisis RAPD varietas Talango dan Manding ..... 41  |



## DAFTAR LAMPIRAN

|  | Halaman |
|--|---------|
| Lampiran 1: Tabel Pembuatan Larutan Stok untuk Medium MS (Murashige and Skoog) ..              | 55      |
| Lampiran 2: Skema Pembuatan Medium MS <sub>0</sub> dengan Penambahan Zat Pengatur Tumbuh ..... | 57      |
| Lampiran 3: Skema Penelitian .....   | 59      |
| Lampiran 4: Deskripsi <i>Z. mays</i> Varietas Talango ...                                      | 61      |
| Lampiran 5: Deskripsi <i>Z. mays</i> Varietas Manding ...                                      | 63      |
| Lampiran 6: Data Pengamatan Utama .....  | 65      |



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tanaman jagung (*Zea mays*) merupakan suatu tanaman yang multiguna. Selain dimanfaatkan sebagai makanan pokok jagung juga banyak sekali dimanfaatkan sebagai bahan baku industri makanan, industri kimia, industri farmasi, dan pakan ternak. Di Indonesia *Z. mays* merupakan komoditas sereal yang berada diposisi ke dua setelah padi sebagai makanan pokok, sedangkan di dunia berada pada posisi ketiga setelah padi dan gandum. Sebagai gambaran, produksi jagung nasional mengalami peningkatan setiap tahunnya, namun kenyataannya hingga kini belum mampu memenuhi kebutuhan domestik sekitar 11 juta ton/tahun, sehingga masih melakukan import dalam jumlah besar yaitu 1 juta ton/tahun (Mejaya *et al.*, 2005). Dalam 20 tahun kedepan, penggunaan *Z. mays* diperkirakan terus meningkat dan bahkan setelah tahun 2020 lebih dari 60% dari total kebutuhan nasional (Departemen Pertanian, 2005). Peningkatan kebutuhan tersebut akan semakin sulit untuk dipenuhi mengingat semakin berkurangnya lahan pertanian akibat adanya konversi lahan. Dilain pihak, peningkatan produksi dengan cara ekstensifikasi lahan atau pembukaan lahan pada area hutan memungkinkan terjadinya kerusakan ekosistem.

Peningkatan produksi dapat dipecahkan dengan memanfaatkan lahan marginal. Lahan marginal di Indonesia terdiri atas lahan pasang surut, lahan salin, gambut, dan lahan-lahan yang berada di dekat areal pertambangan (Yuniati, 2004). Indonesia sebagai negara kepulauan yang berjumlah 17.508 pulau, mempunyai wilayah pantai cukup luas dengan aneka manfaat bagi kehidupan manusia (Gunadi, 2002). Menurut Badan Informasi Geospasial (BIG), Indonesia memiliki total panjang garis pantai sebesar 99.093 Km (Samantha, 2013) sehingga memiliki potensi besar untuk menambah luasan area pertanian. Namun seperti kita ketahui bahwa lahan marginal merupakan

suatu lahan yang mempunyai karakteristik keterbatasan dalam suatu hal, baik keterbatasan satu unsur atau komponen maupun lebih dari satu unsur atau komponen. Keterbatasan dalam pemanfaatan lahan marginal daerah pantai yakni memiliki kandungan salinitas yang tinggi.

Menurut Flowers *dalam* Balkrishna dan Shankarrao (2013), salinitas merupakan salah satu faktor pembatas utama yang berpengaruh terhadap pertumbuhan dan produktivitas tanaman di seluruh dunia. Konsentrasi salinitas yang tinggi menyebabkan berbagai masalah pertanian yang cukup serius yaitu dapat mengurangi produktivitas dari tanaman pertanian (Tuteja dan Mahajan, 2005). Tanaman *Z. mays* memiliki sensitivitas yang cukup tinggi terhadap kondisi salin. Kondisi garam tinggi akan berpengaruh terhadap perubahan fisiologis, biokimia, dan genetik pada tanaman (Dajic, 2006). Berdasarkan hal tersebut maka perlu dikembangkan tanaman jagung yang tahan terhadap cekaman salinitas, salah satunya adalah dengan melakukan seleksi *in vitro* ketahanan *Z. mays* terhadap kondisi salinitas tinggi. Menurut Queiros *et al.* (2007), kultur *in vitro* merupakan suatu teknik yang digunakan untuk mengevaluasi pengaruh salinitas dan memilih varietas dari spesies tanaman yang toleran cekaman salinitas. Pemilihan teknik *in vitro* dalam penelitian ini dikarenakan seleksi *in vitro* mampu meminimalisir faktor lingkungan yang tidak diinginkan, dengan kondisi yang lebih homogen. Penciptaan kondisi yang homogen dapat meningkatkan validitas percobaan. Dengan dilakukannya seleksi *in vitro* diharapkan akan dapat meningkatkan status ketahanan dari tanaman jagung.

Proses seleksi dilakukan pada tahap pembentukan kalus yang berasal dari eksplan yang diinokulasi. Hal ini dikarenakan dalam tahap pembentukan kalus memungkinkan terjadinya keragaman genetik yang tinggi. Keragaman yang muncul pada tahap pengkalusan disebabkan oleh terganggunya siklus pembelahan sel. Lebih jauh, kondisi ini mengakibatkan terjadinya proses *rearrangement* pada susunan gennya. Kalus yang dapat bertahan pada kondisi cekaman salinitas selanjutnya akan dianalisis

keragamannya. Menurut Karp *et al.* dalam Balkrishna dan Shankarrao (2013), metode pilihan dalam mempertimbangkan variasi genetik alami dan akibat seleksi cekaman lingkungan dapat dilakukan dengan menggunakan teknologi marka molekuler pada tingkat genetik. Teknik RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) merupakan analisis marka molekuler yang sederhana, cepat, mudah dilakukan dan membutuhkan sedikit DNA dari kalus yang toleran (Williams *et al.*, dalam Balkrishna dan Shankarrao, 2013). Oleh karena itu, diharapkan teknik ini dapat digunakan untuk mengetahui perbedaan antara varietas yang telah terinduksi gen ketahanannya terhadap salinitas dan yang tidak terinduksi.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Rumusan masalah dalam penelitian seleksi *in vitro* tanaman jagung (*Zea mays* L.) varietas Talango dan Manding terhadap cekaman salinitas yaitu :

1. Bagaimana tingkat ketahanan varietas Talango dan Manding pada kondisi salinitas tinggi.
2. Bagaimana keragaman genetik galur hasil seleksi *in vitro*.

## **1.3 Batasan Masalah**

Batasan masalah dalam penelitian seleksi *in vitro* tanaman Jagung (*Zea mays* L.) varietas Talango dan Manding terhadap cekaman salinitas yaitu:

1. Eksplan yang digunakan pada penelitian ini hanya tanaman *Z. mays* varietas Talango dan Manding yang berasal atau ditanam di Sumenep.
2. Pemberian cekaman salinitas dilakukan pada saat kalus telah berhasil diinduksi.
3. Primer yang digunakan dalam analisis RAPD terlihat pada tabel 3.2.

#### **1.4 Tujuan**

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian seleksi *in vitro* tanaman Jagung (*Zea mays* L.) varietas Talango dan Manding terhadap cekaman salinitas yakni:

1. Menguji pengaruh tingkat ketahanan varietas Talango dan Manding pada kondisi salinitas tinggi.
2. Mengetahui keragaman genetik galur hasil seleksi *in vitro*.

#### **1.5 Manfaat**

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Galur hasil seleksi dapat digunakan secara lebih lanjut dalam perakitan varietas tahan salinitas yakni sebagai tetua persilangan.
2. Memberikan informasi yang dapat dimanfaatkan sebagai hasil antara untuk penelitian pengembangan marka molekuler pada tanaman jagung lokal Indonesia dengan teknik RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*).

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

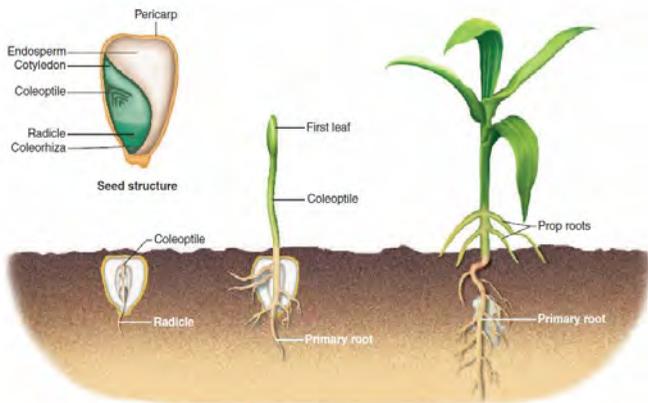
### 2.1 Jagung (*Zea mays* L.)

#### 2.1.1 Klasifikasi Tanaman Jagung (*Zea mays* L.)

Tanaman jagung merupakan tanaman tingkat tinggi. Tanaman ini dalam sistematika tumbuhan diklasifikasikan sebagai berikut :

Regnum : Plantae  
Divisio : Spermatophyta  
Sub Divisio : Angiospermae  
Classis : Monocotyledone  
Ordo : Graminae  
Familia : Graminaceae  
Genus : *Zea*  
Spesies : *Zea mays* L.

(Rukmana, 2009).



Gambar 2.1 Benih dan Perkecambahan Tanaman Monokotil: *Z. mays* (Levetin & McMahon, 2008).

### 2.1.2 Distribusi dan Syarat Tumbuh Tanaman Jagung (*Zea mays* L.)

Tanaman *Z. mays* termasuk jenis tanaman semusim yang tergolong dalam famili graminaceae dan berbiji tunggal (monokotil). Tanaman *Z. mays* berasal dari benua Amerika yang tumbuh sekitar 4.500 tahun lalu di pegunungan Andes, Amerika Selatan. Tanaman *Z. mays* disebarluaskan oleh orang Portugal ke Asia termasuk Indonesia sekitar 400 tahun yang lalu. Pusat pertanaman jagung di benua Asia terdapat di acaina, Filipina, India, dan Indonesia (Rukmana & Yudirachman, 2007). Akar tanaman *Z. mays* dapat tumbuh dan berkembang dengan baik pada kondisi tanah yang sesuai untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman.

Secara umum, tanama *Z. mays* dapat tumbuh di dataran rendah sampai dataran tinggi  $\pm 1300$  m dpl (di atas permukaan laut) dengan kisaran suhu antara  $13^{\circ}\text{C}$ - $38^{\circ}\text{C}$  dan dapat sinar matahari penuh. Di Indonesia tanaman *Z. mays* tumbuh dan berproduksi optimum di dataran rendah sampai ketinggian 750 m dpl. Di pulau Jawa dan Madura sekitar 90% dari luas penanaman *Z. mays* terletak dibawah ketinggian 750 m dpl. Suhu ideal untuk perkecambahan benih adalah  $30^{\circ}\text{C}$ - $32^{\circ}\text{C}$ , sedangkan selama masa pertumbuhannya membutuhkan suhu optimum antara  $23^{\circ}\text{C}$ - $27^{\circ}\text{C}$ . Curah hujan yang ideal untuk tanaman *Z. mays* antara 100 mm-200 mm per bulan. Curah hujan paling optimum sekitar 100 mm-125 mm per bulan. Tanaman *Z. mays* toleran terhadap reaksi keasaman tanah pada kisaran pH 5,5-7,0. Tingkat keasaman tanah yang paling baik untuk tanaman jagung adalah pH 6,8 (Rukmana, 2009). Menurut Rochani (2007), *Z. mays* dapat tumbuh disemua jenis tanah, namun sifat tanah yang paling baik untuk tumbuh yakni memiliki drainase baik, subur dengan humus dan pupuk. Tanah yang subur mampu mempengaruhi produksi *Z. mays* dengan baik. Hal tersebut dikarenakan tanaman *Z. mays* membutuhkan unsur hara terutama nitrogen (N), fosfor (P) dan kalium (K) dalam jumlah yang banyak (Murni & Arif, 2008).

Selain itu, syarat tumbuh *Z. mays* yakni tumbuh pada tanah non salin. Hal ini dikarenakan, *Z. mays* merupakan salah satu tanaman yang cukup sensitif bahkan dianggap paling sensitif jika dibandingkan dengan tanaman sereal lain (Maas & Hoffman dalam Balkrishna & Shankarrao, 2013). Tanah non salin memiliki konduktivitas 0-2 dS/m (Abrol *et al.*, dalam Kusmiyati *et al.*, 2009), sedangkan kemampuan tumbuh *Z. mays* berdasarkan nilai konduktivitasnya sebesar 1,7 dS/m (Tanji & Kielen, 2002).

### **2.1.3 Morfologi dan Penggolongan Tanaman Jagung (*Zea mays* L.)**

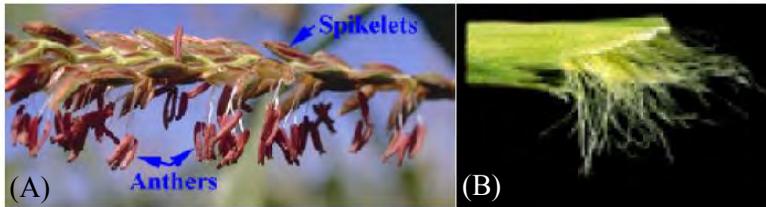
*Z. mays* termasuk tanaman yang memiliki akar serabut. Akar serabut tanaman *Z. mays* terdiri atas tiga macam akar yakni : akar adventif, akar penyokong, dan akar seminal. Akar adventif merupakan akar yang tumbuh relatif dangkal dengan percabangan amat lebat dan berfungsi sebagai penyerap zat hara pada tanaman (Purwono & Hartono, 2008). Akar penyokong memberikan tambah topangan untuk tumbuh tegak dan membantu penyerapan unsur hara. Akar penyokong ini tumbuh diatas permukaan tanah (Rubatzky & Yamaguchi, 1998). Sedangkan akar seminal merupakan akar yang tumbuh ke bawah pada saat biji berkecambah. Akar seminal terdiri dari akar radikal atau akar primer dan sejumlah akar lateral yang muncul sebagai akar adventitious (Irfan, 1999). Perkembangan akar *Z. mays* (kedalaman dan penyebarannya) bergantung pada varietas, pengolahan tanah, fisik dan kimia tanah, keadaan air tanah, dan pemupukan (Smith *et al.*, 1995).

Batang tanaman *Z. mays* tidak bercabang, berbentuk silindris, dan terdiri atas sejumlah ruas dan buku ruas. Pada buku ruas terdapat tunas yang berkembang menjadi tongkol. Dua tunas teratas berkembang menjadi tongkol yang produktif. Batang memiliki tiga komponen jaringan utama yaitu epidermis (kulit), jaringan pembuluh, pusat batang (*pith*). Jaringan pembuluh tertata dalam lingkaran konsentris dengan kepadatan pembuluh yang

tinggi, dan lingkaran-lingkaran menuju perikarp dekat epidermis. Kepadatan pembuluh berkurang begitu mendekati pusat batang. Konsentrasi jaringan pembuluh yang tinggi terletak di bawah epidermis menyebabkan batang tahan rebah. *Z. mays* yang mempunyai batang kuat memiliki lebih banyak lapisan jaringan sklerenkim berdinding tebal di bawah epidermis batang dan sekeliling jaringan pembuluh (Paliwal, 2000).

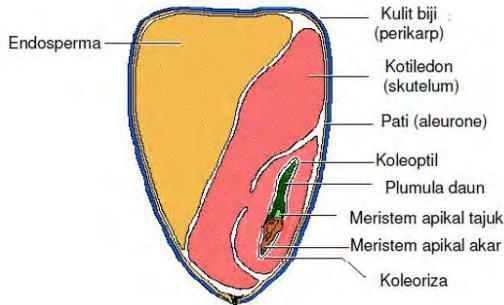
Pada tanaman *Z. mays*, setiap daun terdiri atas helain daun, ligula, dan pelepah daun yang melekat di batang. Jumlah daun sama dengan jumlah buku batang. Umumnya jumlah daun berkisar antara 10-18 helai. Munculnya setiap daun yang terbuka sempurna rata-rata memiliki waktu sekitar 3-4 hari. Jumlah daun tanaman *Z. mays* yang hidup di daerah tropis mempunyai jumlah daun yang relatif lebih banyak jika dibandingkan dengan daerah beriklim sedang (*temperate*) (Paliwal, 2000).

Tanaman *Z. mays* menghasilkan bunga dalam bentuk spikelets. Bunga jantan berbentuk malai pada tangkai bunga utama. Sedangkan spikelets betina dihasilkan dari suatu cabang yang dimodifikasi dari tunas sisi. Bunga betina menghasilkan suatu poros yang menebal disebut tongkol dan ditutupi oleh sejumlah kelobot yang telah mengalami modifikasi (Singh, 1987). Pada bunga betina terdapat sejumlah rambut yang ujungnya membelah dua dan jumlahnya cukup banyak (sesuai dengan jumlah biji yang ada dalam tongkol) (Warisno, 1998). Bunga *Z. mays* termasuk bunga tidak lengkap karena tidak memiliki petal dan sepal. Bunga *Z. mays* juga termasuk bunga tidak sempurna karena bunga jantan dan betina berada pada bunga yang berbeda (Purwono & Hartono, 2008). Menurut Subekti *et al.* (2008) jagung disebut tanaman berumah satu (monoceous) karena bunga jantan dan bunga betina terdapat dalam satu tanaman.



Gambar 2.2 Bunga Tanaman *Z. mays*: (A) Bunga Jantan, (B) Bunga Betina (Subekti *et al.*, 2008).

Buah *Z. mays* terdiri atas tongkol, biji dan daun pembungkus. Biji *Z. mays* mempunyai bentuk, warna dan kandungan endosperm yang bervariasi, tergantung pada jenisnya. Umumnya biji jagung tersusun dalam barisan yang melekat secara lurus atau berkelok-kelok dan berjumlah antara 8-20 baris biji. Biji jagung terdiri atas tiga bagian utama, yaitu pericarp, berupa lapisan luar yang tipis, berfungsi mencegah embrio dari organisme pengganggu dan kehilangan air, endosperm sebagai cadangan makanan, mencapai 75% dari bobot biji yang mengandung 90% pati dan 10% protein, mineral, minyak, dan embrio (lembaga), sebagai miniatur tanaman yang terdiri atas plumula, akar radikal, skutelum, dan koleoptil (Hardman & Gunsolus, 1998).



Gambar 2.3 Struktur Benih *Z. mays* dan Bagiannya (Subekti *et al.*, 2008).

Menurut BPK *dalam* Cahyani (2010), jenis jagung dapat dibedakan berdasarkan bentuk biji dan masa tanamnya. Jenis jagung berdasarkan masa tanamnya dikelompokkan menjadi tiga golongan yakni berumur pendek (genjah) 75–90 hari, berumur sedang (tengahan) 90–120 hari, dan berumur lebih panjang dari 120 hari. Sedangkan jenis jagung berdasarkan bentuk bijinya dikelompokkan menjadi tujuh jenis, yaitu:

1. *Flour corn* atau *soft corn* (*Z. mays* atau *amulacea* sturt = jagung tepung), mengandung zat pati atau tepung.
2. *Flint corn* (*Z. mays indurata* = jagung mutiara), mempunyai biji dengan warna bersinar dan agak keras. Selain itu banyak digunakan sebagai pakan ternak.
3. *Pop corn* (*Z. mays* atau *enerta* sturt = jagung berondong), bila dipanaskan dapat mengembang.
4. *Sweet corn* (*Z. mays saccharata* = jagung manis), mempunyai kandungan gula tinggi sehingga terasa manis.
5. *Pod corn* (*Z. mays tunica* sturt = jagung bungkus), mahkotanya menyelubungi setiap biji, sedangkan tongkolnya terselubung oleh kelobot sehingga membuat bijinya tidak tampak.
6. *Waxy corn* (*Z. mays ceratina* Kulesch) memiliki warna jernih seperti lilin.

7. *Dent corn* (*Z. mays indentata* = jagung gigi kuda), memiliki bentuk seperti gigi kuda, hal ini terjadi akibat pengerutan lapisan bertepung saat biji mengering, sedangkan bagian samping biji mengalami pengerasan sehingga bagian tengah atau bagian atas mengalami penyusutan.

