

**LAPORAN HASIL  
PENELITIAN FUNDAMENTAL I/II**

22 FEB 2008



0800499

**IDENTIFIKASI GEN PENYANDI PERCABANGAN PADA  
DUA GALUR KENAF HASIL MUTASI DENGAN ETHYL  
METHANE SULFONATE (EMS)  
DAN MEKANISMENYA DALAM PENGONTROLAN  
PEMBENTUKAN CABANG**

Oleh

**Dr. Ir. Estri Laras Arumingtyas, MScSt  
Dr. Ir. Retno Mastuti, MAgSc, DAgSc  
Dra. Serafinah Indriyani, MSi**

Dibiayai oleh Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat,  
Dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian  
Nomor : 323/SP/PP/DP2M/II/2006  
Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penugasan Penelitian Desentralisasi  
Nomor : 017/SP2H/PP/DP2M/III/2007  
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi  
Departemen Pendidikan Nasional

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
Nopember 2007**

## DAFTAR ISI

	<b>Hal.</b>
HALAMAN PENGESAHAN .....	i
RINGKASAN DAN SUMMARY .....	ii
PRAKATA.....	vi
DAFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
BAB I PENDAHULUAN.....	1
BAB II TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	4
BAB III TINJAUAN PUSTAKA.....	5
BAB IV METODE PENELITIAN.....	10
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	15
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	30
DAFTAR PUSTAKA.....	31
LAMPIRAN .....	36



## HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN HASIL PENELITIAN FUNDAMENTAL

1. Judul Penelitian : : Identifikasi Gen Penyandi Percabangan pada Dua Galur Kenaf Hasil Mutasi dengan *Ethyl Methane Sulfonate* (EMS) dan Mekanismenya dalam Pengontrolan Pembentukan Cabang
2. Ketua Peneliti
  - a. Nama Lengkap dan Gelar : Dr. Ir.Estri Laras Arumingtyas, MScSt.
  - b. Jenis Kelamin : Perempuan
  - c. NIP : 131 759 546
  - d. Pangkat/Gol. : Pembina/IVa
  - d. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
  - e. Fakultas/Jurusan : MIPA/Biologi
  - f. Perguruan Tinggi : Universitas Brawijaya
  - g. Pusat Penelitian : Lembaga Penelitian Universitas Brawijaya
3. Jumlah Tim Peneliti : 3 orang
4. Lokasi Penelitian : Lab. Fisiologi dan Kultur Jaringan Tumbuhan dan Lab. Biologi Molekuler, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Brawijaya
5. Kerja Sama dengan Institusi Lain :
  - a. Nama Instansi : Lembaga Biologi Molekul Eijkman
  - b. Alamat : Jl. Diponegoro 69, Jakarta
6. Masa Penelitian : 2 tahun
7. Biaya total yang diperlukan : Rp. 54.000.000,- (Limapuluh Empat Juta Rupiah)

Malang, 31 Oktober 2007

Ketua Peneliti

Mengetahui  
An. Dekan Fakultas MIPA  
Pembantu Dekan I

\_\_\_\_\_

Drs. Unggul P. Juswono, MSc  
NIP. 131 879 050

\_\_\_\_\_

Dr. Ir.Estri Laras Arumingtyas, MScSt.  
NIP. 131 759 546

**Menyetujui**  
An. Ketua Lembaga Penelitian  
Universitas Brawijaya  
Sekretaris,

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Ir. Siti Chuzaemi MS.  
NIP. 130 809 321



IDENTIFIKASI GEN PENYANDI PERCABANGAN PADA DUA GALUR  
KENAF HASIL MUTASI DENGAN *ETHYL METHANE SULFONATE* (EMS)  
DAN MEKANISMENYA DALAM PENGONTROLAN PEMBENTUKAN  
CABANG

Estri Laras Arumingtyas, Retno Mastuti, Serafinah Indriyani  
Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Brawijaya

RINGKASAN

Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan jumlah dan perilaku gen, serta mekanisme dalam mengontrol percabangan mutan kenaf hasil perlakuan Ethyl Methane Sulfonate (EMS) melalui teknik persilangan, fisiologi dan molekuler.

Galur murni tipe percabangan basal disilangkan dengan galur murni tipe percabangan apikal. Turunan pertama (F1) dari persilangan tersebut diamati. Secara garis besar terdapat paling tidak 3 kemungkinan yang terjadi yaitu : 1. Bila ada satu gen (tipe percabangan yang satu adalah merupakan alel tipe yang lainnya) dan hubungan antar alelnya dominan penuh, maka F1 hasil persilangan hanya memunculkan 1 sifat bercabang saja yaitu yang lebih dominan, dan F2 akan terdiri dua tipe cabang tersebut dengan perbandingan 3:1. 2. Bila ada 2 gen dan keduanya dominan penuh maka F1 berfenotip gabungan antara percabangan basal dan apikal, F2 akan bersegregasi dengan rasio 9 tanaman bertipe cabang gabungan: 3 tanaman bertipe cabang basal : 3 tanaman bertipe cabang apikal : 1 tanaman tidak bercabang. 3. Bila kedua tipe percabangan dikontrol oleh 2 alel resesif maka F1 adalah tipe tidak bercabang dan F2 bersegregasi menjadi 9 tidak bercabang : 3 tanaman bertipe cabang basal : 3 tanaman bertipe cabang apikal : 1 tanaman tipe bercabang gabungan.

Persilangan antara dua tipe percabangan ini telah dilakukan pada penelitian sebelumnya (Arumingtyas, tidak dipublikasikan), sehingga pada penelitian ini akan dilakukan penanaman F1 yang selanjutnya dibiarkan selfing (penyerbukan sendiri) untuk mendapatkan F2 untuk dilihat pola segregasinya.

Identifikasi sekuen gen cabang secara molekuler dilakukan PCR dengan berbagai primer cabang dan dilanjutkan dengan sekuensing untuk menentukan sekuen gen cabang tersebut. Isolasi DNA dilakukan menggunakan metode Doyle dan Doyle (1987), menggunakan bahan tanaman biji dan daun muda. Penggunaan biji dimaksudkan untuk menjajagi kemungkinan deteksi lebih dini terhadap gen percabangan. PCR menggunakan 5 pasang primer, yang terdiri dari 4 primer spesifik yang diturunkan dari sekuen gen percabangan *AUX1*, *AXRI* dari *Arabidopsis thaliana*, *RMS1* dari *Pisum sativum*, dan *Ls* dari *Lycopersicon esculentum*, serta 1 pasang primer degenerate yang diturunkan dari sekuen yang terkonservasi dari gen-gen *LAS*, *Ls* dan *Moc*. Program yang digunakan 1 menit denaturasi pada suhu 93 °C, 30 detik annealing pada 56 °C, 1 menit ekstensi pada suhu 72 °C, sebanyak 35 siklus. Pemanasan awal dilakukan selama 1 menit pada suhu 93 °C, dan fase pemanjangan terakhir dilakukan selama 10 menit pada suhu 72 °C. Sekuensing dilakukan dengan prosedur Big Dye Terminator mix pada mesin ABI 377A sequencer. Identifikasi fisiologi dilakukan dengan mengukur konsentrasi auksin pada bagian pucuk, batang (cabang apikal, tengah dan basal), dan akar untuk menduga mekanisme pengontrolan cabang.



Keturunan pertama dari persilangan kontrol dengan galur bercabang basal maupun bercabang apikal menghasilkan keturunan yang hampir 100% bercabang baik basal atau apikal. Hal ini menunjukkan bahwa alel yang mengontrol sifat bercabang basal maupun apikal adalah alel resesif. Sementara keturunan pertama (F1) persilangan antara galur bercabang basal dengan galur bercabang apikal terdiri dari 7 tanaman tidak bercabang, 7 tanaman bercabang apikal dan 1 tanaman bercabang basal apikal. Hal ini mengindikasikan adanya 2 gen yang mengontrol sifat bercabang. Akan tetapi konfirmasi melalui penelusuran penurunan sifat bercabang serta segregasi alel-alel bercabang dan tidak bercabang pada keturunan kedua (F2) menunjukkan bahwa tipe percabangan basal merupakan hasil fenomena epigenetik, yang tidak lagi bersegregasi pada keturunan ketiga (F3). Sedangkan tipe percabangan apikal memang benar merupakan hasil ekspresi suatu gen percabangan dan masih terkonservasi sampai ke F3.

Hasil identifikasi gen percabangan melalui teknik PCR dan sekuensing menunjukkan bahwa gen percabangan pada kenaf dapat diamplifikasi dengan primer *AUX1* dan *AXR1* tetapi tidak dapat diamplifikasi oleh primer *Ls*, *RMS1*, dan *Llm*. Hal ini menunjukkan bahwa gen percabangan pada kenaf homolog dengan gen percabangan pada *Arabidopsis thaliana*. Analisis molekuler mengindikasikan adanya gen yang berperan dalam signaling auksin tetapi untuk tipe percabangan berbeda mungkin dikontrol oleh alel yang berbeda untuk lokus gen yang berkaitan dengan signaling auksin. Gen tersebut merupakan anggota dari famili gen pengontrol percabangan dan beraksi pada fase akhir pemunculan cabang melalui pengontrolan signaling auksin untuk menentukan apakah cabang akan berkembang atau tidak. PCR untuk DNA biji menghasilkan pita yang sangat tipis dan berukuran kecil (200 bp) berbeda dengan hasil PCR dengan menggunakan template DNA yang diisolasi dari daun. Hal ini mengindikasikan adanya perbedaan susunan gen dalam biji dengan tanaman dewasa.

Pengamatan fisiologi melalui pengukuran kandungan auksin menunjukkan bahwa tanaman bercabang mempunyai kandungan auksin di cabang yang lebih rendah dibanding pada ujung batang. Pemunculan cabang dipengaruhi oleh kandungan auksin pada ujung batang dan ujung cabang. Kandungan auksin yang lebih tinggi pada ujung cabang dibandingkan dengan pada ujung batang tampaknya mendorong pemunculan cabang. Sementara kandungan auksin yang rendah pada akar mungkin berhubungan dengan keberadaan sitokinin. Hal ini mengindikasikan bahwa gen *AUX1* mengontrol pembentukan cabang dengan cara mengontrol kandungan auksin pada ujung batang dan cabang atau dengan mengatur rasio kandungan auksin pada ujung batang dan cabang.



repository.ub.ac.id

## IDENTIFICATION OF BRANCHING GENE OF TWO KENAF LINE ARISED FROM MUTATION USING ETHYL METHANE SULFONATE (EMS) AND ITS MECHANISM IN CONTROLLING BRANCH FORMATION

Estri Laras Arumingtyas, Retno Mastuti, Serafinah Indriyani  
Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Brawijaya

### SUMMARY

The aim of this research was to determine the gene number, behavior and the mode of action of branching gene in controlling branching type of kenaf mutant lines aroused from EMS mutation using crossing, physiological and molecular techniques.

True lines basal branching plant was crossed with apical branching plant. The first filial (F1) was observed. The F1 should follow one of three possibilities, whether 1. If there was only one gene controlled the two type of branching (one type of branching was the allele of the other) and the allele relation was full dominant, the F1 should only showed one pattern of branching, the dominant. The F2 will be consist the two branching type with the ratio of 3:1. 2. If there were two genes and both were fully dominant, the F1 should the blend of two type of branching (basal-apical) and the F2 will segregate to 9 plants are blended branching: 3 plants are basal branching : 3 plants are apical branching and 1 plant is not branching. 3. If both branching type were controlled by two recessive alleles, the F1 will be non branching type and the F2 will segregate to 9 plants are non branching : 3 plants are apical branching: 3 plants are basal branching and 1 plant is blended branching.

Crossing between the two types of branching has been done in the previous experiment (Arumingtyas, not published), so in this first year research the F1 seed was planted. The F1 plants were let to self polinated to develop F2 seed. The F2 seed will be grown to detect its segregation.

Molecular identification was also conducted using PCR and sequencing techniques. DNA isolation was performed using the method of Doyle dan Doyle (1987). PCR was conducted using 5 pair of primers including 4 specific primers which was designed base on the sequence of branching genes *AUX1*, *AXR1* of *Arabidopsis thaliana*, *RMS1* of *Pisum sativum*, and *Ls* of *Lycopersicum esculentum*, and one pair of degenerate primer designed from amino acid conserve sequence of *LAS*, *Ls* and *Moc* genes. The PCR program used was 93 °C, 1 minute denaturation, 30 second annealing at 56 °C, 1 minute ekstention 72 °C, for 35 cycles. Pre-heating for 1 minute at 93 °C, and the last extention phase was done for 10 minutes at 72 °C. Sequencing was performed using the procedure of Big Dye Terminator mix, at ABI 377A sequencer. Physiological identification was performed by measuring auxin content in the shoot apex, branches (apical, middle and basal) and the root for deducing the mechanism of branching development.

The first filial of the crossing between non branching control plant and basal branching or apical branching plants consist of almost 100% branching, whether for basal branching parent or apical branching parent. This showed that both basal branching and apical branching were controlled by recessive alleles. The first filial of crossing between



basal branching and apical branching plants consist of 7 plants which were non branching and 7 plants were apical branching. One plant was blended basal-apical. This indicate that there were two genes that control both type of branching. However confirmation on the segregation at the F2 plants showed the epigenetic phenomenon responsible to the basal branching appearance, which was not identified in the F3. On the other hand, apical branching was truly genetically controlled and was conserved into F3 offspring.

Identification of branching gene using PCR and sequencing techniques showed that the branching gene of kenaf was successfully amplified by *AUX1* and *AXR1* primers but were not amplified by *Ls*, *RMS1*, and *Llm* primers. This indicate that branching gene of kenaf was homologous to branching gene of *Arabidopsis thaliana*. Molecular analysis indicate that the gene act as auxin signaling, but for different type of branching was controlled by different allele of the same locus. The gene was the member of gene family that control branching and active at the last phase of branching development by controlling auxin signaling to determine whether the branching candidate continue to develop or not. The PCR result was very thin and small in size (200 bp). It was different from the result of PCR using DNA tempale isolated from kenaf leaves. These indicated that there was different arrangement of gene in the seed from the one in the adult plants.

