

**DETEKSI KERAGAMAN GENETIK MENGGUNAKAN PENANDA ISSR
(*Inter Simple Sequence Repeat*) DAN KERAGAMAN FENOTIP PADA
TANAMAN KRISAN (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev)
VARIETAS *PINK FIJI* YANG DIINDUKSI DENGAN
EMS (*Ethyl Methanesulfonate*) SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh :

SHADDIQA MUNAWAROH FAUZIAH

NIM. 13620069



JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI

MAULANA MALIK IBRAHIM

MALANG

2017

**DETEKSI KERAGAMAN GENETIK MENGGUNAKAN PENANDA ISSR
(*Inter Simple Sequence Repeat*) DAN KERAGAMAN FENOTIP PADA
TANAMAN KRISAN (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev)
VARIETAS *PINK FIJI* YANG DIINDUKSI DENGAN
EMS (*Ethyl Methanesulfonate*) SECARA *IN VITRO***

HALAMAN JUDUL

SKRIPSI

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**Oleh :
SHADDIQA MUNAWAROH FAUZIAH
NIM. 13620069**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN)
MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2017**

**DETEKSI KERAGAMAN GENETIK MENGGUNAKAN PENANDA ISSR
(*Inter Simple Sequence Repeat*) DAN KERAGAMAN FENOTIP PADA
TANAMAN KRISAN (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev)
VARIETAS *PINK FIJI* YANG DIINDUKSI DENGAN
EMS (*Ethyl Methanesulfonate*) SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh :
SHADDIQAH MUNAWAROH FAUZIAH
NIM. 13620069

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 19 Desember 2017

Dosen Pembimbing I



Suyono, M.P.
NIP. 19710622 200312 1 002

Dosen Pembimbing II

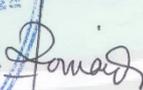


Dr. H. Ahmad Barizi, M.A.
NIP. 19731212 199803 1 001

Tanggal, 5 Januari 2017

Mengetahui
Ketua Jurusan Biologi




Romaidi, M. Si., D. Sc.
NIP. 19810201 200901 1 019

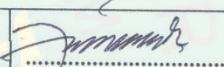
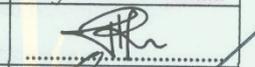
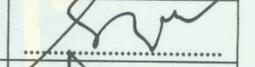
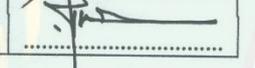
**DETEKSI KERAGAMAN GENETIK MENGGUNAKAN PENANDA ISSR
(Inter Simple Sequence Repeat) DAN KERAGAMAN FENOTIP PADA
TANAMAN KRISAN (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev)
VARIETAS *PINK FIJI* YANG DIINDUKSI DENGAN
EMS (*Ethyl Methanesulfonate*) SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh:
SHADDIQAH MUNAWAROH FAUZIAH
NIM. 13620069

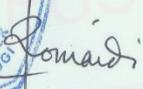
Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan
Dinyatakan Diterima sebagai Salah Satu Persyaratan
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Tanggal:

Penguji Utama	<u>Dr. Evika Sandi Savitri, M.P</u> NIP. 19741018 200312 2 002	
Ketua Penguji	<u>Azizatur Rahmah, M.Sc</u> NIDT. 19860930 20160801 2 065	
Sekretaris Penguji	<u>Suyono, M. P</u> NIP. 19710622 200312 1 002	
Anggota Penguji	<u>Dr. H. Ahmad Barizi, M.A</u> NIP. 19731212 199803 1 001	

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi




Romaidi, M. Si., D. Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Shaddiqah Munawaroh Fauziah
NIM : 13620069
Jurusan : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Skripsi : Deteksi Keragaman Genetik menggunakan Penanda ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) dan Keragaman Fenotip pada Tanaman Krisan (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) Varietas *Pink Fiji* yang Diinduksi dengan EMS (*Ethyl Methanesulfonate*) secara *In Vitro*

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 26 November 2017

Yang membuat pernyataan,



Shaddiqah Munawaroh Fauziah
NIM. 13620069

MOTTO

**“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan.”
(QS. Al-Insyiroh: 6)**

Dari Abu Hurairah dia berkata: Rasulullah bersabda: “Barangsiapa yang membantu seorang muslim (dalam) suatu kesusahan di dunia maka Allah akan menolongnya dalam kesusahan pada hari kiamat, dan barangsiapa yang meringankan (beban) seorang muslim yang sedang kesulitan maka Allah akan meringankan (bebannya) di dunia dan akhirat”

Menanglah tanpa harus menjatuhkan yang lain

*Tetaplah menjadi manusia baik meskipun tidak semua
memperlakukanmu dengan baik
(Shad)*

HALAMAN PERSEMBAHAN

Karya sederhana ini akan ku persembahkan kepada :

1. Kedua orang tuaku Bapak Moh. Hamdan dan Ibu Ekowati Erny Suswatin yang selalu menyayangiku, selalu memberikan dorongan semangat, melantunkan Do'a untukku setiap saat, dan dengan penuh kesabaran selalu memotivasi demi kelancaran dan kesuksesanku meraih cita-cita.
2. Keluarga besar Alm. Fauzi Mansur (Keluarga Migo) yang selalu mendoakan dan memotivasi.
3. Saudara laki-lakiku yang bernama Sukron Umar Hamdan adik perempuanku yang bernama Absawati Fatimahtus Zahro yang selalu aku sayangi dan selalu memberikan perhatian kepadaku secara tidak langsung. Keluarga besarku yang selalu memberi semangat untuk kesuksesanku.
4. Untuk ibu Dwi Anggraeni S.Pd dan ibu Endang Tabrianik S.Pd guru yang seperti orang tua, terimakasih banyak untuk segalanya, serta untuk "kamu" yang selalu dalam doa.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah yang telah dilimpahkan-Nya sehingga skripsi dengan judul **“Deteksi Keragaman Genetik menggunakan Penanda ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) dan Keragaman Fenotip pada Tanaman Krisan (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) Varietas *Pink Fiji* yang Diinduksi dengan EMS (*Ethyl Methanesulfonate*) secara *In Vitro*”** ini dapat diselesaikan dengan baik. Sholawat serta salam semoga tercurahkan kepada Nabi Muhammad ﷺ yang telah mengantarkan manusia ke jalan kebenaran.

Penyusunan skripsi ini tentu tidak lepas dari bimbingan, bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada :

1. Prof. Dr. H. Abd. Haris, M.Ag, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Romaidi, M. Si., D. Sc, selaku Ketua Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Suyono, M.P dan Dr. H. Ahmad Barizi, M.A, selaku dosen pembimbing yang dengan penuh keikhlasan, dan kesabaran telah memberikan bimbingan, pengarahan dan motivasi dalam penyusunan skripsi ini.
5. Kholifah Holil, M.Si. selaku dosen wali yang telah memberikan saran, nasehat dan dukungan sehingga penulisan skripsi dapat terselesaikan.
6. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P dan Azizatur Rahmah, M.Sc, selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran yang membangun sehingga membantu terselesainya skripsi ini.
7. Seluruh dosen, Laboran Jurusan Biologi dan Staf Administrasi yang telah membantu dan memberikan kemudahan, terimakasih atas semua ilmu dan bimbingannya.
8. Kedua orang tuaku Moh. Hamdan dan Ekowati Erny Suswatin, yang selalu memberikan do'a, semangat, serta motivasi kepada penulis sampai saat ini.

9. Fitria Nurul Muthmainah M.Sc (Bunda) yang selalu menyediakan waktunya untuk mendengar keluh kesahku, membantu membuatku menjadi lebih baik dan selalu menyemangati.
10. Untuk Bu Dr. Evika Sandi Savitri, M.P, Bu Azizatur Rahmah, M.Sc, dan Bu Ainun Nikmati Laili M.Si terimakasih banyak telah memberikan pelajaran berharga di luar akademik, membuat penulis mengerti dan memahami.
11. Untuk Pak Bayu Agung P., M.Si terimakasih karena telah memberikan penulis cerita, arahan, guyonan, motivasi dan pelajaran berharga. Terimakasih telah menjadi satu diantara tempat mencurahkan isi hati bagi penulis.
12. Untuk mas Ali Topan S.Si terimakasih banyak telah membantu penulis dalam mempelajari kultur jaringan dan masih banyak lagi.
13. Teman-teman Biologi A sampai D, terimakasih telah menjadi sahabat dan keluarga selama 4 tahun (lebih sedikit) perkuliahan, dan seluruh teman-teman Jurusan Biologi angkatan 2013, yang berjuang bersama-sama menyelesaikan studi sampai memperoleh gelar S.Si.
14. Sahabat-sahabatku Sayyidah, Yayang, Sonah, Kamilia, Shubriyah, Zaidatul, Uswah, Elfa, Anis, Victy, Nadia, Dian yang selalu menghibur dan memberiku semangat untuk kesuksesanku.
15. Untuk Apen, Maslahun, Nada, dan Nurul yang selalu membantu dan menemani, semoga segera menyusul S.Si.
16. Adek-adek biologi angkatan 2014-2016 yang membuatku belajar memahami dan mendengar semoga penelitian ini bermanfaat untuk kalian.
17. Semua pihak yang ikut membantu dan memberikan dukungan baik moril maupun materiil dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberi manfaat bagi penulis khususnya, dan bagi para pembaca pada umumnya. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan ilmu yang bermanfaat dan melimpahkan Rahmat dan Ridho-Nya. Amin.

Malang, 26 November 2017

Penulis

DAFTAR ISI

COVER	i
HALAMAN JUDUL	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	v
MOTTO	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
ABSTRAK	xvi
ABSTRACT	xvii
المخلص البحث	xviii
BAB I	1
PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	10
1.3 Tujuan	11
1.4 Hipotesis	11
1.5 Manfaat Penelitian	12
1.6 Batasan Masalah	13
BAB II	14
KAJIAN PUSTAKA	14
2.1 Tumbuhan dalam Al-Qur'an	14
2.2 Bunga Krisan (<i>Dendranthema grandiflora</i> Tzvelev)	19
2.2.1 Deskripsi Botani	19
2.2.2 Krisan Varietas Pink Fiji	22
2.2.3 Manfaat Bunga Krisan	22
2.2.4 Kandungan Senyawa Kimia	23

2.3 Kultur Jaringan Tumbuhan	23
2.3.1 Pengertian Kultur Jaringan.....	23
2.3.2 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Kultur Jaringan Tumbuhan	25
2.4 Mutagen	28
2.5 Induksi Mutasi.....	28
2.6 Induksi Mutasi pada Krisan	30
2.7 EMS (<i>Etil Methanesulfonate</i>) sebagai Mutagen	31
2.8 Keragaman Somaklonal	34
2.9 Analisis Variasi Genetik dari Marka Molekuler	35
2.10 Penanda Molekuler.....	36
2.11 Penanda ISSR (<i>Inter-Simple Sequence Repeat</i>).....	37
BAB III.....	39
METODE PENELITIAN	39
3.1 Waktu dan Tempat	39
3.2 Rancangan Penelitian	39
3.3 Variabel Penelitian	39
3.4 Alat dan Bahan.....	40
3.4.1 Alat.....	40
3.4.2 Bahan	41
3.5 Prosedur Kerja.....	42
3.5.1 Sterilisasi Alat	42
3.5.2 Pembuatan Media MS	42
3.5.3 Pembuatan Larutan <i>Ethyl Methanesulfonate</i>	43
3.5.4 Sterilisasi Media dan Larutan EMS	43
3.5.5 Sterilisasi Ruang Tanam	43
3.5.6 Perendaman Tunas pada Larutan <i>Ethyl Methanesulfonate</i>	43
3.5.7 Subkultur	44
3.5.8 Analisis Keragaman Genetik Tanaman Krisan Varietas <i>Pink Fiji</i> menggunakan Penanda ISSR	44
3.5.9 Pengamatan	47

3.5.10 Analisis Data	49
BAB IV	50
HASIL DAN PEMBAHASAN	50
4.1 Pengaruh Lama Perendaman dalam EMS 0.77% terhadap Keragaman Fenotipik	50
4.1.1 Keragaman Fenotipik secara Kuantitatif.....	50
4.2 Keragaman Fenotipe pada Planlet.....	53
4.3 Analisis Keragaman Genetik Berdasarkan Penanda ISSR.....	57
4.3.1 Isolasi DNA.....	57
4.3.2 Amplifikasi DNA Berdasarkan Penanda ISSR (<i>Inter Simple Sequence Repeat</i>)	61
4.3.3 Analisis Variasi Genetik Mutan Krisan berdasarkan Penanda ISSR ...	63
4.3.4 Hubungan Kemiripan Krisan Hasil Mutasi dengan EMS 0.77% Berdasarkan Hasil Amplifikasi dengan ISSR	65
4.4 Ulasan Hasil Penelitian dalam Prespektif Al-Qur`an.....	67
BAB V.....	70
PENUTUP.....	70
5.1 Kesimpulan	70
5.2 Saran.....	71
LAMPIRAN.....	86
Lampiran 1. Tabel Hasil Pengamatan	86
Lampiran 2. Tabel Analisis Sidik Ragam	88
Lampiran 3. Hasil Analisis Variansi (anova) Pertumbuhan Krisan varietas <i>Pink Fiji</i>	90
Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian.....	94

DAFTAR GAMBAR

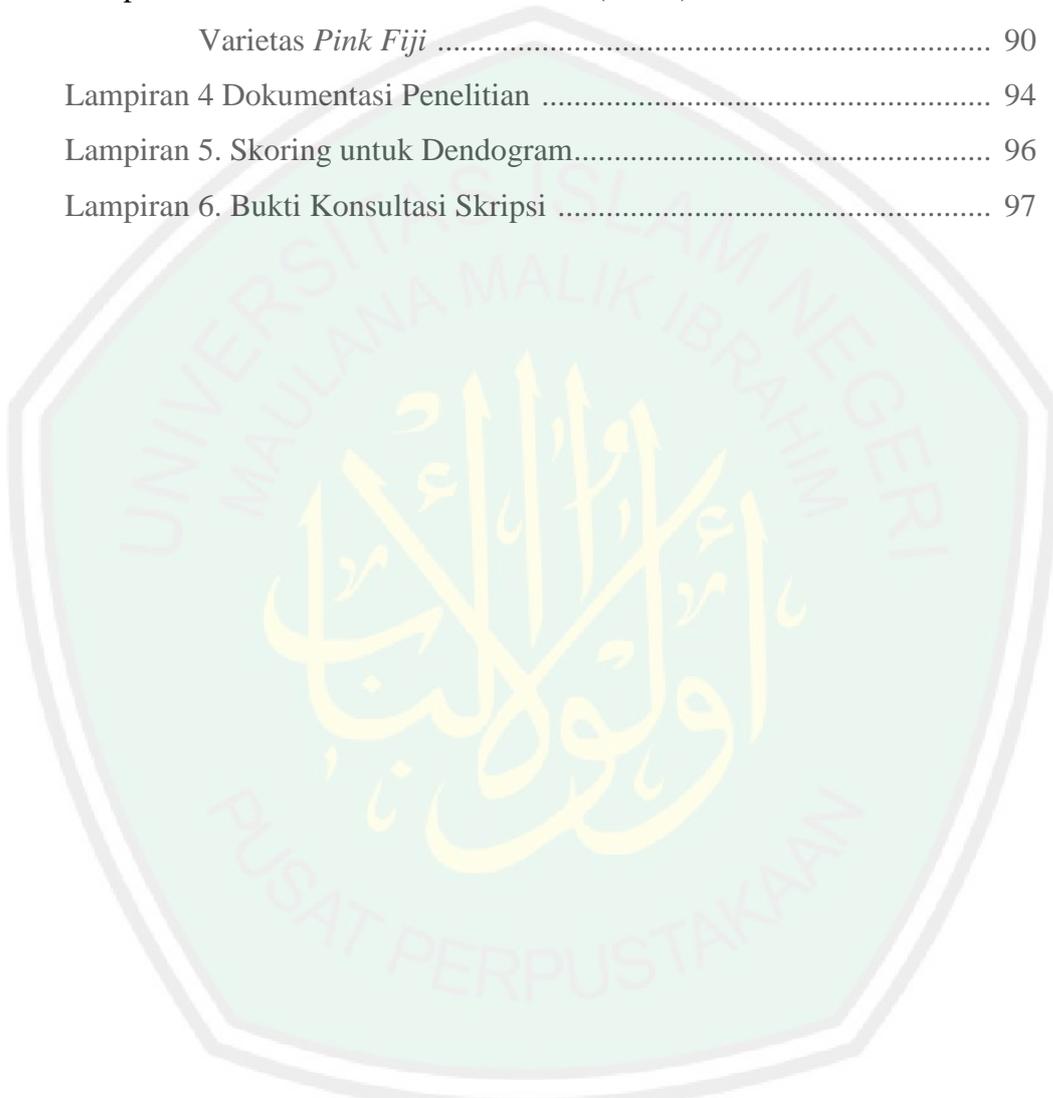
Gambar 2.1 Gambar Beberapa Jenis Krisan	21
Gambar 2.2 Krisan Varietas <i>Pink Fiji</i>	22
Gambar 2.3 Alur Terjadinya Mutan Warna Bunga pada Krisan	31
Gambar 2.4 Struktur Kimia EMS	32
Gambar 2.5 Alkilasi oleh EMS pada posisi O-6 guanin dan posisi O-4 timin	33
Gambar 2.6 Keragaman pertumbuhan tunas in vitro Krisan Varietas Candra Kirana dengan EMS 0.77%	34
Gambar 2.7 Abnormalitas yang terjadi pada bentuk daun tanaman Krisan varietas Mighi dengan perlakuan EMS	35
Gambar 2.7 ISSR	38
Gambar 4.1 Respon warna kalus dari perlakuan lama perendaman dengan EMS 0.77%	53
Gambar 4.2 Perbedaan pertumbuhan tanaman Krisan Varietas <i>Pink Fiji</i> 4 Minggu Setelah Tanam	55
Gambar 4.3 Bentuk Daun.....	55
Gambar 4.4 Hasil elektroforesis DNA genom Krisan	58
Gambar 4.5 Profil DNA hasil Amplifikasi dengan primer (AG)8CT.....	61
Gambar 4.6 Dendogram hubungan kemiripan krisan hasil mutasi dengan EMS 0.77% berdasarkan ISSR	65

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan Flavonoid pada Ekstrak Bunga Krisan (<i>Dendranthema grandiflora</i> Tzvelev)	23
Tabel 2.2 Karakteristik EMS	32
Tabel 3.1 Sekuen Primer (AG)8CT	41
Tabel 3.2 Komponen PCR dalam Satu Tabung untuk Amplifikasi	46
Tabel 4.1 Rekapitulasi Pengaruh lama Perendaman dengan EMS 0.77% terhadap Seluruh Peubah Kuantitatif	50
Tabel 4.2 Frekuensi Keragaman Warna Kalus pada Perlakuan Pengaruh Lama Perendaman dengan EMS 0.77%	54
Tabel 4.3 Frekuensi Keragaman Fenotip dalam Persen	57
Tabel 4.4 Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA Tanaman Krisan Hasil Ekstraksi	60
Tabel 4.5 Jarak Genetik 4 Sampel Tanaman Krisan yang Diberi Perlakuan Lama Perendaman dengan EMS 0.77%	64

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Data Hasil Pengamatan Krisan (<i>Dendranthema grandiflora</i> Tzvelev)	86
Lampiran 2 Tabel Analisis Sidik Ragam	88
Lampiran 3 Hasil Analis Variansi (anova) Pertumbuhan Krisan Varietas <i>Pink Fiji</i>	90
Lampiran 4 Dokumentasi Penelitian	94
Lampiran 5. Skoring untuk Dendogram.....	96
Lampiran 6. Bukti Konsultasi Skripsi	97



ABSTRAK

Fauziah, Shaddiqah Munawaroh. 2017. **Deteksi Keragaman Genetik menggunakan Penanda ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) dan Keragaman Fenotip pada Tanaman Krisan (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) Varietas *Pink Fiji* yang Diinduksi dengan EMS (*Ethyl Methanesulfonate*) secara *In Vitro***. Skripsi. Jurusan Biologi. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
Pembimbing: (1) Suyono, M.P dan (2) Dr. H. Ahmad Barizi, M.A

Kata Kunci: EMS, *In Vitro*, Induksi Mutasi, Mutan, ISSR, Keragaman Genetik, Polimorfisme, Krisan Varietas *Pink Fiji*, Keragaman Fenotip

Krisan (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) merupakan satu diantara jenis tanaman hias yang memiliki nilai ekonomi yang tinggi di Indonesia. Namun terdapat kendala dalam produksinya yaitu terbatasnya varian dari bunga krisan yang ada dan sulitnya dilakukan persilangan sehingga mutasi buatan diperlukan untuk membuat keragaman genetik. EMS (*Ethyl Methanesulfonate*) merupakan senyawa kimia yang bersifat mutagenik dan sering digunakan dalam induksi mutasi buatan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama perendaman EMS 0.77% terhadap keragaman fenotip tanaman krisan varietas *Pink Fiji* dan deteksi keragaman genetik menggunakan penanda ISSR

Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan faktor tunggal yaitu lama perendaman EMS 0 menit, 90 menit, 105 menit, dan 120 menit. Data yang diperoleh berupa kualitatif, data kuantitatif dianalisis dengan *one way* anova. Jika ada pengaruh yang signifikan, analisis dilanjutkan dengan uji beda (*Duncan Multiple Range Test*) DMRT 5%. Data molekuler berupa profil DNA dan dianalisis dengan software PAST.

Hasil penelitian menunjukkan adanya pengaruh lama perendaman EMS 0.77% berpengaruh nyata terhadap keragaman fenotipe tanaman krisan varietas *Pink Fiji* pada semua variabel pengamatan. Perlakuan 120 menit menghasilkan tinggi tanaman dan luas daun terendah, perlakuan 90 dan 105 menit memiliki jumlah tunas dan daun paling banyak. Perlakuan lama perendaman 90-120 menit memperbesar ukuran batang, menit memiliki bentuk daun memanjang, perlakuan lama perendaman 105 dan 120 menit menghasilkan susunan daun roset. Keragaman genetik tanaman krisan menghasilkan pita DNA polimorfisme menggunakan ISSR dengan primer (AG)₈CT. Jarak genetik perlakuan kontrol dengan perlakuan lama perendaman 90 menit, 105 menit, dan 120 menit berturut-turut yaitu 0,9, 0,91, dan 1.

ABSTRACT

Fauziah, Shaddiqah Munawaroh. 2017. **Detection of Genetic Diversity Using ISSR Markers (Inter Simple Sequence Repeat) and the Diversity of Phenotypes on the Chrysanthemum Plant (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) the Fiji Pink Varieties Induced by EMS (Ethyl Methanesulfonate) by In Vitro.** Thesis. Department of Biology. Faculty of Science and Technology. State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang.

Supervisor: (1) Suyono, M.P and (2) Dr. H. Ahmad Barizi, M.A

Keywords: EMS, In Vitro, Induction, Mutation, Mutant, ISSR, Genetic Diversity, Polymorphism, Mum Plant Fiji Variety, Phenotype Diversity

Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) is one of Indonesian ornamental plants which has high economic value. The high level of demand in the country has not been met, therefore most needs of chrysanthemum plants were from imports, causing the barrier of production is limited variant of chrysanthemum flower. Plant breeding program is still constrained in terms of low genetic diversity in germplasm. The artificial mutations were needed in order to make new genetic diversity. EMS (*Ethyl Methanesulfonate*) is a chemical compound that is mutagenic and frequently used in the induction of artificial mutations. Aims of this research is to know the influence of long soaking EMS 0.77% against the phenotypes diversity of chrysanthemum *Pink Fiji* varieties and the detection of genetic diversity using ISSR markers.

Research design used was Completely Randomized Design (RAL) with the single factor that is long soaking the EMS from 0, 90, 120, and 105 minutes. Qualitative data were obtained and analyzed with one way ANAVA. a significant influence was continued with DMRT (Duncan Multiple Range Test) 5%. Molecular data of DNA profiles and analyzed with software PAST.