## 2.1.4 Karakteristik Varietas Jagung (*Zea mays* L.)

### 2.1.4.1 Talango

*Z. mays* varietas talango merupakan jenis *Z. mays* lokal (Komposit) yang berasal dari Kecamatan Talango, Sumenep. Proses penseleksian dilakukan sejak tahun 2003 dengan metode ear to row (Arifin & Fatmawati, 2011). Metode ear to row merupakan suatu teknik seleksi massa yang telah dimodifikasi. Seleksi ear to row ialah seleksi tongkol ke baris dan membutuhkan dua musim. Sesuai dengan namanya maka seleksi ini digunakan untuk tanaman *Z. mays* yang memiliki tongkol (Kristiari *et al.*, 2013). *Z. mays* varietas Talango, memiliki umur yang genjah (berumur pendek) yakni waktu berbunga 40-43 hari setelah tanam, keluar rambut 42-50 hari, masak fisiologis 75 hari. Tinggi tanaman 159,55 cm dengan bentuk batang kecil (diameter 2,1-2,4 cm) serta tahan rebah. Tipe biji mutiara dan berwarna kuning. Memiliki ketahanan penyakit terhadap bulai. Potensi hasil produksi dari varietas Talango sebesar 3,92 ton/ha (Arifin & Fatmawati, 2011).



Gambar 2.4 Penampilan Biji dan Tongkol Varietas Talango (Arifin *et al.*, 2010).

#### 2.1.4.2 Manding

Tanaman *Z. mays* varietas Manding termasuk dalam jenis *Z. mays* lokal (komposit). Berasal dari Kecamatan Manding, Sumenep yang diseleksi tahun 2003 menggunakan metode *Ear To Row*. Umur varietas ini bersifat genjah (berumur pendek) yakni waktu berbunga 38-42 hari, keluar rambut 39-45 hari. Varietas Manding memiliki tinggi tanaman sebesar 106,9 cm dengan batang kecil berdiameter 1,0-1,75 cm dan tahan rebah. Biji varietas Manding bertipe mutiara dan berwarna kuning. Mampu bertahan terhadap penyakit bulai. Potensi hasil produksi dari varietas Manding sebesar 2,94 ton/ha (Arifin & Fatmawati, 2011).



Gambar 2.5 Penampilan Biji dan Tongkol Varietas Manding (Arifin *et al.*, 2010).

## 2.2 Cekaman Salinitas dan Pengaruhnya Terhadap Tanaman Jagung (*Zea mays* L.)

Cekaman pada tanaman didefinisikan sebagai faktor eksternal yang memberikan pengaruh buruk terhadap pertumbuhan, produktivitas, kapasitas reproduksi atau ketahanan hidup (Rhodes *et al. dalam* Morkunas *et al.*, 2014). Sedangkan salinitas menurut Yuniati (2004), garam terlarut dalam tanah dengan konsentrasi yang berlebih. Menurut Haryadi & Yahya *dalam* Nugraheni *et al.* (2003), definisi salinitas adalah terdapatnya garam-garam dalam konsentrasi yang berlebihan, sehingga menekan pertumbuhan tanaman. Penekanan ini dikarenakan oleh konsentrasi total garam terlarut, bukan pengaruh

garam tertentu. Macam garam hanya berpengaruh kecil terhadap pertumbuhan. Cekaman salinitas merupakan suatu cekaman lingkungan yang berpengaruh terhadap produksi tanaman (Wang *et al.*, dalam Tuteja & Mahajan, 2005). Penghambatan produksi tanaman akibat salinitas disebabkan karena terjadinya perubahan diberbagai proses fisiologis dan metabolisme, tergantung pada tingkat keparahan cekaman dan lama waktu cekaman (Rozema *et al.*, dalam Gupta & Huang, 2014).

Menurut Yuniati (2004), Tingginya konsentrasi salinitas akan menyebabkan terjadinya hipertonic dan hiperosmotik pada jaringan sehingga tanaman akan mengalami kematian. Pada awalnya salinitas tanah diketahui sebagai penekan pertumbuhan tanaman dalam bentuk cekaman osmotik yang kemudian diikuti dengan keracunan ion (Rahnama *et al.*, dalam Gupta & Huang, 2014). Terjadinya cekaman salinitas ini diakibatkan adanya akumulasi garam yang berasal dari penyimpanan garam asal bahan induk, pergerakan air laut, atau evaporasi yang tinggi dengan curah hujan yang rendah. Pada umumnya bentuk garam yang dominan pada cekaman salinitas adalah Natrium Klorida (NaCl) (Tuteja & Mahajan, 2005).

Akumulasi garam sering terjadi akibat kekeringan pada musim kemarau pada lahan-lahan pertanian (Tuteja & Mahajan, 2005), sehingga menyebabkan kerugian besar bagi tanah pertanian dan produktivitasnya. Selain itu, kerugian tersebut disebabkan karena beberapa tanaman yang penting secara ekonomis sangat sensitif terhadap tanah dengan kandungan garam tinggi. Beberapa tanaman tersebut adalah padi (*Oryza sativa*), jagung (*Zea mays*), kedelai (*Glycine max*) dan kacang hijau (*Phaseolus vulgaris*). Tanaman yang sensitif salinitas biasa disebut sebagai glychophytes, sedangkan yang tahan akan salinitas disebut halophytes (Munns *et al.*, dalam Gupta & Huang, 2014).

Berubahnya konsentrasi garam dalam tanah akan berpengaruh terhadap sifat fisik dan kimia tanah yakni tekanan

osmotik yang meningkat, peningkatan potensi ionisasi, infiltrasi tanah menjadi buruk, terjadinya kerusakan dan terganggunya struktur tanah, menurunnya permeabilitas tanah dan konduktivitas (Sigalingging *dalam* Sipayung, 2003). Menurut Tuteja & Mahajan (2005), terjadinya deposisi garam pada tanah akan mengakibatkan zona potensi air dalam tanah rendah sehingga tanaman akan susah untuk mendapatkan air dan unsur hara.

Menurut Nassery, Ogata dan Maas *dalam* Basri (1991), pengaruh salinitas dapat menekan proses pertumbuhan tanaman dengan efek yang menghambat pembesaran dan pembelahan sel, produksi protein serta penambahan biomassa tanaman. Pada tanah dengan tingkat salinitas tinggi dapat menunjukkan gejala pertumbuhan seperti pertumbuhan yang tidak normal (daun mengering dibagian ujung dan gejala klorosis). Hal tersebut dikarenakan menurunnya potensial larutan tanah sehingga tanaman kekurangan air. Kandungan NaCl pada tanah yang semakin meningkat akan meningkatkan tekanan osmotik dan daya tahan listrik tanah. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan pengaruh cekaman salinitas terhadap dua kultivar tanaman *Z. mays* yakni Giza 2 dan Trihibryd 321 menunjukkan pengaruh terhadap menurunnya berat basah, berat kering, dan laju pertumbuhan relatif tunas dan akar tanaman *Z.mays* (Mansour *et al.*, 2005).

### **2.3 Mekanisme Toleransi Tanaman Terhadap Cekaman Salinitas**

Pada kondisi cekaman salinitas, tanaman akan mengembangkan berbagai mekanisme pertahanan diri untuk mempertahankan produktivitas tanaman (Ashraf & Foolad, 2007). Menurut Dordipour *et al.* (2004), pengaruh salinitas tergantung pada fase pertumbuhan saat tanaman terkena cekaman. Selain itu, jenis tanaman dan varietas memiliki ketahanan yang bervariasi terhadap salinitas. Mekanisme toleransi tanaman terhadap cekaman salinitas meliputi mekanisme morfologi dan fisiologi.

Mekanisme toleransi secara morfologi dapat dilakukan dengan cara mengurangi jumlah daun untuk memperkecil kehilangan air dari tanaman dan terjadi perubahan struktur khusus seperti penebalan dinding sel untuk mempertahankan keseimbangan air tanaman (Soepandie, 2003). Menurut Harjadi & Yahya *dalam* Sipayung (2003), perubahan struktur akibat cekaman salinitas mampu memperbaiki keseimbangan air tanaman sehingga potensial air dalam tanaman dapat mempertahankan turgor dan seluruh proses biokimia untuk pertumbuhan dan aktivitas yang normal. Perubahan tersebut meliputi ukuran daun yang lebih kecil, stomata yang lebih kecil per satuan luas daun, peningkatan sukulensi, penebalan kutikula dan lapisan lilin pada permukaan daun, serta lignifikasi akar yang lebih awal.

Mekanisme toleransi secara fisiologis dapat dilakukan dengan pengaturan potensial osmosis (*osmoregulasi*) dimana tanaman yang tahan terhadap salinitas mampu melakukan penyesuaian dengan menurunkan potensial osmosis tanpa harus kehilangan turgor (Basri *dalam* Sipayung, 2003).

Pada penelitian Mansour *et al.* (2005), mekanisme toleransi yang dilakukan tanaman *Z.mays* terhadap cekaman salinitas adalah dengan meningkatkan akumulasi prolin dan glycine betaine. Akumulasi prolin seperti yang telah banyak diketahui merupakan langkah pengurangan efek cekaman salinitas (Saxena *dalam* Gupta & Huang, 2014). Prolin intraseluler yang diakumulasi selama cekaman salinitas tidak hanya untuk toleransi tapi juga menyediakan cadangan nitrogen organik sebagai bentuk toleransi terhadap cekaman (Gupta & Huang, 2014). Glycine betaine bersifat tidak beracun pada sel melainkan menaikkan tingkat osmolaritas sel selama masa cekaman. Glycine betaine juga melindungi sel untuk menyesuaikan osmotik sel, stabilitas protein, dan melindungi bagian-bagian proses fotosintesis dari kerusakan akibat cekaman dan mereduksi ROS (Gupta & Huang, 2014).

## 2.4 Seleksi *In Vitro*

Teknik *in vitro* merupakan teknik yang sering diaplikasikan untuk perbaikan karakter tanaman seperti karakter ketahanan tanaman. Pada kultur *in vitro* teknik yang sering digunakan untuk perbaikan karakter tanaman adalah seleksi *in vitro* dan variasi somaklonal. Menurut Predieri *dalam* Sujatmiko *et al.* (2012), seleksi *in vitro* adalah seleksi yang dilakukan terhadap eksplan pada kultur *in vitro* menggunakan elisitor. Sedangkan menurut Purmaningsih & Mariska (2005), seleksi *in vitro* merupakan salah satu metode dari keragaman somaklonal (variasi somaklonal), namun lebih efektif dan efisien. Hal ini dikarenakan perubahan genetik yang terjadi lebih diarahkan pada sifat yang diinginkan dengan menggunakan agen seleksi pada media kultur atau dengan memberikan kondisi tertentu untuk merubah karakter somaklonal yang dibutuhkan (Karp *dalam* Lestari, 2006). Metode tersebut telah banyak dimanfaatkan untuk memperoleh varian-varian tanaman yang resisten terhadap herbisida dan cekaman lingkungan. Beberapa keunggulan menggunakan seleksi *in vitro* yaitu tidak terlalu dipengaruhi faktor lingkungan, memungkinkan dilakukannya seleksi pada tingkat sel dengan satu faktor tunggal (Wenzel & Foroughi-Wehr *dalam* Purmaningsih & Mariska, 2005).

Variasi somaklonal didefinisikan sebagai keragaman genetik dari tanaman yang dihasilkan melalui kultur sel, baik sel somatik seperti sel daun, akar, batang, dan sel gamet (Kadir *dalam* Yunita, 2009). Menurut Skirvin *et al. dalam* Yunita (2009), variasi somaklonal keragaman genetik yang dihasilkan melalui kultur jaringan. Keragaman ini dapat muncul akibat penggandaan dalam kromosom (fusi, endomitosis), perubahan jumlah kromosom, perubahan struktur kromosom, perubahan gen, dan perubahan sitoplasma (Kumar & Matur *dalam* Yunita, 2009).

Pada berbagai tanaman seleksi *in vitro* telah terbukti dapat menghasilkan varietas baru yang tahan dan sifat tersebut dapat wariskan pada keturunannya. Mutasi atau perubahan karakter

yang diwariskan dapat terbentuk pada fase sel bebas maupun kalus pada tahap kultur *in vitro* atau pada eksplan karena adanya sel-sel bermutasi pada jaringan tertentu (Mariska *et al.*, 2001).

## **2.5 Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD)**

Penanda molekuler merupakan teknik yang efektif dalam analisis genetik dan telah diaplikasikan secara luas dalam program pemuliaan tanaman (Karsinah *et al.*, 2002). Salah satu marka molekuler berbasis PCR yang banyak digunakan dalam mengidentifikasi keragaman pada tingkat intraspesies dan antarspesies yakni RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Jena & Das *dalam* Pharmawati, 2009). Menurut Khanam *et al.* (2012), RAPDs merupakan proses amplifikasi fragmen DNA secara acak oleh primer sintetik (biasanya 10 bp) dan menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dalam prosesnya.

Selain RAPD, terdapat beberapa analisis keragaman genetik, diantaranya RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), ISSR (*Inter-simple Sequence Repeat*), SSR (*Simple Sequence Repeat*) (Williams *et al.*, *dalam* Balkrishna & Shankarrao, 2013). Keunggulan teknik RAPD dibandingkan dengan teknik lainnya yaitu kuantitas DNA yang dibutuhkan sedikit, hemat biaya, mudah dipelajari, dan primer yang diperlukan mudah didapatkan karena telah tersedia secara komersial (Azrai, 2005). Selain itu, teknik ini memberikan hasil yang lebih cepat dibandingkan dengan teknik molekuler lainnya. Teknik ini juga mampu menghasilkan jumlah karakter yang relatif tidak terbatas, sehingga sangat membantu untuk keperluan analisis keragaman organisme yang tidak diketahui latar belakang genomnya (Bardakci, 2001).

Teknik RAPD telah banyak diaplikasikan dalam kegiatan pemuliaan tanaman, antara lain analisis keragaman genetik plasma nuftah tanaman (padi, kapas, dan jeruk mandarin) dan analisis populasi genetik tanaman (kakao, kelapa sawit, dan

kelapa) (Azrai, 2005). Menurut Surahman *et al.* (2007), keberhasilan proses amplifikasi DNA dapat dipengaruhi oleh konsentrasi DNA cetakan, konsentrasi magnesium, konsentrasi Taq DNA polimerase, konsentrasi primer dan dNTPs, suhu annealing, waktu dan jumlah siklus tertentu. Selain itu, dapat pula ditentukan oleh primer yang baik. Syarat primer yang baik, diantaranya bebas dari kemungkinan terjadinya primer-dimer dan formasi *self complementarity*, serta stabilitas internal yang tepat.

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Biologi ITS dan Laboratorium Molekuler Rumah Sakit Khusus Infeksi UNAIR pada bulan November 2014 sampai dengan Juli 2015.

#### **3.2 Metode yang Digunakan**

##### **3.2.1 Tahap Persiapan**

###### **3.2.1.1 Sterilisasi Ruangan**

Semua alat yang akan digunakan dimasukkan kedalam *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC). Sebelum dimasukkan alat disemprot terlebih dahulu dengan alkohol 70%. Selanjutnya dilakukan sterilisasi ruang kerja dengan menyalakan UV lamp pada LAFC selama 2 jam. Kemudian dinyalakan blower LAFC selama 30–60 menit dan disemprot bagian meja kerja LAFC dengan alkohol 70%. Setelah itu dibersihkan menggunakan tissue steril. Prosedur kerja secara aseptis dilakukan di dalam LAFC.

###### **3.2.1.2 Sterilisasi Peralatan**

Sterilisasi peralatan yang dilakukan untuk tiap jenis peralatan dalam kultur jaringan dapat diuraikan sebagai berikut:

###### **A. Botol Kultur**

Botol kultur terlebih dahulu dicuci bersih dan direndam menggunakan larutan chlorox yang dilarutkan kedalam air selama semalam ( $\pm$  24 jam). Setelah itu, dibilas dan disterilisasi menggunakan autolaf dengan suhu 121<sup>o</sup>C tekanan 1,5 atm selama 1 jam. Kemudian disimpan pada rak penyimpanan botol.

###### **B. Alat Gelas**

Proses sterilisasi alat-alat gelas seperti labu ukur, Erlenmeyer, gelas beker, gelas ukur, dan cawan petri dimulai dengan mencuci alat-alat tersebut, lalu dikeringkan, ditutup

menggunakan kertas yellow pages. Setelah itu dioven dengan suhu 80°C selama 2 jam. Untuk cawan Petri, di autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 1,5 atm selama 60 menit.

### C. Peralatan Lainnya

Peralatan lain seperti peralatan diseksi (seperti scalpel, pinset, spatula, gunting, dll), *magnetic stirrer*, dan sendok dicuci dan dikeringkan. Kemudian untuk peralatan diseksi dibungkus dengan *yellow pages*. Semua peralatan disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 1,5 atm selama 60 menit.

Sebelum dimasukkan kedalam LAFC, semua peralatan terlebih dahulu disemprot menggunakan alkohol 70% dan pembungkus dibuka didalam LAFC. Saat memulai dan dalam proses bekerja, alat diseksi yang digunakan (skalpel dan pinset) dicelupkan kedalam alkohol 96% dan dilewatkan diatas api bunsen.

#### 3.2.1.3 Sterilisasi Medium

Botol kultur yang telah berisi medium dalam kondisi botol tertutup disterilisasi. Proses sterilisasi dilakukan dengan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 1,5 atm selama 20 menit. Setelah itu, medium disimpan diruang inokulasi.

#### 3.2.1.4 Sterilisasi Eksplan

Proses sterilisasi eksplan benih *Z. mays* varietas Talango dan Manding dilakukan dengan beberapa tahapan yakni:

1. Dicuci di air mengalir selama 15 menit.
2. Direndam dalam air yang telah dicampur dengan sabun cair dan diputar menggunakan *magnetic stirrer* pada *hot plate magnetic stirrer* selama 30 menit. Setelah itu, dibilas menggunakan aquabides steril selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan sterilisasi dalam LAFC.
3. Direndam benih dalam antifungal selama 15 menit. Lalu direndam dengan aquabides steril selama 5 menit.

4. Direndam dalam larutan chlorox 5,25% selama 5 menit. Kemudian direndam dengan aquabides steril selama 7 menit.
5. Tahap terakhir perendaman dilakukan dengan merendam benih dalam alkhoh 70% selama 10 menit dan di rendam dalam aquabides steril selama 7 menit.
6. Semua tahap pensterilan dilakukan sebanyak 2 kali. Kemudian benih jagung siap inokulasi dikeringkan pada cawan petri yang telah diberi kertas saring steril. Selanjutnya dilanjutkan ke tahap inokulasi penginduksian kalus.

### **3.2.2 Tahap Penelitian**

#### **3.2.2.1 Induksi Kalus**

Pada proses induksi kalus medium yang digunakan adalah MS0 dimana dalam media tersebut ditambahkan ZPT yakni 2,4-D dengan konsentrasi 4 ppm. Medium tersebut digunakan dalam penelitian ini berdasarkan penelitian Balkrishna & Shankarrao *et al.* (2013).

Langkah pertama benih yang sudah disterilkan diinokulasi bagian skutelum jagung kedalam botol kultur dengan cara diambil dengan pinset. Pinset dimasukkan ke dalam alkohol 96%, dibakar dengan api bunsen, diletakkan diatas cawan petri steril untuk menunggu dingin (bagian ujung pinset tidak boleh terkena alas meja kerja LAFC). Kemudian diambil, botol kultur dan dibuka tutup plastik botol, dikeluarkan air yang ada didalam botol dengan cara membalikan botol (mulut botol tidak boleh tersentuh meja kerja LAFC). Diputar mulut botol kultur di api bunsen. Selanjutnya di ambil skutelum jagung dan diinokulasi ke dalam botol kultur yang telah berisi medium (diusahakan ujung pinset tidak menyentuh medium). Setelah itu, bagian ujung pinset dibakar di api bunsen dan dicelupkan ke dalam alkohol 96%. Diputar kembali mulut botol kultur pada api bunsen. Di ambil tutup plastik steril, dilewatkan tutup plastik diatas api bunsen (jangan sampai terbakar), ditutupkan pada botol kultur yang telah berisi eksplan. Lalu di ikat rapat dengan menggunakan karet.

Setelah semua proses penginokulasian selesai, botol kultur ditandai menggunakan kertas label yang berisi:

- a) Varietas benih jagung
- b) Tanggal inokulasi
- c) Medium yang digunakan

Setelah eksplan diinokulasi, langkah selanjutnya adalah menyimpan dalam ruang kultur pada kondisi gelap. Kemudian eksplan diinkubasi selama 28 hari pada suhu  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (Balkrishna dan Shankarrao, 2013) dan setiap dua minggu sekali dilakukan subkultur ke medium baru.