Identification of auxin content in the roots, apical shoot, and axillary branches was done using spectrophotometry method. The result showed that the branching plants has higher auxin content in the apical shoot compared to the content in the branches. Branching development seem to be affected by auxin content in the shoot apex and in the branches. The higher auxin content in the branches compared to those in the shoot apex seem to trigger the emergence of branches. This indicate that *AUX1* control the formation of branches by either controlling the content of auxin in the apical shoot and branches or the ratio of auxin content in the shoot and branches

## PRAKATA

Alhamdulillah kami panjatkan ke hadirat Allah s.w.t karena telah selesainya penulisan laporan penelitian kami yang berjudul **“Identifikasi Gen Penyandi Percabangan pada Dua Galur Kenaf Hasil Mutasi dengan Ethyl Methane Sulfonate (EMS) dan Mekanismenya dalam Pengontrolan Pembentukan Cabang”**. Semoga hasil penelitian ini berguna bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Pada kesempatan ini kami ucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Direktorat Pembinaan Penelitian Dan Pengabdian Pada Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional yang telah memberikan dana untuk berlangsungnya penelitian. Juga kepada Lembaga Penelitian Universitas Brawijaya khususnya, dan Universitas Brawijaya umumnya yang telah memberikan bantuan fasilitas yang mendukung terlaksananya penelitian ini.

Kami sadar bahwa laporan penelitian ini masih jauh dari sempurna, dengan demikian kritik dan saran yang bersifat membangun sangat kami harapkan.

Demikian semoga penelitian di bidang molekuler khususnya gen percabangan ini dapat berlangsung secara kontinyu, sehingga dapat diaplikasikan untuk peningkatan daya hasil tanaman serat maupun pangan.

Malang, 31 Oktober 2007

Penulis



DAFTAR TABEL

No.		Hal.
1.	Sekuen Primer yang Digunakan dalam Penelitian.....	11
2.	Hasil Pengamatan Morfologi Percabangan.....	15
3.	Segregasi Phenotip Keturunan Kedua (F2) Persilangan Kontrol dengan tanaman bercabang dan antar tanaman bercabang .....	19
4.	Hasil pengukuran kandungan auksin (ppm) pada akar, ujung batang dan ujung cabang tanaman kenaf bercabang basal, apikal, persilangan antar keduanya serta antar masing-masing tipe bercabang dengan kontrol...	28



## DAFTAR GAMBAR

No.		Hal.
1.	Diagram alir Alir Penelitian Tahun I dan II.....	14
2.	Kontrol KR11 yang tidak bercabang (a) dan tanaman bercabang (b).....	16
3.	Bagan persilangan dan perkiraan genotip kontrol, tanaman bercabang basal dari keturunannya.....	16
4.	Bagan persilangan dan perkiraan genotip kontrol, tanaman bercabang apikal dan keturunannya.....	17
5.	Bagan persilangan tanaman bercabang basal dan apikal serta keturunannya.....	18
6.	Hasil PCR DNA genom kenaf dengan menggunakan Primer RMS1 (a), AUX 1 (b), AXR1 (c), Ls (d) dan Llm (e). ....	20
7.	Hasil PCR dengan primer AUX1 (a) dan AXR1 (b).....	21
8.	Mekanisme proses pembentukan cabang.....	22
9.	Hasil PCR dengan menggunakan primer AUX1.....	23
10.	Hasil analisis alignment antara sekuen PCR tanaman bercabang basal dengan apikal .....	24
11.	Hasil analisis alignment antara sekuen PCR tanaman bercabang basal /apikal dengan kontrol yang tidak bercabang.....	24
12.	Hasil analisis alignment antara sekuen PCR keturunan persilangan BxA dengan tanaman bercabang basal /apikal serta kontrol dengan yang tidak bercabang.....	25
13.	Hasil isolasi DNA biji.....	26
14.	PCR menggunakan template DNA yang diisolasi dari biji kenaf.....	27
15.	Grafik kandungan auksin pada ujung akar, ujung batang dan ujung cabang...	29



## DAFTAR LAMPIRAN

No.		Hal.
1.	Daftar Riwayat Hidup Peneliti.....	36
2.	Abstrak Seminar “International Conference on Molecular Biology of Life Sciences 2007” .....	39



## BAB I PENDAHULUAN

### 1. 1. Uraian Umum Program Penelitian Tahun I

#### 1.1.1 Obyek penelitian

Dari induksi mutasi menggunakan mutagen kimia *Ethyl Methane Sulfonate* (EMS) terhadap kenaf varietas KR 11 yang tidak bercabang, telah didapatkan dua galur baru dengan tipe percabangan berbeda. Galur pertama mempunyai tipe percabangan basal, dan galur kedua mempunyai tipe percabangan apikal. Kedua tipe percabangan ini mungkin dikontrol oleh dua gen yang berbeda.

Galur bercabang sudah didapatkan dari hasil induksi mutasi dengan EMS yang telah dilakukan oleh Arumingtyas dan Indriyani (2004). Berdasarkan tipe percabangannya, galur-galur tersebut dapat dibedakan menjadi dua tipe percabangan yaitu tipe percabangan basal, dimana tipe ini bercabang pada nodus-nodus bawah (nodus 5-15) dan cabang muncul sebelum tanaman berbunga. Tipe kedua adalah tipe bercabang apikal, dimana cabang tipe ini muncul setelah tanaman berbunga pada nodus 20 ke atas. Tipe-tipe ini sama dengan beberapa tipe pada kapri (Arumingtyas, 1992), yang masing-masing dikontrol oleh gen-gen yang berbeda. Tipe bercabang basal dikontrol oleh *RMS1* dan bercabang apikal oleh *RMS2*.

Adanya berbagai gen yang mengontrol munculnya percabangan telah dibuktikan pada berbagai tanaman. Pada *Arabidopsis*, mutan *supershoot/bushy*, dikontrol oleh famili gen sitokrom P450 (Reintanz et al., 2001; Tantikanjana et al., 2001). Tipe percabangan mutan *teosinte branched1 (tb1)* pada jagung mungkin berfungsi sebagai regulator transkripsi dan berekspresi pada cabang (Doebley et al., 1997 yang beraksi dalam penekanan pertumbuhan dan determinasi cabang. Mutasi pada tiga lokus DAD (Decreased Apical Dominance) pada petunia dan lima lokus RMS (*Ramosus*) pada kapri (Napoli et al., 1999) mengurangi penghambatan pertumbuhan cabang dan mempunyai efek pleiotrofik pada sifat-sifat yang tidak ada hubungannya dengan percabangan (Stirnberg et al., 2002). Kloning terhadap gen MAX2 membuktikan adanya peran gen tersebut dalam degradasi protein yang dimediasi oleh ubiquitin pada penghambatan pertumbuhan cabang. Pada *Arabidopsis* mutan hasil perlakuan EMS 0.3 %, 11 jam, *max1* dan *max2* dari NASC menunjukkan percabangan aksilar yang banyak (Stirnberg et al.,



2002). Mutan-mutan tersebut berbeda dengan tipe asalnya berdasarkan hasil SSCP (Bell dan Ecker, 1994) dan CAPS (Koniczny dan Ausubel, 1993). Berdasar pada penelitian Sorefan et al (2003) *MAX4* orthologous dengan *RMS1*. Pada kenaf, analisis RAPD terhadap galur-galur bercabang tersebut menunjukkan adanya polimorfisme antara galur-galur tersebut (Arumingtyas et al., 2005). Demikian juga gen *AXR1* dan ortholognya *AUX1* dari Arabidopsis telah diketahui dibutuhkan dalam berbagai respon auksin. Fenotip bercabang banyak dari tanaman mutan *axr1* telah digunakan sebagai bukti genetik peran auksin dalam mengontrol percabangan (Strinberg et al., 1999).

Munculnya cabang pada tanaman diketahui berkaitan dengan fenomena dominansi apikal. Sedangkan dominansi apikal selama ini dipercayai berkaitan dengan keberadaan auksin. Akan tetapi mekanisme bagaimana auksin mempengaruhi dominansi apikal masih merupakan pertanyaan. Berdasar penelitian-penelitian yang ada selama ini auksin terbukti tidak mengontrol secara langsung pembentukan cabang (Klee et al., 1987; Romano et al., 1993, 1995). Terdapat indikasi adanya peran sitokinin bersamaan dengan pengaruh auksin dalam pemunculan cabang (Cline, 1991). Meskipun demikian sampai saat ini mekanisme pengontrolan percabangan oleh auksin dan sitokinin serta keterkaitan antara kedua hormon tersebut belum jelas.

Berbagai penelitian menunjuk adanya sinyal, ataupun substansi yang menghubungkan level auksin dengan jumlah cabang, tetapi belum pernah diidentifikasi jenis substansi tersebut. Melihat belum adanya identifikasi substansi tersebut, serta selalu munculnya auksin dan atau sitokinin ketika percabangan muncul, mungkin justru imbalanced antara level auksin dan sitokinin yang berperan dalam mengontrol pembentukan cabang.

Dengan demikian pada tahun pertama penelitian diidentifikasi gen-gen penyandi kedua tipe percabangan pada kenaf hasil mutasi *EMS* dengan teknik persilangan, serta analisis molekuler dengan sekuensing gen percabangan tersebut. Pada penelitian tahun kedua dilakukan identifikasi mekanisme pengontrolan pembentukan percabangan melalui observasi kandungan auksin terkait dengan keberadaan gen percabangan pada kenaf. Identifikasi dilakukan dengan meneliti kandungan auksin setiap cabang, tunas apikal serta akar pada dua galur yang berbeda dalam hal keberadaan percabangannya, untuk mengetahui apakah gen yang berbeda (galur yang berbeda) mempengaruhi level auksin

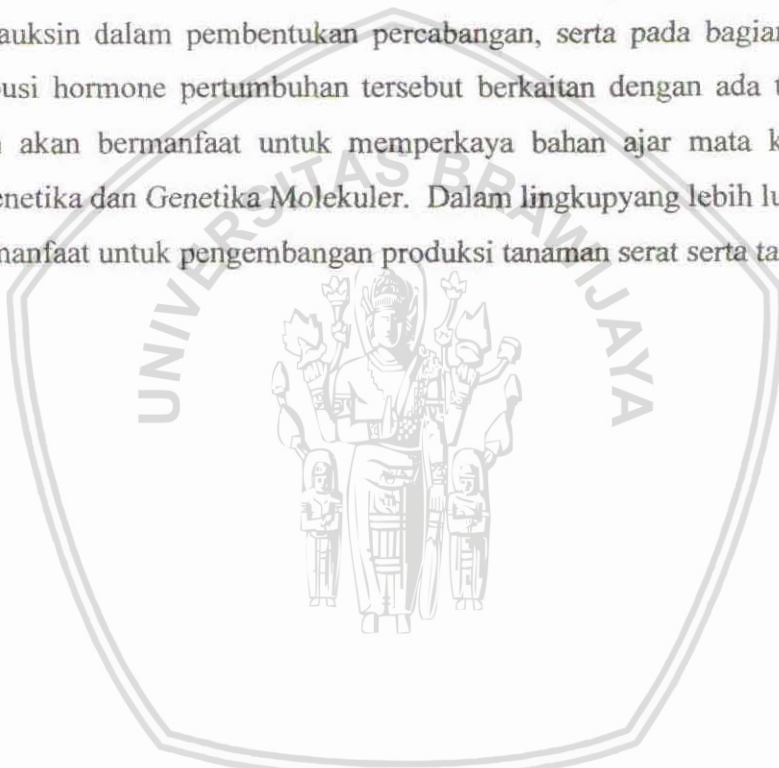
dengan pola yang berbeda serta menduga konsentrasi auksin yang paling berkaitan dengan ada tidaknya cabang.

### 1.1.2 Lokasi Penelitian

Laboratorium Fisiologi, Kultur Jaringan dan Mikroteknik Tumbuhan dan Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Brawijaya

### 1.1.3 Hasil yang Diharapkan

Didapatkan informasi jumlah serta karakter serta sekuen gen yang mengontrol sifat bercabang pada kenaf hasil mutasi EMS. Selain itu juga dapat diketahui dengan tepat peran auksin dalam pembentukan percabangan, serta pada bagian tanaman yang mana distribusi hormone pertumbuhan tersebut berkaitan dengan ada tidaknya cabang Informasi ini akan bermanfaat untuk memperkaya bahan ajar mata kuliah Genetika, Rekayasa Genetika dan Genetika Molekuler. Dalam lingkup yang lebih luas pengetahuan ini akan bermanfaat untuk pengembangan produksi tanaman serat serta tanaman pangan.



## BAB II

### TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

#### 2.1 TUJUAN

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk :

- Mendapatkan informasi jumlah, karakter serta sekuen gen yang mengontrol sifat bercabang pada kenaf hasil mutasi EMS.
- Konfirmasi F2 persilangan tanaman bercabang basal dengan apikal untuk memastikan adanya dua lokus (gen) yang mengontrol kedua tipe percabangan
- Konfirmasi keberadaan gen AUX1 pada tingkat biji untuk menjajagi kemungkinan deteksi lebih dini
- Mengukur konsentrasi auksin dan sitokinin pada bagian pucuk, batang (cabang apikal, tengah dan basal), dan akar untuk menduga mekanisme pengontrolan cabang

#### 2.2. MANFAAT

Pengetahuan tentang identitas gen cabang yang telah jelas mengontrol percabangan pada kenaf, akan membuka peluang untuk mentransfer gen tersebut pada tanaman lain yang mempunyai nilai ekonomis yang lebih tinggi, atau yang berguna untuk kepentingan masyarakat umum seperti tanaman pangan.

Sementara pengetahuan tentang mekanisme pembentukan cabang akan dapat dilakukan manipulasi secara lebih terarah sehingga arsitektur tumbuhan dapat diatur sesuai dengan kebutuhan.

Informasi-informasi tersebut akan bermanfaat untuk memperkaya bahan ajar mata kuliah Genetika, Rekayasa Genetika dan Genetika Molekuler. Dalam lingkup yang lebih luas pengetahuan ini akan bermanfaat untuk pengembangan produksi tanaman serat dan tanaman pangan.



### BAB III

## TINJAUAN PUSTAKA

### 3.1 Inisiasi Percabangan

Variasi percabangan merupakan penyebab penting adanya diversitas bentuk tanaman. Batang tanaman dewasa di karakterisasi dengan adanya cabang aksilar, dimana cabang-cabang berkembang dari meristem cabang aksilar yang terletak di antara daun dan poros batang. Setiap spesies mempunyai pola percabangan yang spesifik yang dapat berubah sepanjang siklus kehidupannya sebagai respon terhadap tahap-tahap perkembangan dan kondisi lingkungan (Cline, 1991; Beveridge et al., 2003). Variasi pola inisiasi meristem cabang aksilar dan aktivitasnya memberikan kontribusi terhadap diversitas arsitektur batang tanaman dan membuat individu tanaman mengadaptasikan morfologi batangnya terhadap lingkungan (Sussex dan Kerk, 2001).