The results showed the influence long soaking EMS 0.77% of phenotypic diversity against chrysanthemum *Pink Fiji* varieties on all variable observations. Long soaking treatment 120 minutes lower the height of the plant and broad leaves, long soaking 105 minutes the highest number of buds and long soaking 90 minutes is equal to 120 minutes in terms of number of leaves. Long soaking treatment 90-120 minutes the highest size of the old stem, long soaking 90-120 minutes has a form of elongated leaves, long soaking 105 and 120 minutes produces a rosette of leaf arrangement. Chrysanthemum plant genetic diversity produces band of DNA polymorphism using ISSR with (AG) 8CT primer. Genetic distance control treatment with long soaking treatment 90, 105, and 120 minutes was 0.9, 0.91, and 1, respectively.

الملخص البحث

فوزية، صديقة موناوروه. 2017. الكشف عن التنوع الوراثي باستخدام إيسر (تكرار تسلسل بسيط بسيط) والتنوع المظهري على أفحوان (ديندرانثيما غرانديفلورا تسفيليف) بدأت الوردية فيجي متنوعة مع إمس (إيثيل ميثان سلفونات) في المختبر. أطروحة. قسم الأحياء. كلية العلوم والتكنولوجيا. جامعة الدولة الإسلامية مولانا مالك إبراهيم مالانج. مستشار: (1) سويونو، الماجستير و (2) د. الحج. أحمد باريزي، الماجستير.

الكلمات الرئيسية: إمس، في المختبر، تحريض الطفرة، المسوخ، إسر، التنوع الوراثي، تعدد الأشكال، أفحوان الوردية فيجيان، التنوع المظهري

أفحوان (ديندرانثيما غرانديفلورا تسفيليف) هي واحدة من النباتات الزينة التي لها قيمة اقتصادية عالية في اندونيسيا. ومع ذلك، هناك قيود في إنتاج المتغيرات المحدودة من الزهور أفحوان القائمة وصعوبة المتصالب بحيث هناك حاجة إلى الطفرات الاصطناعية لخلق التنوع الجيني. إمس (إيثيل ميثان سلفونات) هو مركب كيميائي مطفر وغالبا ما يستخدم في تحريض الطفرات الاصطناعية

والهدف من هذا البحث هو معرفة تأثير وقت الغمر من إمس 0.77% إلى مجموعة متنوعة المظهرية من الوردية أفحوان النبات والكشف عن التنوع الجيني باستخدام علامة إسر والتصميم الكامل العشوائي (رال) مع عامل واحد أي إمس وقت الغمر 0 دقيقة و 90 دقيقة و 105 دقيقة، و 120 دقيقة. البيانات التي تم الحصول عليها هي النوعية، يتم تحليل البيانات الكمية من قبل أنوفا طريقة واحدة. إذا كان هناك تأثير كبير، واستمر التحليل مع 5% دنكان اختبار مجموعة متعددة (دمرت). البيانات الجزيئية هي ملامح الحمض النووي وتحليلها مع برنامج باس

وأظهرت نتائج هذا البحث أن تأثير إمس الغمر 0.77% له تأثير كبير على أصناف المظهري من أصناف فيجي فيجي على جميع متغيرات الملاحظة. أدى العلاج لمدة 120 دقيقة إلى ارتفاع النبات وأدى مساحة ورقة، وكان 90 و 105 العلاج دقيقة أكبر عدد من البراعم. العلاج من الغمر 90-120 دقيقة توسيع حجم الجذعية، والدقيقة لديها شكل ورقة ممدود، أدى العلاج الغمر طويلة من 105 و 120 دقيقة في ترتيب ورقة روزيت. التنوع الوراثي للأفحوان تنتج العصابت الحمض النووي من تعدد الأشكال باستخدام إسر مع الاشعال (أغ) CT8. وكانت المسافة الوراثية للعلاج السيطرة مع علاج طويل من 90 دقيقة، 105 دقيقة، و 120 دقيقة 0.9، 0.91، و 1

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tumbuhan merupakan satu diantara jenis makhluk hidup yang terdapat di alam semesta ini yang memiliki banyak manfaat diantaranya sebagai bahan sandang, pangan (obat), dan papan seperti firman Allah dalam Al-Qur'an Surat Asy- Syuaraa ayat 7 berikut ini:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ۝٧

Artinya : “Dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?”(Qs. Asy-Syuaraa :7).

Penafsiran dari ayat di atas terdiri dari 3 poin utama. Poin pertama pada lafadz *أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ*, poin kedua *كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا*, dan poin ketiga *مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ*. Adapun *أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ* mengandung makna perintah untuk meneliti. *كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا* mengandung makna dunia tumbuhan. Dimana *أَنْبَتْنَا* disertai dengan isim dlomir *نَا* yang berarti ada campur tangan antara Allah SWT dengan makhluknya. Yang dimana manusia sebagai khalifah di bumi ini juga mengambil peranan dalam pertumbuhan tumbuhan seperti halnya dalam penelitian ini induksi mutasi melalui kultur jaringan. *مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ* mengandung makna bahwa segala sesuatu di dunia ini diciptakan berpasang-pasangan. Dalam hal ini di biologi sebagaimana contoh ialah ekologi yakni harus ada keseimbangan. *مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ* menurut Al-Sheikh

(2000) juga diartikan sebagai tumbuhan yang baik dan indah dipandang. Kalimat di atas juga mengandung makna tumbuh-tumbuhan yang baik dapat diartikan sebagai tumbuhan yang bermanfaat. Satu diantara tumbuhan ciptaan Allah yang bermanfaat bagi manusia yaitu tanaman krisan.

Krisan merupakan satu diantara jenis tanaman hias yang memiliki nilai ekonomi yang relatif tinggi di Indonesia serta mempunyai prospek pemasaran cerah. Selain menghasilkan bunga potong dan tanaman hias bunga pot yang dimanfaatkan untuk memperindah ruangan dan menyegarkan suasana, beberapa varietas krisan juga ada yang berkhasiat sebagai obat, antara lain untuk mengobati sakit batuk, nyeri perut, dan sakit kepala akibat peradangan rongga sinus (sinusitis) dan sesak nafas (Widiastuti, *et. al*, 2004).

Perkembangan ekspor krisan Indonesia sejak tahun 2007 hingga tahun 2013 sangatlah fluktuatif dengan rata-rata pertumbuhan sebesar 13,94% per tahun. Volume ekspor krisan tertinggi pada periode ini terjadi pada tahun 2012 sebesar 79.102 kg. BPS (Biro Pusat Statistik) bulan Maret 2014 melaporkan bahwa volume ekspor krisan Indonesia pada tahun 2013 mengalami penurunan sebesar 27,88% menjadi 57.049 kg dari tahun sebelumnya sebesar 79.102 kg. Indonesia berada dalam daftar urutan pengespor bunga krisan ke 22 dengan kontribusi sebesar 0,03% permintaan dunia, angka tersebut setara dengan 61.305 kg dari total ekspor dunia sebesar 182.334.995 kg (Promosiana, 2015). Saat ini bunga krisan varietas dalam negeri telah diekspor ke berbagai negara (Yufdy & Marwoto 2012). Diperkirakan permintaan krisan akan terus mengalami peningkatan sampai dengan tahun 2019 hingga mencapai 70.676 ton, dengan rata-rata pertumbuhan

yang cukup besar yaitu 12,40% per tahun. Pada tahun 2014, permintaan krisan diperkirakan akan terus meningkat hingga tahun 2019 (Ekanantari, 2014).

Terdapat beberapa kendala dalam budidaya tanaman krisan satu diantaranya yaitu faktor lingkungan tumbuh yang terdiri dari ketinggian tempat budidaya, suhu, dan lama penyinaran. Tanaman krisan tumbuh optimal pada ketinggian 600-1.200 m dpl. Untuk pertumbuhan vegetatif membutuhkan suhu udara 20-26°C, sedangkan pembungaan pada suhu 16-18°C dengan kelembaban udara 70-80% (Cassel, 1998). Krisantini dalam Harjadi (1989) menyatakan untuk produksi bunga potong di daerah tropis, tanaman krisan membutuhkan perlakuan hari panjang minimal 14,5 jam per hari dan suhu malam rendah (15,5°C) untuk merangsang pertumbuhan dan mencapai panjang batang tertentu sebelum mencapai pembungaan.

Selain faktor lingkungan, pemilihan varietas yang sesuai juga memegang peranan yang penting dalam produksi tanaman krisan. Menurut Istianingrum (2013) dalam produksi bunga krisan di Kota Batu, petani lebih banyak membudidayakan krisan berwarna putih dan pink. Varietas yang biasa dibudidayakan yaitu *Pink Fiji*, *Reagent Splendid* dan *Bacardi White* karena dinilai lebih tahan terhadap serangan patogen serta kualitas bunganya lebih baik daripada varietas yang lain (Rofiq *et. al*, 2015).

Hingga saat ini varietas krisan yang ditanam petani sebagian besar masih diimpor dari luar negeri dengan nilai impor bibit mencapai lebih dari USD 1 juta. Sejak tahun 2004 hingga 2008 tercatat 506 varietas krisan diimpor dari berbagai negara, seperti Tiongkok, Singapura, Belanda, Amerika Serikat, Jepang, dan

Malaysia (Direktorat Perbenihan dan Sarana Produksi 2009). Krisan varietas baru yang diperdagangkan saat ini di Indonesia sebagian besar masih berasal dari introduksi (Handayati, 2013). Impor yang dilakukan terus-menerus menciptakan ketergantungan pada negara lain sehingga industri krisan di dalam negeri memiliki daya saing yang lemah (Marwoto *et. al* 1999).

Ketergantungan ini harus dihilangkan secara berangsur angsur, pemuliaan tanaman krisan dapat dilakukan secara konvensional (persilangan) maupun menggunakan induksi mutasi baik secara fisik maupun kimiawi. Hibridisasi menghasilkan populasi F1 yang memiliki kombinasi sifat positif dari kedua tetuanya. Namun, untuk mendapatkan suatu kombinasi sifat yang diinginkan haruslah dibentuk populasi persilangan yang sangat banyak, terlebih apabila dihadapkan dengan komoditas tanaman hias poliploid, seperti krisan. Dengan demikian untuk menghasilkan varietas unggul, maka frekuensi persilangan harus ditingkatkan. Persilangan konvensional membutuhkan tenaga kerja, waktu dan biaya yang sangat besar (Sanjaya, 2004).

Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa kondisi iklim di daerah pegunungan Indonesia pada waktu tertentu hampir sama dengan kondisi fitotron untuk persilangan krisan di negara subtropis (Sanjaya *et al.* 2004). Marwoto (1999) menyatakan bahwa pemuliaan tanaman krisan dengan persilangan sulit dilakukan di Indonesia karena diperlukan suhu siang dan malam yang stabil, berkisar sekitar 17°C dengan kelembaban relatif 70%, selain itu krisan mempunyai sifat *self incompatibility*.

Krisan mempunyai sistem *self-incompatibility* yang sangat kuat sehingga banyak persilangan antara individu di dalam dan di luar kerabat mengalami kegagalan. Biasanya hanya 5–50% persilangan antar kerabat (*sibs*) dalam suatu F1 bersifat kompatibel. Masalah sistem *self-incompatible* sporofitik belum dapat dipecahkan secara lengkap, tetapi ada indikasi bahwa hal ini terkait dengan beberapa lokus dan dominasi alel. Sifat poliploid dan sistem *self incompatible* mengakibatkan banyak analisis genetik pada spesies ini mengalami kegagalan dalam mengidentifikasi masalah tersebut (Marwoto, 1999).

Rumitnya konstitusi genetik varietas tanaman hias terutama krisan, maka upaya perbaikan genetik tanaman melalui pemuliaan mutasi merupakan pilihan terbaik untuk merakit varietas unggul baru dengan lebih cepat. Melalui teknik pemuliaan mutasi, dapat mengubah satu atau beberapa karakter tanpa mengurangi nilai komersial suatu varietas (Sanjaya *et. al.*, 2014, Misra *et. al.*, 2003, Nagatomi & Degi, 2009). Mutasi pada tanaman yang diperbanyak secara vegetatif lebih efektif karena dapat mengubah satu atau beberapa karakter tanpa mengubah karakteristik kultivar asalnya (Datta and Gupta, 1981). Gen-gen target yang akan diubah dengan menggunakan sarana penginduksi mutasi tidak terbatas sehingga peluang mendapatkan karakter baru dan unik terbuka lebar (Banerji & Datta 1992, Piri *et al.* 2011, Sanjaya *et al.* 2015).

Pemuliaan tanaman dengan induksi mutasi dapat dilakukan menggunakan teknik kultur jaringan. Kultur jaringan merupakan suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplas, sel, sekelompok sel, jaringan, dan organ, serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik sehingga bagian-bagian

tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman utuh kembali (Gunawan, 1992). Induksi mutasi dengan kultur jaringan dapat dilakukan pada tingkat sel, jaringan, maupun organ sehingga terdapat peluang yang tinggi untuk terjadinya keragaman yang diharapkan serta dapat diturunkan pada generasi selanjutnya. Menurut Larkin dan Scowcroft (1987) untuk memperoleh regeneran mutan yang akan diseleksi baik di tingkat sel atau jaringan (*in vitro*) maupun di tingkat plantlet, maka sel-sel atau jaringan mutan harus bisa diregenerasikan menjadi plantlet yang siap diaklimatisasi.

Variasi somaklonal dapat digunakan sebagai sumber keragaman genetik untuk sifat-sifat yang berguna (*useful traits*) dengan tujuan pemuliaan tanaman. Variasi somaklonal juga merupakan sarana alternatif dalam pemuliaan tanaman untuk menciptakan varietas baru yang resisten terhadap penyakit, herbisida, toleran terhadap kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan seperti kekeringan, pH rendah dan untuk memperbaiki kualitas hasil. Variasi somaklonal juga dapat dilihat dari penampakan luar (fenotip) dari tanaman (Griga *et. al*, 1995, Ignacimuthu, 1997, Kuksova *et. al*, 1997).

Keragaman pada kultur *in vitro* dapat ditingkatkan dengan pemberian mutagen baik secara fisik antara lain iradiasi sinar gamma, sinar uv, sinar radioaktif, dan sinar x maupun kimiawi yaitu menggunakan EMS (*Ethyl Methanesulphonate*). Dale (1989) menyatakan bahwa EMS memiliki rumus kimia $\text{CH}_3\text{-SO}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$. Merupakan senyawa kimia yang dapat menyebabkan mutasi pada tingkat DNA dengan mengubah basa-basa DNA (menyebabkan mutasi titik atau mutasi gen), sedikit kerusakan pada kromosom sehingga sangat

menguntungkan untuk kegiatan pemuliaan tanaman. Mutasi titik juga dapat diturunkan kepada generasi berikutnya.

EMS mudah didapatkan dan juga sudah terbukti merupakan mutagen yang efektif (Nassar *et. al* 2009). Sifat EMS ini yang menyebabkan EMS banyak digunakan untuk menginduksi mutasi secara somaklonal. Mutagen kimia dapat diintroduksi ke dalam jaringan tanaman serta sel sehingga dapat menyebabkan jumlah mutasi yang lebih tinggi, tetapi hasil yang memuaskan bergantung pada konsentrasi bahan kimia, lama perlakuan, suhu, pH larutan mutagenik serta kadar air bahan yang diberi perlakuan (Nasir 2002).

Penggunaan EMS telah banyak digunakan pada berbagai tanaman, hasil penelitian Greene *et. al* (2003) pada tanaman arabidopsis menunjukkan 99% mutasi yang terjadi akibat EMS (20-40 mM selama 10-20 jam) adalah perubahan dari GC menjadi AT, begitu juga sebaliknya. Intensitas mutasi cukup tinggi yaitu terjadi pada 1/3.000 kilo basa atau 10 mutasi per genom.

Penelitian Latado *et. al* (2004) secara *in vitro* menggunakan eksplan berupa pediselus yang diberi perlakuan perendaman EMS 0.77% (0,075 M) selama 1 jam 45 menit pada tanaman krisan (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev cv. Ingrid) dengan bunga berwarna pink tua menghasilkan 5,2% tanaman krisan yang mengalami perubahan warna mahkota bunga menjadi warna pink salmon, pink terang, *bronze*, kuning, dan salmon, sedangkan 89,6% lainnya memiliki fenotip yang seragam.

Rahmah (2011) melaporkan bahwa perlakuan perendaman dengan EMS 0.77% secara *in vitro* pada eksplan tunas krisan varietas Puspita Asri dan Candra

Kirana selama 90 menit, 105 menit, dan 120 menit dapat menimbulkan efek yang berbeda pada kedua varietas tersebut. Pada varietas Puspita Asri menunjukkan pertumbuhan yang terhambat, dihasilkan satu mutan (12% dari total pengamatan) pada perlakuan Puspita Asri (105 menit), mutan bertangkai daun besar berjumlah 10 mutan dihasilkan dari semua perlakuan Puspita Asri (90 menit), dan Puspita Asri (105 menit). Sedangkan pada varietas Candra Kirana menunjukkan peningkatan laju pertumbuhan, diperoleh 2 mutan (13% dari total pengamatan) pada perlakuan Chandra Kirana (105 menit), daun roset sebanyak satu mutan (17% dari total pengamatan) pada perlakuan Chandra Kirana (120 menit).

Krisan varietas *Pink Fiji* merupakan varietas yang jarang digunakan dalam induksi mutasi. Perbedaan varietas yang digunakan dapat memperkaya *scientific literature* dikarenakan pada penelitian sebelumnya menggunakan 2 varietas krisan dan menghasilkan respon yang berbeda sehingga dilakukan penelitian dengan perlakuan yang sama namun berbeda varietas. Dibedakan berdasarkan varietasnya disebabkan perbedaan genetik yang dimiliki sehingga memiliki respon yang berbeda terhadap perlakuan yang sama. Perbedaan dengan penelitian sebelumnya selain pada varietas yang digunakan juga terletak pada variabel pengamatan.

Berdasarkan warna bunganya krisan varietas *Pink Fiji* memiliki peluang lebih besar untuk berubah warna setelah dilakukan induksi mutasi. Menurut Broertjes dalam Schum dan Preil (1998) tanaman krisan dengan warna bunga merah jambu merupakan karakter warna yang memiliki peluang paling besar untuk berubah warna melalui induksi mutasi. Diharapkan induksi mutasi

menggunkan EMS 0.77% pada krisan varietas *Pink Fiji* dengan lama waktu perendaman tertentu mampu menghasilkan keragaman genetik baru yang memiliki nilai eksotik.

Pengamatan yang dilakukan terhadap tanaman krisan sejauh ini masih terbatas pada keragaman fenotipe. Keragaman genetik dapat diamati secara morfologi, namun memiliki kelemahan karena tidak semua perubahan fenotipe diakibatkan oleh mutasi, sehingga identifikasi keragaman genetik secara molekuler perlu dilakukan. Menurut Brown *et al.* (1996) penanda molekuler akan menganalisis hubungan pada tingkat DNA sehingga perubahan yang tidak terlihat dengan penanda lainnya dapat diketahui. Hal ini bermanfaat untuk identifikasi suatu individu atau genotipe, derajat kekerabatan antar genotipe, adanya variasi genetika suatu populasi tanaman, determinasi gen atau kompleks gen yang diinginkan dalam suatu genotip spesifik, dan pengembangan varietas tanaman baru melalui transformasi.

Satu diantara penanda molekuler yang sering digunakan dalam deteksi polimorfisme yaitu ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*) karena memiliki beberapa keuntungan. Penanda molekuler merupakan teknik yang efektif dalam analisis genetik dan telah diaplikasikan secara luas dalam program pemuliaan tanaman. Penanda molekuler ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) merupakan penanda yang berkembang lebih akhir dibanding RAPD dan RFLP. ISSR memiliki *reproducibility* yang tinggi. Hal ini mungkin disebabkan karena digunakannya primer yang lebih panjang (16-25 mers) bila dibanding dengan RAPD yang *reproducibility*-nya rendah. Penanda ISSR itu lebih cepat, lebih

murah, memerlukan jumlah DNA yang sedikit (Reddy, 2002), mampu melakukan pendeteksian genetik polimorfisme tanpa perlu lebih dahulu mengetahui susunan basa (sekuens) dari genom tumbuhan diantara susunan basa yang berulang sepanjang susunan basa berulang tersebut mewakili secara luas dan menyebar di seluruh genom (Wahyuni *et al.*, 2004).

Penanda ISSR ini telah berhasil digunakan untuk mempelajari keragaman genetik pada teh (Mondal, 2002). ISSR menunjukkan polimorfisme yang cukup untuk membedakan antara berbagai kultivar krisan (Wolff *et al.*, 1995). ISSR berhasil menunjukkan keragaman genetik pada purwoceng (Rahmah, 2013). ISSR berhasil mengetahui keragaman genetik pada strawberi (Hussein *et al.*, 2008). Oleh karena itu, diperlukan pemilihan primer ISSR yang tepat untuk bisa menganalisis variasi genetik krisan hasil mutasi dengan EMS. Primer ISSR yang digunakan pada penelitian ini yaitu (AG)₈CT. Pemilihan primer-primer tersebut berdasarkan persentase polimorfisme hasil amplifikasi DNA tanaman purwoceng dengan persentase polimorfisme 100 % (Rahmah, 2013).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh lama perendaman dengan EMS 0.77% terhadap keragaman fenotip tanaman krisan (*D. grandiflora* Tzvelev) varietas *Pink Fiji* secara *in vitro*?

2. Bagaimana hasil mutasi dari perlakuan lama perendaman dengan EMS 0.77% terhadap keragaman genetik tanaman krisan (*D. grandiflora* Tzvelev) varietas *Pink Fiji* secara *in vitro* menggunakan penanda ISSR?

1.3 Tujuan

Tujuan dilaksanakannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui pengaruh lama perendaman dengan EMS 0.77% terhadap keragaman fenotip tanaman krisan (*D. grandiflora* Tzvelev) varietas *Pink Fiji* secara *in vitro*.
2. Untuk mengetahui hasil mutasi dari perlakuan lama perendaman dengan EMS 0.77% terhadap keragaman genetik tanaman krisan (*D. grandiflora* Tzvelev) varietas *Pink Fiji* secara *in vitro* menggunakan penanda ISSR.

1.4 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Terdapat pengaruh lama perendaman dengan EMS 0.77 % terhadap keragaman fenotip tanaman krisan (*D. grandiflora* Tzvelev) varietas *Pink Fiji* secara *in vitro*.
2. Terdapat polimorfisme pada perlakuan waktu lama perendaman tunas tanaman krisan (*D. grandiflora* Tzvelev) varietas *Pink Fiji* menggunakan EMS 0.77% menggunakan penanda ISSR.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Dapat digunakan sebagai dasar untuk pemuliaan tanaman krisan lebih lanjut.
2. Memberikan informasi bahwa perlakuan perendaman dengan menggunakan EMS 0.77% berpengaruh terhadap keragaman fenotip krisan varietas *Pink Fiji*.
3. Memberikan informasi mengenai hasil dari perlakuan lama perendaman dengan EMS 0.77 % terhadap keragaman genetik tanaman krisan varietas *Pink Fiji* secara *in vitro* menggunakan penanda ISSR.



1.6 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Media dasar yang digunakan yaitu media Murashige & Skoog (MS) instan.
2. Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) menggunakan NAA 0.025 mg/L dan BAP 0.5 mg/L.
3. Tanaman krisan steril (plantlet) varietas *Pink Fiji* diperoleh dari PT Muria Sari Bumi.
4. Eksplan yang digunakan yaitu tunas dengan dua mata tunas yang berukuran 1 cm dari plantlet krisan varietas *Pink Fiji* yang berumur 1 bulan.
5. Lama perendaman dengan EMS yaitu 0 menit, 90 menit, 105 menit, dan 120 menit dan konsentrasi EMS yang digunakan yaitu 0.77%.
6. Parameter kualitatif yang diamati yaitu perubahan warna daun, bentuk daun, warna kalus, dan warna batang sebagai indikasi awal terjadinya mutasi.
7. Parameter kuantitatif yang diamati yaitu rata-rata tinggi tanaman, rata-rata jumlah tunas per eksplan, rata-rata jumlah daun per eksplan, rata-rata luas daun, dan frekuensi keragaman fenotipe.
8. Parameter keragaman genetik pada penelitian ini yaitu jumlah & panjang produk amplifikasi, dan persentase polimorfik.
9. Bagian tanaman krisan yang digunakan untuk isolasi DNA adalah daun muda sebanyak 80 mg diisolasi dengan protocol dari Blood-Animal-Plant Preparation Kit Jena Bioscience.
10. Sampel daun yang digunakan untuk isolasi DNA diambil dari tunas tiap perlakuan.