### 3.2.2.2 Seleksi *In Vitro*

Setelah kalus terbentuk, kalus disubkultur ke medium seleksi yakni MS0 + ZPT optimal pertumbuhan kalus + konsentrasi NaCl (0, 2500, 5000, dan 7500 ppm) dan diinkubasi selama 28 hari dalam ruang kultur pada kondisi terang. Selanjutnya dilakukan pengamatan pada presentase kalus hidup, dengan rumus (Htwe *et al.* dalam Ubudiyah, 2013):

$$\text{Presentase Kalus Hidup (\%)} = \frac{\text{Jumlah Kalus yang Toleran}}{\text{Jumlah Kalus yang Diinokulasi}} \times 100\%$$

Selain itu, berat kalus juga diukur dengan cara menimbang berat segar kalus sebelum seleksi (*Initial growth*) dan sesudah seleksi kalus (*Final growth*) dengan satuan miligram (mg) untuk mendapatkan data pertambahan berat kalus.

### 3.2.2.3 Pembuatan Agarose 2%

Pembuatan agarose 2% dilakukan dengan mencampurkan bubuk agarose sebanyak 0,8 gram dan larutan TBE 1x sebanyak 40 ml didalam Erlenmeyer. Larutan dipanaskan dan dihomogenkan dengan menggunakan *hot plate magnetic stirrer* hingga bening dan mendidih. Setelah itu suhu larutan dibiarkan

turun dan ditambahkan EtBr sebanyak 7,5  $\mu$ l. Kemudian dituang ke dalam cetakan agar. Agarose dibiarkan hingga memadat.

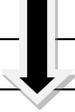
### 3.2.2.4 Ekstraksi DNA dan Analisis RAPD

Proses ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*) 3% dengan beberapa modifikasi sesuai dengan penelitian Saputro (2012). Berikut merupakan tahap proses ekstraksi DNA (gambar 3.1) :

Analisis RAPD dilakukan menurut penelitian Saghai-Marooif *et al.* dalam Balkrishna & Shankarrao (2013) yang telah dimodifikasi. Pada proses ini dicampurkan reaksi sebanyak 25  $\mu$ l (tabel 3.1). Selanjutnya semua reaksi tersebut dicampur. Setelah itu, dilakukan PCR menggunakan PCR *Rotor-Gene Q*. Reaksi PCR diprogram untuk 30 siklus seperti pada gambar 3.2. Selanjutnya produk PCR di visualisasi menggunakan *elektroforesis DNA Mupid-exu submarine electrophoresis system*. Pada teknik elektroforesis menggunakan gel agarose 2% yang ditambahkan 1x buffer Tris-Borat-EDTA (TBE) dan di running pada tegangan 50 volt. Fragmen DNA yang telah terseparasi diwarnai dengan *Ethidium Bromide* (EtBr) dan di dokumentasikan dengan *UV Light Transilluminator Biostep*.

Tabel 3.1 Reaksi pencampuran reagen-reagen untuk proses PCR

| <b>Komponen</b>            |              |
|----------------------------|--------------|
| KAPPA2G Fast ReadyMix (2x) | 12,5 $\mu$ l |
| primer acak                | 1,5 $\mu$ l  |
| ddH <sub>2</sub> O steril  | 10 $\mu$ l   |
| DNA template               | 1 $\mu$ l    |

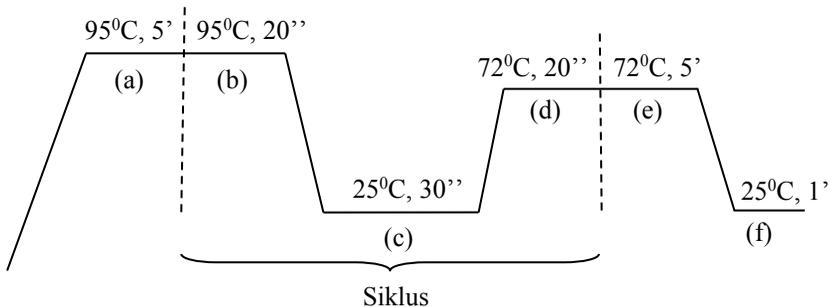


|   |
|---|
| Kalus toleran ditimbang dengan berat 55-80 mg   |
| Dimasukkan kalus kedalam <i>microtube</i> 1,5 ml  |
| Ditambahkan CTAB 3% (200 $\mu$ l) dan digerus sampai halus  |
| Ditambahkan CTAB 3% (300 $\mu$ l) dan divortex  |
| Diinkubasi di <i>Dry Block Heating Thermostat</i> 30 menit pada suhu 55°C   |
| Ditambahkan 500 $\mu$ l CIAA ( <i>chloroform isoamylalcohol</i> ) dan di campur perlahan                                  |
| Dilakukan sentrifugasi menggunakan <i>Refrigerated Benchtop Mikrosentrifuge Kitman-24</i> (15 menit, 12000 rpm, suhu 4°C) |
| Diambil supernatan, dan dipindahkan ke <i>microtube</i> baru  |
| Ditambahkan Amonium Acetat dingin $\pm$ 28 $\mu$ l  |
| Ditambahkan Isopropanol dingin $\pm$ 204 $\mu$ l  |
| Dikocok perlahan dan diinkubasi <i>overnight</i> suhu 4°C   |
| Dilakukan sentrifugasi (5 menit, 12000 rpm, suhu 4°C)   |
| Ditambahkan 700 $\mu$ l etanol 70% dingin dan disentrifugasi (1 menit, 12000 rpm, suhu 4°C)                               |
| Dibuang supernatan pada masing-masing sampel  |
| Ditambahkan 700 $\mu$ l etanol absolut dingin dan disentrifugasi (1 menit, 12000 rpm, suhu 4°C)                           |
| Dibuang supernatan pada masing-masing sampel. Pelet yang terbentuk dikeringanginkan                                       |
| Ditambahkan TE buffer pH 8 (100 $\mu$ l) dan disimpan pada suhu -20°C   |

Gambar 3.1 Tahap Proses Ekstraksi DNA.

Tabel 3.2 Daftar primer dan urutan basa nitrogen yang digunakan untuk analisis RAPD.

| No. | Primer | Urutan Primer (5' – 3') | Jumlah Pasangan Basa |
|-----|--------|-------------------------|----------------------|
| 1   | OPA 02 | TGC CGA GCT G           | 10                   |
| 2   | OPA 10 | GTG ATC GCA G           | 10                   |
| 3   | OPA 13 | CAG CAC CCA C           | 10                   |
| 4   | OPB 07 | GGT GAC GCA G           | 10                   |
| 5   | OPC 02 | GTG AGG CGT C           | 10                   |
| 6   | OPD 08 | GTG TGC CCC A           | 10                   |
| 7   | OPI 01 | ACC TGG ACA C           | 10                   |
| 8   | OPK 20 | GTG TCG CGA G           | 10                   |
| 9   | OPU 19 | GTC AGT GCG G           | 10                   |
| 10  | OPU 20 | ACA GCC CCC A           | 10                   |



Gambar 3.2 Tahap Proses PCR: (a) Denaturasi awal (b) Denaturasi (c) Annealing/Penempelan (d) Elongasi/Ekstensi (e) Elongasi Akhir (f) finishing.

### 3.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dan dilakukan pengulangan 3 kali, sehingga total unit percobaan sebanyak 24 (24 botol kultur). Pengamatan dilakukan selama 28 hari untuk induksi kalus dan 28 hari untuk seleksi *in vitro*.

Berikut ini merupakan tabel rancangan penelitian :

Tabel 3.3 Tabel pengamatan presentase kalus hidup pada seleksi *in vitro*

| <b>Konsentrasi</b><br><b>Varietas</b> | <b>I</b>       | <b>II</b>       | <b>III</b>       | <b>IV</b>       |
|---------------------------------------|----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| <b>Talango</b>                        | T <sub>I</sub> | T <sub>II</sub> | T <sub>III</sub> | T <sub>IV</sub> |
| <b>Manding</b>                        | M <sub>I</sub> | M <sub>II</sub> | M <sub>III</sub> | M <sub>IV</sub> |

Keterangan : I = konsentrasi 0 ppm  
 II = konsentrasi 2500 ppm  
 III = konsentrasi 5000 ppm  
 IV = konsentrasi 7500 ppm

Tabel 3.4 Tabel pengamatan pertumbuhan relatif kalus pada seleksi *in vitro*

| <b>Konsentrasi</b><br><b>Varietas</b> | <b>I</b>       | <b>II</b>       | <b>III</b>       | <b>IV</b>       |
|---------------------------------------|----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| <b>Talango</b>                        | T <sub>I</sub> | T <sub>II</sub> | T <sub>III</sub> | T <sub>IV</sub> |
| <b>Manding</b>                        | M <sub>I</sub> | M <sub>II</sub> | M <sub>III</sub> | M <sub>IV</sub> |

Keterangan : I = konsentrasi 0 ppm  
 II = konsentrasi 2500 ppm  
 III = konsentrasi 5000 ppm  
 IV = konsentrasi 7500 ppm

Tabel 3.5 Tabel pengamatan hasil analisis RAPD

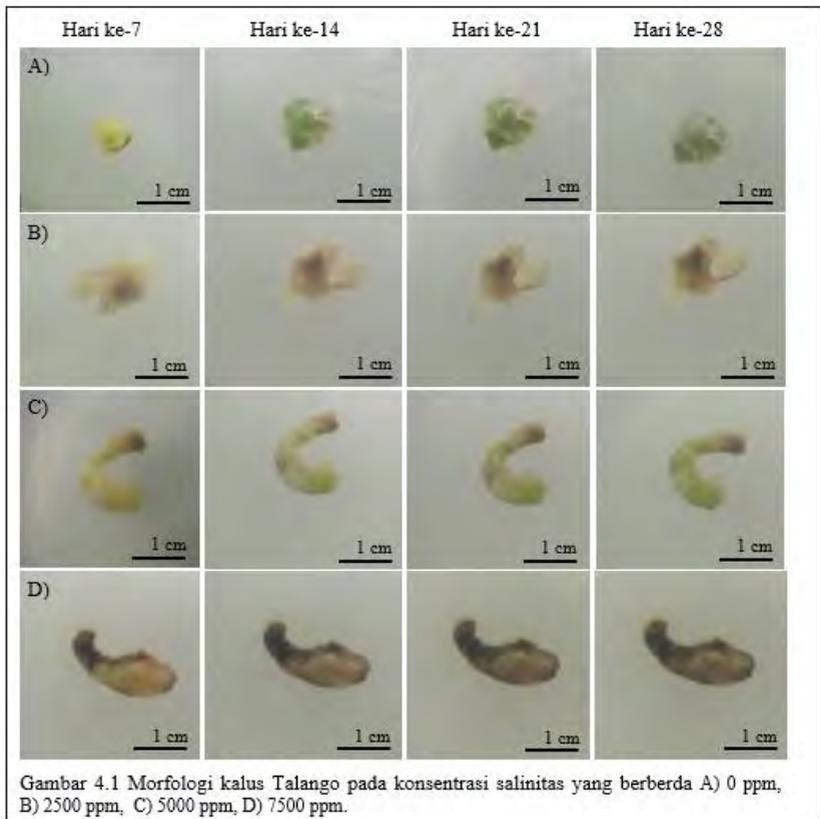
| <b>No.</b> | <b>Primer</b> | <b>Urutan Primer<br/>(5' – 3')</b> | <b>Talango</b>                | <b>Manding</b>                |
|------------|---------------|------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1          | OPA 02        | TGC CGA GCT G                      | Polimorfisme/<br>monomorfisme | Polimorfisme/<br>monomorfisme |
| 2          | OPA 10        | GTG ATC GCA G                      | Polimorfisme/<br>monomorfisme | Polimorfisme/<br>monomorfisme |
| 3          | OPA 13        | CAG CAC CCA C                      | Polimorfisme/<br>monomorfisme | Polimorfisme/<br>monomorfisme |
| 4          | OPB 07        | GGT GAC GCA G                      | Polimorfisme/<br>monomorfisme | Polimorfisme/<br>monomorfisme |
| 5          | OPC 02        | GTG AGG CGT C                      | Polimorfisme/<br>monomorfisme | Polimorfisme/<br>monomorfisme |
| 6          | OPD 08        | GTG TGC CCC A                      | Polimorfisme/<br>monomorfisme | Polimorfisme/<br>monomorfisme |
| 7          | OPI 01        | ACC TGG ACA C                      | Polimorfisme/<br>monomorfisme | Polimorfisme/<br>monomorfisme |
| 8          | OPK 20        | GTG TCG CGA G                      | Polimorfisme/<br>monomorfisme | Polimorfisme/<br>monomorfisme |
| 9          | OPU 19        | GTC AGT GCG G                      | Polimorfisme/<br>monomorfisme | Polimorfisme/<br>monomorfisme |
| 10         | OPU 20        | ACA GCC CCC A                      | Polimorfisme/<br>monomorfisme | Polimorfisme/<br>monomorfisme |

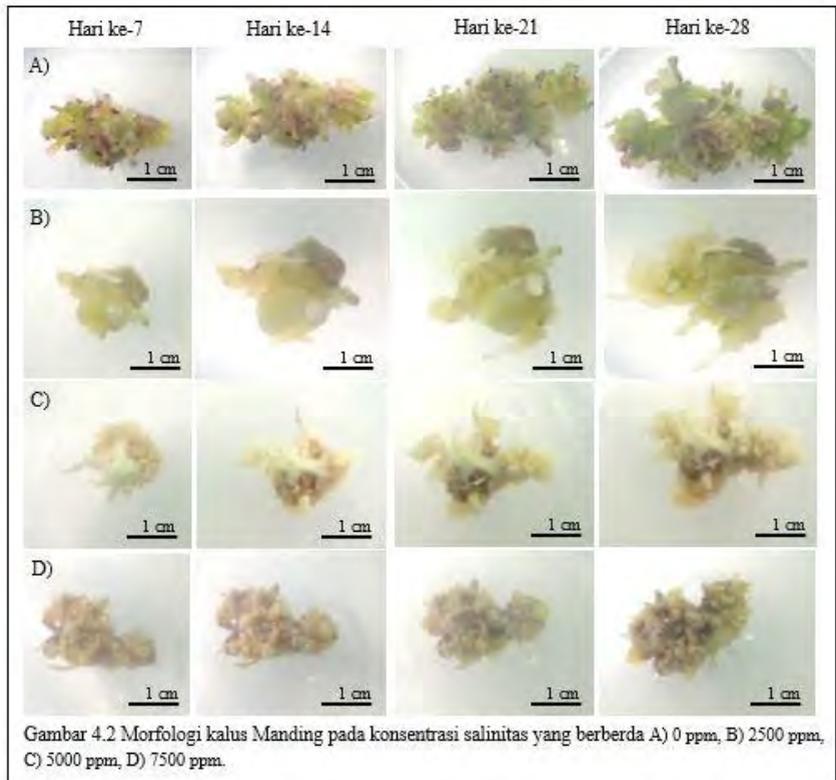
**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Pengaruh Beberapa Konsentrasi Cekaman Salinitas terhadap Morfologi Kalus

Subkultur dilakukan selama 28 hari atau 4 minggu pada medium seleksi yang mengandung NaCl dengan konsentrasi 0, 2500, 5000, dan 7500 ppm. Setiap 7 hari dilakukan pengamatan terhadap perubahan morfologi kalus. Kondisi morfologi kalus dari masing-masing varietas dapat dilihat pada gambar 4.1 dan 4.2 :





Berdasarkan pengamatan yang dilakukan terlihat bahwa terdapat perubahan warna dan tekstur kalus pada medium yang ditambahkan NaCl yakni coklat hingga hitam dan kompak. Perubahan tersebut terjadi pada medium dengan konsentrasi NaCl paling tinggi berbeda dengan kalus tanpa NaCl, dimana memiliki warna lebih hijau. Hal yang sama terjadi pada penelitian Munir & Aftab (2013), dimana kultur kalus tebu yang berada dibawah kondisi tercekam salinitas mengalami pencoklatan (*browning*) dan nekrosis pada konsentrasi salinitas tertinggi. Mekanisme tersebut disebabkan adanya penurunan kandungan klorofil yang dipicu oleh tingginya aktifitas enzim pendegradasi klorofil yakni klorofilase akibat peningkatan garam dilingkungan (Noreen & Ashraf *dalam*

Sevengor *et al.*, 2011). Tingginya kandungan garam menyebabkan penurunan nilai potensial biomolekul seperti klorofil (Shahbaz *et al. dalam* Ashraf & Ashraf, 2012). Induksi salinitas menyebabkan penurunan kandungan klorofil yang berhubungan dengan menurunnya kandungan 5-aminolevulinic acid. 5-aminolevulinic acid berperan sebagai prekursor untuk protochlorophyllide, yang berfungsi sebagai prekursor dalam biosintesis klorofil (Santos *dalam* Ashraf & Ashraf, 2012). Degradasi klorofil pada tanaman yang tercekam salinitas menyebabkan hilangnya phytol, disebabkan oleh meningkatnya aktifitas enzim klorofilase (fang *et al. dalam* Ashraf & Ashraf, 2012). Menurut Sevengor *et al.* (2011), degradasi klorofil dapat dilindungi dengan adanya aktifitas enzim antioksidan yang tinggi. Aktifitas tersebut merupakan salah satu bentuk mekanisme pertahanan terhadap cekaman salinitas (Kusvuran *et al.*, 2012). Warna hitam yang terlihat pada kalus (gambar 4.1 (D)) menunjukkan terjadinya kematian sel. Hal ini dikarenakan molekul NaCl mengalami ionisasi menjadi  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Cl}^-$  yang mengakibatkan peningkatan ion secara berlebihan sehingga terjadi cekaman ion dan mengakibatkan sel-sel kalus mengalami kematian (Farid *et al.*, 2006). Selain itu, peristiwa *browning* terjadi akibat adanya senyawa fenol dimana fenol bersifat racun/toksik bagi sel. pencoklatan jaringan terjadi karena aktivitas enzim oksidase yang mengandung tembaga seperti polifenol oksidase dan tirosinase (Hutami, 2008). *Browning* dapat pula disebabkan adanya mikroorganisme endofitik yang ditemukan dalam jaringan dimana tidak menunjukkan gejala bahwa mereka mungkin bakteri atau ragi (Prittilla *et al.*, 2008).

## **4.2 Pengaruh Cekaman Salinitas terhadap Persentase Kalus Hidup**

Pada penelitian ini, seluruh kalus memberikan respon disetiap perlakuan yang diberikan. Data persentase kalus yang hidup dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Persentase kalus hidup pada seleksi *in vitro*

| Varietas | Konsentrasi NaCl |      |      |       |
|----------|------------------|------|------|-------|
|          | A                | B    | C    | D     |
| Talango  | 100%             | 100% | 100% | 66,7% |
| Manding  | 100%             | 100% | 100% | 100%  |

Keterangan : A = konsentrasi 0 ppm  
 B = konsentrasi 2500 ppm  
 C = konsentrasi 5000 ppm  
 D = konsentrasi 7500 ppm

Berdasarkan tabel diatas terlihat bahwa persentase kalus hidup varietas Talango pada perlakuan 0, 2500, dan 5000 ppm sebesar 100%, namun pada perlakuan 7500 ppm persentase kalus hidupnya sebesar 66,7%. Hal ini sesuai dengan pengamatan morfologi kalus (gambar 4.1), dimana terlihat bahwasanya kalus Talango yang ditumbuhkan pada medium NaCl 7500 ppm, tidak mampu bertahan dalam kondisi cekaman salinitas tertinggi yakni 7500 ppm. Sedangkan kemampuan bertahan kalus Manding sebesar 100% di setiap perlakuan. Perbedaan persentase kalus hidup dalam kondisi tercekam tersebut dapat dipengaruhi oleh berbagai macam mekanisme pertahanan kalus. Beberapa mekanisme toleransi untuk melindungi dari efek cekaman salinitas yakni sintesis zat terlarut organik yang kompatibel seperti prolin, sukrosa, poliol, trehalosa dan QACs (Ashraf and Foolad *dalam* Rai, 2011), homeostatis ion, dan induksi enzim antioksidan (Rai, 2011) sehingga mampu membatasi penyerapan garam dan menyesuaikan tekanan osmotik. Pada penelitian Mansour *et al.* (2005), mekanisme toleransi yang dilakukan tanaman *Z. mays* terhadap cekaman salinitas yakni dengan meningkatkan akumulasi prolin dan glycine betaine pada jaringan. Dimana akumulasi prolin pada kondisi salinitas tinggi berfungsi sebagai penyedia cadangan Karbon dan Nitrogen untuk pertumbuhan, stabilisasi membran, melindungi aktivitas fotosintesis, dan fungsi mitokondria (Kishore *et al. dalam* Rai, 2011). Berdasarkan hal tersebut dapat dikatakan bahwa persentase kalus hidup dengan nilai sebesar 100% dipengaruhi oleh adanya mekanisme toleransi.