Meristem cabang aksilar berkembang dari sel-sel pada bagian dasar dari daun aksilar atau dari sel-sel pada poros batang tepat di atas daun aksilar. Meristem tersebut mungkin diinisiasi pada saat yang sama dengan daun aksilar atau beberapa saat sesudah daun aksilar didifferensiasi (Evans dan Barton, 1997). Begitu diinisiasi, meristem cabang mungkin berkembang menjadi cabang dengan segera, atau mungkin berkembang menjadi kuncup aksilar dimana pertumbuhan ditunda setelah beberapa primordial daun aksilar dibentuk. Cabang mungkin juga mengikuti siklus berulang antara tumbuh dan istirahat (Stafsstrom dan Sussex, 1992).

Berdasarkan letak cabang pada tanaman dapat dikenali adanya berbagai tipe percabangan. Pada kapri terdapat tipe-tipe percabangan basal, aerial (apikal), bersela, dan komplit (basal+aerial) (Arumingtyas dan Murfet, 1992). Saat munculnya cabang serta nodus tempat munculnya cabang dari setiap tipe percabangan bervariasi. Identifikasi gen pengontrol percabangan pada kapri menunjukkan bahwa tipe-tipe percabangan tersebut dikontrol oleh gen-gen yang berbeda-beda (Arumingtyas et al., 1992) Hubungan antar alel dari setiap gen mengikuti pola yang bervariasi juga. Melihat demikian banyaknya tipe percabangan serta saat munculnya cabang, terlihat bahwa

kontrol percabangan membutuhkan banyak signal yang sebagian sudah diketahui dan sebagian belum.

### 3.2 Percabangan dan Produksi Biji

Adanya percabangan akan meningkatkan potensi menghasilkan biji dan meningkatkan biomassa batang. Pada kapri peningkatan jumlah cabang pada mutan K164, K524, K564 dan K586 meningkatkan total panjang batang sebanyak 2.7 sampai 5.3 kali dibandingkan tipe liarnya Torsdag (Arumingtyas, 1992; Arumingtyas dan Murfet, 1992). Sedangkan Blixt (1968) melakukan induksi mutasi dengan 0.35 % EMS pada varietas Parvus (bercabang sedikit, total panjang cabang 40.7 cm, panjang batang utama 134.7 cm) menghasilkan galur WL5951 yang bercabang banyak (total panjang cabang 354.5 cm, panjang batang utama 99 cm) (Arumingtyas, 1992). Jumlah panjang batang dan cabang WL5951 adalah 2.6 kali jumlah panjang batang dan cabang Parvus (Arumingtyas, 1992). Peningkatan jumlah dan panjang cabang ini sekaligus meningkatkan jumlah biji yang dihasilkan.

Berdasarkan *Descriptors and Descriptor States for Characterisation and Preliminary Evaluation Hibiscus cannabinus and H. sabdarifa* yang dikeluarkan oleh International Jute Organisation Germplasm Project pada dasarnya tipe percabangan kenaf ada 6 yaitu: 0 untuk tidak bercabang atau tidak ada pertumbuhan tunas aksilar; 1 untuk percabangan sangat lemah; 3 untuk percabangan lemah; 5 untuk percabangan sedang; 7 untuk percabangan kuat dan 9 untuk percabangan sangat kuat. Hasil penelitian di Balittas Karangploso Malang menunjukkan ada 4 tipe percabangan yaitu: tidak bercabang, rudimenter, jumlah cabang sedang dan bercabang banyak (Hartati *et al.*, 1996).

Biji kenaf terletak dalam kapsul yang berbentuk *ovoid* (oval) dengan ujung runcing. Kapsul terletak pada setiap ketiak daun pada batang maupun cabang (Webber III, Bhardwaj dan Bledsoe, 2002). Di USA biji kenaf sudah menjadi produk komersial. Meskipun demikian ketersediaan biji kenaf sebagai benih pertanaman masih terbatas. Beberapa perusahaan penyedia biji untuk benih pertanaman sudah dikenal di Texas, California, dan Florida seperti *The Jupiter Seed Company and D.B.M. Farms, Inc.*, *KenafSeed.Com*



repository.ub.ac.id

Peningkatan hasil biji per tanaman maupun tinggi tanaman merupakan dua hal yang penting untuk produksi kenaf. Produksi biji yang tinggi akan berguna untuk keperluan penyediaan biji baik untuk pertanaman maupun untuk pemuliaan tanaman, sedangkan tinggi tanaman yang meningkat akan meningkatkan hasil serat tanaman.

### 3.3 Gen-gen Pengontrol Percabangan

Mutan-mutan yang secara khusus kehilangan kemampuan untuk mengontrol pertumbuhan meristem cabang memberikan sarana untuk menyelidiki gen-gen yang terlibat dalam kontrol percabangan. Karakterisasi dari mutan Arabidopsis *supershoot/bushy*, yang bercabang banyak dan menginisiasi banyak cabang per nodus berhasil mengidentifikasi bahwa famili gen sitokrom P450 merupakan elemen yang mengontrol inisiasi meristem maupun pertumbuhannya (Reintanz et al., 2001; Tantikanjana et al., 2001). Kebalikannya mutasi pada lokus *teosinte branched1 (tb1)* pada jagung mempengaruhi pertumbuhan cabang tetapi tidak mempengaruhi inisiasinya. Mutan yang kehilangan fungsi *tb1* menghasilkan cabang yang memanjang yang diakhiri dengan tassel, sementara tipe liarnya mempunyai cabang yang pendek dan diakhiri oleh ear (Doebley et al., 1995). Gen TB1 mungkin berfungsi sebagai regulator transkripsi dan bereksresi pada cabang (Doebley et al., 1997). Pengaruh mutasi *tb1* pada pertumbuhan dan morfologi cabang mengindikasikan bahwa TB1 tidak hanya beraksi dalam penekanan pertumbuhan tetapi juga determinasi cabang.

Mutasi pada tiga lokus DAD (Decreased Apical Dominance) pada petunia dan lima lokus RMS (*Ramosus*) pada kapri (Napoli et al., 1999) menyebabkan hilangnya penghambatan pembentukan cabang. Lokus RMS dan DAD dapat dikelompokkan berdasar apakah peran gen-gen tersebut terbatas pada tunas ataukah juga mempengaruhi pensinyalan antara akar dan tunas, dalam pengontrolan percabangan. Stirnberg et al. (2002) mendapatkan bahwa mutasi pada dua lokus MAX1 dan MAX2 dari Arabidopsis, seperti RMS dan DAD juga mengurangi penghambatan pertumbuhan cabang dan mempunyai efek pleiotrofik pada sifat-sifat yang tidak ada hubungannya dengan percabangan. Kloning terhadap gen MAX2 mengarah pada peran degradasi protein yang dimediasi oleh ubiquitin pada penghambatan pertumbuhan cabang. Demikian juga gen AXR1 dari Arabidopsis telah diketahui dibutuhkan dalam berbagai respon auksin.



Fenotip bercabang banyak dari tanaman mutan *axr1* telah digunakan sebagai bukti genetik peran auksin dalam mengontrol percabangan (Strinberg et al., 1999).

### 3.4 Peran Auksin dan Sitokinin dalam Pembentukan Percabangan

Kontrol pertumbuhan percabangan masih sedikit difahami. Mekanisme pengontrolan yang sampai saat ini dipercayai adalah dominansi apikal. Bukti apikal dominan sudah banyak dilaporkan dan diketahui berhubungan dengan auksin, sehingga selama ini salah satu fokus dari penelitian percabangan adalah kontrol oleh hormone tanaman, terutama auksin dan sitokinin. Penelitian-penelitian ini (Cline, 1994; Tamas, 1995), menunjukkan bahwa auksin yang berada pada tunas apikal dan di transport secara basipetal berfungsi sebagai signal jarak jauh yang bersifat menghambat, tetapi nampaknya tidak beraksi pada pucuk itu sendiri. Dengan demikian tampaknya peran auksin terjadi secara tidak langsung (Phillips, 1975; Tremawas, 1981; Cline, 1991, 1994) tetapi memerlukan mesenger yang dapat menyampaikan signal auksin ke tunas. Beberapa penelitian membuktikan hal ini. Morris (1977) mendapatkan bahwa auksin yang diproduksi pada apeks tidak ditransport ke tunas dan menurut Cline (1996) auksin eksogen yang diberikan secara langsung ke tunas tidak menghambat pertumbuhannya.

Salah satu model menyebutkan bahwa pengaruh auksin dalam pertumbuhan cabang dimediasi oleh sitokinin. Sitokinin secara langsung dapat meningkatkan pertumbuhan tunas (Cline, 1991). Tanaman transgenik yang auksinnya meningkat, menunjukkan penurunan level sitokinin (Eklöf et al., 2000). Sitokinin yang dieksport dari akar meningkat setelah tanaman didekapitasi, tetapi peningkatan sitokinin tidak terjadi bila dilakukan aplikasi auksin pada tanaman yang didekapitasi (Bangerth, 1994).

Meskipun tampaknya terdapat hubungan antara level sitokinin dengan auksin berkaitan dengan munculnya cabang, tetapi tidak terdapat bukti lain yang menunjukkan adanya regulator pertumbuhan tunas di bawah auksin. Penelitian dengan memanfaatkan mutan-mutan percabangan sudah banyak dilakukan. Mutan-mutan *rms* mempunyai jumlah cabang yang banyak, tapi fenotip ini dapat dikembalikan menjadi tidak bercabang dengan menyambungkannya dengan tipe liar sebagai batang bawah. Jadi terdapat sinyal yang dapat melewati sambungan (*graft-transmissible*) dari batang bawah ke atas untuk menghambat percabangan (Foo et al., 2001); Morris et al., 2001). Sinyal ini tampaknya

bukan auksin atau sitokinin sebab bersamaan dengan peningkatan percabangan pada rms kandungan sitokininya rendah dan level serta transport auksin tidak melebihi tipe liar (Beveridge et al., 1997; Morris et al., 2001)

Banyaknya jumlah mutasi atau transgen yang mempengaruhi kandungan auksin, transport atau sensitifitas terhadapnya terutama pada Arabidopsis, memberikan pendekatan yang berbeda untuk menyelidiki peran auksin dalam apical dominansi, dan secara spesifik menyelidiki tahap perkembangan cabang saat level auksin diatur in vivo. Tanaman yang mengekspresikan gen-gen biosintesis IAA pada *Agrobacterium tumefaciens* mempunyai IAA endogen yang tinggi dan menunjukkan peningkatan dominansi apikal (Klee et al., 1987; Romano et al., 1993, 1995).

Studi mutasi oleh Arumingtyas et al. (belum dipublikasikan) mengusulkan bahwa mekanisme pemunculan percabangan melibatkan suatu famili gen yang meregulasi pematangan atau reduksi dominansi apikal atau dengan aklimatisasi terhadap kondisi stress (seperti radiasi UV) dengan cara peningkatan radikal yang dapat menyebabkan terjadinya fotooksidasi auksin (Strid et al., 1994; Rao et al., 1996), peningkatan enzim peroksidase yang mendegradasi IAA sehingga kandungan IAA menurun (Jansen et al., 2001), atau penghambatan *signal* auksin oleh *cryptochrome* (Imaizumi et al., 2002). Kedua proses regulasi ini dapat dipengaruhi oleh perlakuan dari luar seperti pemberian EMS dengan merubah gen-gen biosintesis auksin dan sitokinin, dan gen-gen pembawa *signal* penghambatan auksin.



## BAB IV METODE PENELITIAN

Penelitian ini berjangka waktu dua tahun. Pada tahun pertama dilakukan identifikasi gen penyandi percabangan baik dengan tehnik persilangan ataupun secara molekuler dengan PCR dan sekuensing.

Pada tahun kedua melihat kaitan keberadaan gen/gen-gen cabang tersebut dengan level auksin yang dikandung oleh tanaman untuk melihat jalur pengontrolan gen/gen-gen tersebut dalam pembentukan cabang.

Adapun diagram alir rencana penelitian disajikan dalam gambar 1.

### PENELITIAN TAHUN I

#### a. Identifikasi gen penyandi percabangan

Galur murni tipe percabangan basal disilangkan dengan galur murni tipe percabangan apikal. Turunan pertama (F1) dari persilangan tersebut diamati. Terdapat paling tidak 3 kemungkinan yang terjadi yaitu : Pertama, bila ada satu gen (tipe percabangan yang satu adalah merupakan alel tipe yang lainnya) dan hubungan antar alelnya dominan penuh , maka F1 hasil persilangan hanya memunculkan 1 sifat bercabang saja yaitu yang lebih dominan, dan F2 akan terdiri dari dua tipe cabang dengan perbandingan 3:1. Kedua, bila ada 2 gen dan keduanya dominan penuh maka F1 berfenotip gabungan antara percabangan basal dan apikal, F2 akan bersegregasi dengan rasio 9 tanaman bertipe cabang gabungan: 3 tanaman bertipe cabang basal : 3 tanaman bertipe cabang apikal : 1 tanaman tidak bercabang. Ketiga bila kedua tipe percabangan dikontrol oleh 2 alel resesif maka F1 adalah tipe tidak bercabang dan F2 bersegregasi menjadi 9 tidak bercabang : 3 tanaman bertipe cabang basal : 3 tanaman bertipe cabang apikal : 1 tanaman tipe bercabang gabungan.

#### b. Identifikasi molekuler

Isolasi DNA :

DNA dari daun muda kenaf menggunakan metode Doyle dan Doyle (1999)

PCR untuk gen percabangan kenaf:

Lima pasang primer forward dan primer reverse (Tabel 1) digunakan untuk mengamplifikasi sekuen DNA gen percabangan dari kenaf.