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Tumbuhan dalam Al-Qur'an

Allah menciptakan tumbuhan dengan berbagai macam jenis, bentuk, warna, dan ukuran yang dapat dimanfaatkan oleh manusia. Dalam hal ini adalah tanaman Krisan (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). Sebagaimana dalam firman-Nya surah Thaha (ayat: 53) yang berbunyi:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَوَّلَ لَكُم فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ
أَنْبُوتًا مِنْ تَبَاتٍ شَقِيٍّ ۝

Artinya: “Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuhan-tumbuhan yang bermacam-macam” (Thaha/20: 53).

Ayat tersebut diatas ditafsirkan oleh Maraghi (1993) bahwa Allah menurunkan air hujan untuk menumbuhkan berbagai jenis tumbuh-tumbuhan, seperti palawija, buah-buahan, dengan berbagai rasa, baik manis maupun asam. Allah SWT juga menyertakan berbagai manfaat dalam tumbuh-tumbuhan bagi manusia maupun bagi hewan. فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَنْبُوتًا mengandung arti bahwa Allah menciptakan segala sesuatu di dunia ini berpasang-pasangan. Syanqithi (2007) menafsirkan تَبَاتٍ شَقِيٍّ sebagai jenis tumbuhan yang bermacam-macam manfaat, bentuk warna, ukuran, bau, dan rasa. Sehingga dapat diartikan bahwa Allah menciptakan tumbuhan yang mempunyai berbagai macam manfaat.

Pertumbuhan dan perkembangan Krisan (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) tidak lepas dari kuasa Allah dalam setiap perubahan pertumbuhan dan perkembangan morfologi, warna, dan persentase tumbuhnya. Allah juga menegaskan dalam sebuah ayat yang terkandung dalam surat As-syu'ara ayat 7. Ayat ini merupakan perintah Allah kepada kita agar memperhatikan dengan seksama terhadap tumbuhan yang diciptakanNya, ayat tersebut berbunyi:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ^٧

Artinya: “dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?” (QS. As-Syu'ara: 7).

Penafsiran dari ayat di atas terdiri dari 3 poin utama. Poin pertama pada lafadz *أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ*, poin kedua *كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا*, dan poin ketiga *مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ*. Adapun *كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا* mengandung makna perintah untuk meneliti. *كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا* mengandung makna dunia tumbuhan. Dimana *أَنْبَتْنَا* disertai dengan isim dlomir *نَا* yang berarti ada campur tangan antara Allah SWT dengan makhluknya. Yang dimana manusia sebagai khalifah di bumi ini juga mengambil peranan dalam pertumbuhan tumbuhan seperti halnya dalam penelitian ini induksi mutasi melalui kultur jaringan. *مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ* mengandung makna bahwa segala sesuatu di dunia ini diciptakan berpasang-pasangan. Dalam hal ini di biologi sebagaimana contoh ialah ekologi yakni harus ada keseimbangan. *مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ* menurut Al-Sheikh (2000) juga diartikan sebagai tumbuhan yang baik dan indah dipandang. Kalimat

di atas juga mengandung makna tumbuh-tumbuhan yang baik dapat diartikan sebagai tumbuhan yang bermanfaat.

Kata (الى) pada firmanNya di awal ayat ini: (اولم يروا الي الارض), merupakan kata yang mengandung makna *batas akhir*. Ia berfungsi memperluas arah pandangan hingga batas kemampuannya memandang sampai mencakup seantero bumi, dengan aneka tanah dan tumbuhannya, serta aneka keajaiban yang terhampar pada tumbuh-tumbuhannya. Untuk kata (زوج) berarti pasangan tumbuh-tumbuhan, karena tumbuhan muncul di celah-celah tanah yang terhampar di bumi, dengan demikian ayat tersebut mengisyaratkan bahwa tumbuh-tumbuhan pun memiliki pasangan-pasangan guna pertumbuhan dan perkembangannya (Shihab, 2002).

Kata (كريم) antara lain digunakan untuk menggambarkan segala sesuatu yang baik bagi setiap objek yang disifatinya. Tumbuhan yang paling baik, paling tidak adalah yang subur dan bermanfaat (Shihab, 2002). Mereka kaum yang kehilangan sarana berfikir, berani menentang Rasul, dan mendustakan Kitabnya, sedang Tuhannya yang telah menciptakan bumi dan menumbuhkan didalamnya tanaman dan buah-buahan dengan berbagai macam dan bentuknya (Ali, 1989).

Allah memperingatkan akan keagungan dan kekuasaanNya. Jika orang-orang melihat ciptaan Allah dengan hati dan mata mereka niscaya mereka mengetahui bahwa Allah adalah Dzat yang berhak untuk disembah, karena Allah Maha Kuasa atas segala sesuatu (Al-Qurthubi, 2009). Pada ayat lain, Allah juga menjelaskan tentang proses penciptaan tumbuh-tumbuhan yang ada di muka bumi

ini sebagaimana firman Allah yang tertera dalam surat Al-an'am ayat 95 yang menunjukkan kekuasaan dan kemampuan Allah dalam menciptakan sesuatu:

﴿إِنَّ اللَّهَ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَىٰ يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَمُخْرِجُ الْمَيِّتِ مِنَ الْحَيِّ ذَٰلِكُمُ اللَّهُ فَالِقَآءِ
تُؤَفِّكُونَ ۝﴾

Artinya: “Sesungguhnya Allah menumbuhkan butir tumbuh-tumbuhan dan biji buah-buahan. Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup. (yang memiliki sifat-sifat) demikian ialah Allah, Maka mengapa kamu masih berpaling?” (QS. Al-an'am: 95).

Muhammad bin Tsaur menceritakan dari Ma'mar, dari Qatadah tentang firman Allah “Menumbuhkan butir tumbuh-tumbuhan dan biji buah-buahan,” ia berkata Allah SWT mengeluarkan butir dan biji dari tumbuhan. Kemudian Ibnu Zaid ia berkata Allah SWT mengeluarkannya, lantas menumbuhkan tumbuhan darinya. Mengeluarkan *an-nawat* (biji), lantas mengeluarkan pohon kurma. Juga mengeluarkan *habbah* (butir) lantas mengeluarkan pepohonan yang diciptakannya. Allah SWT mengeluarkan yang hidup dari yang mati, dan yang mati dari yang hidup. Bahwa Dialah yang mengeluarkan butir dari tumbuh-tumbuhan, dan biji dari pepohonan, sebagaimana Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan yang mati dari yang hidup (Ath-Thabari, 2008).

Firman Allah SWT “ *Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati,*” Allah SWT menjelaskan bahwa Dialah yang mengeluarkan tangkai yang hidup dari butir yang mati, dan mengeluarkan butir yang mati dari tangkai yang hidup. Dia juga yang mengeluarkan pohon yang hidup dari biji yang mati, dan biji yang mati dari pohon yang hidup. tumbuhan ketika masih berdiri dan belum kering, dinamakan *hayy* (hidup), sedangkan jika telah kering dan batangnya telah runtuh, dinamakan *mayyit* (mati) (Ath-Thabari, 2008).

Dalam ayat-ayat Al-an'am ini Allah kembali menerangkan dan menguraikan sebagian ayat-ayat penciptaan dengan jelas yang menunjukkan keesaan, kekuasaan, ilmu, dan kebijaksanaan Allah Ta'ala, kemudian menjelaskan makhluk hidup, makhluk mati, dan penciptanNya dalam urusan tumbuh-tumbuhan. Dia mengeluarkan yang mati dari yang hidup, seperti mengeluarkan biji dan benih dari tumbuh-tumbuhan, telur dan *nutfah* dari hewan, az-Zajaj mengatakan, Dia (Allah) mengeluarkan tumbuh-tumbuhan yang hijau segar dari biji yang kering, dan mengeluarkan yang kering dari tumbuh-tumbuhan yang hidup dan tumbuh (Al-Maragi, 1992).

Penafsiran yang hakiki terhadap ayat: "*Mengeluarkan yang hidup dari yang mati*" adalah sebagaimana yang tampak sekarang. Bahwa yang hidup itu, tumbuh dengan mekar dari benda yang mati. Tuhan dengan kekuasaan dan kebijaksanaan yang sempurna adalah Allah yang menciptakan segala sesuatu, dan hanya Dia yang berhak diibadahi, tidak ada sekutu bagiNya. Kemudian mengapa kalian bisa dipalingkan dari ibadah kepadaNya, lalu kalian mempersatukan-Nya dengan yang tidak mempunyai kekuasaan sedikitpun untuk melakukan semua itu, seperti menumbuhkan biji dan benih (Al-Maragi, 1992). Dari penjelasan ayat diatas, didukung pula dengan sebuah hadist yang pernah disebutkan Rasulullah dalam doa berikut "*Nabi Muhammad berdoa: "Ya Allah Tuhan langit dan bumi, dan tuhan segala sesuatu yang menumbuhkan butir tumbuh-tumbuhan dan biji buah-buahan"* (HR. Muslim)".

2.2 Bunga Krisan (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev)

2.2.1 Deskripsi Botani

Tanaman krisan sebagai bunga hias di Indonesia digunakan sebagai bunga pot dan bunga potong. Bentuk bunga krisan yang biasa digunakan sebagai bunga potong dapat digolongkan menjadi beberapa tipe yaitu *single*, *anemone*, *pompom*, *decorative*, dan *standar*. Tipe *single* (tunggal) merupakan tipe bunga krisan yang mirip dengan bunga daisy, bunganya tersusun dari satu atau dua baris bunga pita dengan bunga cakram di tengahnya. Tipe *anemone* mirip dengan tipe *single*, akan tetapi cakram bunganya lebih lebar dan tebal, serta memiliki warna yang berbeda. Tipe *pompon* bunganya berupa susunan rangkaian bunga pita yang pendek dengan bunga cakram yang tidak nampak. Tipe *decorative* mirip dengan *pompon* tidak nampak bunga cakrahnya. Tipe *large flower (standar)* merupakan bunga krisan yang memiliki diameter bunga yang besar yaitu 10.16 cm, cakram bunga tidak tampak, serta memiliki empat subdivisi yaitu *incurved*, *spider*, *spoon*, dan lain-lain (Rimando, 2001).

Krisan sebagai bunga potong dibedakan menjadi dua tipe sesuai dengan budidaya dan permintaan pasar, yaitu tipe *standar* dan tipe *spray*. Tipe *standar* adalah tipe bunga krisan yang tunas terminalnya dipelihara pada satu batang, sedangkan tunas bunga lateralnya dibuang untuk menghasilkan satu bunga pada satu tangkai bunga dengan ukuran besar. Tipe *spray* adalah tipe bunga krisan yang seluruh tunas bunga lateralnya dibiarkan berkembang, akan tetapi bunga yang pertama berkembang dibuang agar tunas lateral yang tumbuh lebih banyak dan berukuran kecil (diameter 2-3 cm) pada satu tangkai bunga (Kofranek, 1992).

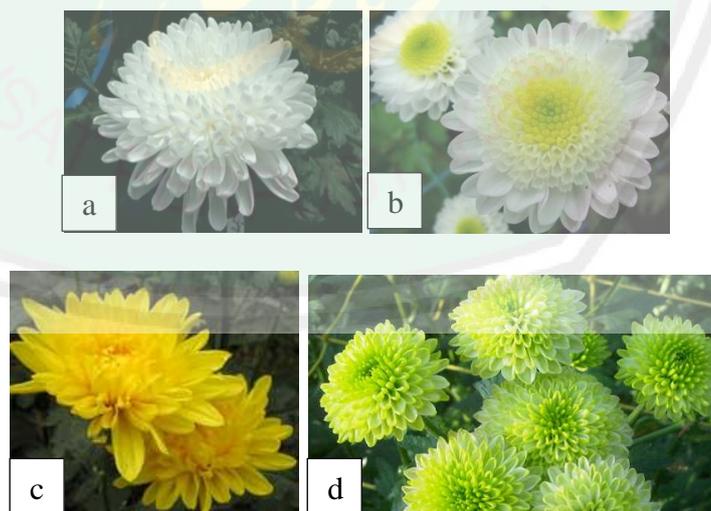
Menurut Rukmana dan Mulyana (1997) batang tanaman krisan tumbuh tegak, berstruktur lunak dan berwarna hijau jika dibiarkan tumbuh menerus batang menjadi keras (berkayu) dan berwarna kecokelat-cokelatan. Perakaran tanaman krisan dapat menyebar kesemua arah pada kedalaman 30-40 cm. Daun pada tanaman krisan merupakan ciri khas dari tanaman ini. Bentuk daun tanaman krisan yaitu bagian tepi bercelah atau bergerigi, tersusun berselang-seling pada cabang atau batang. Buah yang dihasilkan dari proses penyerbukan berisi banyak biji. Biji tersebut digunakan untuk bahan perbanyakan tanaman secara generatif. Biji krisan berukuran kecil dan berwarna coklat sampai hitam. Menurut Hasyim dan Reza (1995) akar krisan mudah mengalami kerusakan akibat pengaruh lingkungan yang kurang baik dikarenakan akar tanaman krisan berjenis serabut.

Klasifikasi ilmiah tanaman krisan menurut Turang *et. al.* (2007) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	:Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Asterales
Famili	: Asteraceae
Genus	: Chrysanthemum Syn Dendranthema
Spesies	: <i>Chrysanthemum morifolium</i> Syn <i>Dendranthema grandiflora</i>
	Tzvelev

Tanaman krisan merupakan tanaman hari pendek yang secara alamiah di daerah sub tropis akan mengalami pertumbuhan vegetatif pada hari panjang (*long day*) pada musim panas dan akan mengalami perkembangan generatif pada hari pendek pada musim gugur. Manipulasi panjang hari dibutuhkan krisan agar dapat berbunga sepanjang waktu dalam setahun. Indonesia memiliki periode penyinaran matahari rata-rata 12 jam, maka diperlukan penambahan penyinaran. Tambahan penyinaran yang diperlukan tanaman krisan agar selalu dalam kondisi *long day plant* a

adalah 4-5 jam dengan maksud memberikan perlakuan pemutusan masa gelap, selama 30 hari sejak awal tanam, atau sampai ketinggian batang tanaman sekitar 25-30 cm. Tanaman krisan memerlukan panjang hari lebih pendek dari 12 periode kritisnya (14,5 jam) untuk berbunga, sehingga akan segera berbunga apabila panjang hari atau jumlah jam terang kurang dari suatu batasan tertentu (Martini, 2014).



Gambar 2.1 a. Krisan Jayani (tipe bunga standar, bentuk bunga dekoratif) b. Krisan Elora (tipe bunga spray, bentuk bunga anemon) c. Krisan Sakuntala (tipe bunga dekoratif, jenis bunga Standar) d. Krisan Pompon Hijau (Baliti, 2014)

2.2.2 Krisan Varietas Pink Fiji

Krisan varietas *Pink Fiji* termasuk ke dalam tipe *standar* dengan tipe bunga yang tunas terminalnya terdapat pada satu batang, sedangkan tunas bunga lateralnya dibuang untuk menghasilkan satu bunga pada satu tangkai bunga dengan ukuran besar (Kofranek, 1992). Merupakan jenis bunga krisan yang memiliki diameter bunga yang besar yaitu 10.16 cm, cakram bunga tidak tampak dan bunga tunggal, termasuk krisan introduksi (Rimando, 2001).



Gambar 2.2 Krisan Varietas *Pink Fiji* a. Bunga Krisan b. Planlet Krisan (dokumentasi pribadi peneliti)

2.2.3 Manfaat Bunga Krisan

Bunga dari krisan sudah lama digunakan untuk mengobati berbagai penyakit seperti demam, sakit kepala, batuk dan gangguan penglihatan secara tradisional. Beberapa kandungan senyawa alami yang potensial seperti flavonoid, triterpenoid dan *caffeoylquinic acid derivatives* telah diisolasi pada beberapa penelitian sebelumnya. Senyawa-senyawa menunjukkan efek farmakologi yang sangat luas, diantaranya sebagai penghambat dari aktivitas enzim HIV-1 *integrase* dan *aldose reductase*, dan sebagai antioksidan, antiradang, anti-mutagenik dan anti-aktivitas alergi (Xie *et. al.*, 2009).

2.2.4 Kandungan Senyawa Kimia

Terdapat delapan senyawa flavonoid dan 58 senyawa volatil yang teridentifikasi. Diantaranya 4 senyawa flavonoid glukosida, yaitu vitexin-2-O-rhamnosida, quercetin-3-galaktosida, luteolin-7-glukosida dan quercetin-3-glukosida (Tabel 2.1).

Tabel 2.1 Kandungan Flavonoid pada Ekstrak Bunga Krisan (*C. Morifolium* Ramat)

Senyawa Flavonoid	Kadar (mg/gr)
Vitexin-2-O- rhamnoside	0.10 ± 0.01
Quercetin-3-galactoside	2.46 ± 0.02
Luteolin-7-glucoside	50.59 ± 0.94
Quercetin-3- glucoside	1.33 ± 0.09
Quercitrin	21.38 ± 0.80
Myricetin	2.13 ± 0.08
Luteolin	5.22 ± 0.48
Apigenin	0.70 ± 0.10
Kaempferol	0.14 ± 0.02
Total	83.95 ± 2.77

Sumber : Sun *et. al.* (2010)

2.3 Kultur Jaringan Tumbuhan

2.3.1 Pengertian Kultur Jaringan

Kultur jaringan merupakan istilah yang ditujukan pada budidaya secara *in vitro* terhadap berbagai bagian tanaman yang meliputi batang, daun, akar, bunga, kalus, sel, protoplas, dan embrio. Bagian-bagian tersebut seperti eksplan, diisolasi dari kondisi *in vivo* dan dikultur pada media buatan yang steril sehingga dapat

beregenerasi menjadi tanaman lengkap (Zulkarnain, 2009). Menurut Gunawan (1998) teknik kultur *in vitro* tumbuhan merupakan metode yang digunakan untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma sel, sekelompok sel jaringan dan organ serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman utuh.

Menurut Yulianti (2010) kultur jaringan *in vitro* merupakan teknik perbanyakan dengan cara memperbanyak jaringan mikro tanaman yang ditumbuhkan secara *in vitro* menjadi tanaman yang sempurna dalam jumlah yang tidak terbatas. Yang menjadi dasar kultur *in vitro* ini adalah totipotensi sel, yaitu bahwa setiap sel dari organ tanaman mampu tumbuh menjadi tanaman yang sempurna bila ditempatkan di lingkungan yang sesuai. Menurut Azriati *et al.* (2010) kultur *in vitro* adalah suatu metode untuk mengisolasi potongan jaringan tanaman dari kondisi alami pada media nutrisi dalam kondisi aseptik, dimana potongan jaringan yang diambil mampu mengadakan pembesaran, pemanjangan, dan pembelahan sel serta membentuk suatu masa sel yang belum terdeferensiasi yang disebut kalus serta membentuk *shootlet* (tunas), *rootlet* (akar), atau plantlet (tanaman lengkap).

Manfaat teknik kultur jaringan *in vitro* yang utama adalah perbanyakan klon atau perbanyakan dari tanaman yang sifat genetiknya identik satu sama lain. Di samping itu teknik kultur *in vitro* bermanfaat dalam beberapa hal khusus yaitu perbanyakan klon secara cepat, keragaman genetik, kondisi aseptik, seleksi tanaman, stok tanaman mikro, lingkungan terkendali, pelestarian plasma nutfah,

produksi tanaman sepanjang tahun, serta untuk memperoleh tanaman yang sulit diperbanyak secara vegetatif konvensional (Zulkarnain, 2009).

Penerapan kultur *in vitro* tumbuhan mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan perbanyakan secara konvensional, diantaranya (Isda, 2009):

- a. Dapat dibentuk senyawa bioaktif dalam kondisi terkontrol dan waktu yang relatif lebih singkat
- b. Kultur *in vitro* terbebas dari kontaminasi mikroba
- c. Setiap sel dapat dihasilkan untuk memperbanyak senyawa metabolit sekunder tertentu
- d. Pertumbuhan sel terawasi proses metabolismenya dapat diatur secara rasional
- e. Kultur *in vitro* tidak bergantung pada kondisi lingkungan seperti keadaan geografi, iklim, dan musim

2.3.2 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Kultur Jaringan Tumbuhan

Faktor yang berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan pada kultur *in vitro* yaitu eksplan, media tanam, kondisi fisik media, zat pengatur tumbuh, dan lingkungan tumbuh (Alitalia, 2008):

1. Eksplan

Eksplan merupakan sebutan bagi bahan yang dikulturkan (ditanam) , Harjadi (1989) menjelaskan bahwa bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan mencakup pucuk, irisan batang, daun, daun bunga, daun keping biji, akar, buah, embrio, meristem pucuk apikal (titik tumbuh), dan jaringan nuselar. Eksplan diusahakan harus dalam kondisi aseptik melalui sterilisasi dengan berbagai bahan kimia sehingga hanya terdapat satu organisme yang diinginkan (Gunawan, 1998).

2. Media

Keberhasilan metode kultur *in vitro* bergantung pada media yang digunakan. Media tidak hanya menyediakan unsur hara (makro dan mikro) tetapi juga karbohidrat (gula) untuk menggantikan karbon yang biasanya diperoleh dari udara melalui fotosintesis. Hasil yang lebih baik akan diperoleh bila ke dalam media tersebut ditambahkan vitamin, asam amino, dan zat pengatur tumbuh (Gunawan, 1998).

Banyak formulasi media, dimana masing-masing berbeda dalam hal kualitas komponennya. Satu diantara formulasi yang banyak digunakan adalah Murashige and Skoog (MS) yang telah ditemukan dan dipublikasikan oleh Toshio Murashige dan Skoog pada tahun 1962. Formulasi dasar mineral dari MS dapat digunakan untuk sejumlah tanaman dalam perbanyakan *in vitro*. Faktor penting yang lain yaitu pengaturan pH media, tingkat keasaman media harus diatur supaya tidak mengganggu fungsi membran sel dan pH sitoplasma. Sel-sel tanaman membutuhkan pH yang sedikit lebih asam berkisar antara 5,5-5,8 (Alitalia, 2008).

3. Zat Pengatur Tumbuh

Zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan senyawa organik bukan nutrisi yang aktif dalam jumlah kecil (10^{-6} - 10^{-5} mM) yang disintesis pada bagian tertentu dari tanaman dan pada umumnya diangkut ke bagian lain tanaman, dimana zat tersebut menimbulkan tanggapan serta reaksi biokimia, fisiologis, dan morfologis. Dua golongan zat pengatur tumbuh yang penting dalam kultur *in vitro* yaitu auksin dan sitokinin. Zat pengatur tumbuh ini mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur sel dan organ. Interaksi dan perimbangan antara zat

pengatur tumbuh yang diberikan dalam media dan yang diproduksi oleh sel secara endogen menentukan arah perkembangan suatu kultur (Gunawan, 1998). Hormon tumbuhan (fitohormon) merupakan senyawa organik yang disintesis di salah satu bagian tumbuhan dan dipindahkan ke bagian lain, pada konsentrasi yang sangat rendah mampu menimbulkan suatu respon fisiologis (Salisbury, 1995).