### **4.3 Pengaruh Cekaman Salinitas terhadap Pertambahan Berat Kalus**

Pertambahan berat kalus didapat dari perhitungan selisih berat akhir setelah inkubasi 28 hari dengan berat awal sebelum inkubasi. Berdasarkan hasil perhitungan tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi NaCl pertambahan berat kalus semakin kecil yakni kalus Talango dan Manding pada konsentrasi 7500 ppm memiliki berat sebesar 0 dan 170 mg jika dibandingkan dengan kalus yang tumbuh pada medium tanpa NaCl. Sedangkan pertambahan berat kalus kedua varietas pada konsentrasi 2500 dan 5000 ppm juga mengalami penurunan tetapi tidak serendah penurunan pada konsentrasi tertinggi.

Berdasarkan tabel 4.2 kedua varietas menunjukkan respon yang berbeda terhadap cekaman salinitas. Hal ini dapat dilihat dari perbedaan pertambahan berat yang berbeda antara varietas Talango dan varietas Manding, dimana varietas Manding memiliki pertambahan berat lebih besar dibandingkan dengan varietas Talango sehingga dapat dikatakan bahwa Varietas Manding memiliki tingkat ketahanan yang lebih baik terhadap cekaman salinitas dibandingkan dengan varietas Talango. Hal ini disebabkan terganggunya pertumbuhan kalus yang tidak optimal.

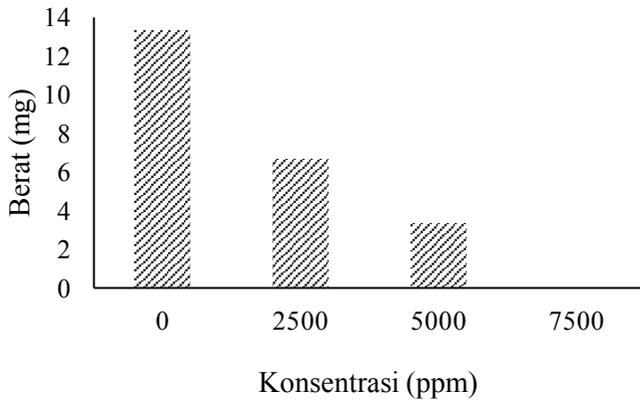
Rendahnya pertambahan berat kalus terjadi seiring dengan tingginya konsentrasi NaCl pada kedua varietas tersebut (gambar 4.3 dan 4.4). Hal ini menunjukkan bahwa kedua varietas yakni Talango dan Manding mampu bertahan pada konsentrasi tertinggi. Hal ini dapat dikatakan bahwa Konsentrasi tertinggi dari penelitian ini belum menjadi konsentrasi lethal bagi kedua varietas. Selain itu, dapat pula diakibatkan karena terjadinya ketidak seimbangan penyerapan air dan hara, serta terhambatnya proses metabolisme. Akibat tingginya konsentrasi garam menyebabkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman terhambat karena banyaknya akumulasi  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Cl}^-$  dalam sitoplasma sehingga memicu perubahan metabolisme dalam sel dan terhambatnya aktivitas enzim. Selain itu, dapat mengakibatkan dehidrasi parsial sel dan hilangnya turgor sel akibat berkurangnya potensial air di dalam sel.

Berlebihnya kandungan  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Cl}^-$  dalam ekstraseluler menghambat asimilasi Nitrogen yakni penyerapan nitrat ( $\text{NO}_3$ ) dimana sangat penting untuk pertumbuhan tanaman (Yuniati, 2004). Pada proses pertumbuhan dan perkembangan, ion  $\text{K}^+$  merupakan unsur penting dan diperlukan dalam jumlah yang cukup besar. Namun dengan kandungan Natrium ( $\text{Na}^+$ ) yang tinggi mengakibatkan ion  $\text{K}^+$  menurun (James et al., 2011). Menurut Tuteja dan Mahajan (2005), fungsi ion  $\text{K}^+$  adalah untuk mempertahankan keseimbangan osmotik, berperan dalam pembukaan dan penutupan stomata. Selain itu, Marschner (2005), menyatakan bahwa tingginya konsentrasi  $\text{NaCl}$  mampu menyebabkan penurunan permeabilitas sel terhadap air dan mengakibatkan menurunnya laju masuknya air ke dalam sel.

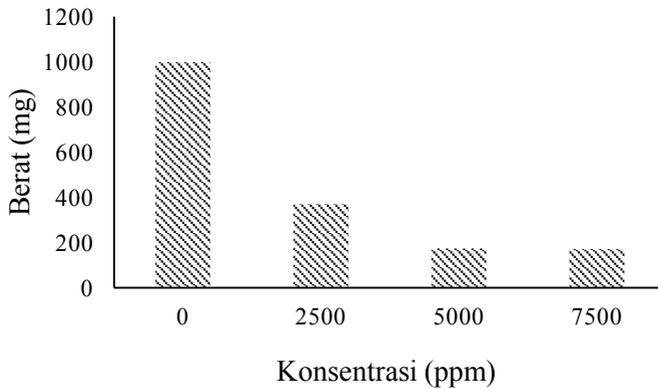
Tabel 4.2 Pengaruh interaksi antara kalus *Z. mays* varietas Talango dan Manding dengan konsentrsi  $\text{NaCl}$  terhadap penambahan berat kalus

| Varietas       | Konsentrasi $\text{NaCl}$ (ppm) | Rata-rata $\pm$ SE |
|----------------|---------------------------------|--------------------|
| <b>Talango</b> | 0                               | 13,33 $\pm$ 1,39   |
|                | 2500                            | 6,67 $\pm$ 1,39    |
|                | 5000                            | 3,33 $\pm$ 1,39    |
|                | 7500                            | 0,00 $\pm$ 0,00    |
| <b>Manding</b> | 0                               | 996,70 $\pm$ 6,22  |
|                | 2500                            | 370,00 $\pm$ 3,81  |
|                | 5000                            | 173,30 $\pm$ 3,67  |
|                | 7500                            | 170,00 $\pm$ 0,00  |

Keterangan : SE (*Standart error*).



Gambar 4.3 Pengaruh interaksi antara kalus *Z. mays* varietas Talango dengan konsentrasi NaCl terhadap pertambahan berat kalus.

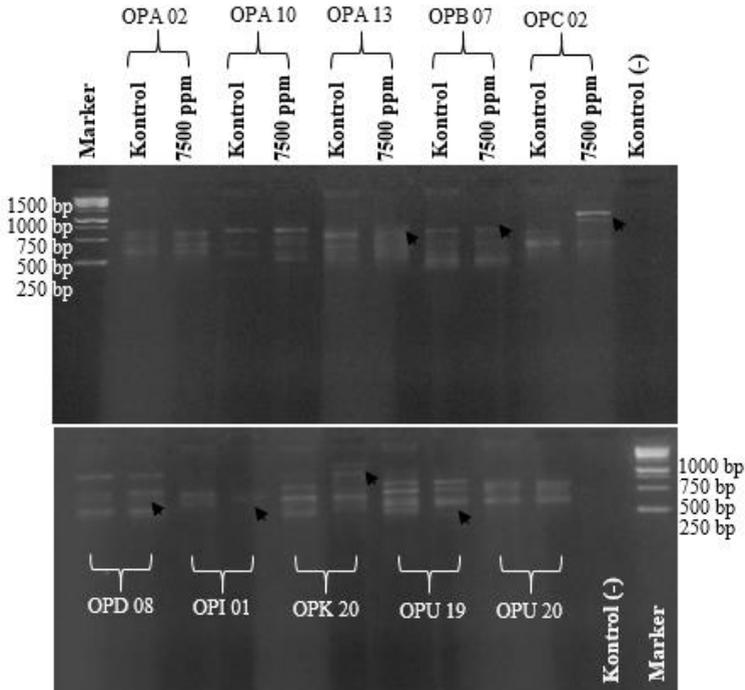


Gambar 4.4 Pengaruh interaksi antara kalus *Z. mays* varietas Manding dengan konsentrasi NaCl terhadap pertambahan berat kalus.

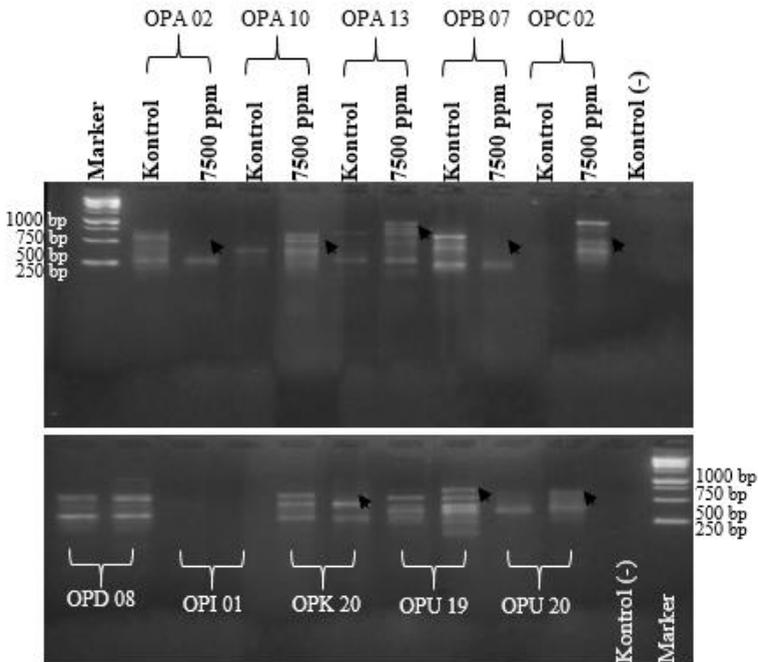
#### 4.4 Analisis RAPD

Variabilitas genetik kalus Talango dan Manding pada perlakuan 0 ppm dan 7500 ppm NaCl dianalisis menggunakan

teknik penanda molekuler RAPD. Hal ini dikarenakan dari semua parameter yang digunakan dalam penelitian ini seperti pengamatan morfologi, persentase kalus hidup dan penambahan berat kalus memberikan hasil bahwa semakin tinggi konsentrasi salinitas yang diberikan memberikan efek negatif terhadap pertumbuhan dan perkembangan kalus. Sehingga dimungkinkan memiliki perbedaan genetik yang tinggi. Hasil analisis RAPD dapat dilihat pada tabel 4.4.



Gambar 4.5 Visualisasi pita DNA yang teramplifikasi pada varietas Talango (tanda panah menunjukkan polimorfisme pita DNA).



Gambar 4.6 Visualisasi pita DNA yang teramplifikasi pada varietas Manding (tanda panah menunjukkan polimorfisme pita DNA).

Berdasarkan gambar 4.5 dan 4.6, dari sepuluh primer yang digunakan pada kedua varietas menunjukkan hasil bahwa hanya lima primer yakni OPA 13, OPB 07, OPC 02, OPK 20, dan OPU 19 yang mampu melakukan polimorfisme. Sedangkan lima primer yakni OPD 08 dan OPI 01 hanya mampu melakukan polimorfisme pada varietas Talango, OPA 02, OPA 10, dan OPU 20 hanya mampu melakukan polimorfisme pada varietas Manding. Menurut Poweli *et al.* (1996), menyatakan bahwa polimorfisme merupakan hasil dari perbedaan panjang DNA yang teramplifikasi dan jarak migrasi pita DNA berbeda dan diikuti dengan tingginya variasi pola pita DNA.

Produk amplifikasi berkisar antara 250 bp sampai 1500 bp untuk Talango sedangkan untuk Manding berkisar antara 250 bp sampai 1000 bp (gambar 4.5 dan 4.6). Rata-rata setiap primer pada Talango dan Manding memproduksi pita DNA yang berbeda. Pada Talango primer OPA 13 menghasilkan pita DNA sebanyak 2 pita, yang mana 1 pita mengalami polimorfisme. OPB 07 memiliki 3 pita DNA, polimorfisme terjadi pada 1 pita DNA. OPC 02 berbeda dengan primer lainnya, primer ini menghasilkan 1 pita DNA sedangkan polimorfismenya sebanyak 1 pita DNA. Hal ini dapat dilihat bahwa pita DNA baru pada kontrol tidak nampak tetapi pita DNA baru nampak ditempat yang berbeda (gambar 4.5). Primer OPD 08 mengalami polimorfisme sebanyak 1 pita dari total 4 pita yang terbentuk. Primer OPI 01, terjadi polimorfisme sebanyak 3 pita dari total 5 pita. Primer OPK 20 mengalami hal yang sama seperti primer OPC 02, dimana jumlah pita pada kontrol sama dengan jumlah pita pada perlakuan (7500 ppm). Hal ini menunjukkan polimorfisme yang terjadi pada primer tersebut berbeda pada letak ukuran pita DNANYA. Primer OPU 19 dari total 5 pita mengalami polimorfisme sebanyak 2 pita. 3 primer lainnya yakni OPA 02, OPA 10, dan OPU 20 memberi produk amplifikasi sebanyak 1, 2, dan 2 tanpa polimorfisme apapun (tabel 4.3).

Sedangkan untuk varietas Manding dari 10 primer hanya 2 primer yang memberi produk amplifikasi tanpa polimorfisme yakni OPD 08 dan OPI 01. 8 primer lainnya memberikan produk amplifikasi dengan polimorfisme. Primer OPA 02 sebanyak 1 pita dari total 2 pita. Primer 10 dari total 1 pita, 2 pita mengalami polimorfisme. Primer 13 terbentuk 2 pita dengan polimorfisme 2 pita. Primer OPB 07 total pita yang terbentuk sebanyak 4 pita dengan polimorfisme 2 pita. OPC 02 produk amplifikasi tidak membentuk pita namun mengalami polimorfisme 4 pita. Primer OPK 20 terjadi polimorfisme sebanyak 2 pita dari total 3 pita. Primer OPU 19 mengalami polimorfisme sebanyak 1 pita dari total 3 pita yang terbentuk. OPU 20 dari total 1 pita mengalami polimorfisme 3 pita (tabel 4.3).

Analisis varian pada tingkat DNA sangat penting dilakukan dalam rangka pemanfaatan seleksi *in vitro* untuk perbaikan tanaman. Variasi tersebut mungkin memiliki dasar genetik yang berbeda (Al-Naggar, 2008). Berdasarkan hasil tersebut telah terjadi polimorfisme oleh sepuluh primer yang digunakan dalam penelitian ini. Adanya polimorfisme tersebut menunjukkan bahwa terjadi perbedaan genetik antara kalus kontrol dan toleran. Hal ini sesuai dengan Matheka (2008), pita yang dihasilkan oleh marker untuk semua somaklonal toleran sama tetapi berbeda untuk tanaman kontrol. Hal tersebut membuktikan kehadiran polimorfisme pada kontrol dan perlakuan menunjukkan perbedaan genetik serta menunjukkan keterlibatan gen tertentu untuk mengendalikan toleransi terhadap kondisi kekurangan air.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

Tabel 4.3 Hasil analisis RAPD varietas Talango dan Manding

| Primer | Urutan Primer<br>(5' – 3') | Talango |           |              |   | Manding |           |              |  |
|--------|----------------------------|---------|-----------|--------------|---|---------|-----------|--------------|--|
|        |                            | Kontrol | Perlakuan | Status       | Keterangan  | Kontrol | Perlakuan | Status       | Keterangan   |
| OPA 02 | TGC CGA GCT G              | 2       | 2         | Monomorfisme | Tidak menunjukkan perbedaan pada jumlah dan ukuran pita DNA   | 2       | 1         | Polimorfisme | Menunjukkan perbedaan pada jumlah pita dan ukuran pita ( $\pm 500$ – $750$ bp) tidak terlihat pada perlakuan       |
| OPA 10 | GTG ATC GCA G              | 1       | 1         | Monomorfisme | Tidak menunjukkan perbedaan pada jumlah dan ukuran pita DNA   | 1       | 3         | Polimorfisme | Menunjukkan perbedaan pada jumlah pita dan ukuran pita ( $\pm 500$ – $750$ bp) terlihat pada perlakuan             |
| OPA 13 | CAG CAC CCA C              | 2       | 1         | Polimorfisme | Menunjukkan perbedaan pada jumlah pita dan ukuran pita berkisar antara $\pm 500$ – $750$ bp tidak terlihat pada perlakuan | 2       | 4         | Polimorfisme | Menunjukkan perbedaan pada jumlah pita dan ukuran pita ( $\pm 500$ bp dan $\pm 750$ bp) terlihat pada perlakuan    |
| OPB 07 | GGT GAC GCA G              | 3       | 2         | Polimorfisme | Menunjukkan perbedaan pada jumlah pita dan ukuran pita ( $\pm 500$ bp) tidak terlihat pada perlakuan                      | 4       | 2         | Polimorfisme | Menunjukkan perbedaan pada jumlah pita dan ukuran pita (antara $\pm 250$ - $750$ bp) tidak terlihat pada perlakuan |
| OPC 02 | GTG AGG CGT C              | 1       | 1         | Polimorfisme | Menunjukkan perbedaan pada ukuran pita ( $\pm 1000$ – $1500$ bp) terlihat pada perlakuan                                  | -       | 4         | Polimorfisme | Menunjukkan perbedaan pada jumlah pita dan ukuran pita (antara $\pm 250$ - $1000$ bp) terlihat pada perlakuan      |
| OPD 08 | GTG TGC CCC A              | 4       | 3         | Polimorfisme | Menunjukkan perbedaan pada jumlah pita dan ukuran pita ( $\pm 500$ bp) tidak terlihat pada perlakuan                      | 2       | 2         | Monomorfisme | Tidak menunjukkan perbedaan pada jumlah dan ukuran pita DNA  |

|        |               |   |   |              |  |   |   |              |  |
|--------|---------------|---|---|--------------|--|---|---|--------------|--|
| OPI 01 | ACC TGG ACA C | 4 | 1 | Polimorfisme | Menunjukkan perbedaan pada jumlah pita dan ukuran pita ( $\pm 500$ bp) tidak terlihat pada perlakuan   | - | - | Monomorfisme | Tidak menunjukkan perbedaan pada jumlah dan ukuran pita DNA  |
| OPK 20 | GTG TCG CGA G | 3 | 3 | Polimorfisme | Menunjukkan perbedaan pada ukuran pita ( $\pm 250$ dan $\pm 500$ bp) tidak terlihat pada perlakuan, namun terlihat pita DNA baru dengan ukuran $\pm 750-1000$ bp | 3 | 1 | Polimorfisme | Menunjukkan perbedaan pada jumlah pita dan ukuran pita ( $\pm 750$ bp) tidak terlihat pada perlakuan |
| OPU 19 | GTC AGT GCG G | 5 | 3 | Polimorfisme | Menunjukkan perbedaan pada jumlah pita dan ukuran pita ( $\pm 250-500$ bp) tidak terlihat pada perlakuan   | 3 | 4 | Polimorfisme | Menunjukkan perbedaan pada jumlah pita dan ukuran pita ( $\pm 750-1000$ bp) terlihat pada perlakuan  |
| OPU 20 | ACA GCC CCC A | 2 | 2 | Monomorfisme | Tidak menunjukkan perbedaan pada jumlah dan ukuran pita DNA  | 1 | 4 | Polimorfisme | Menunjukkan perbedaan pada jumlah pita dan ukuran pita ( $\pm 250-1000$ bp) terlihat pada perlakuan  |

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa tingkat ketahanan *Zea mays* varietas Talango dan Manding terhadap tingginya konsentrasi salinitas berbeda-beda. Semakin tinggi salinitas maka akan berpengaruh terhadap perubahan morfologi warna kalus, persentase kalus hidup, dan penambahan berat kalus yang semakin kecil. Keragaman genetik yang diperoleh melalui analisis RAPD menunjukkan adanya polimorfisme pada kedua varietas dengan primer OPA 13, OPB 07, OPC 02, OPK 20, dan OPU 19. Lima primer lainnya yakni OPD 08 dan OPI 01 menunjukkan polimorfisme pada Talango sedangkan primer OPA 02, OPA 10, dan OPU 20 menunjukkan polimorfisme pada Manding saja. Hal ini membuktikan adanya perbedaan genetik antara kalus kontrol dan toleran.

#### **5.2 Saran**

Seleksi *in vitro* *Z. mays* dalam penelitian ini perlu dilakukan peningkatan konsentrasi NaCl untuk mengetahui tingkat ketahanan kalus *Z. mays* sampai tingkat lethal dimana kalus sudah tidak mampu bertahan, tahap seleksi lebih lanjut seperti tahap regenerasi kalus sampai dengan planlet yang diaklimatisasi untuk mendapatkan varietas *Z. mays* yang toleran, serta dilakukan analisis kandungan prolin, dan metabolit sekunder lainnya.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## DAFTAR PUSTAKA

Arifin, Z. dan Fatmawati. 2011. Pemurnian dan Pengembangan Jagung Varietas Manding, Talango dan Guluk-Guluk Di Kabupaten Sumenep. **Seminar Nasional Serealia**. Jawa Timur: Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Jawa Timur.