Tabel 1. Sekuen Primer yang Digunakan dalam Penelitian

No.	Primer	Sekuen	Jenis
1.	AXR1-F	CGGACGAGGATTACAGTGGT	Spesifik
2.	AXR1-R	CCTCAAGGACAAAGCAAAGC	Spesifik
3.	AUX1-F	CAAGTGGCACAAGTGCTGTT	Spesifik
4.	AUX1-R	GGTGGCTCCGGTAAAGTACA	Spesifik
5.	Ls-F	GGTGGCAATGTAGCTTCCAG	Spesifik
6.	Ls-R	CCAGCTATTCAAATACGCCAG	Spesifik
7.	RMS1-F	TTTTGAAGGTGGCAAGTGTGG	Spesifik
8.	RMS1-R	ACCAGGAGCAACCAAGAAGATG	Spesifik
9.	Llm-F	GA(AG)AC(N)(TC)T(N)GC(N)(GA)T(N)AA(TC) TG(TC)GC	Degenerate
10.	Llm-R	TA(N)CC(TC)TC(N)GA(N)GG(AG)TA(AG)TG	Degenerate

Masing-masing pasangan primer ini dicampur dengan 2 ul 10X buffer Taq Polymerase, 1.6 ul 200  $\mu$ M dNTP, 1.6 ul 2mM MgCl<sub>2</sub> dan 1U Taq Polymerase

Kondisi yang digunakan terdiri dari 1 menit denaturasi pada suhu 93 °C, 30 detik annealing pada 56 °C, 1 menit ekstensi pada suhu 72 °C, sebanyak 35 siklus. Pemanasan awal dilakukan selama 1 menit pada suhu 93 °C, dan fase pemanjangan terakhir dilakukan selama 10 menit pada suhu 72 °C.

Hasil amplifikasi dielektroforesis pada gel agarosa 1.5 % dengan buffer TBE untuk mengecek DNA hasil PCR .

#### Sekuensing DNA

Sekuensing dan persiapannya dilakukan di Lembaga Biologi Molekul Eijkman Jakarta.



## PENELITIAN TAHUN KE II

### a. **Konfirmasi jumlah gen pengatur percabangan kenaf melalui penelusuran segregasi pada tanaman F2 dan penyediaan bahan tanaman untuk analisis hormone**

Benih kenaf kontrol, bercabang basal, bercabang apikal, F2 dari persilangan kontrol X basal, kontrol X apikal serta basal X apikal, ditanam dalam polibag dengan ukuran 10 kg. Media tanam berupa campuran tanah dan humus dengan perbandingan 2:1. Polibag diletakkan di dalam rumah kaca, dengan jarak 40 x 40 cm untuk memaksimalkan percabangan. Pemupukan dengan dosis 60 kg N, 40 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> dan 60 kg K<sub>2</sub>O per ha dilakukan 10 hari setelah tanam sebanyak 1/3 bagian dan sisanya diberikan saat tanaman berumur 35 hari (Sastrosupadi *et al.*, 1996). Penyiraman dilakukan setiap hari pada pukul 08.00. Untuk kontrol, tanaman bercabang basal, tanaman bercabang apikal ditanam sebanyak 10 benih, sedangkan untuk F2 masing-masing digunakan 40 benih. Dari masing-masing kelompok percabangan diambil 5 sampel untuk analisis hormon. Sedangkan untuk penelusuran segregasi percabangan pada F2 pengamatan percabangan dilakukan ketika tanaman sudah memasuki fase generatif.

### b. **Konfirmasi keberadaan gen homolog AUX1 pada biji dengan Polymerase Chain Reaction (PCR).**

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan metode Doyle & Doyle (1987). PCR menggunakan primer yang diturunkan dari gen AUX1 dengan urutan untuk primer Forward: 3'-CAAGTGGCACAAGTGCTGTT-5' dan Reverse : 3'-GGTGGCTCCGGTAAAGTACA-5'. Masing-masing pasangan primer ini dicampur dengan 2 ul 10X buffer Taq Polymerase, 1.6 ul 200 μM dNTP, 1.6 μl 2mM MgCl<sub>2</sub> dan 1U Taq Polymerase

Kondisi yang digunakan terdiri dari 1 menit denaturasi pada suhu 93 °C, 30 detik annealing pada 56 °C, 1 menit ekstensi pada suhu 72 °C, sebanyak 35 siklus. Pemanasan awal dilakukan selama 1 menit pada suhu 93 °C, dan fase pemanjangan terakhir dilakukan selama 10 menit pada suhu 72 °C. Visualisasi hasil PCR dilakukan dengan elektroforesis pada gel agarosa 1.5%.

### c. Pengukuran kandungan IAA

#### - Metode Spektrofotometri (Harborne, 1987)

Kandungan IAA dihitung berdasarkan modifikasi metode senyawa indol (Harborne, 1987) dan metode pengukuran IAA pada kultur bakteri. Sampel dihomogenasi dengan methanol 80 % yang mengandung 2,5 mM Carbamat acid. Hasil homogenasi disaring dengan kertas saring Whatman no 1. Kemudian filtrat disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit. Selanjutnya 200 ul supernatant dicampur dengan 800 ul reagen Salkowsky, ditunggu 10 menit. Konsentrasi IAA ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm. Sebagai standar digunakan larutan IAA yang ditambahkan dengan reagen Salkowsky. Kandungn IAA dalam u/g berat basah sample dihitung dengan rumus berikut:

Hasil (ug/m) X volume methanol

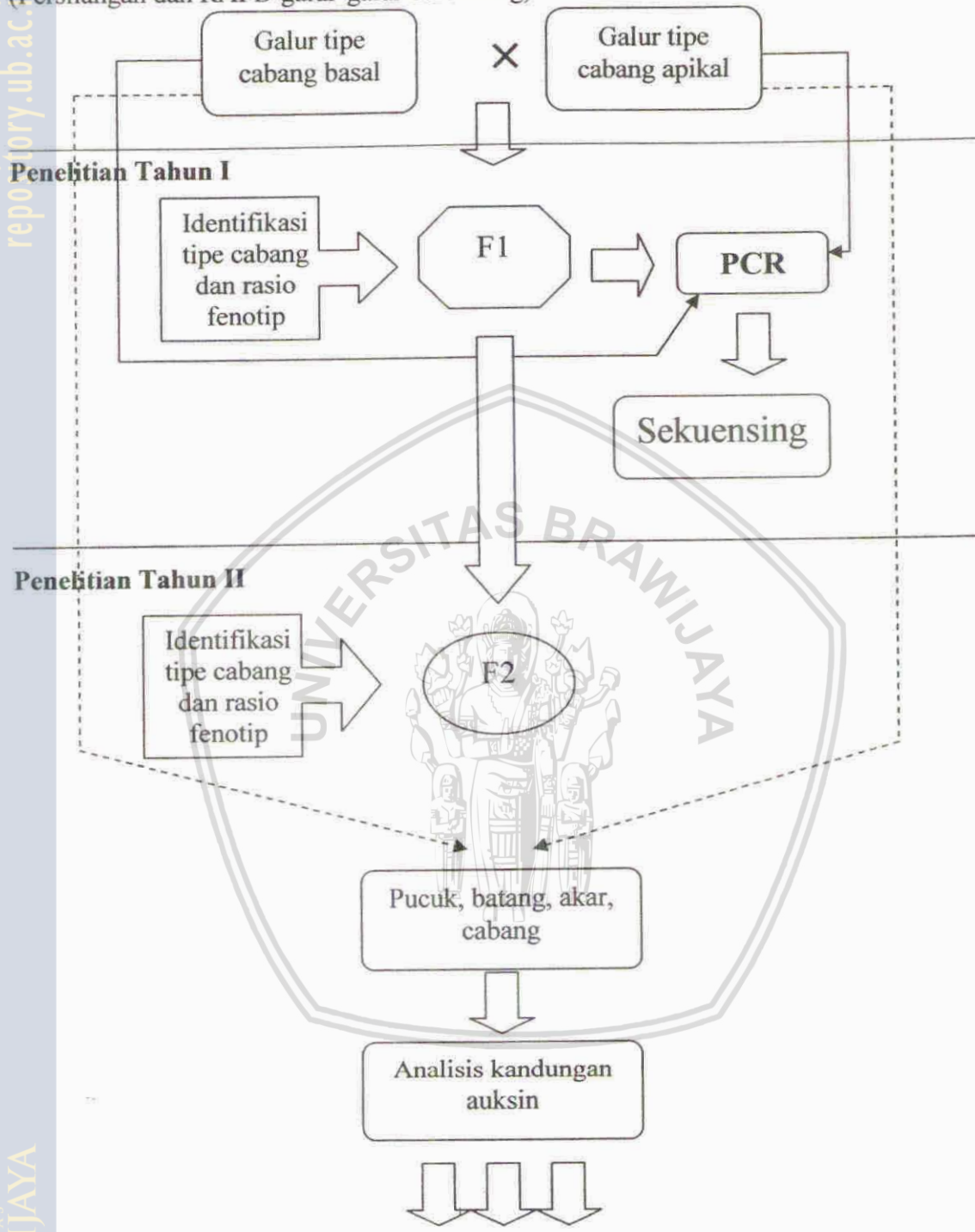
---

Berat sample (g)



**Pra Penelitian Fundamental**

(Persilangan dan RAPD galur-galur bercabang)



**Macam dan karakter molekuler gen pengontrol tipe percabangan**  
**Jumlah gen**  
**Jalur pengontrolan**

Gambar 1. Diagram alir Alir Penelitian Tahun I dan II

**BAB V**  
**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**5.1 Penentuan Jumlah dan Karakter Gen Pengontrol Sifat Percabangan Secara Morfologi**

Dari pengamatan terhadap karakter percabangan pada tanaman kenaf bercabang apikal, basal serta persilangannya dengan kontrol ataupun antar jenis percabangan didapatkan data seperti disajikan pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pengamatan Morfologi Percabangan

Persilangan	Keturunan					Jumlah	Keterangan
	N	B	A	BA	Mati		
K X B	4	0	0	0	1	5	B=resesif
K X A	19	0	2	0	0	21	A= resesif
B X A	7	0	7	1	1	16	A dan B dikontrol gen yang berbeda
K	3	0	0	0	0	3	Tidak bercabang
A	0	0	3	0	0	3	Bercabang apikal

Keterangan : K = kontrol; B = bercabang basal; A = bercabang apikal

Tanaman kontrol tidak bercabang (KR11) menunjukkan adanya siwilan, yaitu cabang yang tidak berkembang (paling panjang lebih kurang 10 cm) (Gambar 1 a). Hal ini khas pada KR11. Siwilan tersebut tidak berkembang menjadi cabang yang sesungguhnya (tidak menghasilkan bunga) dan umumnya meskipun tanaman telah mencapai fase generatif (berbunga) tidak terpicu untuk memanjang. Berbeda dengan tipe tanaman bercabang yang menginisiasi dan memunculkan cabang yang mampu menghasilkan bunga dan ketika tanaman memasuki fase generatif pertumbuhan cabang akan dipicu semakin cepat. Tanaman bercabang basal maupun apikal menunjukkan adanya cabang yang panjang dan nantinya akan menghasilkan bunga dan kapsul (Gambar 1b)

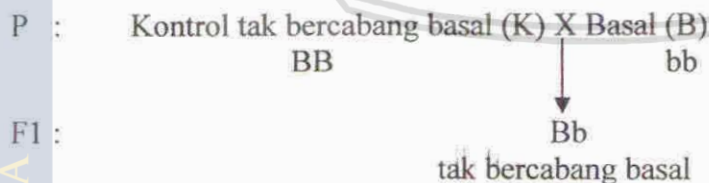




Gambar 2. Kontrol KR11 yang tidak bercabang (a) dan tanaman bercabang (b)

Persilangan kontrol dengan tanaman bercabang basal ( $K \times B$ ), menghasilkan keturunan (F1) 100 % tidak bercabang. Tanaman F1 ini berfenotip sama dengan kontrol yaitu mempunyai siwilan yang tidak berkembang menjadi cabang ketika tanaman memasuki fase generatif. Hal ini menunjukkan bahwa alel bercabang basal bersifat resesif, sehingga ketika disilangkan dengan kontrol maka alel resesif ini akan tertutupi oleh alel dominannya yang berasal dari induk tidak bercabang (kontrol).

Adapun bagan persilangan kontrol dengan tanaman bercabang basal dan perkiraan genotipnya adalah sebagai berikut :

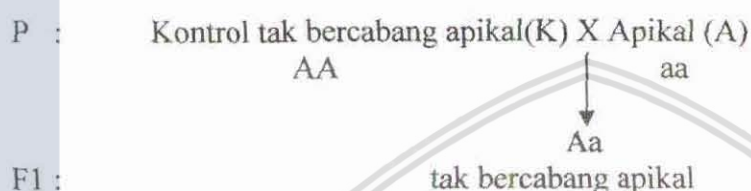


Gambar 3. Bagan persilangan dan perkiraan genotip kontrol, tanaman bercabang basal dan keturunannya.

Demikian juga persilangan kontrol dengan tanaman bercabang apikal ( $K \times A$ ), menghasilkan keturunan (F1) 90.48 % (19 dari 21 tanaman) tidak bercabang dan 9.5 % (2

dari 21 tanaman) bercabang apikal. Sama dengan F1 dari persilangan K X B, F1 tidak bercabang dari persilangan K X A inipun berfenotip sama dengan kontrol yaitu mempunyai siwilan yang tidak berkembang menjadi cabang ketika tanaman memasuki fase generatif. Hal ini menunjukkan bahwa alel bercabang apikalpun juga bersifat resesif, sehingga ketika disilangkan dengan kontrol maka alel resesif ini akan tertutupi oleh alel dominannya yang berasal dari induk tidak bercabang (kontrol).

Adapun bagan persilangan kontrol dengan tanaman bercabang apikal dan perkiraan genotipnya adalah sebagai berikut :



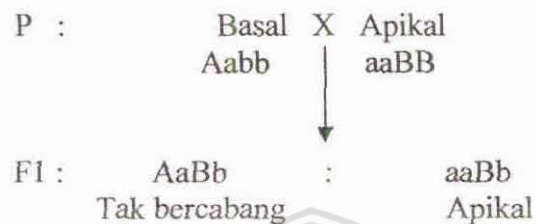
Gambar 4. Bagan persilangan dan perkiraan genotip kontrol, tanaman bercabang apikal dan keturunannya.

