

**KERAGAMAN GENETIS TANAMAN KENAF (*Hibiscus
cannabinus* L.) KR 11 HASIL MUTASI EMS (*Ethyl
Methanesulfonate*) DENGAN PENANDA MOLEKULER DAN
MORFOLOGI**

SKRIPSI

Oleh
RIKZA HAKIN
0910910066



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2014

**KERAGAMAN GENETIS TANAMAN KENAF (*Hibiscus
cannabinus* L.) KR 11 HASIL MUTASI EMS (*Ethyl
Methanesulfonate*) DENGAN PENANDA MOLEKULER DAN
MORFOLOGI**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam
bidang biologi

Oleh
RIKZA HAKIN
0910910066



JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**KERAGAMAN GENETIS TANAMAN KENAF (*Hibiscus
cannabinus* L.) KR 11 HASIL MUTASI EMS (*Ethyl
Methanesulfonate*) DENGAN PENANDA MOLEKULER DAN
MORFOLOGI**

Oleh :

Rikza Hakin

0910910066

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 22 Januari 2014
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
dalam bidang biologi

Menyetujui,

Pembimbing

Dr. Ir. Estri Laras A., MScSt
NIP. 196308181988022001

Mengetahui,
Ketua Program Studi

Rodliyati Azrianingsih, MSc., PhD
NIP. 197001281994122001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rikza Hakin
NIM : 0910910066
Jurusan : Biologi
Penulis skripsi berjudul:

KERAGAMAN GENETIS TANAMAN KENAF (*Hibiscus cannabinus* L.) KR 11 HASIL MUTASI EMS (*Ethyl Methanesulfonate*) DENGAN PENANDA MOLEKULER DAN MORFOLOGI

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan bukan plagiat karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini
2. Apabila di kemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung segala resiko.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan penuh kesadaran.

Malang, 3 Februari 2014
Yang menyatakan,

Rikza Hakin
0910910066

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak untuk dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada pengarang. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



KERAGAMAN GENETIS TANAMAN KENAF (*Hibiscus cannabinus* L.) KR 11 HASIL MUTASI EMS (*Ethyl Methanesulfonate*) DENGAN PENANDA MOLEKULER DAN MORFOLOGI

Rikza, H., Estri Laras A.

Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang

ABSTRAK

Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) merupakan sumber serat yang potensial untuk dimanfaatkan dalam dunia industri. Pemanfaatan kenaf dapat ditingkatkan dengan menghasilkan varietas baru kenaf yang menghasilkan biomassa tinggi, salah satunya menggunakan EMS. Tujuan penelitian ini ialah mengetahui keragaman kenaf mutasi EMS secara molekuler dan morfologi. Penelitian dilakukan menggunakan 6 genotip berbeda, yang terdiri dari satu tanaman kontrol (KR 11) dan 5 tanaman mutan. Metode untuk analisa molekuler dilakukan dengan isolasi DNA serta PCR dan sekuensing dua gen *barcode*, yaitu *matK* dan *rbcL*. Sedangkan analisa morfologi dilakukan dengan mengamati karakter kualitatif dan kuantitatif dari karakter daun, bunga maupun batang. Analisa molekuler pada gen *matK* tidak dapat dilakukan karena ketidakberhasilan proses amplifikasi dengan berbagai kombinasi. Sedangkan amplifikasi pada gen *rbcL* menunjukkan hasil positif pada 3 genotip yang digunakan, yaitu KR 11, mutan 2 dan mutan 5. Hasil sekuensing gen *rbcL* menunjukkan adanya 21 kejadian mutasi dan 18 di antaranya merupakan substitusi. Analisa *Neighbor Joining* menunjukkan bahwa mutan 2 memiliki similaritas paling rendah dengan KR 11 yang merupakan tanaman kontrol. Analisa morfologi yang diamati menunjukkan bahwa perbedaan *character state* antar genotip terjadi pada karakter tinggi tanaman, diameter batang atas, diameter batang bawah, diameter kayu bawah, jumlah nodus, panjang daun, lebar daun dan panjang tangkai daun. Uji similaritas yang dilakukan dengan *Clad97* menunjukkan bahwa genotip mutan 4 memiliki diversitas tertinggi terhadap KR 11 dibandingkan genotip lainnya.