Arifin, Z., Istiqomah, N. dan Fatmawati. 2010. Pengembangan Jagung Varietas Lokal Sumenep. **Prosiding Pekan Serealia Nasional**. Jawa Timur: Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Jawa Timur.

Ashraf, M.A., dan Ashraf, M. 2012. Salt-induced variation in some potential physiochemical attributes of two genetically diverse spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars: photosynthesis and photosystem II efficiency. **Pak. J. Bot.**, 44(1): 53-64.

Ashraf, M. dan Foolad, M.R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, 59, 206-216.

Azrai, M. 2005. Pemanfaatan markah molekuler dalam proses seleksi pemuliaan tanaman. **Jurnal AgroBiogen** 1(1): 26-37.

Balkrishna, R. A. dan Shankarrao, S.S. 2013. *In Vitro* Screening and Molecular Genetic Markers Associated with Salt Tolerance In Maize. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 12(27), pp. 4251-4255.

Bardacki, F. 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. **Turkish Journal of Biology**. 25: 185-196.

Basri, H. 1991. Pengaruh stres garam terhadap pertumbuhan dan produksi empat varietas kedelai. **Thesis**. Bogor: Program Pascasarjana IPB.

Cahyani, W. 2010. Substitusi Jagung (*Zea mays*) dengan Jali (*Coix Lacryma-jobi* L.) Pada Pembuatan Tortila: Kajian Karakteristik Kimia dan Sensori. **Skripsi**. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.

Dajic, Z. 2006. Salt stress: Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants. In: **Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance**. Netherlands: Springer. p. 41–99.

Departemen Pertanian. 2005. Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis Jagung. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. **Departemen Pertanian**. 51 p.

Dordipour, I., Ghadiri, H., Bybordi, M., Siadat, H., Malakoutia, M.J. dan Hussein, J. 2004. The use of saline water from the Caspian sea for irrigation and barley production in northern Iran. **13th International Soil Conservation Organisation Conference**, Brisbane, July 2004.

Farid, M., Musa, Y., Nasaruddin, dan Darmawan. 2006. Variasi Somaklonal Tebu Tahan Salinitas Melalui Mutagenesis *In Vitro*. **Jurnal Agrivigor**. Vol 5 (3), pp. 247-258.

Gunadi, S. 2002. Teknologi Pemanfaatan Lahan Marginal Kawasan Pesisir. **Jurnal Teknologi Lingkungan**. Vol. 3, No. 3: 232-236.

Gupta, B. dan Huang, B. 2014. Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. **International Journal of Genomics**. India: Hindawi Publishing Corporation.

Hardman, L.L. dan Gunsolus, J.L. 1998. **Corn Growth and Development & Management Information for Replant Decisions**. University of Minnesota Extension Service, St. Paul, Minnesota. <<http://www.extension.umn.edu>> [20 Desember 2014].

Hutami, S., 2008. Ulasan masalah pencoklatan pada kultur jaringan. **Jurnal Agrobigen**. Vol 4. No.2 83-88.

Irfan, M. 1999. Respon Tanaman Jagung (*Zea mays* L.) Terhadap Pengolahan Tanah dan Kerapatan Tanam Pada Tanah Andisol dan Ultisol. **Thesis**. Pasca Sarjana Universitas Sumatra Utara, Medan. Hal. 7, 13.

James, R. A., Blake, C., Byrt, C. S. dan Munns, R. 2011. Major genes for Na<sup>+</sup> exclusion, Nax1 and Nax2 (wheatHKT1;4 and HKT1;5), decrease Na<sup>+</sup> accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. **Journal of Experimental Botany**. vol. 62, no. 8, pp. 2939–2947, 2011.

James, R.A., Blake, C.S., Munns, R. 2011. Major Genes for Na<sup>+</sup> Exclusion, Nax1 and Nax2 (wheatHKT1;4 and HKT1;5), Decrease Na<sup>+</sup> Accumulation In Bread Wheat Leaves Under Saline and Waterlogged Condition. **Journal of Experimental Botany**. Vol. 62, no. 8, pp. 2939-2947.

Karsinah., Sudarsono., Setyobudi, L. dan Aswidinnoor, H. 2002. Keragaman genetik plasma nuftah jeruk berdasarkan analisis penanda RAPD. **Jurnal Bioteknologi Pertanian**, Vol. 7, No. 1, pp. 8-16. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Khanam, S., Sham, A., Bennetzen, J.L. dan Aly, M.A.M. 2012. Review article: Analysis of molecular marker-based characterization and genetic variation in date palm (*Phoenix*

*dactylifera* L.). **Australian Journal of Crop Science** 6(8): 1236-1244.

Kristiari, D., Kendarini, N. dan Sugiharto, A.N. 2013. Seleksi Tongkol Ke Baris (Ear To Row Selection) Jagung Ungu (*Zea mays* var *Ceratina Kulesh*). **Jurnal Produksi Tanaman**. Vol. 1 No. 5. Malang: Universitas Brawijaya.

Kusmiyati, F., Purbajanti, E.D. dan Kristanto, B.A. 2009. Macro Nutrients Uptake Of Forage Grasses At Different Salinity Stresses. **Journal Indonesian Trop.Anim.Agric.** 34 [3].

Kusvuran, S., Ellialtioglu, S., Yasar, F., dan Abak, K. 2012. Antioxidative Enzyme Activities in The Leaves and Callus Tissues of Salt-Tolerant and Salt-Susceptible Melon Varieties Under Salinity. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 11 (3), pp. 635-641.

Lestari, E.G. 2006. Review: *In Vitro* Selection and Somaclonal Variation for Biotic and Abiotic Stress Tolerance. **Biodiversitas**. Vol. 7, No. 3, pp. 297-301.

Levetin, E. dan McMahan, K. 2008. **Plant and Society, Fifth Edition**. Tulsa: McGraw-Hill Higher Education.

Mansour, M.M.F., Salama, K.H.A., Ali, F.Z.M. dan Abou Hadid, A.F. 2005. Cell And Plant Responses To NaCl In *Zea Mays* L. Cultivars Differing In Salt Tolerance. **GEN. APPL. Plant Physiology**, 31(1-2), 29-41.

Mariska, I. dan Purnamaningsih, R. 2001. Perbanyak Vegetatif Tanaman Tahunan Melalui Kultur *In Vitro*. **Jurnal Litbang Pertanian**. No 21 (1).

Marschner, H. 2005. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. San Diego: Academic Press.

Matheka, J.M., Magiri, E., Rasha, A.O., dan Machuka, J. 2008. *In vitro* selection and characterization of drought tolerant somaclones of tropical maize (*Zea mays* L.). **Biotechnology** 7 (4): 641-650.

Mejaya, M.J., Dahlan, M. dan Pabandon, M. 2005. **Pola Heterosis Dalam Pembentukan Varietas Unggul Jagung Bersari Bebas dan Hibrida**. Maros: Balai Penelitian Tanaman Serelia.

Morkunas, I., Mai, V. C., Waskiewicz, A., Formela, M. dan Golinski, P. 2014. Major Phytohormones Under Abiotic Stress. **Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants Under Environment**. Volume 2. New York: Springer.

Mukhtasor. 2007. **Pencemaran Pesisir dan Laut**. Jakarta: Pradnya Paramita.

Munir, N., dan Aftab, F. 2013. Effect of NaCl Stress on Callus Morphology and Growth of Sugarcane Callus Culture (cv. SPF 234 and cv. HSF 240). **Pakistan Journal of Science**. Vol. 65 No. 4.

Murni, A.M. dan Arief, R.W. 2008. **Teknologi Budidaya Jagung**. Bogor: Balai Besar Pengkajian dan Pengembangan Pertanian.

Nugraheni, I.T., Solichatun. dan Anggarwulan, E. 2003. Pertumbuhan dan Akumulasi Prolin Tanaman Orok-orok (*Crotalaria juncea* L.) pada Salinitas CaCl<sub>2</sub> Berbeda. Surakarta: **BioSMART**. Volume 5, Nomor 2, Halaman: 98-101.

Paliwal, R.L. 2000. Tropical maize morphology. In: tropical maize: improvement and production. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Rome. p 13-20.

Pharmawati, M. 2009. Optimalisasi Ekstraksi DNA dan PCR-RAPD pada *Grevillea spp.* (Proteaceae). **Jurnal Biologi XIII** (1): 12-16.

Powell, W., Machray, G.C., dan Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trend in plant science reviews**, 1 (7): 215-222.

Prittila, A.M., Podolich, O., Koskima Ki, J.J., Hohtola, E., dan Hohtola, A. 2008. Role of origin and endophyte infection in browning of bud – derived tissue culturs of scots pine (*Pinus sylvestris* L.). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 95: 47-55.

Purmaningsih, R. dan Mariska, I. 2005. Seleksi *In Vitro* Tanaman Padi Untuk Sifat Ketahanan Terhadap Alumunium. **Jurnal Bioteknologi Pertanian**. Vol. 10, No. 2, pp. 61-69.

Purwono. dan Hartono, R. 2008. **Bertanam Jagung Unggul**. Jakarta: Penebar Swadaya.

Queiro's, F., Fidalgo, F., Santos, I. dan Salema, R. 2007. *In vitro* selection of salt tolerant cell lines in *Solanum tuberosum* L. **Biol. Plant.** 51:728–734.

Rai, M.K., Kalia, R.K., Singh, R., Gangola, M.P., dan Dhawan, A.K. 2011. Developing Stress Tolerant Plants Through *In Vitro* Selection-An Overview of The Recent Progress. Elsevier. **Environmental and Experimental Botany**. Vol 7 (1), PP 89-98.

Rochani, S. 2007. **Bercocok Tanam Jagung**. Bogor: Azka Press.

Rubatzky, V.E. dan Yamaguchi, M. 1998. **Sayuran Dunia 2 Prinsip, Produksi, dan Gizi**. Bandung: ITB Press.

Rukmana, R dan Yudirachman, H. 2007. **Jagung Budi Daya, Pasca Panen , dan Penganeragaman Pangan**. Semarang: Penerbit Aneka Ilmu.

Rukmana, R. 2009. **Usaha Tani Jagung**. Jakarta: Kanisius.

Samantha, G. 2013. **Terbaru: Panjang Garis Pantai Indonesia Capai 99.000 Kilometer**. <<http://nationalgeographic.co.id>> [19 Maret 2015].

Saputro, T.B. 2012. Multiplikasi Tunas pada Mikropropagasi Tanaman Transgenik Anggrek *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume Pembawa 35S::KNAT1 pada Media Tanpa Fitohormon. **Tesis**. Yogyakarta: Program Studi Bioteknologi. Universitas Gadjah Mada.

Sevengor, S., Yasar, F., Kusvuran, S., dan Ellialtioglu, S. 2011. The Effect of Salt on Growth, Chlorophyll Content, Lipid Peroxidation and Antioxidative Enzymes of Pumpkin Seedling. **African Journal of Agriculture Research**. Vol. 6 (21), pp. 4920-4924.

Singh, J. 1987. Field Manual of maize Breeding Procedures. **Indian Agricultural Research Institue**, New Delhi-india. Hal 9.

Sipayung, R. 2003. **Stres Garam dan Mekanisme Toleransi Tanaman**. Medan: USU-Press.

Smith, M.E., Miles, C.A. dan Van Beem, J. 1995. Genetic improvement of maize for nitrogen use efficiency. In Maize research for stress environment. **Fourth Eastern and Southern Africa Regional Maize Conference** p. 39-43.

Sopandie, D. 2003. Toksisitas hara dan mekanisme transportasi ion melalui membran tonoplas. **Thesis**. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Hal. 91-202.

Subekti, N.A., Syafruddin., Efendi, R. dan Sunarti, S. 2008. Morfologi Tanaman dan Fase Pertumbuhan Jagung. **Teknik Produksi dan Pengembangan**. Maros: Balai Penelitian Tanaman Serealia.

Sujatmiko, B., Sulistyningsih, E. dan Murti, R.H. 2012. Studi Ketahanan Melon (*Cucumis melo* L.) Terhadap Layu Fusarium Secara *In Vitro* dan Kaitannya dengan Asam Salisilat. **Ilmu Pertanian**. Vol 15 No. 2, : 1-18.

Surahman, M., Muhamad, S. dan Toding, T. 2007. Perakitan Varietas Semangka (*Citrullus lanatus* (Thunberg) Matsum & Nakai) Tanpa Biji Tahan Terhadap Penyakit Layu Fusarium dengan Memanfaatkan Marka RAPD. **Laporan penelitian**. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Tanji, K.K. dan Kielen, N.C. 2002. **Agricultural drainage water management in arid and semi-arid areas**. Rome: Food And Agriculture Organization Of The United Nations.

Tuteja, N. dan Mahajan, S. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Arch. Biochem. Biophys.**, 444: 139-158.

Ubudiyah, I.W.A. 2013. Respon Kalus Beberapa Varietas Padi (*Oryza sativa* L.) pada Kondisi Cekaman Salinitas (NaCl) Secara *In Vitro*. **Tugas Akhir**. Surabaya: Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

Warisno. 1998. **Jagung Hibrida**. Yogyakarta: Kansius.

Yuniati, R. 2004. Penapisan Galur Kedelai *Glycine max* (L.) Merrill Toleran terhadap NaCl untuk Penanaman di Lahan Marginal. **Jurnal Makara Sains** 8 (1): 21-24. Jakarta: Universitas Indonesia.

Yunita, R. 2009. Pemanfaatan Variasi Somaklonal dan Seleksi *In Vitro* dalam Perakitan Tanaman Toleran Cekaman Abiotik. **Jurnal Litbang Pertanian**, 28 (4).

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

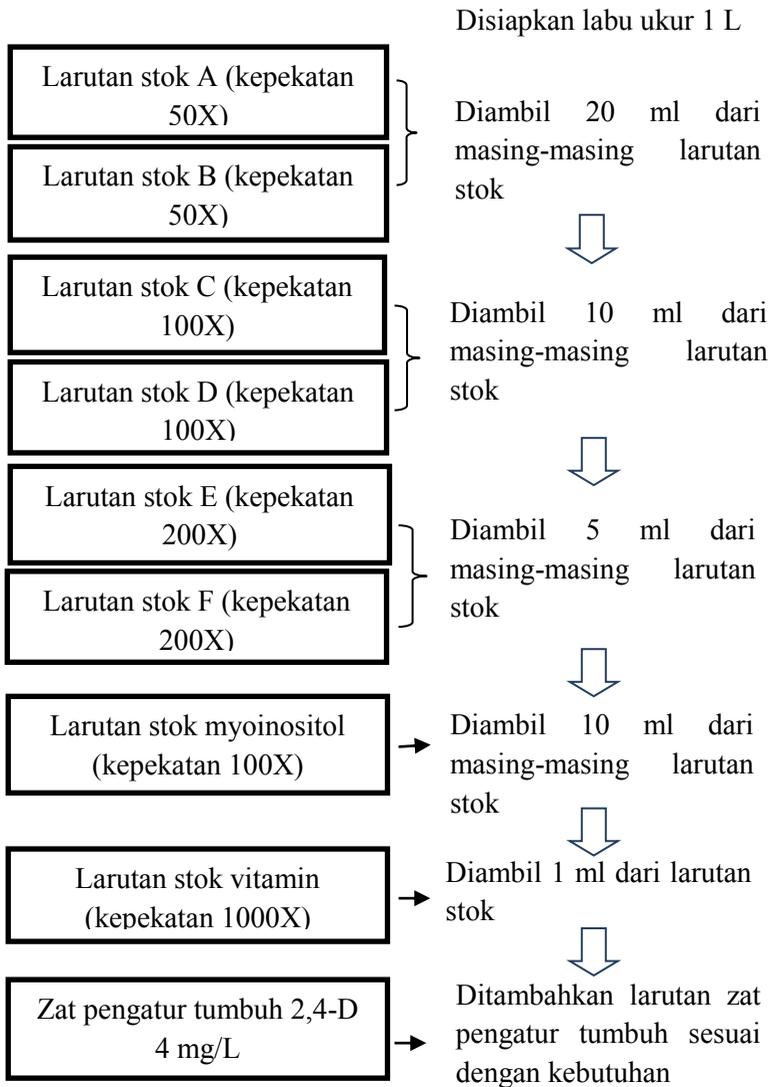
## LAMPIRAN

Lampiran 1: Tabel Pembuatan Larutan Stok untuk Medium MS  
(Murashige and Skoog)

| Larutan stok     | Komposisi   |              | Kepek atan | Berat (gr) |        |        |        |
|------------------|---|--------------|------------|------------|--------|--------|--------|
|                  | Bahan kimia   | Berat (mg/L) |            | 1 L        | 500 ml | 250 ml | 100 ml |
| Stok A           | NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                     | 1650         | 50X        | 82,5       | 41,25  | 20,63  | 8,25   |
| Stok B           | KNO <sub>3</sub>                                    | 1900         | 50X        | 95         | 47,5   | 23,75  | 9,5    |
| Stok C           | CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O                | 440          | 100X       | 44         | 22     | 11     | 4,4    |
| Stok D           | MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 370          | 100X       | 37         | 18,5   | 9,25   | 3,7    |
|                  | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 170          |            | 17         | 8,5    | 4,25   | 1,7    |
| Stok E           | FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 27,8         | 200X       | 5,57       | 2,79   | 1,39   |        |
|                  | FeNa <sub>2</sub> EDTA/Fe EDTA                      | 37,3         |            | 7,45       | 3,73   | 1,86   | 0,75   |
| Stok F           | MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O                | 22,3         | 200X       | 3380       | 1690   | 845    | 338    |
|                  | ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 8,6          |            | 1720       | 860    | 430    | 172    |
|                  | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 6,2          |            | 1240       | 620    | 310    | 124    |
|                  | KI  | 0,83         |            | 166        | 83     | 41,5   | 16,6   |
|                  | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,25         |            | 50         | 25     | 12,5   | 5      |
|                  | CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                | 0,025        |            | 5          | 2,5    | 1,25   | 0,5    |
|                  | CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 0,025        |            | 5          | 2,5    | 1,25   | 100    |
| Stok myoinositol | Myo-inositol  | 100          | 100X       | 10         | 5      | 2,5    | 1      |
| Stok vitamin     | Thiamin HCL   | 0,1          | 1000 X     | 0,1        | 0,05   | 0,025  | 0,01   |
|                  | Nicotinic acid                                      | 0,5          |            | 0,5        | 0,025  | 0,0125 | 0,05   |
|                  | Pyridoxin   | 0,5          |            | 0,5        | 0,025  | 0,0125 | 0,05   |
|                  | Glysin  | 2            |            | 2          | 1      | 0,5    | 0,2    |
| Sukrosa          |   | 30 gram      |            |            |        |        |        |

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

Lampiran 2: Skema Pembuatan Medium MS<sub>0</sub> dengan Penambahan Zat Pengatur Tumbuh





Tambahkan aquabides sampai tepat pada tanda tera dan atur pH antara 5,6-5,8



Tuangkan medium kedalam Erlenmeyer dan tambahkan gula sebanyak 30 gram serta agar sebanyak 8 gram