4. Lingkungan Tumbuh

Lingkungan dalam kultur *in vitro* berguna untuk mengatur proses-proses morfogenik tertentu seperti pembentukan pucuk dan akar, dan tidak untuk fotosintesis karena sumber energi bagi eksplan telah tersedia dalam bentuk sukrosa. Cahaya juga penting dalam pengendalian perkembangan eksplan dan unsur-unsur cahaya yang perlu diperhatikan adalah kualitas cahaya, panjang penyinaran dan intensitas cahaya. Temperatur ruang kultur juga menentukan respon fisiologi kultur dan kecepatan pertumbuhannya. Dari hasil penelitian dijelaskan bahwa fotosintesis jaringan sebagian besar tergantung pada suplai sukrosa dari luar (medium kultur). Dalam hal ini cahaya sangat penting untuk fotomorfogenesis. Fotomorfogenesis merupakan proses menginduksi perkembangan tanaman dan tidak melibatkan energi cahaya dalam jumlah besar. Reaksi morfogenesis dibagi menurut tipe bagian spektrum yang menghasilkan respon. Respon yang utama adalah yang diinduksi oleh spektrum cahaya merah atau biru (Alitalia, 2008).

Temperatur yang umum digunakan untuk kultur berbagai tanaman adalah ± 20 °C. suhu yang terlalu rendah dapat menghambat pertumbuhan tanaman dan suhu yang tinggi dapat mematikan tanaman. Temperatur optimum tergantung

jenis tanaman, sedangkan temperatur normal berkisar antara 22 °C-28 °C (Santoso, 2004).

2.4 Mutagen

Salah satu cara untuk meningkatkan keragaman genetik dapat dilakukan melalui mutasi. Mutasi adalah perubahan dalam struktur gen baik yang terjadi secara spontan maupun secara buatan dengan menggunakan agensia fisik atau kimia. Program mutasi dilaksanakan apabila sumber gen untuk sifat ketahanan tidak terdapat pada plasma nutfah yang dimiliki (Nasir, 2002). Mutagen kimia terdiri atas agen alkilasi yang merupakan bahan kimia yang sangat kuat dan banyak digunakan dalam pemuliaan mutasi dan bahan kimia lainnya, mencakup analog basa Nitzchia, peroksida dan alkaloid tertentu yang memiliki sifat-sifat mutagenik.

Aisyah (2006) menambahkan bahwa mutagen adalah wahana/agen yang dapat menyebabkan mutasi. Mutagen dapat diklasifikasikan sebagai mutagen fisik, mutagen kimia, dan mutagen biologis. Mutagen fisik yaitu radiasi sinar x, sinar gamma, ultraviolet, dan neutron. Mutagen kimia diantaranya dari golongan *alkylating agents* seperti EMS (etil metana sulfonat), DES (Dietil sulfat), EL (etilenimin), dan juga kelompok analog-analog basanya.

2.5 Induksi Mutasi

Mutasi dapat terjadi secara spontan di alam (*spontaneous mutation*) dan dapat terjadi melalui induksi (*induced mutation*). Secara mendasar tidak terdapat perbedaan antara mutasi yang terjadi secara alami dan mutasi hasil induksi.

Keduanya dapat menimbulkan variasi genetik untuk dijadikan dasar seleksi tanaman. Mutasi induksi dapat dilakukan pada tanaman dengan perlakuan bahan mutagen tertentu terhadap organ reproduksi tanaman seperti biji, stek batang, serbuk sari, akar rizome, kalus dan sebagainya (Soeranto, 2003). Mutasi adalah perubahan pada sekuen nukleotida dari molekul DNA. Mutasi dapat menyebabkan perubahan yang tampak pada organisme, yang disebut sebagai perubahan fenotip (Brown, 1989). Organisme yang menunjukkan sifat fenotipe yang asli disebut tipe genotipe liar, sedangkan organisme yang telah mengalami mutasi disebut mutan.

Berdasarkan kerusakannya, mutasi dibedakan menjadi dua yaitu mutasi struktur basa dan mutasi sekuen basa (Tobin dan Morel, 1997). Mutasi juga dapat dikelompokkan berdasarkan besarnya sekuen DNA yang berubah, yaitu pada tingkat genom, kromosom, dan gen. Pada kegiatan pemuliaan mutasi yang diinginkan adalah mutasi pada tingkat gen atau mutasi titik atau perubahan pada sejumlah kecil segmen kromosom. Hal ini disebabkan perubahan pada sejumlah besar segmen kromosom sering menimbulkan pengaruh negatif seperti berkurangnya fertilitas pada tanaman (Van Harten, 1998; Broetjes dan Van Harten 1988).

Mutasi merupakan salah satu metode pemuliaan untuk meningkatkan keragaman genetik tanaman. Salah satu teknologi alternatif untuk mendapatkan genotip baru melalui kultur *in vitro*. Keragaman genetik melalui kultur *in vitro* dapat dilakukan antara lain melalui keragaman somaklonal. (Evans dan Sharp, 1983).

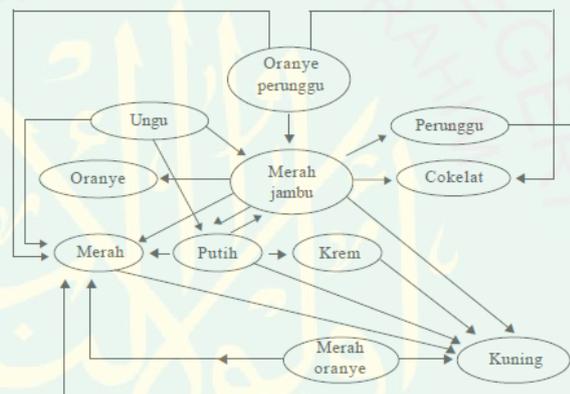
Aplikasi mutagen secara *in vitro* biasa digunakan dalam metode mutasi buatan seiring dengan keberhasilan aplikasi teknik perbanyakan *in vitro* pada berbagai jenis tanaman. Prinsip dasar mutasi *in vitro* adalah meningkatkan frekuensi variasi somaklonal (Maluszynski, 1990) dan meningkatkan efektivitas variasi somaklonal (Ahloowalia, 1995) sehingga keragaman genetik tanaman diharapkan akan meningkat.

Teknik mutasi secara *in vitro* memiliki keunggulan antara lain mampu melibatkan sejumlah besar bahan tanam dan waktu yang dibutuhkan untuk mendapatkan mutan baru relatif lebih cepat dibandingkan teknik mutasi secara *ex vitro* (Ahloowalia, 1995). Kelebihan lainnya yaitu : 1) mutasi dapat dilakukan pada tingkat sel sehingga peluang untuk terjadinya khimera lebih kecil karena mutan yang dihasilkan berasal dari satu sel, 2) laju mutasi lebih tinggi karena masing-masing sel mengalami kontak langsung dengan mutagen, 3) dapat dilanjutkan dengan seleksi secara *in vitro* sehingga seleksi terhadap mutan menjadi lebih efisien (Chahal dan Gosal, 2006).

2.6 Induksi Mutasi pada Krisan

Tanaman krisan (*Chrysanthemum cv. Ingrid*) dengan bunga berwarna pink tua yang diberi perlakuan EMS 0.77 % (0.075 M) selama 1 jam 45 menit menghasilkan 5.2 % tanaman krisan mengalami perubahan warna mahkota bunga menjadi warna pink salmon, pink terang, perunggu, kuning, dan salmon, sedangkan 89.6 % lainnya memiliki fenotipe yang seragam (Latado *et. al.*, 2004).

Perubahan alur warna mahkota bunga krisan dapat dilihat pada Gambar 2.6 Berdasarkan gambar tersebut dapat dilihat bahwa warna mahkota yang memiliki peluang lebih besar untuk mengalami perubahan warna setelah dimutasi yaitu warna merah jambu. Warna ini dapat berubah menjadi oranye, merah, putih, kuning, coklat dan perunggu. Warna kuning merupakan warna terakhir yang dapat dihasilkan dari mutasi krisan. Warna kuning memiliki peluang yang sangat kecil untuk berubah warna menjadi warna lain, perubahan mungkin terjadi dari intensitas warna kuning dari muda hingga pekat.



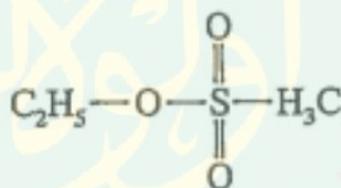
Gambar 2.3 Alur Terjadinya Mutan Warna Bunga pada Krisan (Broertjes dalam Schum dan Preil, 1998).

2.7 EMS (*Etil Methanesulfonate*) sebagai Mutagen

Mutagen kimia lebih mudah tersedia dan kadang rasio mutan yang diinginkan lebih baik dibandingkan hasil iradiasi fisik. Untuk pemuliaan tanaman, kelompok bahan kimia yang banyak digunakan adalah dari kelompok *alkylating agents*. Senyawa ini mengandung satu atau lebih kelompok alkil reaktif yang dapat ditransfer ke molekul lain pada posisi dimana kerapatan elektronnya tinggi (Aisyah, 2006).

EMS merupakan jenis mutagen kimia yang paling potensial (Chopra, 2005). Aisyah (2006) menyatakan bahwa diantara 30 sampai 40 mutagen kimia, salah satu mutagen yang paling kuat dan bermanfaat adalah EMS (*Ethyl Methanesulfonate*). Von Arnim (2005) menambahkan EMS banyak digunakan sebab toksisitasnya tidak terlalu tinggi (*moderate toxicity*), memiliki efektifitas yang tinggi untuk menginduksi banyak mutasi (*multiple mutation*) per genom dan biasanya mutasinya berupa substitusi satu basa.

Hasil penelitian Greene *et. al.* (2003) pada tanaman arabidopsis menunjukkan 99 % mutasi yang terjadi akibat EMS (20-40 mM selama 10-20 jam) adalah perubahan dari GC menjadi AT maupun AT menjadi GC. Intensitas mutasi cukup tinggi yaitu terjadi pada 1/3.000 kilo basa atau 10 mutasi per genom.

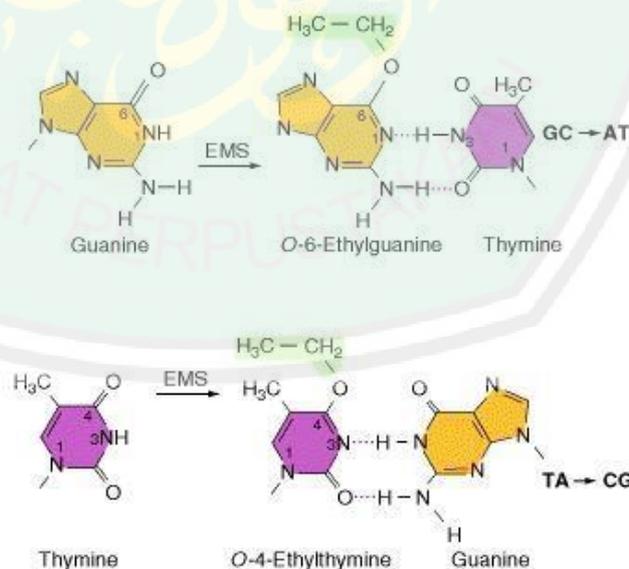


Gambar 2.4 Struktur Kimia EMS (Suzuki *et. al.*, 1989).

Tabel 2.2 Karakteristik EMS (National Toxicology Program, 2011)

Karakter	Informasi
Berat molekul	124.2
Gravitasi spesifik	1.15 pada 22°C
Titik leleh	<- 25°C
Titik didih	213°C – 214°C pada 761 mmHg
Kelarutan dalam air	135 g/L pada 25°C
Tekanan uap	0.328 mmHg pada 25°C

EMS memiliki rumus kimia $\text{CH}_3\text{-SO}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$ (Dale, 1989). *Ethyl Methanesulfonate* merupakan senyawa kimia yang dapat menyebabkan mutasi pada tingkat DNA dengan mengubah basa-basa DNA. EMS memiliki rumus kimia $\text{C}_3\text{H}_8\text{SO}_3$ (Russell, 1992). Mutagen kimia EMS merupakan salah satu zat kimia yang termasuk dalam golongan agen alkilasi yang dapat menyebabkan mutasi titik. Mutasi titik terjadi pada sebuah basa yang dapat berupa insersi, delesi, transversi, atau transisi basa. Insersi dan delesi pada satu atau lebih basa dapat menyebabkan perubahan urutan pembacaan sehingga mengubah susunan asam amino. Transisi dan transversi menyebabkan perubahan ekspresi asam amino. EMS akan mengikatkan gugus etilnya pada DNA guanin (G) pada posisi 7-N dan 6-O yang akan membentuk gugus O6-etilguanin. Terjadinya etilasi ini menyebabkan kesalahan pemasangan basa ketika replikasi, sehingga menyebabkan mutasi acak pada rantai DNA (Sambrook dan Russell, 2001).

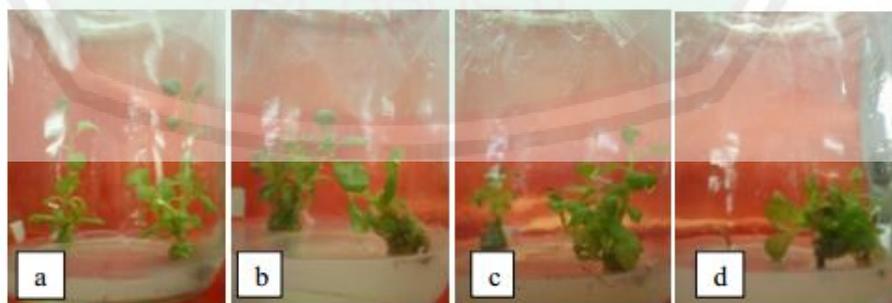


Gambar 2.5 Alkilasi oleh EMS pada posisi O-6 guanin dan posisi O-4 timin, sehingga terjadi kesalahan pasangan basa (*mispairing*) (AJF, 1999)

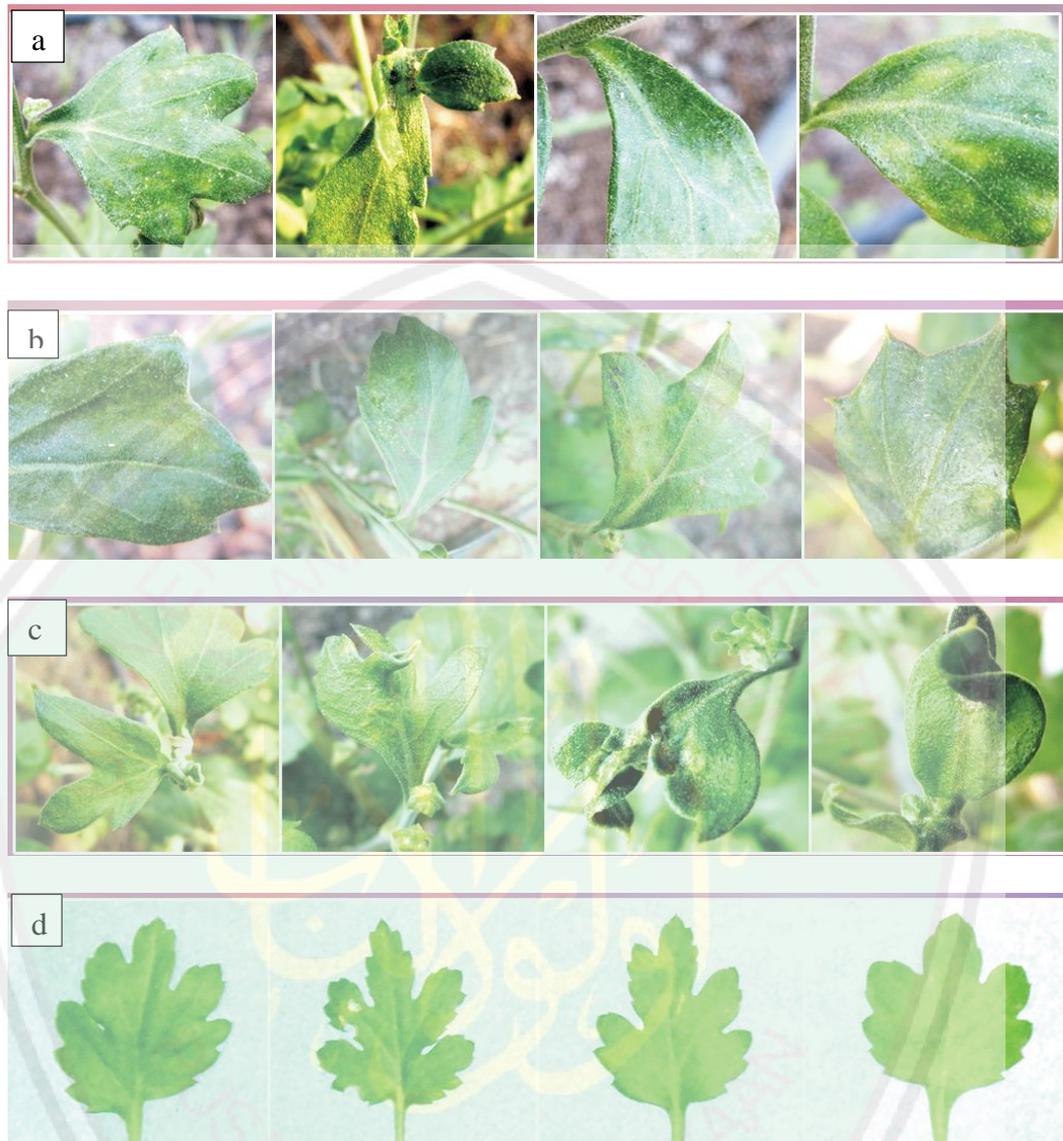
Ajjah (2009) menuliskan bahwa eksplan purwoceng yang diberi perlakuan EMS menunjukkan adanya peningkatan variasi fenotip tunas. Variasi yang muncul yaitu tangkai daun besar, daun veriegata dan albino. Frekuensi variasi fenotipe tunas paling tinggi diperoleh pada perlakuan EMS 0.5 % selama 1 jam yaitu 12 % pada suhu kontrol dan 26.7 % pada suhu 23.3 ± 2.1 °C.

2.8 Keragaman Somaklonal

Keragaman somaklonal merupakan variasi genetik tanaman yang dihasilkan melalui kultur jaringan atau kultur sel, yang meliputi semua variasi genetik yang terjadi pada tanaman yang diregenerasikan dari sel yang tidak berdiferensiasi seperti protoplas, kalus ataupun jaringan (Larkin dan Scowcroft, 1981). Variasi genetik akan diekspresikan pada tanaman regeneran dalam bentuk karakter-karakter varian. Variasi ini merupakan manifestasi mutasi dan akan diturunkan kepada keturunannya melalui perbanyakan vegetatif ataupun generative. Keragaman somaklonal dapat diamati melalui perubahan morfologi (Ignacimuthu *et. al.*, 1997).



Gambar 2.6 Keragaman pertumbuhan tunas in vitro Krisan Varietas Candra Kirana saat 9 MST pada berbagai lama perendaman EMS 0,77%. a-d : berturut-turut perendaman EMS 0,77% 0, 90, 105, dan 120 menit. (Rahmah, 2011)



Gambar 2.7 Abnormalitas yang terjadi pada bentuk daun tanaman Khrisan varietas Mighi dengan perlakuan EMS a. 0,02 % b. 0,03 % c. 0,04 % d. Kontrol dengan eksplan berupa potongan akar pada kondisi *ex vitro* (Kapadiya *et. al.*, 2014)

2.9 Analisis Variasi Genetik dari Marka Molekuler

Pita DNA yang dihasilkan karena polimorfisme melalui elektroforesis dapat dianalisis untuk melihat keanekaragaman genetik dari suatu kelompok organisme. Analisis variasi genetik dapat dilakukan dengan cara membuat

kesepakatan biner, seperti jika ada pita pada suatu posisi berat molekul dianggap bernilai 1, jika tidak ada bernilai 0. Beberapa program statistik khusus yang dapat digunakan antara lain NT-Sys, Popgen, Arlequin dan Treecon. Masing-masing software digunakan sesuai dengan kebutuhan analisis (Suryanto, 2003).

2.10 Penanda Molekuler

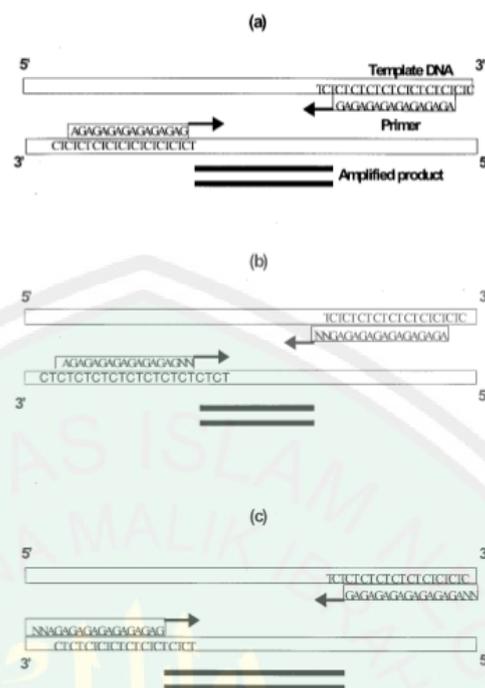
Penanda molekuler atau penanda DNA merupakan suatu sekuen pendek DNA yang menunjukkan adanya polimorfisme antar individu yang berbeda dalam satu spesies. Penanda molekuler mempunyai tingkat polimorfisme yang sangat tinggi, jumlahnya tidak terbatas, tidak dipengaruhi oleh lingkungan, dan tingkat heritabilitasnya hampir 100%. Suatu penanda dikatakan efektif apabila dapat membedakan antara dua tetua yang berbeda genotipenya dan dapat dideteksi dengan mudah dalam populasi yang diuji (Wirnas 2005).

Penanda molekuler akan menganalisis hubungan pada tingkat DNA sehingga perubahan yang tidak terlihat dengan penanda lainnya dapat diketahui. Hal ini bermanfaat untuk identifikasi suatu individu atau genotipe, derajat kekerabatan antar genotipe, adanya variasi genetika dalam suatu populasi tanaman, determinasi gen atau kompleks gen yang diinginkan dalam suatu genotipe spesifik, dan pengembangan varietas tanaman baru melalui transformasi (Brown *et. al.*, 1996)

2.11 Penanda ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*)

Teknik pengulangan urutan sederhana (ISSR) adalah metode berbasis PCR, yang melibatkan segmen DNA di antara dua daerah ulangan mikrosatelit identik dengan primer berulang yang berorientasi pada arah yang berlawanan. Teknik ini menggunakan mikrosatelit, sebagai primer dalam reaksi PCR primer tunggal yang menargetkan beberapa lokus genom antar-SSR dengan ukuran yang berbeda. Pengulangan mikrosatelit yang digunakan sebagai primer dapat dinukleotida, trinukleotida, tetranukleotida atau pentanukleotida. Primer yang digunakan dapat berupa *unanchored* (Gupta et al., 1994; Meyer et al., 1993; Wu et al., 1994) atau primer *anchored* posisi 3' tau 5' (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Primernya panjang (16-25 bp) menghasilkan polimorfisme yang lebih tinggi. Produk yang diamplifikasi (penanda ISSR) biasanya 200-2000 bp panjang dan dapat diperiksa dengan baik oleh elektroforesis gel agarose dan poliakrilamida (Reddy, 2002).

Penanda ISSR menghasilkan pita yang lebih polimorfisme daripada RAPD, bahkan 6.5 kali lebih tinggi dibanding RAPD karena panjang primer yang lebih panjang dari primer RAPD (Quian et al., 2001) lebih cepat dan lebih mudah digunakan (Lanham & Brennan, 1999). Penanda ISSR merupakan dominan marker, tidak memerlukan desain primer karena bekerja secara acak.



Gambar 2.8 Skema ISSR dengan PCR Ket: Skema primer tunggal (AG)₈, *unanchored* (a), *anchored* pada 3' (b), *anchored* pada 5' (c) dengan DNA target (TC)_n (Reddy *et al.*, 2002).