Kata kunci : kenaf, keragaman, *matK*, morfologi, *rbcL*

GENETIC DIVERSITY IN KENAF (*Hibiscus cannabinus* L.) KR 11 BASED ON MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL MARKER

Rikza, H., Estri Laras A.

Biology Department , Faculty of Sciences, Brawijaya University
Malang

ABSTRACT

Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) is one potential source of fiber plant. To increase production of kenaf plant can be done by construction of new varieties of kenaf that produce high biomass, such as mutation with EMS. The purpose of this study was to determine the genetic diversity of kenaf arised from EMS mutation in molecular and morphological analysis. The study was conducted using 6 different genotypes, KR 11 control and five different mutants. Molecular analysis performed by DNA isolation, PCR and sequencing two kinds of barcode gen, *matK* and *rbcL*. Observation of morphological characters was conducted on the qualitative and quantitative character of the leaves, flowers and stems characters. Molecular results indicated that *matK* gene can not be amplified with many combination. Positive result from *rbcL* amplification was showed in three different genotypes, KR 11, mutant 2 and mutant 5. Genetic diversity in *rbcL* gene sequences appeared in the presence of 22 mutations and 19 of them were nucleotide substitution. Most of substitution in *rbcL* gene sequences was transversion (86%). Neighbor Joining analysis showed that genotype mutant 2 had lowest similarity index with control. The observed morphological analysis based on Kenaf Characterization Guidance showed character state diversity on plant height, stem top diameter, bottom diameter, core bottom diameter, number of nodes, leaf length, leaf width and petiole length. Similarity test using *Clad97* showed that mutant 4 had highest diversity index with control between other mutant.

Keyword : diversity, kenaf, *matK*, morphology, *rbcL*

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah skripsi yang berjudul “Keragaman Genetis Tanaman Kenaf (*Hibiscus Cannabinus* L.) KR 11 Hasil Mutasi EMS (*Ethyl Methanesulfonate*) dengan Penanda Molekuler Dan Morfologi” ini. Tidak lupa penulis juga menyampaikan terima kasih kepada berbagai pihak yang membantu mulai penelitian hingga penulisan naskah, antara lain:

1. Ibu Dr. Ir. Estri Laras A., MScSt yang telah membimbing dengan sabar mulai awal penelitian hingga akhir penulisan naskah serta Ibu Rodliyati Azrianingsih, MSc., PhD serta Ibu Dr. Nunung Harijati, MS atas saran yang diberikan, baik untuk pelaksanaan penelitian serta perbaikan penulisan naskah
2. Keluarga di rumah yang senantiasa memberi semangat dan dorongan moril serta materiil kepada penulis
3. Keluarga besar Laboratorium FKM terutama Mbak Wati, Mbak Elok, Mbak Mufida, Mbak Yayuk, Alfian, dan Arbaul, atas bantuan, saran dan semangat yang selalu diberikan kepada penulis
4. Teman – teman sekalian terutama Rahmi sekeluarga (atas kesediannya menyediakan tempat penanaman kenaf dan semua bantuan selama penelitian dan penulisan naskah), Nadiyah beserta keluarga (atas semangat dan kesabarannya mengingatkan penulis) serta teman – teman angkatan 2009 yang lainnya
5. Laboran Lab. Biologi Molekuler dan Mbak Arik yang telah banyak membantu penelitian terutama untuk analisis molekuler.

Penulis menyadari bahwa naskah ini jauh dari kata sempurna sehingga kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan agar dapat menyusun naskah yang lebih baik. Penulis juga berharap agar hasil penelitian ini dapat bermanfaat, tidak hanya bagi kalangan akademisi tapi juga bagi masyarakat luas.

Malang, Januari 2014

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan.....	4
1.4. Manfaat.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Tanaman Kenaf (<i>Hibiscus cannabinus</i>)	5
2.1.1. Biologi Tanaman Kenaf dan Diversitasnya	5
2.1.2. Syarat Tumbuh Tanaman Kenaf	8
2.1.3. Kenaf Varietas KR 11	8
2.1.4. Kenaf Mutan EMS.....	9
2.2. Analisis Diversitas Genetis.....	10
2.2.1. Pengertian dan Konsep Analisis	10
2.2.2. <i>matK</i> Sebagai Salah Satu Gen untuk <i>Barcode</i>	10
2.2.3. Penggunaan gen <i>rbcL</i>	12
BAB III METODE PENELITIAN	14
3.1. Waktu dan Tempat	14
3.2. Cara Kerja.....	14
3.2.1. Persiapan Media Penanaman	14
3.2.2. Pemilihan Benih	14
3.2.3. Penanaman Benih dan Pemupukan.....	15
3.2.4. Isolasi DNA Total.....	16
3.2.5. Amplifikasi Gen <i>matK</i>	17
3.2.6. Amplifikasi Gen <i>rbcL</i>	18
3.2.7. Sekuensing.....	19
3.2.8. Pengamatan Karakter Morfologis.....	19
3.2.9. Analisis Molekuler dan Morfologi	24