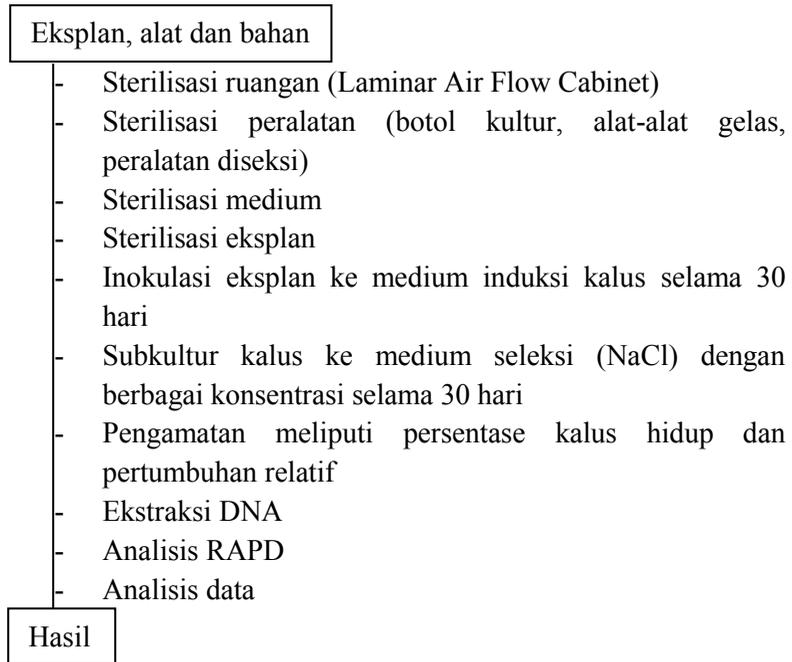


Panaskan medium hingga agar larut sempurna



Tuang medium kedalam botol kultur

## Lampiran 3: Skema Penelitian



**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

Lampiran 4: Deskripsi *Z. mays* Varietas Talango

|                       |   |
|-----------------------|---|
| Nama                  | : Talango   |
| Tipe                  | : Lokal (Komposit)  |
| Asal                  | : Kecamatan Talango Sumenep,<br>diseleksi sejak tahun 2003 dengan<br>metode Ear To Row                |
| Umur                  | : Genjah<br>50% berbunga : 40-30 hari<br>50% keluar rambut : 42-50 hari<br>Masak fisiologis : 75 hari |
| Tinggi tanaman        | : 159,55 cm   |
| Keseragaman           | : Seragam   |
| Batang                | : Kecil (diameter : 2,1-2,4 cm)   |
| Warna batang          | : Hijau   |
| Kerebahan             | : Tahan   |
| Warna daun            | : Hijau   |
| Bentuk malai          | : Kecil terbuka (mencar)  |
| Warna malai           | : Coklat  |
| Warna sekam           | : Coklat  |
| Warna rambut          | : Coklat-kemerahan  |
| Perakaran             | : Sempurna (baik)   |
| Bentuk tonkol         | : Pendek dan gemuk  |
| Kedudukan tongkol     | : Di pertengahan tingggi tanaman  |
| Kelobot               | : Menutup tongkol sempurna  |
| Baris biji            | : Lurus dan rapat   |
| Jumlah baris biji     | : 10-13   |
| Tipe biji             | : Mutiara   |
| Warna biji            | : Kuning  |
| Bobot 1000 butir biji | : 151,3 gram  |
| Hasil rata-rata       | : 3,35 ton/ha   |

|                    |   |
|--------------------|---|
| Potensi hasil      | : 3,92 ton/ha   |
| Ketahanan penyakit | : Tahan penyakit bulai  |
| Daerah sebaran     | : Kec. Kota, Batuan, Gapura, Dungkek,<br>Kalianget dan Talango    |
| Anjuran tanam      | : Jarak tanam 60 cm x 20 cm,<br>2 tanaman/lubang (166.000 tan/ha) |
| Pengusul           | : BPPTP Jawa Timur; Dinas Pertanian<br>Kabupaten Sumenep          |
| Pemulia            | : S. Roesmarkam, F. Arifin  |
| Peneliti           | : Sri Zunaini Saadah, Chusnurrofiq,<br>Moh Hafi dan Farid         |
| Teknisi Lapang     | : Robiin, Abu, Suryadi, Bambang H dan<br>Herunoto                 |

Lampiran 5: Deskripsi *Z. mays* Varietas Manding

|                       |   |
|-----------------------|---|
| Nama                  | : Manding   |
| Tipe                  | : Lokal (Komposit)  |
| Asal                  | : Kecamatan Manding Sumenep,<br>diseleksi sejak tahun 2003 dengan<br>metode Ear To Row                |
| Umur                  | : Genjah<br>50% berbunga : 38-42 hari<br>50% keluar rambut : 39-45 hari<br>Masak fisiologis : 65 hari |
| Tinggi tanaman        | : 106,9 cm  |
| Keseragaman           | : Seragam   |
| Batang                | : Kecil (diameter : 1,0-1,75 cm)  |
| Warna batang          | : Hijau   |
| Kerebahan             | : Tahan   |
| Warna daun            | : Hijau   |
| Bentuk malai          | : Kecil terbuka (merekah)   |
| Warna malai           | : Coklat  |
| Warna sekam           | : Coklat  |
| Warna rambut          | : Coklat-kemerahan  |
| Perakaran             | : Sempurna (baik)   |
| Bentuk tonkol         | : Kecil lonjong   |
| Kedudukan tongkol     | : Di pertengahan tingggi tanaman  |
| Kelobot               | : Menutup tongkol sempurna  |
| Baris biji            | : Lurus dan rapat   |
| Jumlah baris biji     | : 9-12  |
| Tipe biji             | : Mutiara   |
| Warna biji            | : Kuning  |
| Bobot 1000 butir biji | : 139,4 gram  |
| Hasil rata-rata       | : 2,44 ton/ha   |

|                    |   |
|--------------------|---|
| Potensi hasil      | : 2,97 ton/ha   |
| Ketahanan penyakit | : Tahan penyakit bulai  |
| Daerah sebaran     | : Kec. Manding, Dasuk, Ambunten, Pasongsongan, Rubaru, Batu putih, Batang-Batang Sumenep ( $\pm$ 51.000 ha) |
| Anjuran tanam      | : Mampu ditanam rapat 60 cm x 20 cm, 2 tanaman/lubang (166.000 tan/ha)                                      |
| Pengusul           | : BPPTP Jawa Timur; Dinas Pertanian Kabupaten Sumenep   |
| Pemulia            | : S. Roesmarkam, F. Arifin  |
| Peneliti           | : Sri Zunaini Saadah, Chusnurrofiq, Moh Hafi dan Farid  |
| Teknisi Lapang     | : Robiin, Abu, Suryadi, Bambang H dan Herunoto  |

Lampiran 6: Data Pengamatan Utama

| Varietas | Konsentrasi NaCl | Berat (mg) | Persentase kalus hidup (%) |
|----------|------------------|------------|----------------------------|
| Talango  | 0 ppm            | 10         | 100                        |
|          |                  | 10         |                            |
|          |                  | 20         |                            |
|          | 2500 ppm         | 10         | 100                        |
|          |                  | 0          |                            |
|          |                  | 10         |                            |
|          | 5000 ppm         | 0          | 100                        |
|          |                  | 10         |                            |
|          |                  | 0          |                            |
|          | 7500 ppm         | 0          | 66,7                       |
|          |                  | 0          |                            |
|          |                  | 0          |                            |
| Manding  | 0 ppm            | 1120       | 100                        |
|          |                  | 890        |                            |
|          |                  | 980        |                            |
|          | 2500 ppm         | 390        | 100                        |
|          |                  | 320        |                            |
|          |                  | 400        |                            |
|          | 5000 ppm         | 250        | 100                        |
|          |                  | 220        |                            |
|          |                  | 170        |                            |
|          | 7500 ppm         | 170        | 100                        |
|          |                  | 170        |                            |
|          |                  | 170        |                            |

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## Biodata Penulis



Penulis bernama lengkap Fathin Finariyah, biasa dipanggil Fathin atau Fafin adalah putri pertama dari pasangan Fauzi dan Faizatul Husnah. Penulis dilahirkan pada tanggal 6 Mei 1993 dan dibesarkan di Desa Ngemboh, Ujungpangkah, Gresik. Penulis memiliki hobi membaca buku (terutama novel non fiksi). Sebelum resmi menjadi mahasiswi jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember melalui jalur UNDANGAN, penulis sempat menimba ilmu di TK ABA Ngemboh, SD Negeri 1 Ngemboh, SMP Negeri 1 Sidayu dan SMA Muhammadiyah 1 Gresik. Selama kuliah penulis menerima beasiswa BIDIKMISI, menjadi asisten laboratorium pada mata kuliah SPT 2 (Struktur Perkembangan Tumbuhan 2), serta sempat aktif di berbagai macam organisasi kemahasiswaan dimulai dari menjadi anggota Seni dan Budaya UKM Cinta Rebana periode 2011-2012, anggota Departemen Kaderisasi FKIQ (Forum Kajian Islam Al-Qur'an) periode 2011-2012 dan 2012-2013, anggota Hubungan Masyarakat UKM KSR (Korps Suka Rela) periode 2012-2013, dan Sekretaris Departemen Kesejahteraan Mahasiswa HIMABITS periode 2013-2014. Selain itu, penulis juga aktif mengikuti beberapa pelatihan dan kepanitian dalam berbagai kegiatan kampus. Penulis sering melakukan kegiatan sosial yakni donor darah rutin setiap 3 bulan sekali di PMI Surabaya. Penulis dapat dihubungi ke alamat email sebagai berikut [fathinfinariyah@gmail.com](mailto:fathinfinariyah@gmail.com).

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## DAFTAR GAMBAR

|  | Halaman |
|--|---------|
| Gambar 2.1 Benih dan Perkecambahan Tanaman Monokotil: <i>Z. mays</i> .....   | 5       |
| Gambar 2.2 Bunga Tanaman <i>Z. mays</i> : (A) Bunga Jantan, (B) Bungan Betina .....  | 9       |
| Gambar 2.3 Struktur Benih <i>Z. mays</i> dan Bagiannya   | 10      |
| Gambar 2.4 Penampilan Biji dan Tongkol Varietas Talango .....  | 11      |
| Gambar 2.5 Penampilan Biji dan Tongkol Varietas Manding .....  | 12      |
| Gambar 3.1 Tahap Proses Ekstraksi DNA .....  | 24      |
| Gambar 3.2 Tahap Proses PCR:(a) Denaturasi awal (b) Denaturasi (c) Annealing/Penempelan (d) Elongasi/Ekstensi (e) Elongasi Akhir (f) Pendinginan ..... | 25      |
| Gambar 4.1 Morfologi kalus Talango pada konsentrasi salinitas yang berbeda A) 0 ppm, B) 2500 ppm, C) 5000 ppm, D) 7500 ppm .....                       | 29      |
| Gambar 4.2 Morfologi kalus Manding pada konsentrasi salinitas yang berbeda A) 0 ppm, B) 2500 ppm, C) 5000 ppm, D) 7500 ppm .....                       | 30      |
| Gambar 4.3 Pengaruh interaksi antara kalus <i>Z.</i>   |         |

|            |   |    |
|------------|---|----|
|            | <i>mays</i> varietas Talango dengan konsentrasi NaCl terhadap penambahan berat kalus .....                                    | 35 |
| Gambar 4.4 | Pengaruh interaksi antara kalus <i>Z. mays</i> varietas Manding dengan konsentrasi NaCl terhadap penambahan berat kalus ..... | 35 |
| Gambar 4.5 | Visualisasi pita DNA yang teramplifikasi pada varietas Talango (tanda panah menunjukkan polimorfisme pita DNA) .....          | 36 |
| Gambar 4.6 | Visualisasi pita DNA yang teramplifikasi pada varietas Manding (tanda panah menunjukkan polimorfisme pita DNA) .....          | 37 |

# Seleksi *In Vitro* Tanaman Jagung (*Zea mays* L.) Varietas Talango dan Manding terhadap Cekaman Salinitas

Fathin Finariyah, dan Triono B Saputro

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh  
Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

*e-mail*: trionobsaputro@bio.its.ac.id

**Abstrak**—Produksi *Zea mays* setiap tahunnya mengalami peningkatan. Peningkatan tersebut akan sulit dipenuhi mengingat semakin berkurangnya lahan pertanian akibat konversi lahan. Pemanfaatan lahan marginal sebagai lahan pertanian kini semakin banyak digunakan. Salah satu masalah dalam penggunaan lahan marginal adalah adanya kandungan salinitas yang tinggi, dimana menyebabkan adanya cekaman salinitas yang berdampak buruk bagi produktivitas. Sehingga perlu dilakukan proses seleksi, salah satu caranya yakni seleksi *in vitro*. Pada penelitian ini, *Z. mays* yang digunakan adalah varietas Talango dan Manding. Tujuan penelitian yakni untuk menguji pengaruh tingkat ketahanan varietas Talango dan Manding terhadap salinitas. Pembentukan kalus ditumbuhkan di medium MS0+4 ppm 2,4-D dan diinkubasi selama 28 hari. Setelah itu, kalus diberi perlakuan dengan menambahkan NaCl (0, 2500, 5000, 7500 ppm) kedalam medium MS0+4 ppm 2,4-D dan diinkubasi selama 28 hari. Selanjutnya, dilakukan pengamatan morfologi kalus, perhitungan persentase kalus hidup serta pertambahan berat kalus yang mampu bertahan. Hasil yang diperoleh yakni terjadi perubahan morfologi terhadap warna kalus, semakin tinggi konsentrasi NaCl menunjukkan terjadinya *browning*. Persentase kalus hidup menunjukkan bahwa semua kalus pada kedua varietas mampu bertahan disetiap perlakuan kecuali kalus Talango yang tumbuh pada medium dengan konsentrasi salinitas tinggi.

**Kata Kunci**—Kalus, Salinitas, Seleksi *in vitro*, *Z. mays*.

## I. PENDAHULUAN

TANAMAN jagung (*Zea mays*) merupakan tanaman yang multiguna, termasuk dalam jenis tanaman semusim, tergolong dalam famili graminaceae dan berbiji tunggal (monokotil). Di Indonesia *Z. mays* merupakan komoditas sereal yang berada diposisi kedua setelah padi sebagai makanan pokok, sedangkan di dunia berada diposisi ketiga setelah padi dan gandum. Rujukan [1], menjelaskan bahwa dalam 20 tahun kedepan, penggunaan *Z. mays* diperkirakan terus meningkat dan bahkan setelah tahun 2020 lebih dari 60% dari total kebutuhan nasional. Adanya konversi dan ekstensifikasi lahan menyebabkan kebutuhan tersebut akan sulit untuk dipenuhi. Hal tersebut dapat diatasi dengan memanfaatkan lahan marginal.

Lahan marginal merupakan suatu lahan yang mempunyai karakteristik keterbatasan dalam suatu hal, baik keterbatasan satu unsur atau komponen maupun lebih dari satu unsur atau komponen. Indonesia memiliki pulau dengan jumlah 17.508,

yang mana mampu memberikan wilayah cukup luas untuk dimanfaatkan bagi kehidupan manusia [2]. Rujukan [3], menjelaskan bahwa garis pantai Indonesia memiliki panjang sebesar 81.000 Km sehingga memiliki potensi besar untuk menambah luasan area pertanian. Namun, keterbatasan dalam memanfaatkan lahan marginal yakni kandungan salinitas yang tinggi.

Salinitas merupakan salah satu faktor pembatas utama yang berpengaruh terhadap pertumbuhan dan produktivitas tanaman di seluruh dunia [4]. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan pengaruh cekaman salinitas terhadap dua kultivar tanaman *Z. mays* yakni Giza 2 dan Trihibryd 321 menunjukkan pengaruh terhadap menurunnya berat basah, berat kering, dan laju pertumbuhan relatif tunas dan akar tanaman *Z. mays* [5]. Rujukan [6], menjelaskan bahwa tingginya salinitas menyebabkan berbagai masalah pertanian yang cukup serius yaitu dapat mengurangi produktivitas dari tanaman pertanian. *Z. mays* memiliki sensitivitas yang cukup tinggi terhadap kondisi salin. Kondisi garam tinggi akan berpengaruh terhadap perubahan fisiologis, biokimia, dan genetik pada tanaman [7]. Berdasarkan hal tersebut maka perlu dikembangkan *Z. mays* yang tahan terhadap cekaman salinitas, salah satunya adalah dengan melakukan seleksi *in vitro*. Kultur *in vitro* merupakan suatu teknik yang digunakan untuk mengevaluasi pengaruh salinitas dan memilih varietas dari spesies tanaman yang toleran cekaman salinitas [8]. Pemilihan teknik *in vitro* dalam penelitian ini dikarenakan seleksi *in vitro* mampu meminimalisir faktor lingkungan yang tidak diinginkan, dengan kondisi yang lebih homogen. Penciptaan kondisi yang homogen dapat meningkatkan validitas percobaan. Proses seleksi dilakukan pada tahap pembentukan kalus karena memungkinkan terjadinya proses *rearrangement* pada susunan gennya.

## II. URAIAN PENELITIAN

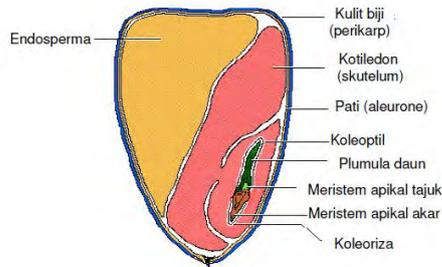
### A. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Biologi ITS pada bulan November 2014 sampai dengan Juli 2015.

### B. Induksi Kalus

Proses induksi kalus menggunakan medium MS0 yang ditambahkan ZPT (zat pengatur tumbuh) yakni 2,4-D dengan

konsentrasi 4 ppm. Medium yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan penelitian [4]. Pertama, eksplan biji *Z. mays* disterilisasi menggunakan antifungal yang sudah dilarutkan (1:10), larutan chlorox 5,25%, dan alkohol 70%. Kemudian diambil bagian skutelum *Z. mays* untuk diinokulasikan kedalam medium. Setelah eksplan diinokulasi, dilakukan proses inkubasi dalam ruang kultur pada kondisi gelap selama 28 hari dengan suhu  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (Balkrishna dan Shankarrao, 2013) dan setiap dua minggu sekali dilakukan subkultur ke medium baru.



Gambar 1. Struktur benih *Z. mays* dan bagiannya (Subekti *et al.*, 2008).

C. Seleksi *In Vitro*

Kalus yang terbentuk disubkultur ke medium seleksi yakni MS0 + ZPT optimal pertumbuhan kalus + konsentrasi NaCl (0, 2500, 5000, 7500 ppm) dan diinkubasi selama 28 hari dalam ruang kultur dengan kondisi terang. Selanjutnya dilakukan pengamatan presentase kalus hidup, dengan [9] :

$$\text{Presentase Kalus Hidup (\%)} = \frac{\text{Jumlah Kalus yang Toleran}}{\text{Jumlah Kalus yang Diinokulas}} \times 100\%$$

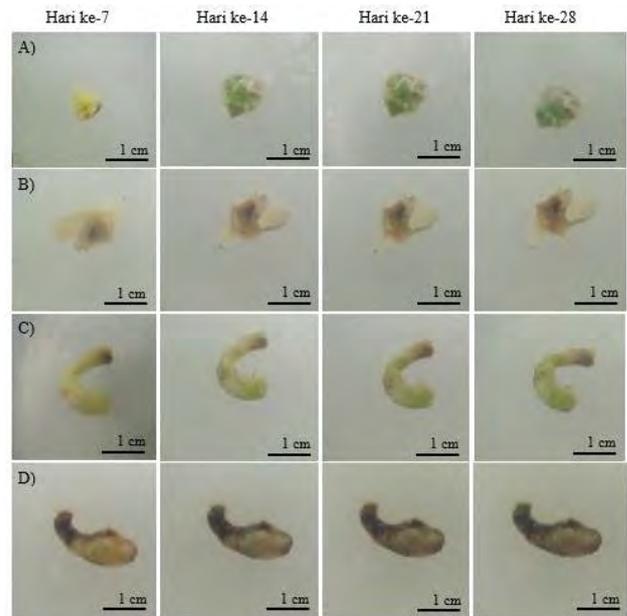
Selain itu, berat kalus juga diukur dengan cara menimbang berat segar kalus sebelum seleksi (*Initial growth*) dan sesudah seleksi kalus (*Final growth*) dengan satuan miligram (mg) untuk mendapatkan data pertambahan berat kalus.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

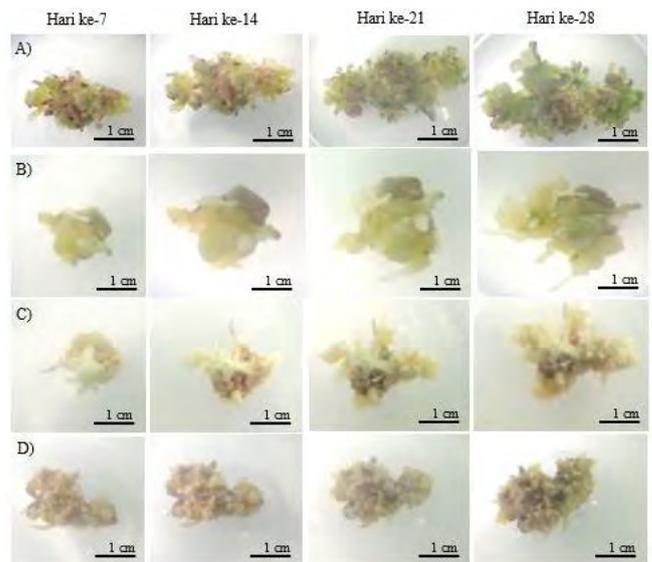
A. Pengaruh Beberapa Konsentrasi Cekaman Salinitas terhadap Morfologi Kalus

Subkultur dilakukan selama 28 hari atau 4 minggu pada medium seleksi yang mengandung NaCl dengan konsentrasi 0, 2500, 5000, dan 7500 ppm. Setiap 7 hari dilakukan pengamatan terhadap perubahan morfologi kalus. Kondisi morfologi kalus dari masing-masing varietas dapat dilihat pada gambar 2 dan 3:

Berdasarkan pengamatan yang dilakukan terlihat bahwa terdapat perubahan warna dan tekstur kalus pada medium yang ditambahkan NaCl yakni coklat hingga hitam dan kompak. Perubahan tersebut terjadi pada medium dengan konsentrasi NaCl paling tinggi berbeda dengan kalus tanpa NaCl, dimana memiliki warna lebih hijau. Hal yang sama terjadi pada penelitian [10], dimana kultur kalus tebu yang berada dibawah kondisi tercekam salinitas mengalami pencoklatan (*browning*) dan nekrosis pada konsentrasi salinitas tertinggi. Mekanisme tersebut disebabkan adanya penurunan kandungan klorofil yang dipicu oleh tingginya aktifitas enzim pendegradasi klorofil yakni klorofilase akibat peningkatan garam dilingkungan [11].