Penanda ISSR ini telah berhasil digunakan untuk mempelajari keragaman genetik pada teh (Mondal, 2002). ISSR menunjukkan polimorfisme yang cukup untuk membedakan antara berbagai kultivar krisan (Wolff *et al.*, 1995). ISSR berhasil menunjukkan keragaman genetik pada purwoceng (Rahmah, 2013). ISSR berhasil mengetahui keragaman genetik pada strawberi (Hussein *et al.*, 2008). tiga 5' primer anchored bisa membedakan 20 kultivar Brassica napus (Charters *et al.*, 1996). ISSR adalah penanda pilihan untuk menilai keanekaragaman genetik cocoa (Charters & Wilkinson, 2000). ISSR mampu membedakan keragaman genetik Gloriosa superba L. yang diinduksi dengan mutagen (Selvarasu, 2017).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus – November 2017 di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan CV Muria Sari Bumi dan di Laboratorium Genetika Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk ke dalam penelitian eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari satu faktor yaitu, lama perendaman ke dalam *Ethyl Methanosulfonate* 0,77% yang terdiri dari 4 level sebagai berikut:

- a. J0 = 0 menit
- b. J1 = 90 menit
- c. J2 = 105 menit
- d. J3 = 120 menit

Setiap perlakuan diulang sebanyak 6 kali, sehingga terdapat 24 unit percobaan.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 3 variabel yang meliputi: 1) variabel bebas, 2) variabel terikat dan 3) variabel terkendali. Variabel

bebas dalam penelitian ini adalah lama perendaman dengan *Ethyl Methanosulfonate*. Variabel terikat dalam penelitian merupakan variabel kualitatif yaitu: perubahan warna daun, bentuk daun, dan warna batang serta variabel yang dapat diukur yaitu: rata-rata tinggi tanaman, rata-rata jumlah tunas per eksplan, rata-rata jumlah daun per eksplan, rata-rata luas daun, dan frekuensi keragaman fenotipe, jumlah & panjang produk amplifikasi, dan persentase polimorfik. Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah suhu, cahaya, medium MS, konsentrasi ZPT, dan pH.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas ukur, cawan petri, batang pengaduk, botol kultur, alat-alat diseksi (scalpel, pinset, gunting), *Laminar Air Flow* (LAF), timbangan analitik (*Virra*), pipet, autoklaf, lampu bunsen, penyemprot alkohol, pH meter (*Merk*), lemari pendingin, rak kultur, *Air Conditioner* (AC), lampu, oven (*Thermo scientific*), kertas label, *hot plate & magnetic stirrer* (*Nuova*), aluminium foil (*Sunshine*), alat wrap plastik, rak kultur, kertas label, panci, kompor (*Rinnai*), *Millipore* 0,20 μm (*Millex*), alat suntik (*Terumo*), kapas, penggaris (*Butter Fly*), wadah nitrogen cair, mortar & alu, tube 1,5 mL, inkubator, vortex (*Thermo scientific*), mikropipet, tip, spatula, *centrifuge* (*Pico 17*), nano drop (*Micro-spectrofotometer Nano 200-1002*), mesin PCR (*Bio-RAD 580BR7730*), cetakan agar, perangkat elektroforesis gel agarosa (*Bio-RAD Power Pac Basic 041BR 23783*), gel tray, sisir, *power supply*, plastik wrap,

UV transilluminator *XR Universal Hodd II 76S/08491* (Gel Doc), *microwave U-Rolux*, botol sterilisasi, botol larutan, plastik klip, masker, sarung tangan, dan tissue.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu eksplan berupa dua mata tunas krisan (*D. grandiflora* Tzvelev) varietas *Pink Fiji* yang diambil dari plantlet berumur 1 bulan sepanjang 1 cm, *Ethyl methanesulfonate* (*Sigma*) sesuai konsentrasi, larutan natrium buffer fosfat pH 7 (*Thermo scientific*), DMSO (*dimethyl sulfo-oxida*) 4% (*Sigma*), aquades, media MS (Murashige and Skoog) (*Ducefa Biochemie*), 0,1 NaOH, 0,1 HCl, ZPT berupa BA (*New Sunshine*) dengan konsentrasi 0,5 mg/L, NAA (*New Sunshine*) dengan konsentrasi 0,025 mg/L, aquades steril, spiritus, es balok, etanol 96 % (*Lipi*), dan alkohol 70 % (*Lipi*), alkohol 90 % (*Lipi*), karbol (*wipol*), formalin (*Vetpack*), daun tanaman krisan varietas *Pink Fiji*, nitrogen cair (*Lipi*), Blood-Animal-Plant Preparation Kit, ddH₂O (*Biolab Medika*), Sampel hasil isolasi DNA, Primer (AG)8CT (*Macrogen*), PCR mix (taq polymerase, dNTPS, MgCl, dan buffer) (*INtRON*), gel agarose (*Sciencepreneur*), buffer TBE, DNA ladder (*Promega*), Loading dye (*INtRON*), dan DNA staining.

Tabel 3.1 Sekuen primer ISSR yang digunakan (Rahmah, 2015)

No	Primer	Sekuen 5'-3'
1	(AG)8CT	AGAGAGAGAGAGAGCT

3.5 Prosedur Kerja

3.5.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat *dissecting set* (scalpel, pinset, gunting), alat-alat gelas dan logam dicuci dengan detergen dan dibilas dengan air bersih beberapa kali dan kemudian dikeringkan. Alat-alat logam ditutup aluminium foil, sedangkan alat-alat gelas dan cawan petri dibungkus dengan kertas, kemudian disterilkan dalam *autoclave* dengan suhu 121° C selama 15 menit. Alat-alat *dissecting set* (scalpel, pinset, gunting) disterilisasi dengan alkohol 90% dan dibakar dengan nyala api spiritus setiap kali akan digunakan di LAF.

3.5.2 Pembuatan Media MS

Media yang digunakan adalah media 1 MS dengan penambahan ZPT adalah sebagai berikut: Media MS ditimbang sebanyak 4,43 gr, gula sebanyak 30 gr dan agar-agar 7 gr. Bahan-bahan seperti media MS, gula dan ZPT (NAA 0,025 mg/L dan BA 0,5 mg/L) dimasukkan ke dalam gelas beker dan diletakkan di atas hot plate. Aquades ditambahkan ke dalam gelas beker sampai volume 1 liter, kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga homogen. pH diukur hingga mencapai 5,8 dengan pH meter, jika pH kurang dari 5,8 maka ditambahkan larutan NaOH 0,1 N dan jika pH lebih dari 5,8 maka ditambahkan HCl 0,1 N. Larutan dipindahkan ke dalam panci, diletakkan di atas kompor, kemudian ditambah dengan agar sebanyak 7 gr. Media dipanaskan dan diaduk hingga mendidih kemudian diangkat. Media diisikan ke dalam 40 botol kultur masing-masing sebanyak 25 ml. Botol kultur yang berisi media ditutup dengan

penutupnya. Botol berisi media MS diinkubasi dalam ruang inkubator selama minimal 3 hari.

3.5.3 Pembuatan Larutan *Ethyl Methanesulfonate*

Pembuatan larutan EMS dilakukan dengan menggunakan larutan natrium buffer posfat pH 7 dan DMSO 4% sebagai pelarut. Terdapat konsentrasi yang akan digunakan, yaitu 0,77% dengan cara mengambil 0,77 ml EMS dan dijadikan 100 ml dengan menambahkan buffer posfat pH 7. Sedangkan untuk kontrol tunas krisan langsung disubkultur pada media MS yang telah disiapkan sebelumnya.

3.5.4 Sterilisasi Media dan Larutan EMS

Media dalam botol kultur disterilkan dengan cara dimasukkan kedalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit dan larutan EMS disterilisasi dengan menggunakan *millipore* 0,20 µm.

3.5.5 Sterilisasi Ruang Tanam

Adapun langkah kerja dalam sterilisasi ruang tanam adalah : Lantai pada ruang inisiasi dipel dengan karbol yang telah dicampur dengan air. Lantai dipel dengan karbol murni. Meja LAF dibersihkan dengan alkohol 70% kemudian dinyalakan sinar UV selama 1 x 24 jam. Sinar UV dimatikan setelah 1 x 24 jam dan sebelum melakukan inisiasi dibersihkan lagi meja LAF dengan alkohol 70%.

3.5.6 Perendaman Tunas pada Larutan *Ethyl Methanesulfonate*

Tunas dipotong sesuai ukuran yang telah ditentukan yaitu 1 cm (memiliki dua mata tunas) dari botol krisan (*D. grandiflora* Tzvelev) varietas *Pink Fiji*, kemudian diletakkan pada cawan petri, dihitung dan dimasukkan ke dalam larutan EMS sesuai dengan perlakuan lama perendaman yaitu selama 90 menit, 105

menit, dan 120 menit. Eksplan dikocok dengan menggunakan *shaker* 80 rpm agar larutan mengenai seluruh bagian tunas.

3.5.7 Subkultur

Eksplan tunas krisan (*D. grandiflora* Tzvelev) varietas *Pink Fiji* yang telah direndam EMS kemudian dicuci dengan air steril sebanyak tiga kali selama 15 menit. Selanjutnya eksplan ditanam di dalam media MS + NAA 0,025 mg/L dan BA 0,5 mg/L. Setiap botol kultur ditanam tiga eksplan. Setelah eksplan ditanam, botol ditutup. Botol kultur kemudian dipindahkan ke ruang kultur dengan kondisi ruang optimum (suhu 16 °C).

3.5.8 Analisis Keragaman Genetik Tanaman Krisan Varietas *Pink Fiji* menggunakan Penanda ISSR

1. Isolasi DNA

Metode isolasi DNA dari daun krisan yang telah dimutasi dengan EMS secara *in vitro* berdasarkan protokol isolasi DNA dari Blood-Animal-Plant Preparation Kit Jena Bioscience adalah sebagai berikut: daun tanaman krisan varietas *Pink Fiji* diambil daun mutan positif dari setiap tunas serta daun dari perlakuan kontrol dan ditambahkan nitrogen cair, digerus dengan menggunakan mortar hingga halus. Daun tanaman krisan varietas *Pink Fiji* yang telah halus ditimbang sebanyak 80 mg menggunakan neraca analitik, kemudian dimasukkan ke dalam tube berukuran 1.5 ml. *Lysis Cell* (serbuk daun ditambahkan 300 µl Lysis buffer dan 2 µl RNAse, vortex selama 60 detik, tambah 8 µl Proteinase K dicampur dengan cara dipipet, inkubasi pada suhu 60°C selama 20 menit, ditunggu hingga dingin selama 5 menit, tambah

300 μ l *Binding Buffer* dan vortex hingga tercampur, diletakkan dalam lemari es suhu 4°C selama 5 menit, sentrifus 10.000 rpm selama 5 menit).

Column activation (letakkan *spin column* pada *wash tube* 2 ml, ditambahkan 100 μ l *Activation Buffer* pada *spin column*, sentrifus 10.000 rpm selama 30 detik, buang larutan pada tube 2 ml). *Column Loading* (supernatan diletakkan pada *spin column*, sentrifus 10.000 rpm selama 1 menit, buang larutan pada *wash tube* 2 ml). *Primary washing* (*Washing Buffer* sebanyak 500 μ l dimasukkan ke dalam *spin column*, sentrifus selama 30 detik, buang larutan pada bagian *wash tube* 2 ml). *Secondary washing* (*Washing Buffer* sebanyak 500 μ l dimasukkan ke dalam *spin column*, sentrifus selama 30 detik, buang larutan pada bagian *wash tube* 2 ml, sentrifus 10.000 rpm selama 2 menit untuk menghilangkan sisa *Washing Buffer*, ganti *wash tube* dan pindahkan *spin column* ke *elution tube*). *Elution of DNA* (*Elution Buffer* sebanyak 50 μ l ditambahkan ke dalam *spin column*, inkubasi pada suhu ruang selama 1 menit, sentrifus 10.000 rpm selama 2 menit, DNA siap disimpan pada suhu 4°C).

2. Uji Kemurnian dan Konsentrasi DNA Secara Kuantitatif menggunakan Nano Drop

Power supply dipastikan sudah terhubung. Alat dihidupkan dengan menekan tombol power di bagian belakang. Pilih menu “ACID” pada layar untuk analisis DNA menggunakan pointer. Pilih jenis asam nukleat yang akan dianalisis yaitu “DsDNA”. *Upper pedestal* dibuka, dibersihkan *lower pedestal* dan *upper pedestal* secara perlahan menggunakan tissue. Blank

diletakkan di atas *lower pedestal* sebanyak 2 μl , *lower pedestal* ditutup dengan menurunkan *upper pedestal*, klik “*read blank*” dan tunggu hingga muncul tulisan “*measurement ready*” pada layar. *Upper pedestal* dibuka dan dibersihkan bagian upper dan *lower pedestal* dengan tissue. Sampel diletakkan di atas *lower pedestal* dan ditutup secara perlahan kemudian klik “*measure*”. Hasil kemurnian dan kuantitas DNA akan muncul pada layar.

Berikut rumus manual perhitungan apabila menggunakan spektrofotometer:

Rumus menghitung kuantitas DNA

$$\times 260 \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$$

Rumus menghitung kemurnian DNA

$$\frac{\times 260}{\times 280}$$

3. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Sampel DNA yang akan diamplifikasi diambil dari stok kerja DNA yang konsentrasinya tidak diencerkan. Untuk setiap tabung PCR berisi 12.5 μL campuran yang terdiri dari :

Tabel 3.2 Komponen PCR dalam satu tabung untuk amplifikasi

No	Komponen PCR	Konsentrasi Awal	Volume (μl)	Konsentrasi akhir
1	PCR Master mix Soln	2x	7.5	1x
2	Primer	100 pmol	1.5	8 pmol
3	Nuclease free water		2.5	
4	DNA		1	
			12.5	

Larutan tersebut dihomogenkan dan siap digunakan untuk proses *running*. Program *running* PCR sebanyak 35 siklus dengan reaksi: predenaturasi 95°C selama 3 menit, denaturasi 95°C selama 1 menit, suhu annealing (primer 1 53°C, primer 2 54°C) selama 50 detik, elongasi 72°C selama 2 menit, dan terakhir post elongasi 72°C selama 4 menit. dan akhir dari seluruh siklus dikondisikan pada suhu tetap 4°C. Larutan sampel siap digunakan untuk proses elektroforesis.

4. Elektroforesis

DNA hasil amplifikasi PCR sebanyak 2 μ L ditambahkan 1 μ L *Loading dye* diletakkan pada 1% gel agarose (Gel dibuat dengan melarutkan 0.4 gr agarosa pada 40 mL bufer TBE ditambah dengan *DNA staining* sebanyak 3 μ L) kemudian dielektroforesis dengan gradasi waktu dan tegangan listrik yang ditentukan (100 volt 5 menit, 80 volt 10 menit, dan 60 volt 25 menit). Marker (*DNA ladder*) yang digunakan adalah 100 bp-1500 bp Promega dan 1 Kb Promega masing-masing sebanyak 3 μ l dan divisualisasikan pada *UV transiluminator*.

3.5.9 Pengamatan

Pengamatan keragaman fenotip dilakukan secara non destruktif selama 4 MST (Minggu Setelah Tanam) dan pengamatan keragaman genetik dilakukan secara destruktif. Parameter yang diamati dan diukur adalah:

1. Parameter Keragaman Fenotip

1.1 Parameter Kualitatif

- a. Perubahan warna dan bentuk daun
- b. Perubahan ukuran batang
- c. Perubahan warna kalus

1.2 Parameter Kuantitatif

- a. Rata-rata tinggi tunas

Kriteria tinggi tanaman yang diukur yaitu mulai batang paling bawah hingga ke bagian paling atas. Pada proses pengukuran, tanaman tidak dikeluarkan dari botol kultur, sehingga digunakan penggaris yang ditempel pada botol kultur. Diukur pada minggu ke 4.

- b. Rata-rata jumlah tunas per eksplan

Pengamatan ini dilakukan pada minggu ke 4 dengan menghitung jumlah tunas yang terbentuk pada tiap eksplan.

- c. Rata-rata jumlah daun per eksplan

Kriteria jumlah daun yang dihitung adalah semua daun yang membuka penuh yang terbentuk pada tiap eksplan. Diamati pada minggu ke 4.

- d. Rata-rata luas daun

Kriteria luas daun yang dihitung adalah semua daun yang membuka penuh yang terbentuk pada tiap eksplan. Diamati pada minggu ke 4.

- e. Frekuensi Keragaman Fenotipe

Frekuensi keragaman fenotipe dinyatakan dalam persen dan dihitung berdasarkan semua variabel pengamatan yang berbeda dari kontrol (warna

kalus, warna dan bentuk daun, serta ukuran batang) dibagi dengan total eksplan. Dinyatakan dalam rumus sebagai berikut.

$$\text{Frek KF (\%)} = \frac{\Sigma \text{ eksplan yang berbeda dari kontrol}}{\Sigma \text{ eksplan yang diamati}} \times 100$$

2. Parameter Keragaman Genetik

Parameter keragaman genetik yang diamati yaitu jumlah & panjang produk amplifikasi, dan persentase polimorfik.

3.5.10 Analisis Data

Data pengamatan berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif berupa pengamatan visual hasil kultur disajikan secara deskriptif. Data kuantitatif berupa data perlakuan terhadap keragaman fenotip dianalisis menggunakan uji statistik ANOVA *One Way* bila terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan uji DMRT pada taraf 5 %. Analisis keragaman genetik dilakukan dengan pemberian skor untuk pita-pita yang muncul. Skor 1 diberi untuk pita yang muncul dan untuk pita yang tidak muncul diberi skor 0, kemudian data skoring dianalisis menggunakan PAST (*Palaeontological Statistics*) untuk analisis keragaman genetik yaitu jarak genetik dan dendogram.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Lama Perendaman dalam EMS 0.77% terhadap Keragaman Fenotipik

4.1.1 Keragaman Fenotipik secara Kuantitatif

Parameter kuantitatif yang diamati dalam penelitian ini adalah rata-rata tinggi tanaman, rata-rata jumlah tunas per eksplan, rata-rata jumlah daun per eksplan, luas daun dan frekuensi keragaman fenotipe. Berdasarkan hasil analisis varian (ANOVA) menunjukkan bahwa semua parameter yang diamati memiliki hasil F hitung $>$ F tabel 5% yang berarti terdapat pengaruh lama perendaman EMS 0.77% terhadap pertumbuhan tanaman. Hasil yang berbeda nyata tersebut selanjutnya dilakukan uji lanjut *Duncan Multiple Range Tests* (DMRT) 5% yang disajikan pada tabel 4.1.

Tabel 4.1. Rekapitulasi Pengaruh Lama Perendaman EMS 0.77% terhadap Seluruh Peubah Kuantitatif

Perlakuan	Tinggi Tanaman (cm)	Luas (cm)	Daun Jumlah Tunas	Jumlah Daun
0 menit	4.3333 ^b	.1700 ^b	1.1667 ^a	7.1667 ^a
90 menit	3.2167 ^b	.1500 ^{ab}	3.1667 ^{bc}	18.3333 ^b
105 menit	3.3833 ^b	.1200 ^{ab}	3.8333 ^c	18.3333 ^b
120 menit	1.7667 ^a	.1017 ^a	1.8333 ^{ab}	8.0000 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf notasi DMRT (5%) yang sama tidak berbeda nyata

Respon tanaman krisan varietas *Pink Fiji* yang diberi perlakuan lama perendaman EMS 0.77% selama 0 menit- 105 menit memiliki kecenderungan yang sama pada variabel pengamatan tinggi tanaman dan luas daun. Perendaman

0 menit-105 menit tidak mengalami perubahan tinggi tanaman dan luas daun. Perendaman selama 120 menit menghasilkan tinggi tanaman dan luas daun terendah. Pada perlakuan perendaman selama 90 menit dan 105 menit berpengaruh pada peningkatan jumlah tunas dan daun dibandingkan dengan perlakuan kontrol, sedangkan pada perlakuan lama perendaman selama 120 menit sama dengan kontrol yang berarti tidak ada pengaruh lama perendaman 120 menit terhadap variabel tersebut.

Hasil penelitian menunjukkan secara umum lama perendaman lebih dari 105 menit cenderung bersifat negatif, semakin lama perendaman maka akan menghambat pertumbuhan tanaman krisan. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Rustini (2014) bahwa semakin lama perlakuan perendaman dengan EMS 1% selama 9 dan 12 jam semakin signifikan terjadinya penurunan tinggi tanaman cabai rawit dibandingkan dengan kontrol. Hal ini serupa dengan hasil penelitian Jabeen dan Mirza (2004) yang melakukan induksi mutasi pada cabai besar dengan EMS 0,1% selama 6 jam, menghasilkan mutan kerdil. Menurut Gaul (1977) menurunnya tinggi tanaman merupakan salah satu fenomena yang biasa terjadi pada tanaman yang diperlakukan mutagen. Perubahan yang terjadi pada morfologi tanaman akibat perlakuan EMS seperti hasil penelitian pada tanaman stroberi yang diberi EMS menghasilkan ukuran daun yang lebih kecil daripada tanaman kontrol (Murti *et al.*, 2013).

Perlakuan EMS 1% selama 9 jam menghasilkan tanaman yang paling tinggi, jumlah cabang paling banyak, dan jumlah daun paling banyak. Dapat dikatakan perlakuan EMS 1% selama 9 jam efektif untuk tinggi tanaman, jumlah

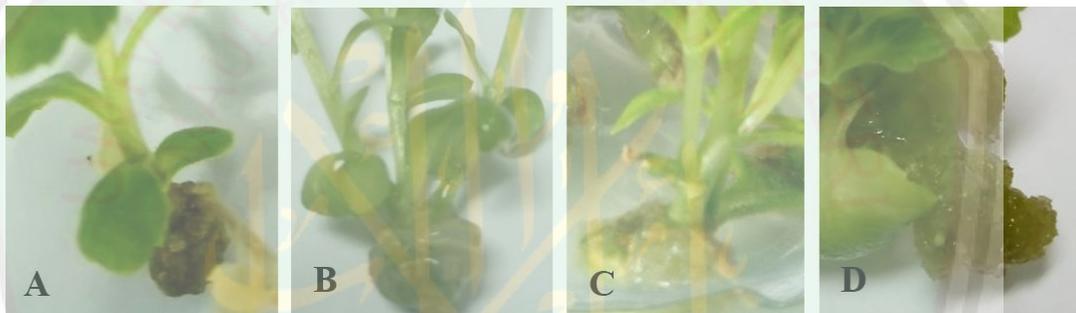
cabang dan jumlah daun tanaman cabai merah dibandingkan lama perendaman 12 jam. Sedangkan untuk jumlah buah cabai merah menunjukkan peningkatan jumlah buah pada perlakuan EMS 1% selama 6 jam dibandingkan dengan tanaman kontrol. Jika dibandingkan pada masing-masing perlakuan, tingkat penyerapan jumlah mutagen yang terjadi akan berbeda-beda sehingga fluktuasi nilai perubahan pada setiap perlakuan akan berbeda (Manzila *et al.*, 2010)

Rahmah (2011) melaporkan bahwa lama perendaman EMS 0.77 % pada varietas Candra Kirana dan Puspita Asri menyebabkan tinggi tanaman dan jumlah daun pada lama perendaman 90 menit mengalami penurunan dibandingkan kontrol, kemudian lama perendaman 105 dan 120 menit mengalami peningkatan. Semakin lama perendaman menyebabkan semakin banyak jumlah tunas pada varietas Candra Kirana dibandingkan dengan kontrol, sementara pada varietas Puspita Asri tidak mengalami perubahan dari perlakuan kontrol .

Keragaman yang disebabkan oleh mutagen EMS berbeda pada tiap spesies bahkan varietas. Dapat berakibat positif dan negatif bergantung pada konsentrasi dan lama perendaman yang diberikan dikarenakan perbedaan materi genetik dan toleransi dalam merespon mutagen. Hal tersebut diduga karena EMS merupakan mutasi titik sehingga menyebabkan perubahan pengenalan basa pengkode protein, yang seharusnya terbentuk untuk mengkode suatu protein tertentu menjadi tidak terbentuk/ tidak terekspresi, bahkan yang sebelumnya tidak terekspresi menjadi terekspresi. Mutasi yang diakibatkan oleh EMS secara acak sehingga tidak dapat dikendalikan mutasi yang menguntungkan dan yang merugikan.