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	26
4.1. Analisa molekuler.....	26
4.1.1. Isolasi DNA.....	26
4.1.2. Amplifikasi Gen <i>matK</i>	27
4.1.3. Amplifikasi Gen <i>rbcL</i>	32
4.2. Analisa Keragaman Morfologi.....	36
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	51
5.1. Kesimpulan.....	51
5.2. Saran.....	51
DAFTAR PUSTAKA	52
LAMPIRAN	57



DAFTAR TABEL

1. Genotip kenaf yang digunakan	14
2. Hasil uji kuantitatif dan nilai konsentrasi DNA.....	27
3. Kombinasi PCR dengan primer 390F dan 1326R.....	28
4. Kombinasi PCR dengan primer MG15 dan MG1.....	30
5. Karakter kuantitatif yang diamati pada 6 genotip kenaf.....	45

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR GAMBAR

1. <i>Hibiscus cannabinus</i> L.....	5
2. Lokasi <i>matK</i> dalam kloroplas genom.....	12
3. Pengukuran panjang daun tanaman kenaf.....	21
4. Ketentuan panjang daun kenaf dari Deptan.....	22
5. Lebar daun tanaman kenaf.....	22
6. Letak mahkota bagian luar (a) dan mahkota bagian dalam (b).....	23
7. Contoh bunga tanaman kenaf.....	23
8. Hasil elektroforesis DNA dengan agarose 1%.....	26
9. Letak pasangan primer MG1 + MG15 dalam <i>trnK</i>	29
10. Struktur Gen <i>trnK</i> serta letak primer MG15 dan MG1.....	32
11. Hasil elektroforesis PCR dengan primer <i>rbcL</i>	33
12. Mutasi nukleotida gen <i>rbcL</i> dari 3 individu kenaf mutan.....	34
13. Dendogram kenaf berdasarkan sekuen gen <i>rbcL</i>	35
14. Tanaman kenaf saat terserang kutu putih.....	37
15. Kondisi pangkal batang tanaman kenaf.....	37
16. Akar tanaman kenaf yang diduga terserang nematoda.....	38
17. Warna batang tanaman kenaf 6 genotip berbeda.....	40
18. Perbandingan ukuran sudut daun dari 6 genotip kenaf.....	41
19. Perbandingan rata-rata diameter tengah 6 genotip kenaf.....	42
20. Perbandingan tinggi tanaman kenaf genotip mutan 3 dan 4.....	44
21. Percabangan kenaf.....	46
22. Dendogram similaritas karakter 6 genotipe kenaf.....	47
23. Perbandingan tinggi tanaman kenaf.....	48
24. Perbandingan diameter batang atas, tengah dan bawah tanaman kenaf.....	49
25. Perbandingan diameter kayu tanaman kenaf.....	50

DAFTAR LAMPIRAN

1. Komposisi Bahan.....	57
2. LT1. Penggolongan Karakter Kuantitatif Kenaf	58
3. LT2. Penggolongan Karakter Kualitatif Kenaf.....	60
4. LT3. Rata-rata Data Karakter Morfologi	62
5. Skoring Karakter Kuantitatif.....	63
6. Skoring Karakter Kualitatif	66
7. Hasil Analisa Molekuler.....	69
8. Analisa Data Statistik	71
9. Foto Pengamatan.....	83