Dari kedua persilangan di atas diketahui bahwa baik tipe percabangan basal maupun apikal sama-sama dikontrol oleh alel resesif. Akan tetapi sampai tahap ini belum diketahui apakah kedua alel tersebut adalah alel yang sama. Untuk konfirmasi hal tersebut maka dilihat hasil persilangan antara tanaman bercabang basal dengan apikal. Persilangan tanaman bercabang basal dengan apikal (B X A), menghasilkan keturunan (F1) 46.67 % (7 dari 15 tanaman) tidak bercabang dan 46.67 % (7 dari 15 tanaman) bercabang apikal serta 6.67 % (1 dari 15 tanaman) bercabang basal apikal. Tujuh tanaman F1 yang tidak bercabang berfenotip sama dengan kontrol yaitu mempunyai siwilan yang tidak berkembang menjadi cabang ketika tanaman memasuki fase generatif, sedangkan tujuh tanaman bercabang apikal seperti induk bercabangnya. Munculnya F1 yang tidak bercabang ini menunjukkan adanya dua lokus yang mengontrol kedua tipe percabangan. Lokus yang satu yang mengatur munculnya percabangan apikal bersifat homozigot resesif (*aa*) pada tanaman bercabang apikal, sementara pada tanaman bercabang basal lokus ini heterozigot (*Aa*). Sementara lokus kedua pada tanaman bercabang basal bersifat homozigot resesif (*bb*), sedangkan pada tanaman bercabang aerial bersifat homozigot dominan (*BB*). Pada F1, alel resesif dari lokus A dari tanaman bercabang apikal dan alel



dominan dari tanaman tidak bercabang bergabung menghasilkan fenotip tidak bercabang sebanyak sekitar 50%. Dengan demikian dari persilangan ini diketahui bahwa ada dua lokus atau dua gen yang mengontrol kedua tipe percabangan kenaf.

Adapun bagan persilangan kontrol dengan tanaman bercabang apikal dan perkiraan genotipnya adalah sebagai berikut :



Gambar 5. Bagan persilangan dan perkiraan genotip tanaman bercabang basal dan apikal dan keturunannya.

Adanya 2 gen yang berbeda yang mengontrol kedua tipe percabangan tersebut tampaknya sejalan dengan teori mekanisme pengontrolan pembentukan cabang yang berkaitan dengan keberadaan hormon pertumbuhan auksin dan sitokinin serta rasio keduanya. Auksin diproduksi di pucuk dan ditransportasi basipetal, sedangkan sitokinin diproduksi di ujung akar dan ditransportasi ke segala arah. Auksin menyebabkan penghambatan pembentukan cabang. Perlu sinyal untuk menyampaikan efek penghambatan ke cabang dan perlu keseimbangan auksin-sitokinin yang tepat sehingga cabang muncul. Saat munculnya cabang basal maupun apikal terjadi hampir bersamaan, dengan cabang basal muncul terlebih dahulu. Tampaknya inisiasi cabang basal dan aerial terjadi pada waktu yang sama dan dikontrol oleh alel yang berbeda dari gen yang berbeda, sesuai dengan hasil interpretasi data persilangan di atas.

Konfirmasi jumlah gen pengatur percabangan kenaf melalui penelusuran segregasi pada tanaman F2 menghasilkan data seperti tersaji pada tabel 3. Berdasarkan penelitian) pada tahun pertama, persilangan kontrol dengan tanaman bercabang basal (K X B) diindikasikan bahwa sifat bercabang basal dikontrol oleh alel resesif berdasarkan fakta bahwa F1 berfenotip normal, yang berarti bahwa F1 tersebut adalah heterozigot. Hampir 100% (9 dari 10 tanaman) F2 dari persilangan tersebut berfenotip normal, tidak terdapat segregasi bercabang basal kecuali hanya satu tanaman. Keadaan ini jauh berbeda dari nilai segregasi harapan 3:1 (normal : bercabang). Hal ini mengindikasikan

bahwa sifat bercabang basal ini tidaklah dikontrol oleh gen. Sifat yang muncul lebih merupakan sifat epigenetik (menyerupai efek gen, tetapi tidak diwariskan)

Tabel 3. Segregasi Phenotip Keturunan Kedua (F2) Persilangan Kontrol dengan tanaman bercabang dan antar tanaman: bercabang

Galur	Phenotip	Keturunan				Keterangan
		Normal	Apikal	Basal	BA	
KXB	N	9	0	1	0	Tan. heterozigot, shrnnya tjd segregasi (3:1) → mungkin basal mrpkn efek epigenetik
KXB	N	8	0	2	0	
KxA	N	4	0	0	0	Tan. heterozigot, tjd segregasi, terkonfirmasi gen apikal resesif
KxA	N	4	0	0	0	
KxA	A	0	0	0	0	Tan. resesif homozigot, tdk segregasi, terkonfirmasi gen apikal resesif
KxA	A	1	0	0	0	
BXA	N	4	0	1	0	Tidak terdapat pola yg jelas, mendukung kemungkinan epigenetik
BxA	N	4	0	1	0	
BxA	BA	3	0	2	0	
BxA	A	2	0	3	0	
BxA	N	3	0	2	0	
A	A	0	0	0	0	
B	B	0	0	5	0	
K	N	3	0	0	0	

Fenomena epigenetik didefinisikan sebagai perubahan ekspresi gen tanpa merubah sekuen nukleotida dari gen. Fenomena ini terjadi pada berbagai gen pada berbagai organisma. Berdasarkan contoh-contoh yang diberikan oleh Henikoff dan Matzke (1997) fenomena epigenetik melibatkan perubahan ekspresi gen-gen yang berada dalam kromosom pada berbagai organisma, umumnya dimediasi oleh perubahan struktur kromatin dan atau metilasi DNA yang diwariskan tetapi mempunyai potensi untuk kembali ke struktur semula (reversible). Fenomena ini merupakan bagian dari regulasi proses ekspresi gen, yang sangat berkaitan dengan kebutuhan tanaman untuk bertahan hidup. Terkait dengan proses pembentukan galur bercabang basal ini dalam penelitian terdahulu yaitu dengan mutasi menggunakan *Ethyl Methane sulfonate* (EMS) maka kemungkinan fenomena epigenetik ini terjadi karena proses mutasi yang tidak tuntas.

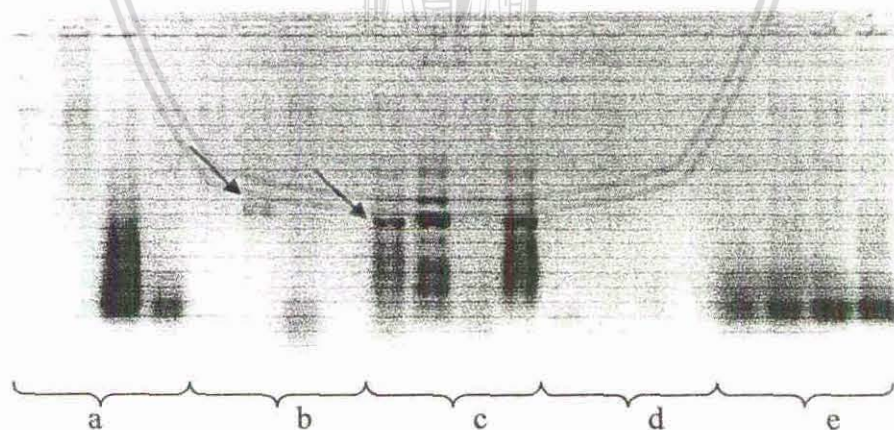


Dari sisi tanaman sendiri hal ini dimungkinkan karena dengan perubahan (struktur kromatin atau metilasi DNA) yang tidak stabil (reversible) maka sudah memungkinkan untuk survive.

Berbeda dengan tipe percabangan basal, tipe percabangan apikal terbukti benar terjadi karena perubahan DNA yang diwariskan. Hal ini ditunjukkan dari hasil persilangan kontrol dengan tanaman bercabang apikal yang menghasilkan F1 yang sebagian besar normal, hanya sebagian kecil (lebih kurang 5%) menunjukkan fenotip bercabang apikal. Diduga fenotip normal adalah heterozigot. Hal ini terkonfirmasi pada penelitian tahun kedua ini dengan munculnya segregan bercabang apikal pada F2 (Tabel 3) sebanyak 20 % ( $0.5 < p < 0.7$ , uji chi-square untuk rasio pewarisan monogenik 3:1). Keadaan ini didukung oleh hasil penanaman F1 yang bercabang apikal, yang diduga terjadi karena mutasi resesif pada kedua kromosom homolog, yang menghasilkan F2 yang hampir kesemuanya bercabang apikal. Dengan demikian melalui penelitian ini telah terkonfirmasi bahwa percabangan apikal dikontrol oleh alel resesif. Adanya segregan normal (10%) diduga karena adanya pengaruh lingkungan yang menyebabkan tidak munculnya cabang.

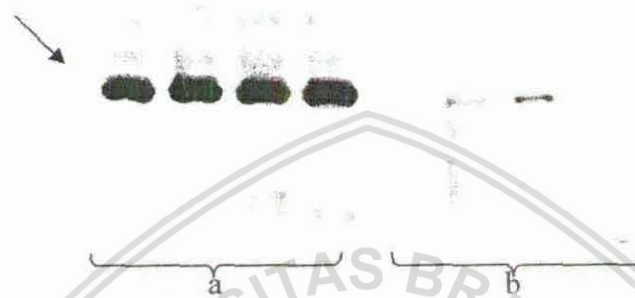
## 5.2 Identifikasi Molekuler Sekuen Gen Percabangan

Dari Polymerase Chain Reaction (PCR) dengan menggunakan 5 pasang primer didapatkan hasil sebagai berikut :



Gambar 6. Hasil PCR DNA genom kenaf dengan menggunakan Primer RMS1 (a), AUX 1 (b), AXR1 (c), Ls (d) dan Llm (e). Tanda  $\rightarrow$  menunjukkan pita hasil amplifikasi

Dari ke lima primer yang digunakan hanya AXR1 dan AUX1 yang dapat mengamplifikasi DNA genom kontrol, tanaman bercabang basal, tanaman bercabang apikal, F1 persilangan basal dengan apikal maupun F1 persilangan kontrol dengan tanaman bercabang apikal (Gambar 7)



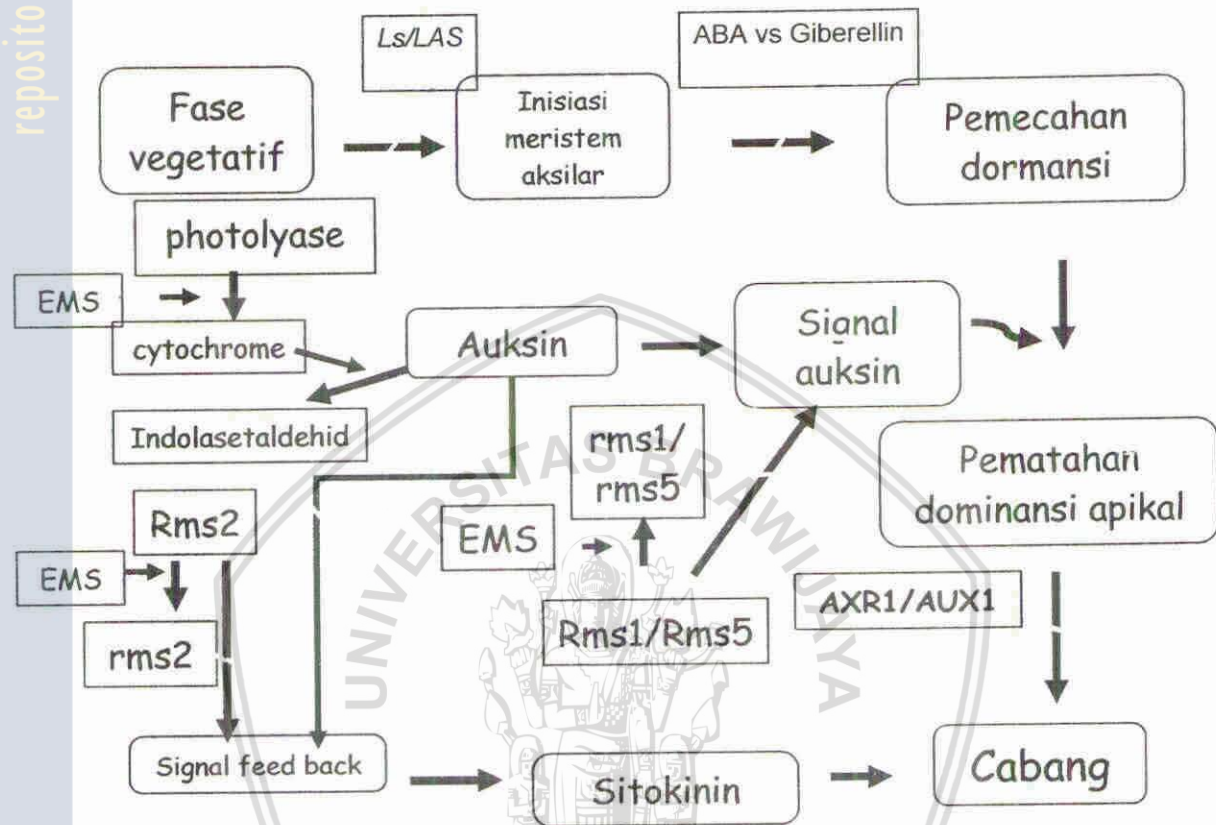
Gambar 7. Hasil PCR dengan primer AUX1 (a) dan AXR1 (b). Tanda → menunjukkan pita hasil amplifikasi

Pita hasil amplifikasi AXR1 dan AUX1 dari kelima sampel terletak pada posisi yang sama yang menunjukkan bahwa berat molekul fragmen yang dihasilkan adalah sama. Meskipun demikian BM yang sama belum tentu menunjukkan sekuen yang sama. Akan tetapi berdasar penelitian Rouse et al. (1998); Shimizu-Sato dan Mori (2001); Stirnberg et al. (1999) dan Ward dan Leyser (2004) yang menunjukkan bahwa AXR1 dan AUX1 sama-sama bekerja dalam signaling auksin, pada fase setelah cabang dibentuk. Bahkan AXR merupakan anggota dari famili gen AUX/IAA. Dengan demikian adanya kesamaan pita hasil amplifikasi PCR menunjukkan bahwa AXR1 dan AUX1 adalah homolog. Berdasarkan konsistensi munculnya pita pada posisi yang diharapkan maka dari kedua kelompok hasil PCR tersebut dipilih hasil amplifikasi AUX1 yang menghasilkan pita target lebih tebal (Gambar 7) untuk dilakukan sekuensing.