4.2 Keragaman Fenotipe pada Planlet

Hasil pengamatan pada warna kalus mengalami perbedaan setelah diberi perlakuan lama perendaman EMS 0.77 %. Penelitian ini menunjukkan bahwa semakin lama perendaman eksplan dengan EMS 0.77 % maka kalus menjadi hijau. Kalus pada tanaman kontrol berwarna coklat kehitaman sedangkan kalus pada perlakuan EMS 0.77 % selama 90 menit cenderung berwarna hijau, lama perendaman 105 menit cenderung berwarna hijau kekuningan, kemudian kalus pada lama perendaman 120 menit berwarna hijau kecoklatan (Gambar 4.1).



Gambar 4.1 Respon warna kalus dari perlakuan lama perendaman dengan EMS 0.77% (a) 0 menit (coklat), (b) 90 menit (hijau), (c) 105 menit (hijau kekuningan), (d) 120 menit (hijau kecoklatan)

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan diperoleh hasil bahwa pada perlakuan lama perendaman dengan EMS 0.77% 0 menit warna kalus didominasi dengan warna coklat sebesar 44.5%, perlakuan lama perendaman 90 menit didominasi oleh kalus berwarna hijau sebanyak 72%, kemudian lama perendaman 105 menit didominasi kalus berwarna hijau kekuningan sebanyak 67%, dan lama perendaman 120 menit didominasi kalus berwarna hijau kecoklatan sebanyak 67% (Tabel 4.2).

Tabel 4.2 Frekuensi Keragaman Warna Kalus pada Perlakuan Lama Perendaman EMS 0.77 %

Perlakuan Lama Perendaman EMS 0.77%	Warna Kalus (%)			
	Coklat	Hijau	Hijau kekuningan	Hijau Kecoklatan
0 menit (kontrol)	44.5	33.5	11	11
90 menit	0	72	17	11
105 menit	7	13	67	13
120 menit	0	22	11	67

Kalus yang berwarna hijau kecoklatan kebanyakan merupakan kalus yang tidak memiliki tunas, diduga semakin lama perendaman EMS 0.77% menyebabkan bertambahnya toksisitas sehingga eksplan tidak dapat membentuk tunas. Junaid *et al.* (2008) melaporkan bahwa pada lama perendaman tertentu EMS secara *in vitro* dapat meningkatkan induksi kalus. Qosim *et al.* (2012) melaporkan bahwa perlakuan EMS konsentrasi 0,2% selama 12 jam semua eksplan tidak dapat beregenerasi membentuk tunas. Hal ini sesuai dengan penelitian Resti *et al.* (2009), perlakuan EMS dapat mendorong pembelahan sel tanaman, namun semakin tinggi konsentrasi dan semakin lama perendaman EMS yang digunakan, maka dapat menyebabkan kematian pada sel tanaman.

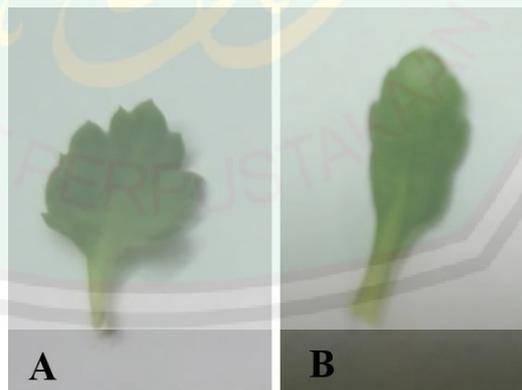
Menurut penelitian Sarker dan Biswas (2002); Dhanavel *et al.* (2008), aplikasi EMS dapat mempengaruhi terjadinya penghambatan pada pembelahan sel. Penghambatan pada sel secara berturut-turut mengakibatkan terjadinya kematian sel tanaman yang disebabkan karena mutagen kimia secara langsung, yaitu melalui perendaman yang bersifat toksik sehingga mengakibatkan sel tidak mampu berpoliferasi membentuk tunas. Perlakuan EMS yang bersifat sebagai

agen pengkelat dapat menyebabkan terjadinya mutasi titik, sehingga mereduksi sifat fertilitas, penghambatan kemampuan jaringan membentuk tunas dan pada akhirnya hasil mengalami kematian (Greene *et al.* 2003).

Keragaman fenotipik akibat lama perendaman EMS 0.77% juga diamati berdasarkan warna, ukuran, serta bentuk pada daun dan batang. Pengamatan fenotipik juga dilakukan dengan mengamati batang membesar, serta bentuk planlet yang roset (Gambar 4.2).



Gambar 4.2 Perbedaan pertumbuhan tanaman Krisan Varietas *Pink Fiji* 4 Minggu Setelah Tanam Perlakuan Perendaman a. Kontrol (0 menit), b. 90 menit, c. 105 menit bentuk sebagian roset dan sebagian normal, d. 120 menit berbentuk roset.



Gambar 4.3 Bentuk daun (A) perlakuan kontrol dan (B) bentuk daun memanjang pada perlakuan 90, 105, dan 120 menit

Hasil aplikasi EMS 0.77% selama 90 menit cenderung membentuk daun berbentuk bulat seperti pada perlakuan kontrol dan sebagian susunan daun roset.

Sedangkan pada perlakuan lama perendaman 105 menit menghasilkan tunas yang lebih banyak dengan susunan daun yang roset, daun berbentuk variatif, ada yang berbentuk bulat dan ada yang memanjang. Pada perlakuan EMS selama 120 menit menghasilkan jumlah tunas yang lebih banyak dibandingkan dengan kontrol, dengan susunan daun roset dan bentuk daun variatif ada yang bulat seperti kontrol namun lebih lebar dan ada yang memanjang. Variasi yang terjadi diduga dikarenakan perlakuan mutasi pada penelitian ini menggunakan tunas yang terdiri dari banyak sel, sehingga ketika diberi perlakuan mutasi respon tiap sel berbeda dan terbentuk keragaman dalam satu planlet. Keragaman juga ditemukan pada ukuran batang yang lebih besar pada lama perendaman EMS selama 120 menit dibandingkan dengan kontrol. Perlakuan lama perendaman 90 menit dan 105 menit menghasilkan ukuran batang yang variatif ada yang lebih besar dan ada yang sama dengan kontrol.

Perlakuan lama perendaman dengan EMS 0.77% selama 105 dan 120 menit menunjukkan kecenderungan memiliki gejala warna daun klorosis. Vagera *et al.* (2004) juga melaporkan bahwa EMS 20mM telah menginduksi 50% mutan defisiensi klorofil termasuk albino dan non-albino pada tanaman barley kultivar Nodum. Rahmah (2011) menyatakan bahwa lama Perendaman EMS 0.77% menyebabkan respon linear yang menurun terhadap jumlah kloroplas tanaman. Namun pada penelitian ini tidak ditemukan adanya variegata maupun albino, hal tersebut mungkin dikarenakan jumlah ulangan kurang banyak sehingga peluang munculnya mutasi belum semua terlihat. Frekuensi keragaman fenotipe dapat dilihat pada tabel 4.3.

Tabel 4.3 Frekuensi Keragaman Fenotipe Planlet dalam Persen

Lama Perendaman EMS 0.77%	Daun memanjang (%)	Tangkai Daun Besar (%)	Daun Roset (%)
0 menit	0	0	0
90 menit	28	11	39
105 menit	67	67	60
120 menit	83	100	83

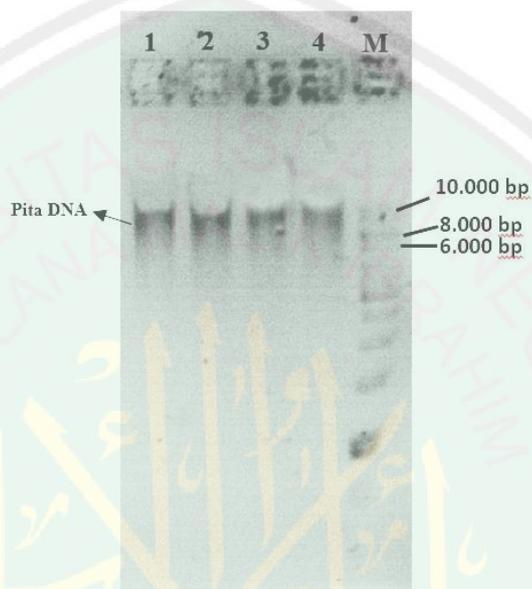
4.3 Analisis Keragaman Genetik Berdasarkan Penanda ISSR

4.3.1 Isolasi DNA

Analisis DNA dimulai dengan melakukan isolasi DNA total dari daun tanaman krisan varietas *Pink Fiji* dengan menggunakan Blood-Animal-Plant DNA preparation kit JENA Bioscience. Kelebihannya yaitu kit persiapan DNA Blood-Animal-Plant berbasis kolom spin dirancang untuk isolasi DNA genom yang cepat dan tinggi dari seluruh darah, sel hewan dan jaringan tanaman. Metode berbasis kolom spin sepenuhnya menghilangkan penghambat PCR seperti kation dan protein sehingga menghasilkan preparasi DNA genomik dengan kemurnian tinggi. Tidak ada penggunaan fenol atau kloroform, penanganannya aman dan tidak menghasilkan limbah berbahaya.

Alasan digunakan organ daun dari tanaman karena bagian ini lebih mudah diekstrak secara teknik daripada bagian tanaman lainnya seperti akar, batang dan biji. Pemilihan daun muda untuk isolasi DNA karena daun muda memiliki tekstur yang lunak dibandingkan daun tua sehingga lebih mudah untuk

dihaluskan. Selain itu, kandungan polisakarida, polifenol dan metabolit sekunder lebih sedikit daripada daun tua sehingga diharapkan hasil isolasi DNA bisa lebih murni (Syafaruddin, 2011). Hasil uji kualitatif DNA dengan elektroforesis dapat dilihat pada gambar 4.4.



Gambar 4.4 Hasil elektroforesis DNA genom Krisan. M merupakan marker 10000 bp. Keterangan sumur : lama perendaman EMS 0.77% selama (1) 0 menit, (2) 90 menit, (3) 105 menit dan (4) 120 menit.

Berdasarkan gambar 4.4 diperoleh hasil bahwa panjang pita DNA adalah 10.000 bp dan ketebalan pita DNA yang paling tipis adalah pada sampel nomor 4 yaitu perlakuan lama perendaman dengan EMS 0.77% selama 120 menit menunjukkan konsentrasi DNA yang paling sedikit dibandingkan dengan sampel lainnya. Uji kualitas DNA dengan elektroforesis tersebut sesuai dengan hasil uji kuantitatif DNA menggunakan nano drop (tabel 4.8). Berdasarkan uji kuantitatif diketahui bahwa konsentrasi DNA hasil isolasi berkisar antara 38.92 sampai 122.51 ng/ μ l. Sampel nomor 4 memiliki konsentrasi DNA yang paling sedikit

yaitu 38.92 ng/μl, sampel nomor 1 80.51 ng/μl, sampel nomor 3 103.90 ng/μl, sampel nomor 2 memiliki konsentrasi DNA yang paling tinggi diantara sampel lainnya yaitu 122.51 ng/μl.

Gambar 4.4 selain menunjukkan ketebalan pita DNA juga menunjukkan terjadinya smear pada pita DNA. Pada hasil elektroforesis diketahui bahwa masih terdapat smear pada semua sampel. Smear pita yang paling tebal dimiliki oleh sampel 2, kemudian sampel 3. Sedangkan sampel 4 dan 1 memiliki smear yang lebih tipis. Semakin sedikit atau tidak ada smear menunjukkan semakin baik kualitas DNA.

Pita DNA yang tebal dan mengumpul (tidak menyebar) menunjukkan konsentrasi yang tinggi dan DNA total yang diekstrak dalam kondisi utuh. Sedangkan, pita DNA yang terlihat menyebar menunjukkan adanya ikatan antar molekul DNA yang terputus pada saat proses ekstraksi berlangsung, sehingga genom DNA terpotong menjadi bagian-bagian yang lebih kecil. Terputusnya ikatan antar molekul tersebut dapat disebabkan oleh adanya gerakan fisik yang berlebihan yang dapat terjadi dalam proses pemipetan, pada saat dibolak-balik dalam ependorf, disentrifus atau karena temperatur yang terlalu tinggi (Irmawati, 2003).

Kemurnian DNA genom dari hasil elektroforesis dikonfirmasi dengan uji kuantitatif menggunakan nano drop dapat dilihat pada tabel 4.8.

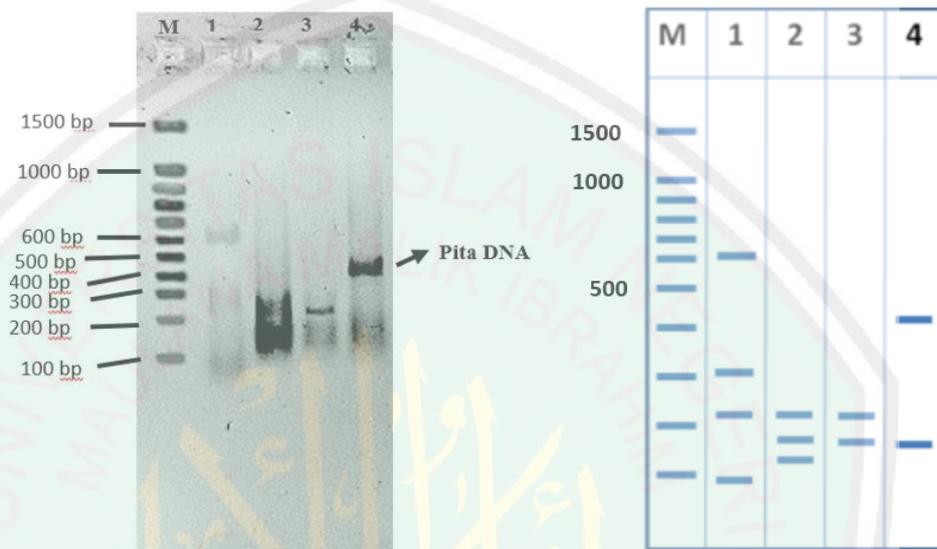
Tabel 4.4 Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA hasil ekstraksi.

No.	Perlakuan lama perendaman EMS 0.77%	Abs260	Abs280	260/280	Konsentrasi DNA (ng/μl)
1.	0 menit	0.44	0.30	1.48	80.51
2.	90 menit	2.08	1.58	1.32	122.51
3.	105 menit	0.73	0.56	1.31	103.90
4.	120 menit	0.78	0.40	1.92	38.92

Kemurnian DNA hasil isolasi berkisar antara 1,31 sampai 1,92. Sampel DNA yang murni adalah sampel nomor 4 yaitu 1,92. Sampel nomor 2 dan 3 memiliki kemurnian DNA yang hampir sama yaitu 1,32 dan 1,31, sedangkan sampel nomor 1 yaitu 1,48. Kemurnian DNA di bawah 1,8 menunjukkan adanya kontaminan protein dan fenol. Apabila kemurnian DNA melebihi 2 menunjukkan adanya kontaminan RNA. Hal tersebut dikarenakan pita DNA/RNA dapat menyerap cahaya UV pada 260 nm, sedangkan kontaminan protein atau fenol akan menyerap cahaya pada 280 nm. Berdasarkan hasil uji kualitatif dan kuantitatif DNA, maka analisis DNA dapat dilanjutkan ke tahap amplifikasi.

4.3.2 Amplifikasi DNA Berdasarkan Penanda ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*)

Amplifikasi DNA dengan ISSR ini menggunakan 1 primer yaitu (AG)₈CT (Gambar 4.5).



Gambar 4.5 Profil DNA hasil amplifikasi DNA dengan primer (AG)₈CT terhadap tanaman kontrol dan hasil mutasi dengan EMS 0.77%. Keterangan M= marker 100bp, lama perendaman EMS 0.77% selama 0 menit (sampel 1), 90 menit (sampel 2), 105 menit (sampel 3), 120 menit (sampel 4).

Amplifikasi DNA dengan primer (AG)₈CT menghasilkan 7 pita polimorfisme. Sampel 1 memiliki pita dengan ukuran 90 bp, 230 bp, 300 bp, dan 610 bp. Sampel 2 memiliki pita dengan ukuran 230 bp, 180 bp, dan 140 bp. Sampel 3 memiliki pita dengan ukuran 180 bp dan 230 bp. Sampel 4 memiliki pita dengan ukuran 180 bp dan 420 bp. Pita yang muncul pada perlakuan induksi mutagen menunjukkan adanya sekuen DNA genom yang unik dan hanya dimiliki oleh tanaman yang diberi perlakuan mutasi.

Pita DNA yang baru ditunjukkan oleh munculnya pita DNA pada tanaman yang diberi perlakuan mutasi. Berdasarkan profil DNA pada gambar 4.5 diketahui

bahwa primer (AG)₈CT dinilai dapat mendeteksi keragaman genetik baru pada tanaman krisan hasil mutasi melalui perlakuan lama perendaman EMS 0.77% yang menghasilkan 100% pita DNA polimorfisme. Perlakuan lama perendaman dengan EMS 0.77% selama 90 menit memiliki pita DNA baru pada panjang 140 bp dan 180 bp. Perlakuan lama perendaman 105 menit memiliki pita DNA baru pada posisi 180 bp. Pada perlakuan lama perendaman 120 menit memiliki pita baru pada posisi 180 bp dan 420 bp sedangkan pita DNA lama tidak nampak.

Perbedaan ukuran pita DNA menunjukkan telah terjadi perubahan basa nitrogen sebagai akibat mutasi oleh EMS 0.77% sehingga primer yang semula menempel pada situs tertentu, karena situs tersebut berubah menjadi tidak bisa dikenali oleh primer tersebut kemudian primer tersebut menempel pada situs yang baru. Situs baru yang terbentuk hasil mutasi dikenali oleh primer sehingga menghasilkan pita DNA yang baru (polimorfisme). Menurut Sambrook dan Russell (2001) EMS akan mengikatkan gugus etilnya pada DNA guanin (G) pada posisi 7-N dan 6-O yang akan membentuk gugus O₆-etilguanin. Terjadinya etilasi ini menyebabkan kesalahan pemasangan basa ketika replikasi, sehingga menyebabkan mutasi acak pada rantai DNA sehingga terjadi polimorfisme.

Pita DNA dengan panjang basa yang berbeda diakibatkan oleh sekuen DNA yang berbeda sehingga ketika mengalami proses translasi akan menghasilkan kode protein yang berbeda. Sekuen DNA tersebut merupakan informasi genetik yang terdapat di dalam gen struktural yang diekspresikan melalui proses transkripsi dan translasi sehingga menghasilkan asam amino yang terangkai menjadi polipeptida (protein) dengan berbagai fungsi dalam

metabolisme. Fenotip dan proses metabolisme individu ditentukan oleh protein-protein tersebut, sehingga adanya variasi yang nampak adalah merupakan indikasi bervariasinya protein-protein yang dimiliki oleh tanaman tertentu (Liu *et al.*, 2006).

Pita DNA hasil amplifikasi dengan panjang basa yang sama diasumsikan sebagai lokus gen yang sama. Namun, belum tentu memiliki sekuen basa DNA yang sama. Untuk mengetahui perbedaan sekuen pita pada lokus yang sama perlu dilakukan sekuensing DNA. Karakterisasi sekuen berguna untuk mengetahui jenis gen yang teramplifikasi.

Berdasarkan hasil amplifikasi, persentase polimorfisme primer yang digunakan pada penelitian ini yaitu 100%. Hasil tersebut sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Rahmah (2013) persentase polimorfisme hasil amplifikasi DNA menggunakan primer (AG)8CT pada tanaman purwoceng di Pulau Jawa yaitu 100 % (Rahmah, 2013). Persentase polimorfisme primer yang digunakan pada penelitian ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Wolf (1995) menggunakan primer yang hampir mirip dengan primer yang digunakan pada penelitian ini yaitu (AG)8C pada krisan dengan polimorfisme 54%. Dapat disimpulkan bahwa primer yang digunakan pada penelitian ini juga efektif dalam mendeteksi polimorfisme pada tanaman krisan mutan akibat lama perendaman dengan EMS 0.77%.

4.3.3 Analisis Variasi Genetik Mutan Krisan berdasarkan Penanda ISSR

Variasi genetik keempat sampel krisan yang diberi perlakuan lama perendaman dengan EMS 0.77% berdasarkan analisis jarak genetik. Jarak genetik

digunakan untuk menunjukkan seberapa dekat kekerabatan dilihat dari nilainya (Meisetyani, 2006). Hasil analisis jarak genetik keempat sampel krisan varietas *Pink Fiji* yang diberi perlakuan lama perendaman EMS 0.77% dapat dilihat pada tabel 4.5.

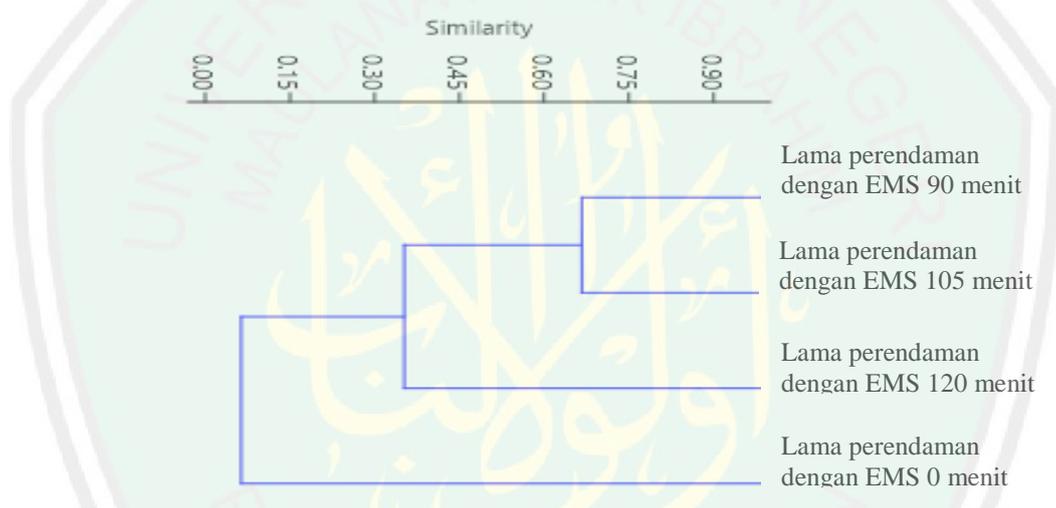
Tabel 4.5 Jarak genetik keempat sampel krisan varietas *Pink Fiji* yang diberi perlakuan lama perendaman EMS 0.77%

Perlakuan	0 menit	90 menit	105 menit	120 menit
0 menit	0			
90 menit	0.90	0		
105 menit	0.91	0.33	0	
120 menit	1	0.75	0.55	0

Berdasarkan tabel 4.5 jarak genetik empat sampel krisan menunjukkan kisaran antara 0,33-1. Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa jarak genetik antara perlakuan lama perendaman 0 menit dengan 120 menit memiliki jarak genetik terjauh dengan nilai 1. Jarak genetik yang besar ini menandakan bahwa hubungan kekerabatan kedua perlakuan sangat jauh. Jarak genetik terjauh kedua adalah perlakuan lama perendaman 0 menit dengan 105 menit yaitu 0.91. Jarak antara lama perendaman 0 menit dengan 90 menit yaitu 0.90. Jarak antara lama perendaman 90 menit dengan 105 menit yaitu 0.33, 90 menit dengan 120 menit yaitu 0.75. jarak antara lama perendaman 105 menit dengan 120 menit yaitu 0.55. Jarak genetik yang dekat menunjukkan bahwa hubungan kemiripan kedua perlakuan sangat dekat yaitu perlakuan lama perendaman dengan EMS 0.77% selama 90 dan 105 menit.

4.3.4 Hubungan Kemiripan Krisan Hasil Mutasi dengan EMS 0.77% Berdasarkan Hasil Amplifikasi dengan ISSR

Hubungan kemiripan tanaman krisan varietas *Pink Fiji* kontrol dengan tiga tanaman krisan hasil mutasi menggunakan EMS 0.77% berdasarkan hasil amplifikasi ini didasarkan pada hasil amplifikasi primer (AG)8CT. Hasil analisis hubungan kekerabatan antar aksesori menggunakan software PAST (*Paleontological Statistics*) disajikan dalam bentuk dendogram dinyatakan dengan nilai kemiripan (*similarity*) (gambar 4.6).