Gambar 2. Morfologi kalus Talango pada konsentrasi salinitas yang berbeda A) 0 ppm, B) 2500 ppm, C) 5000 ppm, D) 7500 ppm.



Gambar 3. Morfologi kalus Manding pada konsentrasi salinitas yang berbeda A) 0 ppm, B) 2500 ppm, C) 5000 ppm, D) 7500 ppm.

Selain itu, peristiwa *browning* terjadi akibat adanya senyawa fenol dimana fenol bersifat racun/toksik bagi sel. pencoklatan jaringan terjadi karena aktivitas enzim oksidase yang mengandung tembaga seperti polifenol oksidase dan tirosinase [12]. *Browning* dapat pula disebabkan adanya mikroorganisme endofitik yang ditemukan dalam jaringan dimana tidak menunjukkan gejala bahwa mereka mungkin bakteri atau ragi [13]. Warna hitam yang terlihat pada kalus (gambar 2 (D)) menunjukkan terjadinya kematian sel. Hal ini dikarenakan molekul NaCl mengalami ionisasi menjadi  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Cl}^-$  yang mengakibatkan peningkatan ion secara berlebihan sehingga terjadi cekaman ion dan mengakibatkan sel-sel kalus mengalami kematian [14].

**B. Pengaruh Konsentrasi Cekaman Salinitas terhadap Persentase Kalus Hidup**

Pada penelitian ini, seluruh kalus memberikan respon disetiap perlakuan yang diberikan. Data persentase kalus yang hidup dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1.  
Persentase kalus hidup pada seleksi *in vitro*

| Varietas | Konsentrasi NaCl |      |      |      |
|----------|------------------|------|------|------|
|          | A                | B    | C    | D    |
| Talango  | 100%             | 100% | 100% | 100% |
| Manding  | 100%             | 100% | 100% | 100% |

Keterangan : A (0 ppm), B (2500 ppm), C (5000 ppm), D (7500 ppm).

Berdasarkan tabel diatas terlihat bahwa persentase kalus hidup varietas Talango pada perlakuan 0, 2500, dan 5000 ppm sebesar 100%, namun pada perlakuan 7500 ppm persentase kalus hidupnya sebesar 66,7%. Hal ini sesuai dengan pengamatan morfologi kalus (gambar 2), dimana terlihat bahwasanya kalus Talango yang ditumbuhkan pada medium NaCl 7500 ppm, tidak mampu bertahan dalam kondisi cekaman salinitas tertinggi. Sedangkan kemampuan bertahan kalus Manding sebesar 100% di setiap perlakuan. Perbedaan persentase kalus hidup dalam kondisi tercekam tersebut dapat dipengaruhi oleh berbagai macam mekanisme pertahanan kalus. Beberapa mekanisme toleransi untuk melindungi dari efek cekaman salinitas yakni sintesis zat terlarut organik yang kompatibel seperti prolin, sukrosa, polioliol, trehalosa dan QACs [15], homeostatis ion, dan induksi enzim antioksidan [15] sehingga mampu membatasi penyerapan garam dan menyesuaikan tekanan osmotik. Pada penelitian [5], mekanisme toleransi yang dilakukan tanaman *Z. mays* terhadap cekaman salinitas yakni dengan meningkatkan akumulasi prolin dan glycine betaine pada jaringan. Dimana akumulasi prolin pada kondisi salinitas tinggi berfungsi sebagai penyedia cadangan Karbon dan Nitrogen untuk pertumbuhan, stabilisasi membran, melindungi aktivitas fotosintesis, dan fungsi mitokondria [15]. Berdasarkan hal tersebut dapat dikatakan bahwa persentase kalus hidup dengan nilai sebesar 100% dipengaruhi oleh adanya mekanisme toleransi.

**C. Pengaruh Cekaman Salinitas terhadap Pertambahan Berat Kalus**

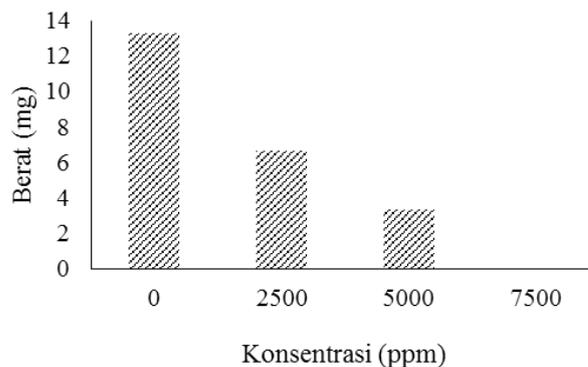
Pertambahan berat kalus didapat dari perhitungan selisih berat akhir setelah inkubasi 28 hari dengan berat awal sebelum inkubasi. Pengaruh interaksi antara varietas *Z. mays* dengan perlakuan konsentrasi NaCl ditunjukkan pada tabel 2. Penurunan berat kalus terjadi seiring dengan tingginya konsentrasi NaCl pada kedua varietas tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa kedua varietas yakni kalus Talango dan Manding pada konsentrasi 7500 ppm memiliki berat sebesar 0 dan 170 mg jika dibandingkan dengan kalus yang tumbuh pada medium tanpa NaCl. Sedangkan pertambahan berat kalus kedua varietas pada konsentrasi 2500 dan 5000 ppm juga mengalami penurunan tetapi tidak serendah penurunan pada konsentrasi tertinggi. Berdasarkan tabel 3 kedua varietas menunjukkan respon yang berbeda terhadap cekaman salinitas. Hal ini dapat dilihat dari perbedaan pertambahan berat yang berbeda antara varietas Talango dan

varietas Manding, dimana varietas Manding memiliki pertambahan berat lebih besar dibandingkan dengan varietas Talango sehingga dapat dikatakan bahwa Varietas Manding memiliki tingkat ketahanan yang lebih baik terhadap cekaman salinitas dibandingkan dengan varietas Talango. Hal ini disebabkan terganggunya pertumbuhan kalus yang tidak optimal.

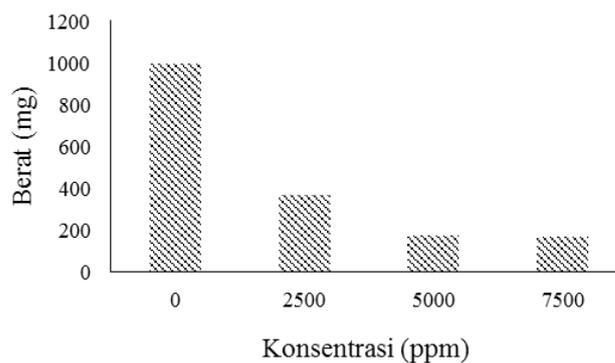
Tabel 2.  
Pengaruh interaksi antara kalus *Z. mays* varietas Talango dengan konsentrasi NaCl terhadap pertambahan berat kalus

| Varietas | Konsentrasi NaCl | Rata-rata ± SE |
|----------|------------------|----------------|
| Talango  | 0 ppm            | 13,33 ± 1,39   |
|          | 2500 ppm         | 6,67 ± 1,39    |
|          | 5000 ppm         | 3,33 ± 1,39    |
|          | 7500 ppm         | 0,00 ± 0,00    |
| Manding  | 0 ppm            | 996,70 ± 6,22  |
|          | 2500 ppm         | 370,00 ± 3,81  |
|          | 5000 ppm         | 173,30 ± 3,67  |
|          | 7500 ppm         | 170,00 ± 0,00  |

Keterangan : SE (Standart error).



Gambar 4. Pengaruh interaksi antara kalus *Z. mays* varietas Talango dengan konsentrasi NaCl terhadap pertambahan berat kalus.



Gambar 5. Pengaruh interaksi antara kalus *Z. mays* varietas Manding dengan konsentrasi NaCl terhadap pertambahan berat kalus.

Rendahnya pertambahan berat kalus terjadi seiring dengan tingginya konsentrasi NaCl pada kedua varietas tersebut (gambar 4 dan 5). Hal ini menunjukkan bahwa kedua varietas yakni Talango dan Manding mampu bertahan pada konsentrasi tertinggi. Hal ini dapat dikatakan bahwa Konsentrasi tertinggi dari penelitian ini belum menjadi konsentrasi lethal bagi kedua varietas. Selain itu, dapat pula diakibatkan karena terjadinya ketidak seimbangan penyerapan air dan hara, serta terhambatnya proses

metabolisme. Akibat tingginya konsentrasi garam menyebabkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman terhambat karena banyaknya akumulasi  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Cl}^-$  dalam sitoplasma sehingga memicu perubahan metabolisme dalam sel dan terhambatnya aktivitas enzim. Selain itu, dapat mengakibatkan dehidrasi parsial sel dan hilangnya turgor sel akibat berkurangnya potensial air di dalam sel. Berlebihnya kandungan  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Cl}^-$  dalam ekstraseluler menghambat asimilasi Nitrogen yakni penyerapan nitrat ( $\text{NO}_3$ ) dimana sangat penting untuk pertumbuhan tanaman [16]. Pada proses pertumbuhan dan perkembangan, ion  $\text{K}^+$  merupakan unsur penting dan diperlukan dalam jumlah yang cukup besar. Namun dengan kandungan Natrium ( $\text{Na}^+$ ) yang tinggi mengakibatkan ion  $\text{K}^+$  menurun [17]. Rujukan [6], menyatakan bahwa fungsi ion  $\text{K}^+$  adalah untuk mempertahankan keseimbangan osmotik, berperan dalam pembukaan dan penutupan stomata. Selain itu, rujukan [18], menyatakan bahwa tingginya konsentrasi  $\text{NaCl}$  mampu menyebabkan penurunan permeabilitas sel terhadap air dan mengakibatkan menurunnya laju masuknya air ke dalam sel.

#### IV. KESIMPULAN/RINGKASAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa tingkat ketahanan *Zea mays* varietas Talango dan Manding terhadap tingginya konsentrasi salinitas berbeda-beda. Semakin tinggi konsentrasi salinitas maka akan berpengaruh terhadap perubahan morfologi warna kalus, persentase kalus hidup yang rendah, dan penambahan berat kalus yang semakin menurun.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis F.F. mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia yang telah memberikan dukungan finansial melalui Beasiswa Bidik Misi tahun 2011-2015. Selain itu, penulis juga mengucapkan terima kasih kepada dosen pembimbing yang memberikan dana pada penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

- [1] Departemen Pertanian. "Prospek dan arah pengembangan agribisnis jagung". Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Departemen Pertanian (2005).
- [2] S. Gunadi. "Teknologi pemanfaatan lahan marginal kawasan pesisir". *Jurnal Teknologi Lingkungan*. Vol. 3, No. 3 (2002) 232-236.
- [3] Mukhtasor. *Pencemaran pesisir dan laut*. Jakarta: Pradnya Paramita (2007).
- [4] R. A. Balkrishna, dan S. S.Shankarrao. "In vitro screening and molecular genetic markers associated with salt tolerance in maize". *African Journal of Biotechnology*. Vol. 12(27), (2013) pp. 4251-4255.
- [5] M. M. F. Mansour, K. H. A. Salama, F. Z. M. Ali, dan A. F. Abou Hadid. "cell and plant responses to  $\text{NaCl}$  in *Zea Mays* L. cultivars differing in salt tolerance". *Gen. Appl. Plant Physiology*, 31(1-2) (2005) 29-41.
- [6] N. Tuteja, dan S. Mahajan. "Cold, salinity and drought stresses: An overview". *Arch. Biochem. Biophys.*, 444 (2003) 139-158.
- [7] Z. Dajic. "Salt stress: physiology and molecular biology of stress tolerance in plants". In: *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance*. Netherlands: Springer (2006) p. 41-99.
- [8] F. Queiro's, F. Fidalgo, I. Santos, dan R. Salema. "In vitro selection of salt tolerant cell lines in *Solanum tuberosum* L". *Biol. Plant*. 51 (2007) 728-734.

- [9] I. W. A. Ubudiyah "Respon kalus beberapa varietas padi (*Oryza sativa* L.) pada kondisi cekaman salinitas ( $\text{NaCl}$ ) secara *in vitro*". *Tugas Akhir*. Surabaya: Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (2013).
- [10] N. Munir, dan F. Aftab. "Effect of  $\text{NaCl}$  stress on callus morphology and growth of sugarcane callus Culture (cv. SPF 234 and cv. HSF 240)". *Pakistan Journal of Science*. Vol. 65 No. 4 (2013).
- [11] S. Sevengor, F. Yasar, S. Kusvuran, dan S. Ellialtioglu, "The effect of salt on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidative enzymes of pumpkin seedling". *African Journal of Agriculture Research*. Vol. 6 (21) (2011) pp. 4920-4924.
- [12] S. Hutami. "Ulasan masalah pencoklatan pada kultur jaringan". *Jurnal Agrobigen*. Vol 4. No.2 (2008) 83-88.
- [13] A. M. Prittila, O. Podolich, J. J. Koskima Ki, E. Hohtola, dan A. Hohtola. "Role of origin and endophyte infection in browning of bud - derived tissue culters of scots pine (*Pinus sylvestris* L.)". *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 95: (2008) 47-55.
- [14] M. Farid, Y. Musa, Nasaruddin, dan Darmawan. "Variasi somaklonal tebu tahan salinitas melalui mutagenesis *in vitro*". *Jurnal Agrivigor*. Vol 5 (3), (2006) pp. 247-258.
- [15] M. K. Rai, R. K. Kalia, R. Singh, M. P. Gangola, dan A. K. Dhawan. "Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection-an overview of the recent progress". Elsevier. *Environmental and Experimental Botany*. Vol 7 (1), (2011) PP 89-98.
- [16] R. Yuniati. "Penapisan galur kedelai *Glycine max* (L.) Merrill toleran terhadap  $\text{NaCl}$  untuk penanaman di lahan marginal". *Jurnal Makara Sains* 8 (1): (2004) 21-24.
- [17] R. A. James, C. Blake, C. S. Byrt, dan R. Munns. "Major genes for  $\text{Na}^+$  exclusion, *Nax1* and *Nax2* (wheatHKT1;4 and HKT1;5), decrease  $\text{Na}^+$  accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions". *Journal of Experimental Botany*. vol. 62, no. 8, (2011) pp. 2939-2947.
- [18] H. Marschner. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. San Diego: Academic Press (2005).



**ITS**  
Institut  
Teknologi  
Sepuluh Nopember

**TUGAS AKHIR – SB141503**

**SELEKSI *IN VITRO* TANAMAN JAGUNG (*Zea mays* L.) VARIETAS  
TALANGO DAN MANDING TERHADAP CEKAMAN SALINITAS**

Oleh :

Fathin Finariyah (1511 100 012)

**PENGUJI I : Aunurohim, S.Si., DEA.**  
**PENGUJI II : Wirdatul Muslihatin, S.Si., M.Si.**  
**PENGUJI III : Triono Bagus Saputro, S.Si., M.Biotech.**

Jurusan Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

# Latar Belakang

Jagung



Seleksi  
*In Vitro*



Lahan  
Marginal



Cekaman Salinitas



Analisis  
RAPD



Menurunkan produktifitas, mengganggu metabolisme, dll.

## **RUMUSAN MASALAH**

1. Bagaimana tingkat ketahanan varietas Talango dan Manding terhadap salinitas.
2. Bagaimana keragaman genetik galur hasil seleksi *in vitro*.

## **BATASAN MASALAH**

1. Eksplan yang digunakan pada penelitian ini hanya tanaman *Z. mays* varietas Talango dan Manding yang berasal atau ditanam di Sumenep.
2. Pemberian cekaman salinitas dilakukan pada saat kalus telah berhasil diinduksi.

## TUJUAN

1. **Menguji pengaruh tingkat ketahanan varietas Talango dan Manding terhadap salinitas.**
2. **Mengetahui keragaman genetik galur hasil seleksi in vitro.**

## MANFAAT

1. **Galur hasil seleksi dapat digunakan secara lebih lanjut dalam perakitan varietas tahan salinitas yakni sebagai tetua persilangan.**
2. **Memberikan informasi yang dapat dimanfaatkan sebagai hasil antara untuk penelitian pengembangan marka molekuler pada tanaman jagung lokal Indonesia dengan teknik RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*).**

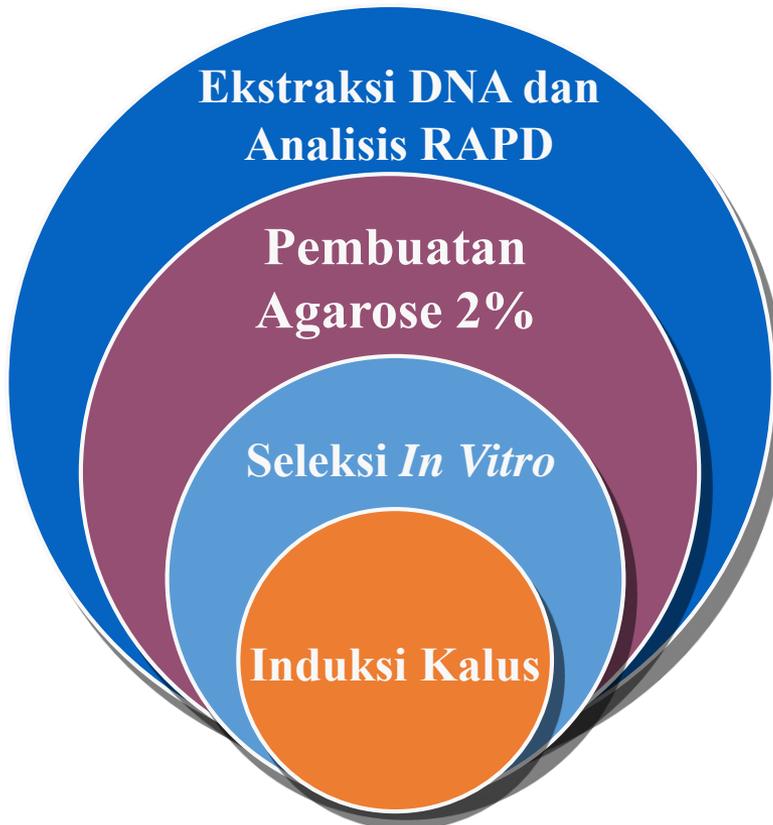
# Metodologi

**Waktu**

Bulan Nopember 2014 sampai Juli 2015

Laboratorium Kultur Jaringan Biologi ITS dan  
Laboratorium Molekuler Rumah Sakit Khusus  
Infeksi UNAIR

**Lokasi**



- Metode CTAB 3%
- 10 primer dan 30 siklus

- 0,8 gr + larutan TBE 1x sebanyak 40 ml

- MS0 + 4 ppm 2,4-D + Konsentrasi NaCl (0, 2500, 5000, 7500 ppm), 28 hari inkubasi