Dari keempat gen yang digunakan sebagai dasar penyusunan primer spesifik, *Ls* adalah gen percabangan yang berperan paling awal dalam proses pembentukan cabang. *Ls* berperan dalam GA signaling yang mungkin berkaitan dengan inisiasi cabang dan pemecahan dormansi tunas yang disebabkan oleh keberadaan ABA (Schumacher et al,



1999). Berikutnya RMS1 berperan dalam mempengaruhi transport signal auksin dalam proses pematangan dominansi apikal (Beveridge et al., 1997 dan 2000). Sedangkan AXR1 dan AUX1 berperan pada fase paling akhir yaitu setelah cabang muncul dan menentukan apakah cabang akan berkembang ataukah tidak (Stirnberg et al., 1999).



Gambar 8. Mekanisme proses pembentukan cabang

Hal ini sesuai dengan pengamatan morfologi tanaman yang menunjukkan bahwa tanaman kontrol ataupun F1 yang tidak bercabang selalu memunculkan siwilan (Gambar 2). Hal ini berarti bahwa sebenarnya inisiasi sudah dilakukan dan dormansi sudah dipatahkan tetapi untuk tanaman AUX1 (dominan) siwilan tidak berkembang menjadi cabang, sementara alel resesifnya (*aux1*) menyebabkan cabang berkembang. Dengan demikian posisi AXR1/AUX1 dalam mekanisme proses pembentukan cabang adalah sebagaimana tergambar pada Gambar 8.

Dari hasil PCR untuk primer yang sama terlihat bahwa pita yang dihasilkan terletak pada posisi yang sama baik untuk kontrol, tanaman bercabang basal, tanaman bercabang apikal maupun persilangan antara tanaman basal dan apikal (Gambar 9).

Mengingat bahwa secara morfologi kelima sampel yang digunakan sangat berbeda maka kemungkinan yang terjadi adalah bahwa antara alel-alel percabangan (tidak bercabang dan bercabang) hanya berbeda beberapa basa-basa nitrogen pada *site* tertentu saja, sehingga tidak mempengaruhi proses priming (*annealing*). Perbedaan yang hanya beberapa basa saja pada DNA template akan mungkin menyebabkan panjang sekuen yang dihasilkan sama.

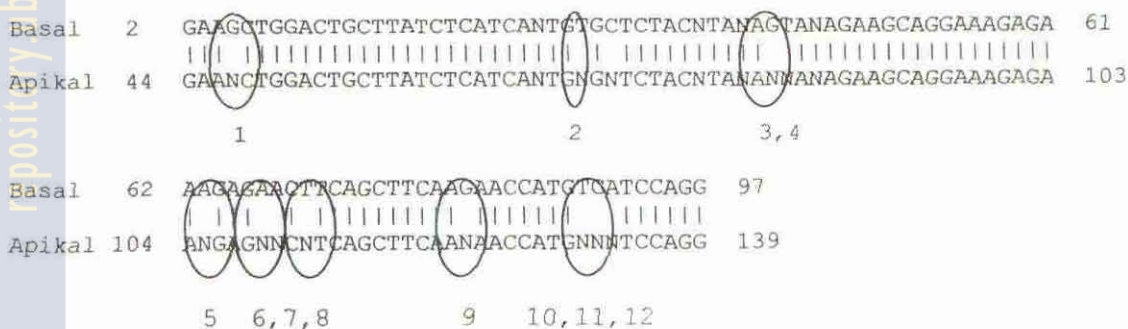


Gambar 9. Hasil PCR dengan menggunakan primer AUX1. M = 100 bp DNA marker; a = Kontrol, b= Kontrol X Apikal, c = Basal X Apikal, d = Basal, e = Apikal

Tampaknya perbedaan morfologi yang teramati disebabkan oleh perbedaan pada beberapa basa yang menyebabkan perbedaan ekspresi percabangan pada tanaman dengan tipe cabang berbeda berkaitan dengan konsentrasi auksinnya. Hasil sekuensing membuktikan hal ini. Analisis alignment antara sekuen alel cabang basal dan cabang apikal menunjukkan beberapa (12) perbedaan basa nitrogen (Gambar 10). Perbedaan ini menyebabkan dihasilkannya protein yang berbeda sehingga mempengaruhi transport auksin yang menyebabkan perbedaan imbalan auksin dengan zat pengatur tumbuh lain



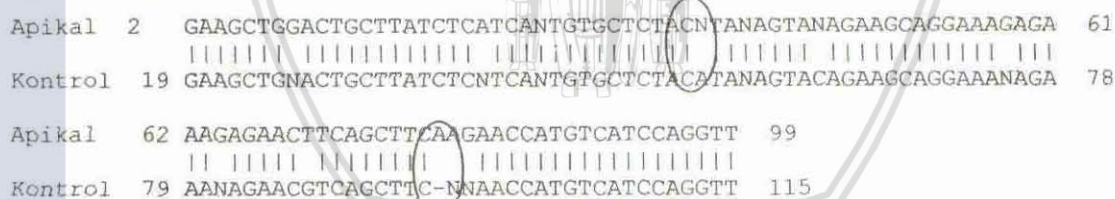
misalnya sitokinin. Tampaknya perbedaan yang terjadi tidak menyebabkan perubahan yang drastis sehingga cabang tetap muncul tetapi dengan tipe yang berbeda.



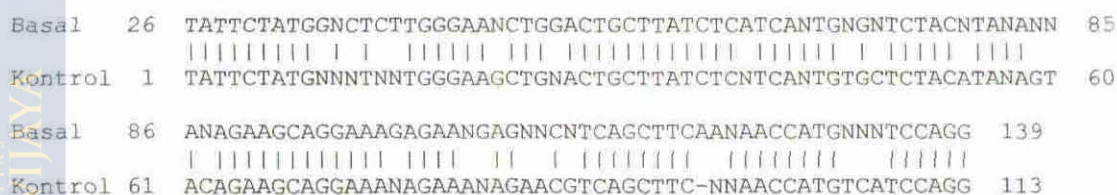
Gambar 10. Hasil analisis alignment antara sekuen PCR tanaman bercabang basal dengan apikal

Perbedaan yang nyata ditunjukkan oleh hasil analisis alignment sekuen PCR tanaman bercabang basal maupun apikal dengan kontrol. Perbedaan yang terjadi tidak sekedar perubahan basa nitrogen tetapi juga hilangnya basa (Gambar 11), yang memungkinkan terjadinya frameshift dan menghasilkan protein yang sama sekali berbeda atau bahkan dapat menghasilkan kodon stop yang menyebabkan terhentinya sintesis protein.

#### Apikal vs Kontrol



#### Basal vs Kontrol



Gambar 11. Hasil analisis alignment antara sekuen PCR tanaman bercabang basal /apikal dengan kontrol yang tidak bercabang

Hal ini menjelaskan tidak munculnya cabang pada tanaman kontrol dan sebaliknya munculnya cabang pada tanaman mutan.

Analisis alignment antara tanaman bercabang basal atau apikal dengan hasil persilangan kedua tanaman tersebut menunjukkan bahwa persilangan antara kedua tipe percabangan menghasilkan keturunan yang lebih cenderung mempunyai persamaan sekuen yang tinggi dengan tanaman bercabang apikal. Hal ini sesuai dengan hasil pengamatan morfologi yang menunjukkan bahwa keturunan bercabang dari persilangan tersebut ternyata bercabang apikal, dan tidak satupun yang bercabang basal. Di lain pihak analisis alignment antara keturunan persilangan BxA dengan kontrol menunjukkan adanya delesi yang dapat menyebabkan terjadinya frameshift, seperti terjadi pada analisis sebelumnya.

**Basal vs BXA**

Basal	14	TTCTCCTCCANATATTCTATGGNCTCTGGGAANCTGGACTGCTTATCTCATCANTGNGNTCT	73
B X A	13	TTCTCCTCCANATNTTCTATGNNCTNNTGGGAAGCTGGACTGCTTATCTCATCANTGTGCTCT	72
Basal	74	ACNTANANNANAGAAGCAGGAAAGAGAANGAGNNCNTCAGCTTCAANAACCATGNNNTCCA	137
B X A	73	ACNTAGAGTACAGAAGCAGGAAAGAGAAGAGAACCTCAGCTTCAAGAACCATGTCATCCA	136

**Apikal vs BXA**

Apikal	2	GAAGCTGGACTGCTTATCTCATCANTGTGCTCTACNTANAGTANAGAAGCAGGAAAGAGA	61
B X A	43	GAAGCTGGACTGCTTATCTCATCANTGTGCTCTACNTAGAGTACAGAAGCAGGAAAGAGA	102
Apikal	62	AAGAGAACTTCAGCTTCAAGAACCATGTCATCCAGGTT	99
B X A	103	AAGAGAACGTCAGCTTCAAGAACCATGTCATCCANGTT	140

**Kontrol vs BXA**

Kontrol	2	TTCTATGNNNTNNTGGGAAGCTGNACTGCTTATCTONTCANTGTGCTCTACATANAGTAC	61
B X A	27	TTCTATGNNCTNNTGGGAAGCTGGACTGCTTATCTCATCANTGTGCTCTACNTAGAGTAC	86
Kontrol	62	AGAAGCAGGAAANAGAAANAGAACGTCAGCTTC-NNAACCATGTCATCCAGGTT	114
B X A	87	AGAAGCAGGAAAGAGAAAGAGAACGTCAGCTTCAAGAACCATGTCATCCANGTT	140

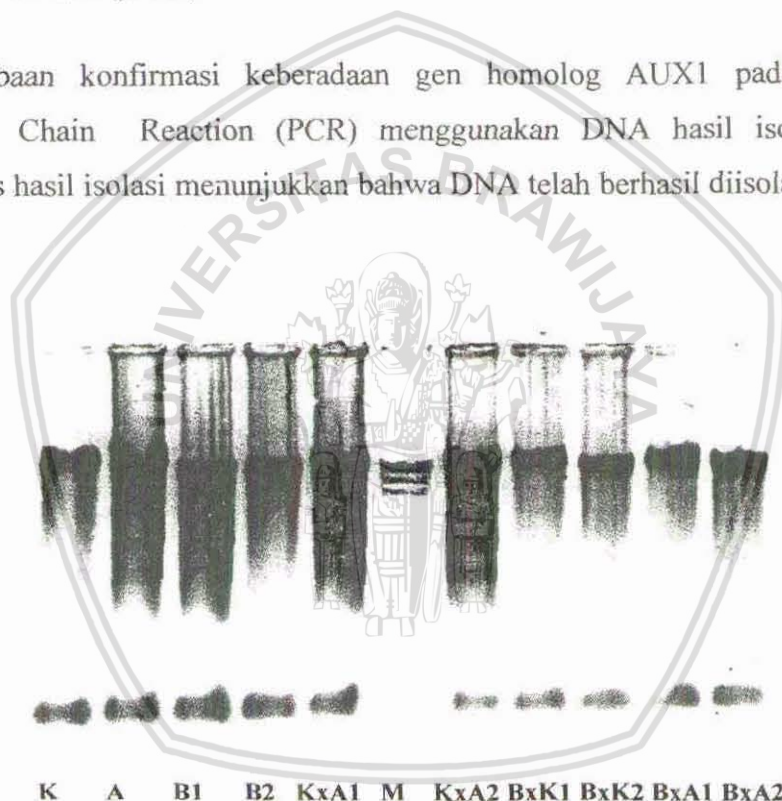
Gambar 12. Hasil analisis alignment antara sekuen PCR keturunan persilangan BxA dengan tanaman bercabang basal /apikal serta kontrol dengan yang tidak bercabang



Analisis homologi fragmen-fragmen a, b, c, d maupun e hasil PCR tersebut dengan menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) menunjukkan adanya homologi yang tinggi dengan gen-gen percabangan AUX1 atau gen-gen yang mengontrol pembentukan protein pembawa influx auksin (Lampiran 2). Dalam penelitian ini belum digunakan primer percabangan yang berkaitan dengan signaling sitokinin karena belum ada gen yang berkaitan dengan signaling sitokinin yang sudah jelas diidentifikasi.

### 5.3 Konfirmasi keberadaan gen homolog AUX1 pada biji dengan Polymerase Chain Reaction (PCR).

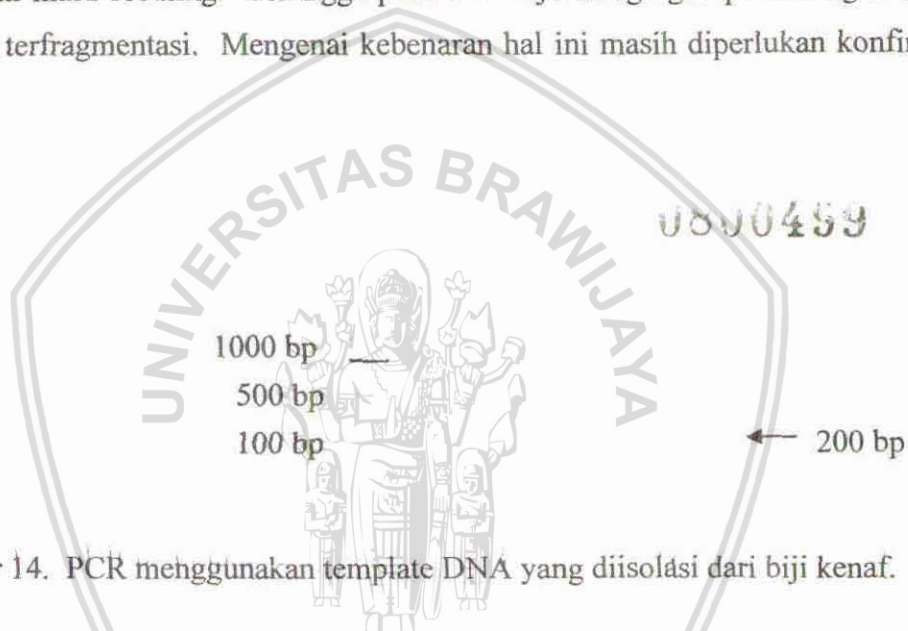
Percobaan konfirmasi keberadaan gen homolog AUX1 pada biji dengan Polymerase Chain Reaction (PCR) menggunakan DNA hasil isolasi dari biji. Elektroforesis hasil isolasi menunjukkan bahwa DNA telah berhasil diisolasi dengan baik (Gambar 3)



Gambar 13. Hasil isolasi DNA biji

PCR menggunakan template DNA dari biji tersebut ternyata berhasil mengamplifikasi gen AUX1. Akan tetapi hasil amplifikasi amat tipis dan berukuran kecil (lebih kurang 200 bp, Gambar 4), jauh lebih kecil dan lebih tipis bila dibandingkan dengan hasil amplifikasi menggunakan template DNA daun yang dilakukan pada

penelitian tahun pertama (ukuran pita hasil amplifikasi 900 bp). Keadaan ini diduga terjadi karena fragmen DNA yang berhasil diamplifikasi dari biji hanya merupakan sebagian dari gen AUX1. Biji merupakan bagian tanaman yang penting untuk perkembangbiakan, akan tetapi ketika biji tidak berada pada kondisi lingkungan yang memungkinkan untuk perkecambahan, maka hampir tidak ada aktivitas metabolisme yang berlangsung, atau walaupun ada berlangsung dengan sangat tingkat yang sangat rendah. Hal ini yang diduga menyebabkan kebanyakan gen tidak on, atau beberapa mungkin belum di-*rearrangement* menjadi susunannya yang aktif. Sementara pemunculan percabangan adalah aktivitas pertumbuhan yang berlangsung ketika tanaman sudah melewati masa seedling. Sehingga pada fase biji diduga gen percabangan masih dalam bentuk terfragmentasi. Mengenai kebenaran hal ini masih diperlukan konfirmasi lebih lanjut.