Gambar 4.6 Dendogram hubungan kemiripan krisan varietas *Pink Fiji* hasil mutasi dengan EMS 0.77% berdasarkan ISSR

Hubungan kemiripan antar perlakuan tersebut dapat diketahui dari koefisien genetiknya. Koefisien genetik terbentang antara 0 sampai 1. Apabila koefisien genetiknya semakin dekat dengan 1 maka semakin mirip secara genetik, namun apabila koefisien genetiknya mendekati 0 maka semakin berbeda secara genetik (Pratiwi, 2012).

Dendogram pada gambar 4.6 memperlihatkan bahwa sampel 2 dengan sampel 3 memiliki tingkat kemiripan 0.67. Sampel 4 memiliki tingkat kemiripan

0.34 dengan sampel 2 dan sampel 3. Sedangkan sampel 1 memiliki kondisi genetik yang jauh berbeda dengan perlakuan lainnya. Tingkat kemiripan genetik sampel 1 dengan perlakuan lainnya hanya 0.09. Hubungan kemiripan berdasarkan dendogram di atas sesuai dengan data keragaman fenotipik krisan varietas *Pink Fiji* pada masing-masing perlakuan.

Hasil analisis perlakuan mutasi yang diakibatkan oleh EMS 0.77% menunjukkan perubahan dari tiap perlakuan lama perendaman, semakin lama perendaman dengan mutagen EMS maka semakin jauh hubungan kekerabatan tanaman krisan varietas *Pink Fiji* dengan kontrol. Hal tersebut berarti telah terjadi perubahan sekuen DNA sehingga menyebabkan situs penempelan primer menjadi berubah karena semakin lama perendaman dengan EMS maka toksisitas juga semakin bertambah pada tanaman yang terkena mutagen.

Mutasi terjadi karena gugus alkil bereaksi dengan DNA dengan cara mengalkilasi basa purin dan pirimidin. Alkil dapat terjadi pada atom O-6 dari basa guanin sehingga berakibat perubahan pasangan dari sitosin menjadi berpasangan dengan timin yang mengakibatkan perubahan kode genetik dari GC menjadi AT pada generasi sel berikutnya (Sega, 1984). Penggunaan EMS untuk meningkatkan terjadinya mutasi telah banyak dilaporkan, satu diantaranya menghasilkan mutan pada tanaman kedelai melalui mutagenesis secara *in vitro* (Grabau *et al.* 1995).

Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Selvarasu (2017) menunjukkan bahwa primer ISSR mampu menunjukkan polimorfisme pada tanaman *Gloria superba* yang telah diinduksi dengan mutagen EMS. Penelitian juga dilakukan oleh Aswandi (2015) terhadap tanaman *Solanum lycopersicum* melaporkan

bahwa primer ISSR juga merupakan alat yang andal dalam skrining awal mutan yang dikembangkan melalui paparan EMS. Meskipun Primer ISSR merupakan primer umum yang masih belum bisa secara pasti digunakan untuk menyeleksi krisan hasil mutasi. Oleh karena itu, hal analisis variasi genetik masih perlu diklarifikasi dengan menggunakan penanda molekuler gen spesifik.

4.4 Ulasan Hasil Penelitian dalam Prespektif Al-Qur`an

Mutasi merupakan suatu perubahan baik terhadap gen tunggal, sejumlah gen dan susunan kromosom atau perubahan urutan nukleotida DNA kromosom yang berakibat pada perubahan protein yang dihasilkan. Mutasi dapat terjadi pada setiap bagian tanaman dan fase pertumbuhan tanaman, namun lebih banyak terjadi pada bagian yang sedang aktif membelah seperti pada bagian meristem. Pemuliaan tanaman dengan induksi mutasi bertujuan untuk perbaikan tanaman sehingga dapat menghasilkan varietas unggul dan mempunyai bentuk yang berbeda serta terjadi keragaman genetik yang luas.

Perbaikan varietas tanaman dapat dilakukan dengan menggunakan mutagen fisik atau kimiawi untuk meningkatkan keragaman genetik Chopra (2005). Mutasi buatan menggunakan EMS merupakan satu diantara usaha manusia untuk memperoleh tanaman yang beragam. Terjadinya keanekaragaman hayati di bumi tidak terlepas dari segala kuasa Allah SWT seperti dalam QS Al-Qashas ayat 68:

وَرَبُّكَ يَخْلُقُ مَا يَشَاءُ وَيَخْتَارُ مَا كَانَ لَهُمُ الْخِيَرَةُ سُبْحَانَ اللَّهِ وَتَعَالَىٰ عَمَّا يُشْرِكُونَ

Artinya: *Dan Tuhanmu menciptakan apa yang Dia kehendaki dan memilihnya. Sekali-kali tidak ada pilihan bagi mereka. Maha Suci Allah dan*

Mahatinggi dari apa yang mereka persekutukan (dengan Dia) (Qs. Al-Qashash/28:68).

Allah SWT memberitahukan bahwa hanya Dia sematalah yang mampu mencipta dan memilih, dan bahwa tiada seorangpun yang mampu menentangNya dalam hal tersebut, serta tiada yang meminta pertanggungjawaban terhadapNya. Dia memilih apa yang dikehendakiNya pasti ada, dan apa yang tidak dikehendakiNya pasti tidak ada (Abdullah, 2005).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan lama perendaman dengan EMS 0.77% dengan waktu tertentu mampu meningkatkan hasil pada beberapa variabel pengamatan fenotipik serta menurunkan hasil pada beberapa variabel lainnya. Data menunjukkan lama perendaman lebih dari 105 menit cenderung berakibat negatif terhadap semua variabel. Terbukti bahwa EMS juga mampu mengakibatkan variasi genetik setelah dianalisis dengan penanda ISSR menghasilkan pita polimorfisme. Dalam Al-qur`an dijelaskan bahwa Allah menurunkan segala sesuatu sesuai dengan ukurannya. Allah SWT berfirman dalam Qs.Al-Hijr/15 ayat 21:

وَإِنْ مِنْ شَيْءٍ إِلَّا عِنْدَنَا خَزَائِنُهُ وَمَا نُنزِّلُهُ إِلَّا بِقَدَرٍ مَعْلُومٍ

Artinya:” dan tidak ada sesuatupun melainkan pada sisi Kami-lah khazanahnya dan Kami tidak menurunkannya melainkan dengan ukuran yang tertentu“ (Qs. Al-Hijr/15:21).

Allah SWT berfirman *وَإِنْ مِنْ شَيْءٍ إِلَّا عِنْدَنَا خَزَائِنُهُ وَمَا نُنزِّلُهُ إِلَّا بِقَدَرٍ مَعْلُومٍ* “Dan Kami tidak menurunkannya melainkan dengan ukuran tertentu,” maksud dari ayat tersebut adalah Allah menurunkan segala sesuatu sesuai dengan kehendak dan keinginan-

Nya, yang didalamnya terkandung hikmah yang besar, dan rahmat bagi hamba-hambaNya (Abdullah, 2003).

Ayat di atas menjelaskan bahwa Allah menciptakan segala sesuatu sesuai dengan ukurannya, ada manfaat serta hikmah yang besar. Untuk dapat melihat manfaat serta hikmah dibaliknya, perlu dikaji dan dipelajari dengan hati yang ikhlas. Dalam hal ini termasuk penelitian untuk mengetahui lama perendaman EMS 0.77% terhadap keragaman fenotip dan genotip tanaman krisan secara *in vitro*. Penelitian tersebut perlu dilakukan agar memperoleh manfaat untuk diri sendiri dan orang lain. Dan apapun hasil dari perlakuan yang diberikan adalah semata-mata sesuai dengan kehendak-Nya dan keinginan-Nya. *Allahu`alam bishawab.*

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh berdasarkan penelitian yang telah dilakukan yaitu:

1. Lama perendaman dengan EMS 0.77% selama 105 menit memberikan pengaruh terhadap keragaman fenotipik tanaman krisan varietas *Pink Fiji* pada semua parameter pengamatan baik secara kuantitatif dan kualitatif, yaitu memiliki jumlah tunas dan daun paling banyak, memperbesar ukuran batang, menghasilkan kalus berwarna hijau kekuningan, memiliki bentuk daun memanjang, dan menghasilkan susunan daun roset.
2. Lama perendaman dengan EMS 0.77% memberikan pengaruh terhadap keragaman genetik tanaman krisan varietas *Pink Fiji* menghasilkan pita DNA polimorfisme menggunakan ISSR dengan primer (AG)₈CT. Jarak genetik kontrol dengan perlakuan lama perendaman 90 menit yaitu 0.90. Jarak genetik kontrol dengan perlakuan lama perendaman 105 menit sebesar 0.91. Sedangkan jarak genetik terjauh yaitu 1.0 perlakuan kontrol dengan perlakuan lama perendaman 120 menit.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan saran yang dapat diberikan yaitu:

1. Perlu dilakukan mutasi pada kalus somatik embriogenik agar hasilnya lebih seragam.
2. Perlu dilakukan sekuensing pita hasil amplifikasi dengan primer gen spesifik agar data yang diperoleh lebih valid.
3. Aklimatisasi mutan positif untuk mengetahui pola pertumbuhan, morfologi, dan kualitas tanaman terutama pada bagian bunga.
4. Perlakuan lama perendaman dalam EMS 0.77% selama 105 menit efektif dalam menghasilkan keragaman fenotip tunas krisan varietas *Pink Fiji*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah. 2005. *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 4*. Bogor: Pustaka Imam Syafi'i.
- Ahloowalia, B. 1995. In vitro mutagenesis for the improvement of vegetatively propagated plants. In Staff of the IAEA (Eds.). *Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement. Proceedings of International Symposium on the Use of Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement*. International Atomic Energy Agency. Vienna. page 531-541.
- Aisyah, S. I. 2006. *Mutasi Induksi*. Dalam S. Sastrosumarjo (Ed). *Sitogenetika Tanaman*. Bogor: IPB.
- AJF , Griffiths, Gelbart WM, Miller JH, et al. 1999. *Modern Genetic Analysis*. New York: W. H. Freeman.
- Ali, dkk,. 1989. *Terjemah Tafsir Al maraghi*. Semarang: Toha Putra Semarang.
- Alitalia, Y. 2008. Pengaruh Pemberian BAP dan NAA terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Tunas Mikro Kantong Semar (*Nepenthes mirabilis*) Secara *In vitro*. *Skripsi*. Program Studi Hortikultura Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor.
- Al-Maraghi. 1993. *Tafsir Al-Maragi*. Semarang: Toha Putra Semarang.
- Al-Qurtubi, Syaikh Imam. 2009. *Tafsir Al qurthubi*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Al-Syeikh, A. B. M. 2000. *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 7*. Kairo: Mu'assasah Daar Al-Hilaal.
- As Showi, As Syaikh Ahmad Bin Muhammad. 2009. *Hasiah As Showi Ala Tafsiril Jalalain*. Bairut: Dar Al Kutub Al 'Ilmiyah.

- Aswandy, Aswaneza Binti Khairul, Nur Rawaidah, Kenneth Francis Rodrigues, and Cheong Bo Eng. 2015. Evaluation of the Mutagenic Effect of Ethyl Methanesulfonate on Hexokinase nuclear DNA Locus of *Solanum lycopersicum*. *Int'l Conf. on Advances in Science, Engg., Technology & Natural Resources (ICASETNR-15)*.
- Ath-Thabari. 2008. *Jami' Al Bayan an Ta'wil Ayi Al Qur'an*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Azmat, Muhammad Abubakkar. Cheema, Hafiza Masooma N. Rajwana, Ishtiaq Ahmad. Khan, Ahmad Sattar. Khan, Asif Ali. 2012. Extraction of DNA suitable for PCR application from mature leaves of *Mangifera indica* L. *Journal of Zhejiang University- Science B (Biomedicine and Biotechnology)*. Vol.13 (4): 230-243.
- Azriati, E., Asmeliza, dan Nelfa Y. 2010. Respon Regenerasi Eksplan Kalus Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) Terhadap Pemberian NAA secara *In vitro*. *Jurnal Littri* 11(2): 31-38.
- Balai Penelitian Tanaman Hias, 2014, Komoditas Prioritas Krisan, [online], (<http://balithi.litbang.pertanian.go.id/daftar-varietas-7-krisan.html> , diakses tanggal 06 Mei 2017)
- Banerji, BK & Datta, SK 1992, Gamma Ray Induced Flower Shape Mutation in *Chrysanthemum* cv. Jaya, *J. Nuclear Agric. Biol.*, Vol. 21, No. 2, Pp.73-79.
- Barnum S. R. 2005. *Biotechnology an Introduction 2nd Ed*. USA: Brooks/Cole.
- Bassam BJ, Caetano-Anolles G. Gresshoff PM. 1992. DNA amplification fingerprinting of bacteria. *Application of Microbiology Biotechnology*. Vol. 38 : 70-76.
- Broertjes. C. dalam Schum, A. and W. Preil. 1998. *Induced Mutation in Ornamental Plants. Somaclonal and Induced Mutation in Crop Improvement*. Kluwer. Ac. Pub., Dordrecht.

- Broertjes. C. dan A. M. Van Harten. 1988. *Applied Mutation Breeding for Vegetatively Propagated Crops*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher B. V.
- Brown S. M, Szewc-McFadden, Kresovich S. 1996. *Development and application of Simple Sequence Repeats (SSR) loci for plant genome analysis, methods of genome analysis in plants*. New York: CRC Pr.
- Brown, T. A. 1989. *Genetics a Molecular Approach*. London: Van Nostrand Reinhold (International).
- Cassel, A.C. 1998. *In-vitro induced mutation for diseases resistance*, 367-378p; In Jain *et. al.* (Ed). *Somaclonal Variation and Induced Mutation in Crop Improvement*, Kluwer Academic Press.
- Chahal, G. S. and S. S. Gosal. 2006. *Principles and Procedures of Plant Breeding, Biotechnological and Conventional Approaches*. Alpha Science International Ltd. Pangbourne.
- Charters, Y.M., A. Robertson, M.J. Wilkinson & G. Ramsay, 1996. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers. *Theor Appl Genetics* 92: 442-447.
- Charters, Y.M. & M.J. Wilkinson, 2000. The use of self-pollinated progenies as 'in-groups' for the genetic characterization of cocoa germplasm. *Theor Appl Genetics* 100: 160-166.
- Chopra, V. L. 2005. Mutagenesis: Investigating The Proses and Processing The Outcome for Crop Improvement [special section: Chromosomes to Food Security]. *Curr Sci* 89(2): 353-359.
- Dale, J. W. 1989. *Molecular Genetics of Bacteria*. John Willey and Sons. Chichester.

- Datta, S. K and M. N. Gupta,. 1981. Effects of Gamma Irradiation on Rooted Cuttings of Korean Type Chrysanthemum cv. Nimrod. Bangladesh. *Journal Botany* 10(2): 124-131.
- Dhanavel D, Pavadai P, Mullainathan L, Mohana D, Raju G, Giriya M, Thilagavathi C. 2008. Effectiveness and efficiency of chemical mutagens in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Afr. J. Biotechnol.* 7: 4116-4117.
- Direktorat Perbenihan dan Sarana Produksi. 2009. *Kebijakan pengembangan perbenihan tanaman krisan*, Yogyakarta: Lokakarya Sosialisasi SOP Krisan.
- Dwimahyani, I., S. Widiarsih dan Yulidar. 2006. Pengaruh Iradiasi Sinar Gamma terhadap Pertumbuhan dan Pembungaan Stek Pucuk Krisan (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) CV. Dark Fiji. *Risalah Seminar Ilmiah Isotop dan Radiasi*. Jakarta.
- Ekanantari. 2014. *Outlook Komoditi Krisan*. Jakarta: Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian.
- Gaul. 1977. *Mutagen effect in the first generation after seed treatment : plant injury and lethality*. In IAEA: *Manual on Mutation Breeding*. 2nd ed. Joint FAO/IAEA Division of Atomic Energy in Food and Agriculture.
- George, E. F. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. Netherlands: Springe.
- Grabau EA, Haulan R, Pesce A. 1995. Mutagenesis and selection for oligomycin resisten in soybean (*Glycine max* L.Merr) suspension culture cells. *Plant Cells Tissue Organ Cult.* 42:121-127.
- Greene, E. A., C. A. Codomo., N.E. Taylor., J. G. Henikoff., B. J. Till., S. H. Reynolds., L. C. Enns., C. Burtner., J. E. Johnson., A. R. Odden., L. Comai., and S. Henikoff. 2003. Spectrum of Chemically Induced Mutations from a Large Scale Reverse Genetics Screen in Arabidopsis. *Genetics* 164: 731-740.

- Griga, M., Stejskal, J. and Bebet; K. 1995. *Analysis of Tissue Culture*. England: Exegenetics Limited.
- Gunawan, L.W. 1998. *Teknik Kultur Jaringan*. Bogor. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman : PAU IPB.
- Gupta, P.K. & R.K. Varshney, 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163–185.
- Handayati, W. 2013. Perkembangan Pemuliaan Mutasi Tanaman Hias di Indonesia. *Jurnal Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi*. 9 (1): 67- 80.
- Harjadi, S. S. 1993. *Pengantar Agronomi*. Jakarta: Gramedia.
- Hasyim, I. dan M. Reza. 1995. *Krisan*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Ignacimuthu, S. 1997. *Plant Biotechnology*. London: Science Publishers Inc.
- Irmawati. 2003. Perubahan Keragaman Genetik Ikan Kerapu Tikus Generasi Pertama Pada Stok Hatchery. *Thesis tidak diterbitkan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Isda, M. N. 2009. Induksi Kalus *Centella asiatica* Melalui Aplikasi Auksin dan Sitokinin. *Jerami* 2(3).
- Istianingrum, P. 2013. Pengaruh Generasi Benih Terhadap Pertumbuhan dan Pembungaan Krisan (*Crhysanthemum* sp.) Varietas Rhino. *Buletin Panel Tanaman Hias*. 2(2): 131-139.
- Jabeen, Nyla dan Bushra Mirza. *Ethyl Methanesulfonate* Induces Morphological Mutations in *Capsicum annum*. 2004. *International Journal of Agriculture & Biology*. 1560–8530/06–2–340–345.

- Junaid, A, Mujib & Sharma, MP 2008. *Effect of growth regulators and ethylmethane sulphonate on growth, and chlorophyll, sugar and Proline contents in Dracaena sanderiana cultured in vitro. Biol. Plantarum, vol. 52, no. 3, pp. 569-72.*
- Kapadiya, D. B., S. L. Chawla, A. I. Patel, dan T. R. Ahlawat. 2014. Exploitation of Variability Through Mutagenesis in Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) Var. Maghi. *The Bioscan an International Quarterly Journal of Life Science* 9(4): 1799-1804.
- Kernodle SP, Cannon RE, Scandalios JG. 1993. Concentration of Primer and template qualitively affect product in random-amplified polymorphic DNA PCR. *Biotechnology*. 14 : 362-364.
- Kofranek, M. A. 1992. *Cut chrysanthemums*, p. 7-11. In R. A. Larson (Ed). Introduction to Floriculture Second Edition. California: Academic Press, Inc.
- Korbin M, Kuras A, Golis A, urawics E. 2000. Effect of DNA quality on randomly amplified polymorphic DNA-based identification of strawberry (*Fragaris x ananassa*) genotypes. *Journal of Fruit Ornamerntal Plant Resources*. Vol. 8 : 07-115.
- Krisantini. 1989. Florikultur. dalam S. S. Harjadi. (Ed). *Dasar-Dasar Hortikultura. Jurusan Budidaya Pertanian. Fakultas Pertanian. Bogor: Institut Pertanian Bogor.*
- Kuksova, V. B., Piven, N. M.; Gleba, Y.Y. 1997. Somaclonal Variation and In Vitro Induced Mutagenetis in Grapevine. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 49: 17-27.
- Lanham, P.G. & R.M. Brennan, 1998. Characterization of the genetic resources of red currant (*Ribesrubrum*: subg. *Ribesia*) using anchored microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 96:917-921.
- Larkin, P. J. and W. R. Scowcroft. 1981. Somaclonal Variation, a Novel Source of Variability from Cell Culture for Plant Improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60:179-274.

- Larkin, P. J. and Scowcroft. 1987. Somaclonal Variation History, Methods and Meaning. *Isma State. Journal of res.* 61 hal.
- Latado, R. R., A. H. Adames, and A.T. Neto. 2004. In vitro Mutation Of Chrysanthemum (*Dendranthema Grandiflora* Tzvelev) With Ethyl Methane Sulphonate (EMS) In Immature Floral Pedicels. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 103–106.
- Liu, J. J., Ekramoddoullah AKM, Hunt R, Zainal A. 2006. Identification and characterization of RAPD markers linked to a major gene (Cr2) for resistant to *Cronartium ribicola* (Fish) in *Pinus monticola* (D.Don). *Phytopathology*. Vol. 96:395-399.
- Maluszynski, M. 1990. *Induced Mutation an Integrating Tool*. In J. Perry Gustafson (Ed.). *Gene Manipulation in Plant Improvement I*. New York and London: Plenum Press.
- Maniatis T. 1982. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. New York: CSH.
- Manzila, I., S.H. Hidayat, I. Mariska, dan S. Sujiprihati. 2010. Induksi kalus dan daya regenerasi tunas cabai melalui kultur in vitro. *Jurnal AgroBiogen*. 6:111.
- Martini, T. 2014. *Kajian Pengendalian Penyakit Karat (*Puccinia horiana*) pada Tanaman Krisan Berdasarkan Prinsip Epidermis*. Disertasi. Yogyakarta: Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada,
- Maryani, Y. dan Zamroni. 2005. Penggandaan Tunas Krisan melalui Kultur Jaringan. *Ilmu Pertanian* 12 (1) : 51-55.
- Marwoto, B. 1999. Perakitan dan Pengembangan Varietas Baru Krisan (*Dendranthema grandiflora*) di Indonesia. *Makalah Workshop Florikultura II*. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor.

- Marwoto, B., L. Sanjaya dan K. Yuniarto. 2004. Hibridisasi Krisan dan Karakterisasi Tanaman F1. *Jurnal Hortikultura*. 14(2) : 304–3011.
- Meisetyani, Reny. 2006. Studi Keanekaragaman Morfologi dan Genetik Jamur Tiram (*Pleurotus sp.*) dengan teknik PCR-RFLP. Skripsi. Bogor: IPB.
- Meyer, W., T.G. Mitchell, E.Z. Freedman & R. Vilgays, 1993. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 31: 2274–2280.
- Misra, P, Datta, S. K, & Chakrabarty, D. 2003. Mutation in Flower Colour and Shape of *Chrysanthemum morifolium* Induced by Gamma-radiation. *Biologica plantarum*, Vol. 47, No. 1, pp.153-156.
- Mondal, T.K.. 2002. Assesment of Genetic Diversity of Tea (*Camelia sinensis* L. Kuntze) by Inter-Sequence Repeated Polymerase Reaction. *Euphytica* 128:307-315.
- Mukherjee, Arup K., Atanu Dey, Laxmikanta Acharya, Siddhartha K Palai and Pratap C Panda. 2013. Studies on genetic diversity in elite varieties of *Chrysanthemum* using RAPD and ISSR markers. *Indian Journal of Biotechnology* Vol 12, pp 161-169.
- Murti, R. H., Kim, H. Y., and Yeoung, Y. R. 2013. Effectiveness of Gamma Ray Irradiation and Ethyl Methane Sulphonate On in Vitro Mutagenesis of Strawberry. *African Journal of Biotechnology*. 12(20):4803-4812.
- Nagatomi S, & Degi, K 2009. Mutation Breeding Of *Chrysanthemum* By Gamma Field Irradiation And In Vitro Culture, In. Y. Shu (Ed.) *Induced Plant Mutations In The Genomic*. Era, FAO of the united nation, Rome, Concurrent session 8 : Mutation Induction and Breeding of Ornamental and Vegetatively Propagated Plants.
- Nasir, M. 2002. *Bioteknologi Molekuler, Teknik Rekayasa Genetika Tanaman*. Bandung: PT. Citra Aditya Bakti.
- Nassar M. N, Cucolo M, Miller S. A. 2009. Ethyl Methanesulphonate in a Parenteral Formulation of BMS-214662 Mesylate, a Selective

Fernasytransferase Inhibitor: Formation and Rate of Hydrolysis. *Pharm Dev Technol.* 14(6): 672-677.