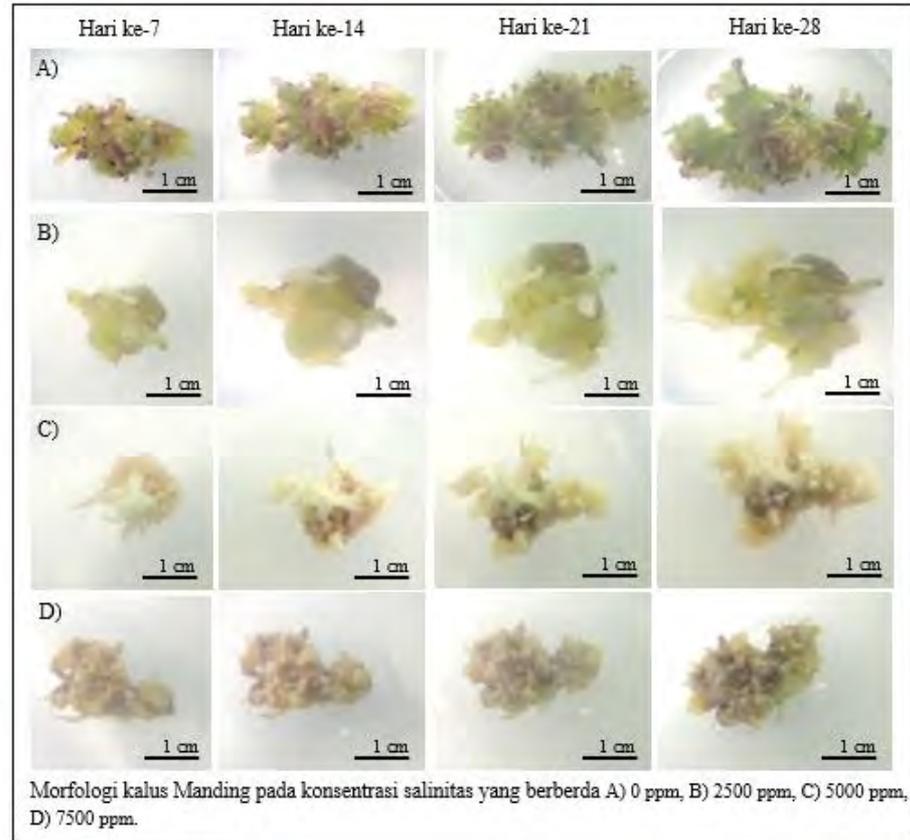
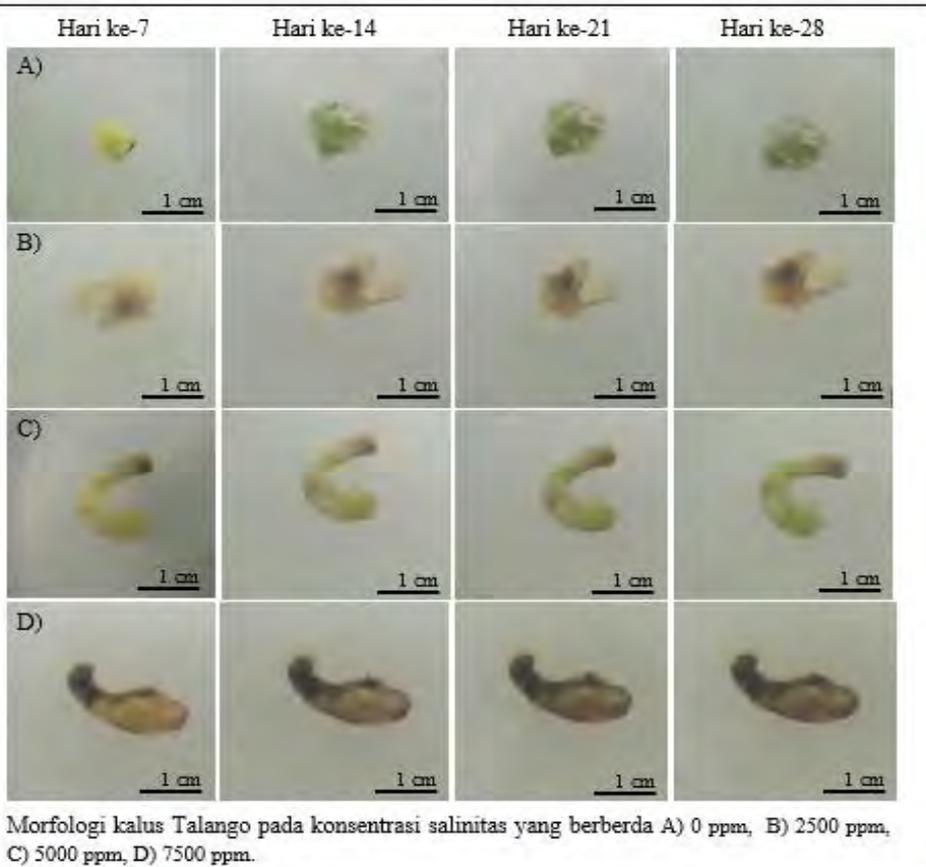
- MS0 + 4 ppm 2,4-D
- 28 hari inkubasi

# Rancangan Penelitian

- Rancangan acak lengkap (RAL)
- Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali, sehingga total unit percobaan sebanyak 24 botol kultur
- Analisis data pertambahan berat kalus didapat dari pengurangan berat kalus akhir setelah perlakuan dan berat awal sebelum perlakuan

# Hasil dan Pembahasan

## Pengaruh Beberapa Konsentrasi Cekaman Salinitas terhadap Morfologi Kalus



# Pengaruh Cekaman Salinitas terhadap Persentase Kalus Hidup

Tabel persentase kalus hidup pada seleksi *in vitro*

| Varietas | Konsentrasi NaCl |      |      |       |
|----------|------------------|------|------|-------|
|          | A                | B    | C    | D     |
| Talango  | 100%             | 100% | 100% | 66,7% |
| Manding  | 100%             | 100% | 100% | 100%  |

Keterangan :

A = konsentrasi 0 ppm

B = konsentrasi 2500 ppm

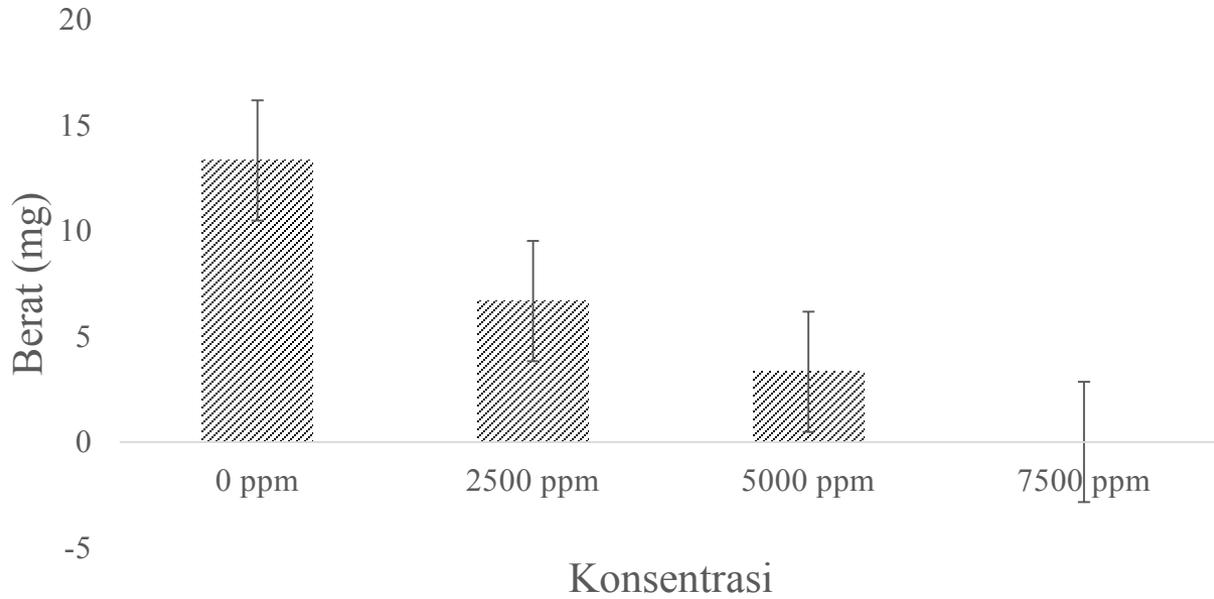
C = konsentrasi 5000 ppm

D = konsentrasi 7500 ppm

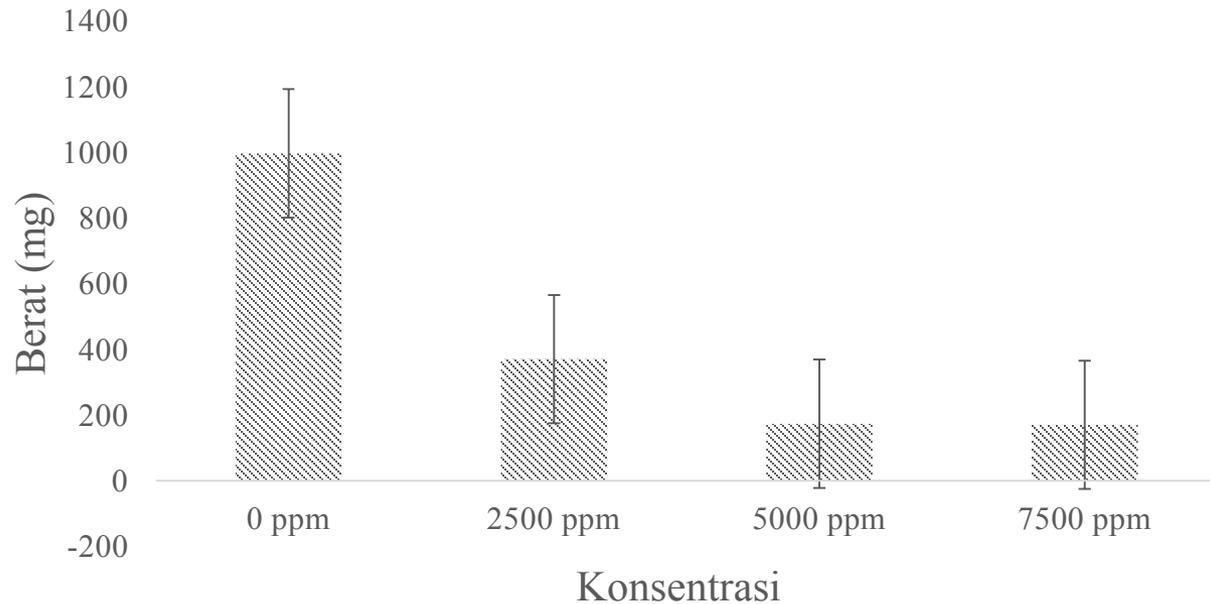
# Pengaruh Cekaman Salinitas terhadap Pertambahan Berat Kalus

Tabel pengaruh interaksi antara kalus *Z. mays* varietas Talango dan Manding dengan konsentrasi NaCl terhadap pertambahan berat kalus

| Varietas | Konsentrasi NaCl | Berat (mg)    |
|----------|------------------|---------------|
| Talango  | 0 ppm            | 13,33 ± 1,39  |
|          | 2500 ppm         | 6,67 ± 1,39   |
|          | 5000 ppm         | 3,33 ± 1,39   |
|          | 7500 ppm         | 0,00 ± 0,00   |
| Manding  | 0 ppm            | 996,70 ± 6,22 |
|          | 2500 ppm         | 370,00 ± 3,81 |
|          | 5000 ppm         | 173,30 ± 3,67 |
|          | 7500 ppm         | 170,00 ± 0,00 |



**Grafik pengaruh interaksi antara kalus *Z. mays* varietas Manding dengan konsentrasi NaCl terhadap pertambahan berat kalus**

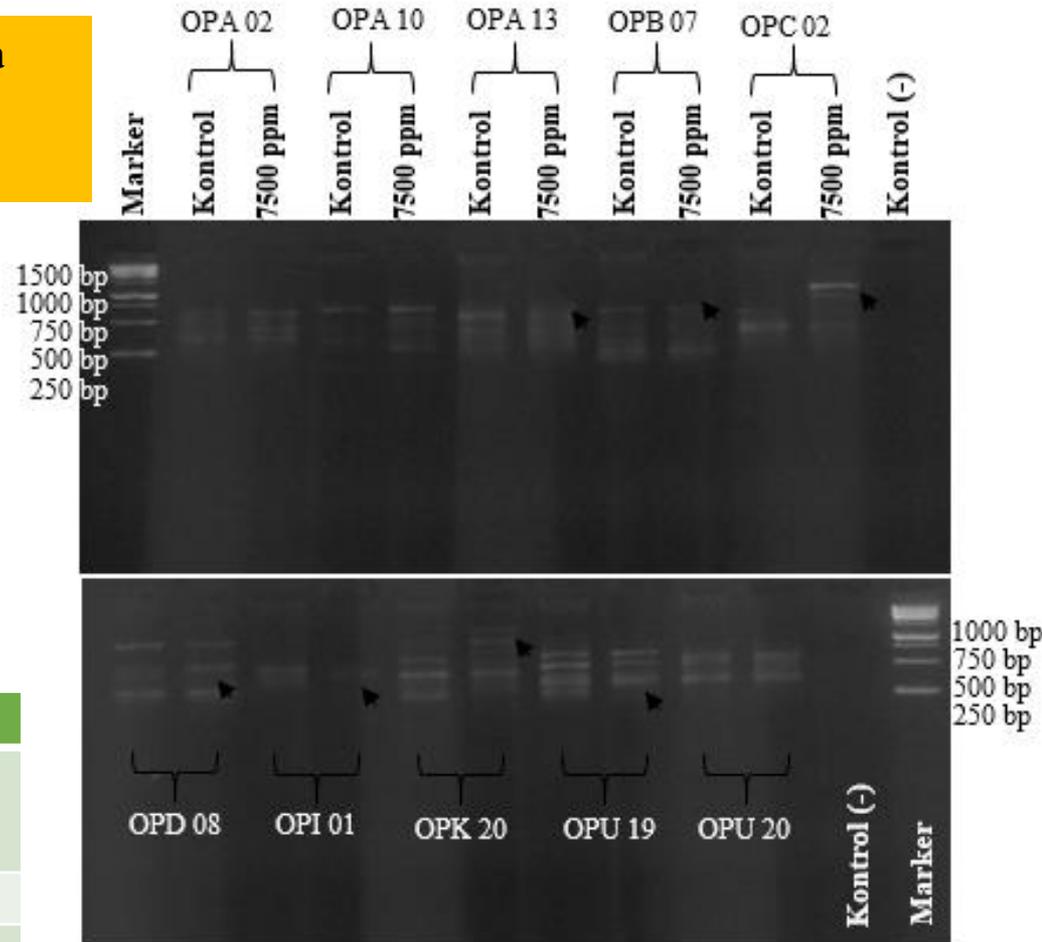


# Analisis RAPD

Tabel pengamatan hasil analisis RAPD

| No. | Primer | Urutan Primer<br>(5' – 3') | Talango             | Manding             |
|-----|--------|----------------------------|---------------------|---------------------|
| 1   | OPA 02 | TGC CGA GCT G              | <b>Monomorfisme</b> | Polimorfisme        |
| 2   | OPA 10 | GTG ATC GCA G              | <b>Monomorfisme</b> | Polimorfisme        |
| 3   | OPA 13 | CAG CAC CCA C              | Polimorfisme        | Polimorfisme        |
| 4   | OPB 07 | GGT GAC GCA G              | Polimorfisme        | Polimorfisme        |
| 5   | OPC 02 | GTG AGG CGT C              | Polimorfisme        | Polimorfisme        |
| 6   | OPD 08 | GTG TGC CCC A              | Polimorfisme        | <b>Monomorfisme</b> |
| 7   | OPI 01 | ACC TGG ACA C              | Polimorfisme        | <b>Monomorfisme</b> |
| 8   | OPK 20 | GTG TCG CGA G              | Polimorfisme        | Polimorfisme        |
| 9   | OPU 19 | GTC AGT GCG G              | Polimorfisme        | Polimorfisme        |
| 10  | OPU 20 | ACA GCC CCC A              | <b>Monomorfisme</b> | Polimorfisme        |

**Visualisasi pita DNA yang teramplifikasi pada varietas Talango (tanda panah menunjukkan polimorfisme pita DNA)**

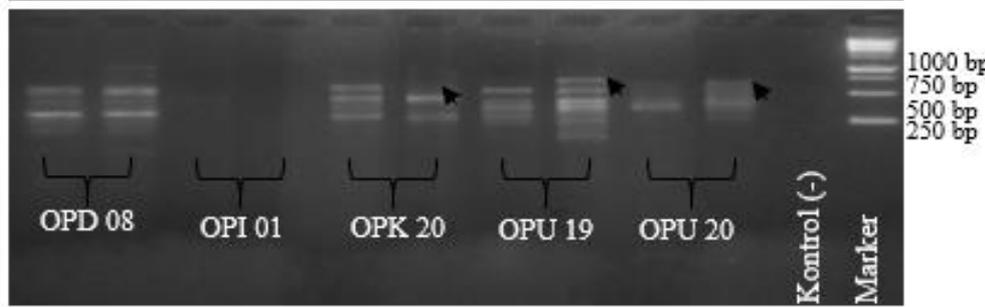
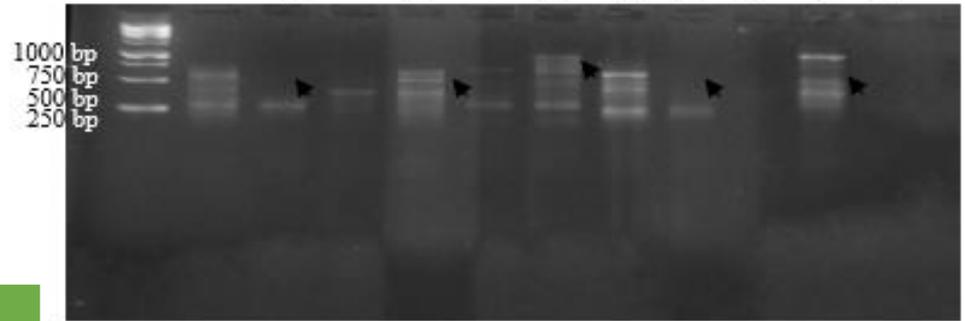


Tabel polimorfisme pita DNA Talango

| Primer | Talango                 |                              |                                |
|--------|-------------------------|------------------------------|--------------------------------|
|        | Urutan Primer (5' – 3') | Jumlah Pita DNA Pada Kontrol | Jumlah Pita DNA Pada Perlakuan |
| OPA 02 | TGC CGA GCT G           | 2                            | 2                              |
| OPA 10 | GTG ATC GCA G           | 1                            | 1                              |
| OPA 13 | CAG CAC CCA C           | 2                            | 1                              |
| OPB 07 | GGT GAC GCA G           | 3                            | 2                              |
| OPC 02 | GTG AGG CGT C           | 1                            | 1                              |
| OPD 08 | GTG TGC CCC A           | 4                            | 3                              |
| OPI 01 | ACC TGG ACA C           | 4                            | 1                              |
| OPK 20 | GTG TCG CGA G           | 3                            | 3                              |
| OPU 19 | GTC AGT GCG G           | 5                            | 3                              |
| OPU 20 | ACA GCC CCC A           | 2                            | 2                              |

**Visualisasi pita DNA yang teramplifikasi pada varietas Manding (tanda panah menunjukkan polimorfisme pita DNA)**

OPA 02    OPA 10    OPA 13    OPB 07    OPC 02  
 Kontrol    7500 ppm    Kontrol (-)



Tabel polimorfisme pita DNA Manding

| Primer | Manding                 |                              |                                |
|--------|-------------------------|------------------------------|--------------------------------|
|        | Urutan Primer (5' - 3') | Jumlah Pita DNA Pada Kontrol | Jumlah Pita DNA Pada Perlakuan |
| OPA 02 | TGC CGA GCT G           | 2                            | 1                              |
| OPA 10 | GTG ATC GCA G           | 1                            | 3                              |
| OPA 13 | CAG CAC CCA C           | 2                            | 4                              |
| OPB 07 | GGT GAC GCA G           | 4                            | 2                              |
| OPC 02 | GTG AGG CGT C           | -                            | 4                              |
| OPD 08 | GTG TGC CCC A           | 2                            | 2                              |
| OPI 01 | ACC TGG ACA C           | -                            | -                              |
| OPK 20 | GTG TCG CGA G           | 3                            | 1                              |
| OPU 19 | GTC AGT GCG G           | 3                            | 4                              |
| OPU 20 | ACA GCC CCC A           | 1                            | 4                              |

# Kesimpulan dan Saran

## Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa tingkat ketahanan *Zea mays* varietas Talango dan Manding terhadap tingginya konsentrasi salinitas berbeda. Semakin tinggi salinitas maka akan berpengaruh terhadap perubahan morfologi, dan penambahan berat kalus yang semakin kecil. Keragaman genetik yang diperoleh melalui analisis RAPD menunjukkan adanya polimorfisme. Hal ini membuktikan adanya perbedaan genetik antara kalus kontrol dan toleran

## Saran

- Meningkatkan konsentrasi NaCl untuk mengetahui tingkat ketahanan kalus *Z. mays* sampai tingkat lethal dimana kalus sudah tidak mampu bertahan
- Tahap seleksi lebih lanjut seperti tahap regenerasi kalus sampai dengan planlet yang diaklimatisasi untuk mendapatkan varietas *Z. mays* yang toleran
- Dilakukan analisis kandungan prolin, dan metabolit sekunder lainnya.