Gambar 14. PCR menggunakan template DNA yang diisolasi dari biji kenaf.

#### 5.4 Pengukuran kandungan IAA (ppm)

Kandungan auksin dideteksi pada ujung akar, ujung batang dan ujung cabang. Ujung akar merupakan sink (tempat menerima auksin) seperti juga cabang, sedangkan ujung batang merupakan tempat di mana auksin diproduksi. Dengan mengamati kandungan auksin di ketiga posisi tersebut diharapkan dapat diketahui bagaimana hubungannya dengan pembentukan percabangan. Hasil pengamatan terhadap kandungan auksin pada ketiga posisi pada tanaman disajikan pada tabel 4.

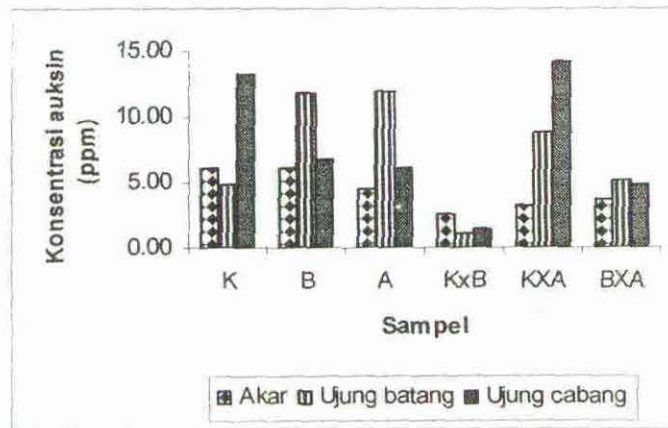


Tabel 4. Hasil pengukuran kandungan auksin (ppm) pada akar, ujung batang dan ujung cabang tanaman kenaf bercabang basal, apikal, persilangan antar keduanya serta antar masing-masing tipe bercabang dengan kontrol

Sampel	Ujung Akar	Ujung batang	Ujung cabang	Jumlah	Cbng/btng	Btng/akar
K	6.14	4.77	13.26	24.18	2.78	0.78
B	6.11	11.70	6.79	24.60	0.58	1.91
A	4.48	12.00	6.11	22.60	0.51	2.68
KxB	2.52	1.08	1.39	4.99	1.28	0.43
KXA	3.26	8.81	14.20	26.27	1.61	2.70
BXA	3.64	5.16	4.79	13.59	0.93	1.42

Dari hasil di atas terlihat bahwa pada tanaman kontrol (K =tidak bercabang) ataupun yang disilangkan dengan kontrol (KXB, KXB) kandungan auksin pada ujung cabang selalu lebih tinggi daripada kandungan auksin pada ujung batang dimana auksin diproduksi (rasio kandungan auksin di ujung cabang/ujung batang lebih dari 1). Hal ini mungkin terjadi karena auksin yang diproduksi di ujung batang hamper kesemuanya tersedot ke ujung cabang, dan menyebabkan terjadinya penghambatan pembentukan cabang sesuai dengan teori Cline (1994) dan Tamas (1995) tentang dominansi apikal. Sedangkan kandungan auksin di ujung batang untuk tanaman-tanaman tersebut di atas relative rendah (kurang dari 10 ppm) tetapi cukup untuk menunjang pertumbuhan ujung apikal.

Pada tanaman-tanaman bercabang ( B= bercabang basal, A=bercabang apikal dan hasil persilangan keduanya (BXA), rasio antara kandungan auksin di ujung cabang/ujung batang menunjukkan nilai di bawah 1. Jadi kandungan auksin di ujung cabang lebih rendah daripada kandungan di ujung batang. Kandungan auksin di cabang selalu di bawah 10 ppm, bahkan hanya berkisar antara 4.79-6.79, sehingga pertumbuhan cabang menjadi tidak terhambat, sesuai dengan prinsip dominansi apikal Cline (1994) dan Tamas (1995).



Gambar 15. Grafik kandungan auksin pada ujung akar, ujung batang dan ujung cabang.

Sementara itu bila dilihat masing-masing plot kandungan auksin pada ujung akar untuk tanaman yang mengandung alel cabang selain B (KXA, KXB, BXA) mempunyai nilai relatif lebih rendah dibanding K. Umumnya kandungan auksin pada akar tanaman, kebalikan dari kandungan sitokinin, karena antara lain disebabkan karena akar merupakan tempat produksi sitokin. Menurut teori nutrisi untuk menjelaskan dominansi apikal, sitokinin yang ditransport dari akar ke cabang akan menyebabkan terjadinya sink nutrisi pada cabang, yang menyebabkan pertumbuhan cabang berlangsung dengan cepat. Di dukung dengan keberadaan sitokinin tersebut menyebabkan pembelahan sel dalam proses pertumbuhan cabang menjadi lebih cepat. Konfirmasi lebih lanjut mengenai hal ini perlu dilakukan.



## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1. Kesimpulan

Berdasarkan pola pewarisan sifat percabangan, percabangan apikal merupakan ekspresi dari suatu gen. Gen tersebut dalam keadaan resesif menyebabkan munculnya percabangan. Sementara, percabangan basal ternyata adalah merupakan efek dari fenomena epigenetik. Analisis molekuler mengindikasikan adanya gen *AUX1* pada kenaf, yang berperan dalam signaling auksin. Gen tersebut merupakan anggota dari famili gen pengontrol percabangan *AUX-IAA* dan beraksi pada fase akhir pemunculan cabang melalui pengontrolan signaling auksin untuk menentukan apakah cabang akan berkembang atau tidak. Gen tersebut dapat dideteksi pada DNA yang diisolasi dari daun tetapi tidak terdeteksi pada DNA yang diisolasi dari biji.

Pemunculan cabang dipengaruhi oleh kandungan auksin pada ujung batang dan ujung cabang. Kandungan auksin yang lebih tinggi pada ujung cabang dibandingkan dengan pada ujung batang tampaknya mendorong pemunculan cabang. Sementara kandungan auksin yang rendah pada akar mungkin berhubungan dengan keberadaan sitokin

#### 6.2. Saran

Identifikasi keberadaan dan konsentrasi auksin dan sitokinin perlu dilakukan untuk mengetahui imbalanced kedua hormon dan posisi (batang, cabang akar) kedua hormon itu ketika tanaman menghasilkan cabang. Selain itu, perlu penelitian lebih lanjut untuk konfirmasi keberadaan sitokinin pada posisi ujung akar, batang dan cabang untuk melihat hubungannya dengan pemunculan cabang.

Selain itu konfirmasi mengenai kemungkinan perbedaan susunan gen percabangan pada biji dan pada tanaman dewasa perlu dilakukan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arumingtyas, E.L. 1992. Genetic analysis of flowering and branching mutants of *Pisum sativum* L. (Master Thesis)
- Arumingtyas, E.L. & Indriyani, S. 2004. The effect of Ethyl Methane Sulfonate (EMS) to the Morphology and Molecular character of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Natural* 8(2): 24-28
- Arumingtyas, E.L. and Murfet, I.C. 1992. Branching in *Pisum* : Inheritance and allelism test with 17 ramosus mutants. *Pisum Genetic* 24:17-31.
- Arumingtyas, E.L., Basuki, N., Sudjindro, Sumitro, S.B. 2005. Variability Of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) Treated by Ethyl Methanesulfonate (EMS) Base on Randomly Amplified Polymorphic DNA's (Raps). Diseminarkan pada International Conference of Plant Genomic and Biotechnology: Challenge and opportunity. Di Raipur, India, 26-28 Oktober 2005.
- Bangerth, F. 1994. Response of cytokinin concentration in the xylem exudate of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to decapitation and auxin treatment, and relationship to apical dominance. *Planta* 194:439-442.
- Bell, C.J. and Ecker, J.R. 1994. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* 19:137-144.
- Beveridge, C.A., Symon, G.M. and Turnbull, C.G.N. 2000. Auxin inhibition of decapitation-induced branching is dependent on graft transmissible signals regulated by genes *Rms1* and *Rms2*. *Plant Physiol.* 123:689-697.
- Beveridge, C.A., Symon, G.M., Murfet, I.C., Ross, J.J. and Rameau, C. 1997. The *rms1* mutant of pea has elevated indole-3-acetic acid levels and reduce root-sap zeatin riboside content but increased branching controlled by graft-transmissible signals. *Plant Physiol.* 115:1251-1258.
- Beveridge, C.A., Weller, J.L., Singer, S.R. and Hofer, J.M.I. 2003. Axillary meristem development: Budding relationship between network controlling flowering, branching and photoperiod responsiveness. *Plant Physiol.* 131:927-934.
- Blixt, S. 1968. Linkage studies in *Pisum*. XII. Linkage Relations of the Genes *Fr* and *Fru* determining ramification. *Agri. Hort. Genet.* 26:136-141.
- Cline, M.G. 1991. Apical dominance. *Bot. Rev.* 57:318-358.
- Cline, M.G. 1994. The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development. *Physiol. Plant.* 90:230-237



- Cline, M.G. 1996. Exogenous auxin effects on lateral bud outgrowth in decapitated shoots. *Ann. Bot.* 78:255-266.
- Doebley, J., Stec, A. and Gustus, C. 1995. *teosinte branched1* and the origin of maize: evidence for epistasis and the evolution of dominance. *Genetics* 141:333-346.
- Doebley, J., Stec, A. and Hubbard, L. 1997. The evolution of apical dominance in maize. *Nature* 386: 485-488
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem Bull.* 19:11-15.
- Eklöf, S., Astot, C., Sitbon, F., Moritz, T., Olsson, O and Sadberg, G. 2000. Transgenic tobacco plants co-expressing *Agrobacterium iaa* and *ipt* genes have wildtype hormone levels but display both auxin and cytokinin-overproducing phenotypes. *Plant J.* 23:279-284.
- Evans, M.M.S. and Barton, M.K. 1997. Genetics of angiosperm shoot apical meristem development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:673-701.
- Foo, E., Turnbull, C. and Beveridge, C.A. 2001. Long distance signaling and the control of branching in the *rms1* mutant of pea. *Plant Physiol.* 126:203-209.
- Hazra, S.K., & Shome, A. 1986. EMS-induced sensitivity of excised mature embryos and seeds and genetic behaviour of seed sterility in *Hibiscus cannabinus* L. *Phytobreedon.* 2(1):43-48.
- Hazra, S.K., & Shome, A. 1987. Incited effectiveness of EMS in *Hibiscus cannabinus* L. by excised mature embryo treatment. *J. Agronomy & Crop Science.* 159:278-281.
- Hazra, S.K., Shome, A & Roy, M.K.G. 1987. Immediate (M1) response of *Corchorus olitorius* L. to ethyl methanesulphonate treatment. *Phytobreedon.* 3(1):45-49.
- Henikoff, S. And M. A. Matzke, 1997 Exploring and explaining epigenetic effects. *Trends Genet.* 13:293-295
- Hua-chun, G., Guan-li, X., Ben-cai, S. & Hong-gao, L. 2004. Effect of Sucrose Concentrations in Media of Potato Tuber Induction on Endogenous Hormones. *World Potato Congress, 11 August 2004*
- Jabeen, N & Mirza, B. 2002. Ethyl Methane Sulfonate enhances genetic variability in *Capsicum annum*. *Asian Journal of Plant Sciences* 1(4):425-428.
- Khan, I.A. 2001. Induced polygenic mutations in wheat (*Triticum aestivum* L.)

- Konieczny, A. and Ausubel, F.M. 1993. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* 4:403-410.
- Lamprecht, H. 1950. The degree of ramification in *Pisum* caused by polymeric genes. *Agri. Hort. Genet.* 8:1-6.
- Leeper, E. 2002. Identification and analysis of EMS-induced genetic suppressors of the *tub3 rbl2* lethal phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *bug journal* 5:31-36.
- Mehandjiev, A, Noveva, S, and Kosturkova, G. 1999. Induced mutation and their application in genetic improvement of pea. *Pisum Genetics* 31:24-26.
- Mohan, D.P., Benepal, P.S., Sheikh, A.Q. & Rangappa, M. 2001. Determination of optimal mutagenic dose of ethylmethane sulfonate, diethyl sulfate and ethidium bromide for beans (*Phaseolus vulgaris* L.).
- Monti, L.M. & Scarascia Mugnozza, G.T. 1967. Mutazioni per precocita e ramosita indotte in pisello. *Genetica Agraria* 21:301-312.
- Morris, D.A. 1977. Transport of exogenous auxin in two-branched dwarf pea seedlings (*Pisum sativum* L.) *Planta* 136:91-96.
- Morris, D.A. 1977. Transport of exogenous auxin in two-branched dwarf pea seedlings (*Pisum sativum* L.) *Planta* 136:91-96.
- Morris, S.E., Turnbull, C.G.N., Murfet, I.C. and Beveridge, C.A. 2001. mutational analysis of branching in pea. Evidence that *Rms1* and *Rms5* regulate the same novel signal. *Plant Physiol.* 126: 1205-1213.
- Nadeau, J.A. & Sack, F.D. 2002. Control of stomatal distribution on the Arabidopsis leaf surface. [www.sciencemag.org/cgi content full/296/5573/1694/DC1](http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/296/5573/1694/DC1)
- Napolí, C.A., Beveridge, C.A. and Snowden, K.C. 1999. Reevaluating concepts of apical dominance and the control of axillary bud outgrowth. *Curr. Top. Dev. Biol.* 44:127-169.
- Odeigah, PGC, Osanyinpeju, AO and Myers, GO. 1998. Induced Mutation in Cowpea , *Vigna unguiculata* (Leguminosae). <http://www.ots.duke.edu/tropibiojnl/claris/46-3/ODEIGAH>
- Rameau, C, Bodelin, C, and Cadier, D. 1997. New ramosus Mutants at Loci *Rms1*, *Rms3*, and *Rms4* Resulting from the Mutation Breeding Program at Versailles. *Plant Journal* 12:1329-1338.