National Toxicology Program. 2011. Report on Carcinogens. Research Triangle Park, NC: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, *National Toxicology Program*. Ed ke-12. p194.

Ng., W.L. and S.G. Tan. 2015. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Are We Doing It Right?. *ASM Sci. J.*, 9(1), 30–39.

Piri, I., Babayan, M., Tavassoli, A., & Javaheri, M. 2011. The use of Gamma Irradiation in Agriculture, a Review. *African J. of Microbiology* Vol. 5, No. 32, pp. 5806-5811.

Pratiwi, Putri. 2012. Analisis Variasi Genetik Beberapa Populasi *Globba leucantha* Miq. Di Sumatera Barat dengan RAPD. Tesis. Sumatera ; Universitas Andalas.

Promosiana, Anastasia. 2015. *Statistik Produksi Hortikultura 2014*. Jakarta: Direktorat Jenderal Hortikultura, Kementerian Pertanian.

Qosim, W.A., N. Istifadah, I. Djatnika dan Yunitasari. 2012. *Pengaruh Mutagen Ethyle Methane Sulfonat Terhadap Kapasitas Regenerasi Tunas Hibrida Phalaenopsis In Vitro*. *Hortikultura*, 22 :360-365.

Quian, W., Ge, S. and Hong, D. Y. 2001. Genetic variation within and among populations of wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 440-449.

Rahmah, Azizatur. 2013. Hubungan Kekerabatan Aksesori Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molkenb.) di Pulau Jawa Berdasarkan Karakter Morfologi dan Molekuler. *Tesis*. Yogyakarta:UGM.

Rahmah, Syifauro. 2011. Induksi Keragaman Dua Varietas Krisan (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) dengan Etil Metana Sulfonat (EMS) secara In Vitro. Skripsi. Bogor: Program Sarjana, Institut Pertanian Bogor.

- Reddy, P.M Sarla N., & Siddiq E.A.. 2002. *Inter simple Sequence Repeat (ISSR) Polimorfism and ITS Application in Plant Breeding*. *Euphytica* 128:9-17.
- Resti, Z., Yanti Y, dan Sutoyo. 2009. Strategi mendapatkan mutan bawang merah yang tahan terhadap penyakit hawar daun *Xanthomonas* melalui induksi mutasi secara *in vitro* dengan *Ethyl Methanesulfonate* dalam Qosim, WA. 2012. Pengaruh Mutagen Etil Metan Sulfonat terhadap kapasitas regenerasi tunas hibrida *Phalaenopsis in vitro*. *J. Hort*, 22(4): 360-365
- Rimando, T.J. 2001. *Ornamental Horticulture a Little Giant in the Tropics*. Philippine: University of the Philippines Los Banos (UPLB).
- Rofiq, Mochammad., Niken Kendarini, dan Damanhuri. 2015. Uji Daya Hasil Pertumbuhan dan Pembungaan Dua Generasi Bibit pada Tiga Varietas Krisan (*Chrysanthemum* sp.). *Jurnal Produksi Tanaman*, Volume 3, Nomor 4.
- Rukmana, R. dan A.E. Mulyana. 1997. *Krisan (seri bunga potong)*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Russell, P. J. 1992. *Genetics*. Third edition. New York: Harper Collins Pub. 758 P.
- Rustini, Ni Kadek Dewi dan Made Pharmawati. 2014. Aksi Ethyl Methane Sulphonate terhadap Munculnya Bibit dan Pertumbuhan Cabai Rawit (*Capsicum frutescens* L.). *Jurnal Bioslogos* Vol. 4 Nomor 1.
- Salisbury, F. B dan C.W. Ross. 1995. *Fisiologi Tumbuhan* . Jilid 3. Bandung: ITB.
- Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Eds. 3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanjaya, L., R. Kurniati dan E. Febrianty. 2004. Isolasi Mutan Khimer dari Petal Bunga Krisan Varietas Komersial. *Prosiding Seminar Nasional Florikultura*. Bogor: 242 – 248.

- Sanjaya, L., Y. Supriyadi, R. Meilasari, dan K. Yuniarto. 2004. Teknik Mutasi dengan Menggunakan Sinar Gamma pada Varietas-Varietas Krisan. *Prosiding Seminar Nasional Florikultura Bogor*, 249-256.
- Sanjaya, L, Marwoto, B, Hersanti, Harsanti, L, & Raharjo, I. B. 2014. *Induksi mutasi krisan standar untuk perbaikan ketahanan terhadap penyakit karat melalui iradiasi sinar gamma*. Laporan KKP3N 2014, Jakarta: Badan Litbang Pertanian.
- Sanjaya, Lia., Budi Marwoto, dan Rudy Soehendi. 2015. Membangun Industri Bunga Krisan yang Berdaya Saing Melalui Pemuliaan Mutasi. *Pengembangan Inovasi Pertanian* Vol. 8 No. 1: 43-54.
- Santoso, U dan F. Nursandi. 2004. *Kultur Jaringan Tanaman*. Malang: UMM Press.
- Sarker RH, Biswas A. 2002. In vitro plantlet regeneration and agrobacterium mediated genetic transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Tiss. Cult.* 12(2):155-165.
- Sega GA. 1984. A review of the genetic effects of *ethylmethanesulfonate*. *Mutat Res* 134(2-3):113-142.
- Selvarasu, Anandhi and Rajamani Kandhasamy. 2017. Molecular and Agro-Morphological Genetic Diversity Assessment of *Gloriosa superba* Mutants. *European Journal of Medicinal Plants* 21(1): 1-13.
- Shihab, Quraish. 2002. *Tafsir Al-Mishbah*. Jakarta: Lentera Hati.
- Soedjono, S. 2003. Aplikasi Mutasi Induksi dan Variasi Somaklonal dalam Pemuliaan Tanaman. *Jurnal Litbang Pertanian* 22(2):70-78.
- Soeranto, H. 2003. Peran Iptek Nuklir dalam Pemuliaan Tanaman untuk Mendukung Industri Pertanian. *Puslitbang Teknologi Isotop dan Radiasi*. Jakarta: Badan Tenaga Nuklir Nasional.

- Sun QL, Hua S, Ye JH, Zheng XQ, Liang YR. 2010. Flavonoids and volatiles in *Chrysanthemum morifolium* Ramat flower from tongxiang country in China. *J of Afr Biotechnol.* 9(23):3817-3821.
- Suryanto. 2003. *Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler*. Digitized by usu digital library. 30 Mei 2017.
- Suzuki, D. T., A. J. F. Griffiths, J. H. Miller dan R. C. Lewontin. 1989. *An Introduction to Genetic Analysis fourth edition*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Syafaruddin dan Trijoko Santoso. 2011. Optimasi Teknik Isolasi dan Purifikasi DNA yang Efisien dan Efektif pada Kemiri Sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco))Airy Shaw. *Jurnal Littri*. Vol. 17(1).
- Syanthiqi, S. 2007. *Tafsir Adqa'ul Bayan*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Tobin, J. A., dan R. E. Morel. 1997. *Asking About Cell*. New York: Saunders College Publishing.
- T.S. Hussein, A.A. Tawfik and M.A. Khalifa. 2008. Molecular Identification and Genetic Relationships of Six Strawberry Varieties using ISSR Markers. *Int. J. Agri. Biol.*, Vol. 10, No. 6.
- Turang, Arnold.C, Luice A.Taulu, Louise A. Matindas, Eddy Taslan. 2007. *Krisan*. Departemen Pertanian Balai Pengkajian Teknologi Pertanian. Sulawesi Utara.
- Vagera, J., J. Novotny, and L. Ohnoutkova. 2004. Induced Androgenesis In vitro in Mutated Population of Barley, *Hordeum vulgare*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture Kluwer Academic Publisher* 77: 55-61.
- Van Harten, A. M. 1998. *Mutation Breeding : Theory and Practical Application*. United Kingdom: Cambridge University Press.

- Von Arnim, A. G. 2005. *Molecular Approaches to The Study of Plant Development*. Dalam: Trigiano, R. N., Gray, D. J., (Eds). *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press. Danvers.
- Wahyuni S, Xu DH, Bermawie N, Tsunematsu H, dan Ban T.. 2004. Skrining ISSR primer studi pendahuluan kekerabatan antar jahe merah, jahe emprit dan jahe besar. *Buletin TRO XV* 1: 33-42.
- Wattimena, G.A. 1998. *Zat Pengatur Tumbuh*. Bogor: PAU IPB.
- Weising K, Nybom H, Wolff K, Kahl G. 2005. *DNA Fingerprinting in Plants Principles, Methods and Applications*. Boca Raton: CRC Press.
- Widiastuti, L. Tohari dan Sulistyaningsih, E. 2004. Pengaruh Intensitas Cahaya dan Kadar Dominosida terhadap Iklim Mikro dan Pertumbuhan Tanaman Krisan Dalam Pot. *Ilmu Pertanian*, 11 (2): 35-42.
- Wijayani, Y., dan Mudyantini, W. 2007. Pertumbuhan Tunas dan Struktur Anatomi *Protocorm Like Body* Anggrek *Grammatophyllum scriptum* (Lindl.) Bl. dengan Pemberian Kinetin dan NAA. *Bioteknologi*, 4 (2) : 33-40.
- Williams et al. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18:6531-6535.
- Wirnas, D. 2005. *Analisis Kuantitatif dan Molekular dalam Rangka Mempercepat Perakitan Varietas Baru Kedelai Toleran terhadap Intensitas Cahaya Rendah*. Bogor: Sekolah Pascasarjana IPB.
- Wolff, K., E. Zietkiewicz, and H. Hofstra. 1995. Identification of Chrysanthemum Cultivars and Stability of DNA Fingerprint Patterns. *Theor. Appl. Genet.* 91:439–447.
- Wu, K., R. Jones, L. Dannaeburger & P.A. Scolnik, 1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Res* 22: 3257–3258.

- Xie, Y. Y., Yuan., Yang, J. Y., Wang, L. H., dan Wu, C. F. 2009. Cytotoxic Activity of Flavonoids from The Flowers of *Chrysanthemum morifolium* on Human Colon Cancer Colon 205 Cells. *Journal of Asian Natural Products Research*. 11 (9) : 771-778.
- Yufdy, M. P., M. Soedarjo, B. Marwoto, B. Winarto, S. Rianawati, A. S. Setyowati, I. B. Rahardjo, I. Djatnika, E. Tasman, A. Saefulloh, D. S. Badriah dan Y. Sulyo. Revitalisasi Balai Penelitian Tanaman Hias Mendukung Peningkatan Kualitas dan Daya Saing Produk Florikultura. *Balai Penelitian Tanaman Hias*.
- Yulianti, Nurheti. 2010. *Kultur Jaringan Tanaman Skala Rumah Tangga*. Yogyakarta: Uly Publisher.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski & D. Labuda, 1994. Genome finger printing by Inter simple sequence repeat (ISSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.
- Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman*. Jakarta: Bumi Aksara.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Tabel Hasil Pengamatan

A. Hasil Tinggi Tanaman

perlakuan	Ulangan						Total	Total ²	Rata-Rata
	1	2	3	4	5	6			
0 menit	4.3	4.4	4.4	4.3	4.1	4.5	26	676	4.333333333
90 menit	1.9	2.5	4.4	3.8	2.8	3.9	19.3	372.49	3.216666667
105 menit	3.4	2.3	3.7	4	2.7	4.2	20.3	412.09	3.383333333
120 menit	2.3	0	0	2.7	2.3	3.3	10.6	112.36	1.766666667
	11.9	9.2	12.5	14.8	11.9	15.9	76.2	1572.94	3.175

B. Hasil Jumlah Daun

perlakuan	Ulangan						Total	Total ²	Rata-rata
	1	2	3	4	5	6			
0 menit	6	8	8	6	9	6	43	1849	7.166667
90 menit	5	10	24	22	23	26	110	12100	18.33333
105 menit	18	9	20	26	13	24	110	12100	18.33333
120 menit	7	0	0	11	11	19	48	2304	8
	36	27	52	65	56	75	311	28353	12.95833

C. Hasil Jumlah Tunas

perlakuan	ulangan						Total	Total ²	Rata-Rata
	1	2	3	4	5	6			
0 menit	1	1	1	1	1	1	6	36	1
90 menit	2	2	4	3	4	4	19	361	3.166667
105 menit	6	2	3	5	2	5	23	529	3.833333
120 menit	1	0	0	3	3	4	11	121	1.833333
	10	5	8	12	10	14	59	1047	2.458333

D. Hasil Luas Daun

perlakuan	ulangan						Total	Total ²	Rata-Rata
	1	2	3	4	5	6			
0 menit	0.17	0.18	0.15	0.18	0.16	0.18	1.02	1.0404	0.17
90 menit	0.15	0.17	0.13	0.15	0.14	0.16	0.9	0.81	0.15
105 menit	0.1	0.12	0.14	0.12	0.11	0.13	0.72	0.5184	0.12
120 menit	0.1	0	0	0.12	0.17	0.22	0.61	0.3721	0.101667
	0.52	0.47	0.42	0.57	0.58	0.69	3.25	2.7409	0.135417



Lampiran 2. Tabel Analisis Sidik Ragam

A. Analisis Statistik pada Tinggi tanaman

Sumber Keragaman	Derajat Bebas	JK	KT	F hitung	F Tabel (5%)
Perlakuan	3	20.22167	6.740556	7.684464	2.71089
Galat	20	17.54333	0.877167		
Total	23	37.765			

Keterangan: F hitung > F tabel berarti terdapat pengaruh perlakuan terhadap variabel pengamatan.

B. Analisis Statistik pada Jumlah Daun

Sumber Keragaman	Derajat Bebas	JK	KT	F hitung	F Tabel (5%)
Perlakuan	3	695.4583333	231.8194444	5.394286084	2.710889837
Galat	20	859.5	42.975		
Total	23	1554.958333			

Keterangan: F hitung > F tabel berarti terdapat pengaruh perlakuan terhadap variabel pengamatan.

C. Analisis Statistik pada Jumlah Tunas

Sumber Keragaman	Derajat Bebas	JK	KT	F hitung	F Tabel (5%)
Perlakuan	3	29.45833	9.819444	13.54406	2.71089
Galat	20	14.5	0.725		
Total	23	43.95833			

Keterangan: F hitung > F tabel berarti terdapat pengaruh perlakuan terhadap variabel pengamatan.

D. Analisis Statistik pada Luas Daun

Sumber Keragaman	Derajat Bebas	JK	KT	F hitung	F Tabel (5%)
Perlakuan	3	0.016713	0.005571	2.622597	2.71089
Galat	20	0.042483	0.002124		
Total	23	0.059196			

Keterangan: $F_{hitung} > F_{tabel}$ berarti terdapat pengaruh perlakuan terhadap variabel pengamatan.



Lampiran 3. Hasil Analisis Variansi (anava) Pertumbuhan Krisan varietas *Pink Fiji*

A. Uji analisis variansi pengaruh lama perendaman EMS 0.77% terhadap Tinggi Tanaman

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual
N		24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	0E-7
	Std. Deviation	.94959183
	Absolute	.167
Most Extreme Differences	Positive	.084
	Negative	-.167
Kolmogorov-Smirnov Z		.819
Asymp. Sig. (2-tailed)		.514

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Tinggi_tanaman

Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
perendaman 120 menit	6	1.7667 ^a	
perendaman 90 menit	6		3.2167 ^b
perendaman 105 menit	6		3.3833 ^b
perendaman 0 menit	6		4.3333 ^b
Sig.		1.000	.063

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

B. Uji analisis variansi pengaruh lama perendaman EMS 0.77% terhadap Jumlah Daun

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual
N		24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	0E-7
	Std. Deviation	8.21738172
	Absolute	.195
Most Extreme Differences	Positive	.195
	Negative	-.118
Kolmogorov-Smirnov Z		.956
Asymp. Sig. (2-tailed)		.320

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Jumlah_Daun

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Perlakuan lama perendaman dengan EMS 0 menit	6	7.1667 ^a	
Perlakuan lama perendaman dengan EMS 120 menit	6	8.0000 ^a	
Perlakuan lama perendaman dengan EMS 90 menit	6		18.3333 ^b
Perlakuan lama perendaman dengan EMS 105 menit	6		18.3333 ^b
Sig.		.828	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

C. Uji analisis variansi pengaruh lama perendaman EMS 0.77% terhadap Jumlah Tunas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual
N		24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	0E-7
	Std. Deviation	1.61335010
	Absolute	.123
Most Extreme Differences	Positive	.100
	Negative	-.123
Kolmogorov-Smirnov Z		.601
Asymp. Sig. (2-tailed)		.863

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Jumlah_tunas

Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Perlakuan lama perendaman dengan EMS 0 menit	6	1.1667 ^a		
Perlakuan lama peredaman dengan EMS 120 menit	6	1.8333 ^{ab}	1.8333 ^{ab}	
Perlakuan lama perendaman dengan EMS 90 menit	6		3.1667 ^{bc}	3.1667 ^{bc}
Perlakuan lama perendaman dengan EMS 105 menit	6			3.8333 ^c
Sig.		.395	.098	.395

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

D. Uji analisis variansi pengaruh lama perendaman EMS 0.77% terhadap Luas Daun

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual
N		24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	0E-7
	Std. Deviation	.04305120
Most Extreme Differences	Absolute	.215
	Positive	.215
	Negative	-.208
Kolmogorov-Smirnov Z		1.051
Asymp. Sig. (2-tailed)		.219

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Luas_Daun

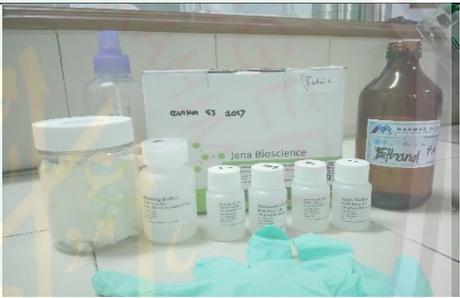
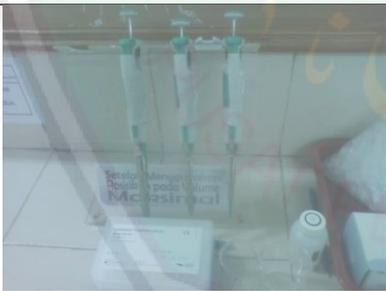
Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Lama perendaman dengan EMS 0.77% selama 120 menit	6	.1017 ^a	
Lama perendaman dengan EMS 0.77% selama 105 menit	6	.1200 ^{ab}	.1200 ^{ab}
Lama perendaman dengan EMS 0.77% selama 90 menit	6	.1500 ^{bc}	.1500 ^{bc}
Lama perendaman dengan EMS 0.77% selama 0 menit	6		.1700 ^b
Sig.		.100	.089

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian

 <p>Buffer Fosfat pH 7</p>	 <p>Ethyl Methanesulfonate</p>
 <p>Eksplan Tunas Krisan</p>	 <p>Kit Isolasi DNA dan Ethanol 70%</p>
 <p>Mikropipet</p>	 <p>Amplifikasi dengan PCR Biorad</p>

 <p>Inisiasi di dalam enkas</p>	 <p>Perendaman Eksplan dalam larutan EMS 0.77%</p>
 <p>Cetakan untuk membuat agarose</p>	 <p>Buffer TE, 1x, agarose, neraca analitik, gelas ukur, erlenmeyer dan aquades</p>
 <p>Uji kuantitatif DNA menggunakan nano drop</p>	 <p>Rak penyimpanan tanaman kultur</p>

Lampiran 5. Skoring untuk dendogram

	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X
1																	
2	610		420	300	230	180	140	90	bentuk daun susunan daun	ukuran batang	warna kalus	tinggi tanaman	luas daun	jumlah daun	jumlah tunas		
3	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1
5	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	2	0	0	0	1	1
6	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	3	1	1	0	0	0
7																	
8	bentuk daun																
9	susunan daun																
10	ukuran batang																
11	warna kalus																
12	tinggi tanaman																
13	jumlah daun																
14	jumlah tunas																
15	luas daun																
16																	
17																	

Lampiran 6. Bukti Konsultasi Skripsi



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
 Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
 Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : SHADDIQAH MUNAWAROH FAUZIAH
 NIM : 13620069
 Program Studi : S1 BIOLOGI
 Semester : GANJIL/ GENAP TA
 Pembimbing : SUYONO, M.P
 JudulSkripsi :DETEKSI KERAGAMAN GENETIK MENGGUNAKAN PENANDA ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) DAN KERAGAMAN FENOTIP PADA TANAMAN KRISAN (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) VARIETAS *PINK FLJI* YANG DIINDUKSI DENGAN EMS (*Ethyl Methanesulfonate*) SECARA *IN VITRO*

NO	TANGGAL	URAIAN KONSULTASI	TTD PEMBIMBING
1.	02-05-2017	ACC Judul Skripsi	1.
2.	20-05-2017	Revisi Judul Skripsi	2.
3.	28-06-2017	Konsultasi BAB I	3.
4.	06-06-2017	Konsultasi BAB I dan BAB II	4.
5.	09-06-2017	Konsultasi BAB I, II dan III	5.
6.	10-06-2017	Revisi BAB I, II dan III	6.
7.	11-07-2017	ACC BAB I, II dan III	7.
8.	01-11-2017	Konsultasi Hasil Data Pengamatan	8.
9.	07-11-2017	Konsultasi Analisis Data	9.
10.	15-11-2017	Konsultasi BAB IV	11.
11.	01-12-2017	Revisi BAB IV	12.
12.	05-12-2017	Revisi BAB IV	13.
13.	08-12-2017	Revisi BAB IV	14.
14.	10-12-2017	ACC BAB IV	15.
15.	15-12-2017	Konsultasi BAB V	16.
16.	15-12-2017	ACC Skripsi	17.

Malang, 4 Januari 2017

Pembimbing Skripsi,

Suyono, M.P
 NIP. 19710622 200312 1 002



Ketua Jurusan,

Romadi, M. Si.,D. Sc
 NIP. 19810201 200901 1 019



KEMENTERIAN AGAMA
 UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
 MALANG
 FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
 JURUSAN BIOLOGI
 Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
 Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

KARTU KONSULTASI AGAMA SKRIPSI

Nama : SHADDIQAH MUNAWAROH FAUZIAH
 NIM : 13620069
 Program Studi : S1 BIOLOGI
 Semester : GANJIL/ GENAP TA
 Pembimbing : Dr. H. Ahmad Barizi, M.A
 JudulSkripsi : DETEKSI KERAGAMAN GENETIK MENGGUNAKAN
 PENANDA ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) DAN
 KERAGAMAN FENOTIP PADA TANAMAN KRISAN
 (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) VARIETAS *PINK FLJI*
 YANG DIINDUKSI DENGAN EMS (*Ethyl Methanesulfonate*)
 SECARA *IN VITRO*

NO	TANGGAL	URAIAN KONSULTASI	TTD PEMBIMBING
1.	04-07-2017	Konsultasi BAB I, II dan IV	1.
2.	27-07-2017	Revisi BAB I, II dan IV	2.
3.	10-11-2017	Revisi BAB I dan IV	3.
4.	25-11-2017	Revisi BAB IV	4.
5.	10-12-2017	ACC BAB I, II dan IV	5.
6.	12-12-2017	Revisi BAB I, II dan IV	6.
7.	15-12-2017	ACC Agama	7.

Malang, .. 4 Januari2017

Pembimbing Agama Skripsi,

Dr. H. Ahmad Barizi, M.A
 NIP. 197312121998031001

Ketua Jurusan



Romaidi, M. Si., D. Sc
 NIP. 198102012009011019