- Rao, A.V, Ashfaq Farooqui, M., & Sadanandam, A. 1997. Induction of lincomycin and streptomycin resistance by nitrosomethylurea and ethyl methanesulphonate in *Capsicum annum* L. *Plant Cell Report* 16(12):865-868.
- Reintanz, B., Lehen, M., Reichelt, M., Gershenson, J., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Godde, M., Uhl, R. and Palme, K. 2001. *bus* a bushy Arabidopsis CYP79F1 knockout mutant with abolished synthesis of short –chain aliphatic glucosinolates. *Plant Cell* 13:351-367
- Rouse, D., Mackay, P., Stirnberg, P., Estelle, M & Leyser, O. 1998. Changes in auxin response from mutation in an AUX/IAA gene. *Science* 279:1371-1373
- Russel, P.J. 1994. *Fundamentals of genetics*. HarperCollins College Publisher. New York.
- Schumacher, K, Schmitt, T., Rossberg, M., Scmitz, G. & Theres, K. 1999. The lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 96:290-295.
- Shimizu-Sato, S., & Mori, H. 2001. Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. *Platphysiol*. 17:1405-1413.
- Singh, G., Sareen, P.K, Saharan, R.P. & Singh, A. 2001. Induced variability in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding* 61(3):281-282.
- Sorefan, K., Booker, J., Haurogné, K., Goussot, M., Bainbridge, K., Foo, E., Chatfield, S., Ward, S., Beveridge, C., Rameau, C. and Leyser, O. 2003. MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in Arabidopsis and pea. *Genes & Dev*. 17:1469-1474.
- Stafstrom, J.P. and Sussex, I.M. 1992. Expression of a ribosomal protein gene in axillary buds of pea seedlings. *Plant Physiol*. 100:1494-1502
- Stirnberg, P., Sande, K. and Leyser, H.M.O. 2002. MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in Arabidopsis. *Development*. 129:1131-1141.
- Strickberger, M.W. 1985. *Genetics*. Macmillan Pub. Co. New York
- Strinberg, P., Chatfield, S.P. and Leyser, H.M.O. 1999. AXR1 acts after lateral bud formation to inhibit lateral bud growth in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 121:839-847.
- Sudjindro, Purwati, R.D. & Marjani. 1999. Uji Daya Hasil Galur-galur Kenaf (*Hibiscuss cannabinus* L.). *Prosiding Simposium V Perhimpunan Ilmu Pemuliaan Indonesia (PERIPI) Komisariat Daerah Jawa Timur*. Universitas Brawijaya Malang. Lembaga Penerbit Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya.

Sussex, I.M. and Kerk, N.M. 2001. The evolution of plant architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 33-37.

Suzuki, D.T., Griffiths, A.J.F., Miller, J.H. & Lewontin, R.C. 1989. *An Introduction to Genetic Analysis* fourth edition. W.H. Freeman and Company, New York.

Tamas, I.A. 1995. Hormonal regulation of apical dominance. In *Plant hormones* (ed. P.J. Davies), pp.572-597. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Tantikanjana, T., Yong, J.W.H., Letham, D.S., Griffith, M., Hussain, M., Ljung, K., Sandberg, G. and Sundaresan, V. 2001. Control of axillary bud initiation and shoot architecture in *Arabidopsis* through the SUPERSHOOT gene. *Genes Dev.* 15:1577-1588

Tian, Q & Reed, J.W. 1999. Control of auxin-regulated root development by *Arabidopsis thaliana* SHY/IAA3 gene. *Development* 126:711-721

Ward, S.P., & Leyser, O. 2004. Shoot Branching. *Curr. Opinion in Plant Biol.* 7:73-78.

Zaffari, G. R., Peres, L. E. P., Teacenco, F.A., & Kerbauy, G.B. 2002. Indole-3-acetic acid metabolism in normal and dwarf micropropagated banana plants (*Musa* spp. AAA). *Braz. J. Plant Physiol.*, 14(3):211-217





## LAMPIRAN 1. Daftar Riwayat Hidup Peneliti

### Ia. DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENELITI UTAMA

• **Nama Lengkap dan Gelar**  
Dr. Ir. Estri Laras Arumingtyas, MScSt

**Tempat/tanggal lahir**  
Trenggalek/18-8-1963

• **Pendidikan**

UNIVERSITAS/INSTITUT DAN LOKASI	GELAR	TAHUN SELESAI	BIDANG STUDI
IPB Bogor	Ir	1987	Agronomi
Univ. of Tasmania Australia	MScSt	1992	Plant Genetics
Universitas Brawijaya Malang	Dr	2006	Plant Mutation

• **Pengalaman kerja dalam penelitian dan pengalaman profesional serta kedudukan saat ini**

INSTITUSI	JABATAN	PERIODE KERJA
Universitas Brawijaya	Staf Pengajar	1988- sekarang
Tohoku University, Jepang	Visiting Scientist	Agustus – Oktober 2004

• **Daftar publikasi yang relevan dengan proposal penelitian yang diajukan**

- Arumingtyas, E.L., Basuki, N., Sudjindro, Sumitro, S.B. 2006. Analisis Mutasi Mutan Kenaf Bercabang hasil Mutasi dengan EMS. Disampaikan pada Seminar Basic Science 3, Malang, 25 February 2006.
- Arumingtyas, E.L., Basuki, N., Sudjindro, Sumitro, S.B. 2005. Variability Of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) Treated by Ethyl Methanesulfonate (EMS) Base on Randomly Amplified Polymorphic DNA's (Raps). Diseminarkan pada International Conference of Plant Genomic and Biotechnology: Challenge and opportunity. Di Raipur, India, 26-28 Oktober 2005.
- Arumingtyas, E.L. & Indriyani, S. 2004. Peningkatan variabilitas genetik kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) varietas KR11 dengan induksi mutasi EMS. *Natural* 8(2): 24-28
- Arumingtyas, E.L. & Indriyani, S. 2001. The effect of Mutagen Colchicine to the Morphology and Yield of Soybean. *Natural* 2(1):1-7.
- Arumingtyas, E.L. & Murfet, I.C. 1992. Branching in Pisum : Inheritance and Allelism test with 17 ramosus mutants. *Pisum Genetics* 24:17-31.
- Arumingtyas, E. L. 1992. Genetic Analysis of Flowering and Branching Mutants of *Pisum sativum* L. (Master thesis)

Malang, Oktober 2007

Dr. Ir. Estri Laras Arumingtyas, MScSt

**1b. DAFTAR RIWAYAT HIDUP ANGGOTA PENELITI**

**Nama Lengkap dan Gelar**  
 Retno Mastuti, Ir., MAgSc., DAgSc.

**Tempat/tanggal lahir**  
 Ambon, May 9, 1965

**Pendidikan**

UNIVERSITAS/INSTITUT DAN LOKASI	GELAR	TAHUN SELESAI	BIDANG STUDI
IPB Bogor	Ir	1989	Biology
Nagoya University, Japan	MAgrSc	1995	Plant Physiology
Nagoya University, Japan	DAgrSc	1998	Plant Tissue Culture

**• Pengalaman kerja dalam penelitian dan pengalaman profesional serta kedudukan saat ini**

INSTITUSI	JABATAN	PERIODE KERJA
Universitas Brawijaya	Staf Pengajar	1990- sekarang

- **Daftar publikasi yang relevan dengan proposal penelitian yang diajukan**
- **Mastuti, R.,** H. Miyake, T. Taniguchi and Y. Takeoka. 2003. Culture of *Celosia cristata* cell suspension protoplasts. J. Berkala Hayati 9(1):1-7.
- Munawarti, A., **R., Mastuti,** W.B. Widyasari and E. Sugiyarta. 2003. "Efisiensi Transformasi genetik Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* pada Kalus Tebu Varietas POJ 3016", Jurnal-jurnal Ilmu Hayati (Life Sciences) Unibraw, Malang, Vol. 15 No. 2:132-138.
- **Mastuti, R.,** A. Munawarti, W.B. Widyasari and E. Sugiyarta. 2002. Enzymatically Isolation of Sugarcane (*Saccharaum officinarum* L.) Protoplasts. J. Ilmu-ilmu Hayati (Life Sciences) 14:211-219
- Kirana, C., S.B. Sumitro, M.A. Widodo, **R. Mastuti,** S. indriyani, N. Sigittianawati, N.P.E. Widhiyanti dan B. Alfi. 2001. Komposisi senyawa bioaktif benalu. Jurnal-jurnal Ilmu Teknik (Engineering). Lembaga Penelitian UNIBRAW vol. 13 no. 2 Oktober
- Supriyadi dan **R. Mastuti.** 2000. Using transmission electron microscope (TEM) for observation of plant cell ultrastructure. Fusii 6:13-16
- **Mastuti, R.,** H. Miyake, T. Taniguchi and Y. Takeoka. 1998. Ultrastructure of hybrid callus between C3 and C4 species of Amaranthaceae. Plant Prod. Sci. 1(2):136-144
- **Mastuti, R.,** H. Miyake, T. Taniguchi and Y. Takeoka. 1998. Ultra structure of fusion product between protoplasts from C3 and C4 species of Amaranthaceae. Plant Prod. Sci. 1(1):67-74

Malang, Oktober 2007



Retno Mastuti, Ir., MAgSc., DAgSc



**L.c DAFTAR RIWAYAT HIDUP ANGGOTA PENELITI**

**Nama Lengkap dan Gelar**  
Dra. Serafinah Indriyani, MSi

**Tempat/tanggal lahir**  
Surabaya/9-9-1963

• **Pendidikan**

UNIVERSITAS/INSTITUT DAN LOKASI	GELAR	TAHUN SELESAI	BIDANG STUDI
Univ. Airlangga/Surabaya	Dra	1987	Biologi
Insitut Teknologi Bandung/Bandung	MSi	1993	Biologi Perkembangan Tumbuhan

• **Pengalaman kerja dalam penelitian dan pengalaman profesional serta kedudukan saat ini**

INSTITUSI	JABATAN	PERIODE KERJA
Universitas Brawijaya	Staf Pengajar	1988- sekarang

- **Daftar publikasi yang relevan dengan proposal penelitian yang diajukan**
- Indriyani, S. & Arumingtyas, E.L. 1994. Pengaruh kombinasi hormon GA3, IAA dan Kinetin terhadap internodus kapri.
- Indriyani, S & Arumingtyas, E.L. 1997. Variasi isoenzim pada biji kacang hijau. *Natural* 1(1): 1- 7
- Indriyani, S, Arisoesiloningsih, E & Arumingtyas, E.L. 2000. Kajian anatomi varietas kedelai tahan kering.
- Indriyani, S. 2002. Studi perkembangan struktur reproduktif pada kakao. *Natural* 6(2):8-15
- Arumingtyas, E.L. & Indriyani, S. 2004. Peningkatan variabilitas genetik kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) varietas KR11 dengan induksi mutasi EMS. *Natural*. In press.

Malang, Oktober 2007



Dra. Serafinah Indriyani, MSi

LAMPIRAN 2. Abstrak Seminar “International Conference on Molecular Biology of Life Sciences 2007”

GENETIC AND PHYSIOLOGICAL ANALYSIS OF BRANCING ON KENAF  
(*Hibiscus cannabinus*)

Estri Laras Arumingtyas, Retno Mastuti, Serafinah Indriyani  
Department of Biology, Faculty of Mathematic and Natural Sciences,  
Brawijaya University

0800499

ABSTRACT

The objective of this research was to determine the genotypic and physiology properties of two branching types of kenaf mutant line aroused from Ethyl Methane Sulfonate (EMS) mutation. The genotypic property was observed based on the existence of branching gene and the physiological character observed was the auxin concentration. For molecular analysis, DNA of kenaf seed and leaves were isolated using Doyle dan Doyle (1987) method. The sequence of branching gene was identified using PCR and sequencing techniques. PCR was conducted using 5 pair of primers including 4 specific primers which was designed base on the sequence of branching genes *AUX1*, *AXR1* of *Arabidopsis thaliana*, *RMS1* of *Pisum sativum*, and *Ls* of *Lycopersicum esculentum*, and one pair of degenerate primer designed from amino acid conserve sequence of *LAS*, *Ls* and *Moc* genes. The PCR program used was 93 °C, 1 minute denaturation, 30 second annealing at 56 °C, 1 minute ekstention 72 °C, for 35 cycles. Pre-heating for 1 minute at 93 °C, and the last extention phase was done for 10 minutes at 72 °C. Sequencing was performed using the procedure of Big Dye Terminator mix, at ABI 377A sequencer. Confirmation on the physiological properties of branching lines was determine using spectrophotometry methods.

Identification of branching gene using PCR and sequencing techniques showed that the branching gene of kenaf was succesfully amplified by *AUX1* and *AXR1* primers but were not amplified by *Ls*, *RMS1*, and *Llm* primers. This indicates that branching gene of kenaf was homologous to branching gene of *Arabidopsis thaliana*. Molecular analysis indicate that the gene act as auxin signaling, but different type of branching was controlled by different allele of the same locus. The gene was the member of gene family that control branching and active at the last phase of branching development by controlling auxin signaling to determine whether the branching candidate continue to develop or not. Determination of auxin content in the roots, apical shoot, and axillary branches showed that the branching plants has higher auxin content in the apical shoot compared to the content in the branches. This indicate that *AUX1* control the formation of branches by either controlling the content of auxin in the apical shoot and branches or the ratio of auxin content in the shoot and branches

Key word : branching gene, auxin, kenaf,mutation.