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kenaf (*Hibiscus cannabinus*) merupakan salah satu tanaman yang memiliki nilai ekonomis yang tinggi, terutama dalam dunia industri. Menurut Hossain dkk. (2011), kenaf merupakan salah satu sumber serat yang cukup potensial untuk dikembangkan dan dimanfaatkan secara optimal. Serat kenaf dibedakan berdasarkan lokasi dan tipenya. Kulit kayu kenaf mengandung serat dengan tipe memanjang (*long fiber strand*) yang tersusun atas sekumpulan *bast fiber*, sedangkan kayunya tersusun atas serat yang disebut *core fiber*. Masing-masing jenis serat dari tanaman kenaf ini dapat dimanfaatkan menjadi pulp, kertas, tali, karung goni dan juga papan fiber. Menurut Mostofa dkk. (2002), penggunaan kenaf sebagai bahan baku pembuatan kertas dapat menghasilkan kertas yang cerah, berkualitas tinggi dan juga tidak mudah berubah warna menjadi kekuningan. Keuntungan lain penggunaan kenaf sebagai bahan baku serat ialah serat yang dihasilkan merupakan serat yang lebih mudah terdegradasi dibandingkan serat sintetik sehingga lebih ramah terhadap lingkungan. Selain itu, hal ini dapat mengurangi penebangan kayu hutan yang biasa digunakan sebagai bahan tambahan dalam pembuatan kertas (Sudjindro, 2007).

Banyaknya manfaat dan nilai ekonomis yang dimiliki oleh tanaman kenaf menunjukkan perlunya dilakukan budidaya yang lebih serius terhadap tanaman ini. Sebenarnya, budidaya kenaf sudah dilakukan di Indonesia. Menurut Purwati (2003), pengembangan kenaf sebenarnya sudah dimulai pada tahun 1978/1979 dan mencapai puncaknya pada tahun 1986/1987 dengan luas area produksi yang mencapai 26.000 ha. Tetapi, pemanfaatan serat kenaf terus mengalami penurunan akibat adanya persaingan dengan serat sintetik sehingga nilai jual kenaf terus menurun. Nilai jual yang menurun ini berimbas kepada luas area perkebunan kenaf hingga tersisa 3.000 ha saja yang terletak di daerah Jawa Timur dan Kalimantan Timur. Jawa Timur merupakan salah satu area pengembangan kenaf dengan luas wilayah yang mencapai 2262 Ha. Hal ini tentunya masih belum cukup karena pada tahun 2004, Indonesia masih mengimpor 850.000 ton pulp *wood* dan 50.000 ton pulp *non wood* (kenaf) untuk mencukupi kebutuhan pulp dalam negeri (Sudjindro, 2007).

Usaha budidaya kenaf sudah cukup banyak dilakukan. Hal ini dibuktikan dengan pelepasan beberapa varietas unggul tanaman kenaf oleh Balai Tanaman Pemanis dan Serat, Malang. Varietas unggul tanaman kenaf yang sudah dilepas antara lain ialah KR 11 untuk lahan bonorowo, KR 14 dan 15 untuk lahan podsolik merah kuning (PMK) dan KR 9 dan KR 12 untuk lahan kering (Balittas, 2010).

Selain menggunakan perbaikan genetik kenaf melalui budidaya, usaha perbaikan genetik tanaman kenaf juga pernah dilakukan dengan menginduksi terjadinya mutasi menggunakan mutagen kimia. Salah satu mutagen yang digunakan ialah EMS (*Ethyl Methanesulphonate*). EMS memiliki formula $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{C}_2\text{H}_5$. Senyawa ini dapat menyebabkan mutasi secara acak akibat adanya substitusi nukleotida (Kumar dkk., 2012). Pemberian EMS pada beberapa jenis tanaman terbukti menyebabkan perubahan sekuen genom diikuti dengan perubahan fenotip dari tanaman tersebut. Misalnya pada tanaman kapri varietas Parvus, pemberian EMS dapat menghasilkan mutan bercabang banyak dengan jumlah biji yang lebih banyak dibandingkan tipe asalnya (Arumingtyas dan Murfet, 1992). Pemberian mutagen pada tanaman kenaf ini pernah dilakukan pada kenaf varietas KR 11. Varietas KR 11 dipilih karena varietas ini merupakan salah satu varietas unggul kenaf yang tahan terhadap genangan dan memiliki potensi hasil sekitar 2,75 – 4,2 ton/hektar (Balittas, 2011). Pada tanaman kenaf, pemberian EMS terbukti mengakibatkan perubahan beberapa karakter morfologi. Menurut Arumingtyas dkk. (2005), induksi EMS menyebabkan peningkatan panjang cabang mutan tanaman kenaf hingga 167%. Tetapi, pemberian EMS ini juga menyebabkan penurunan diameter batang (81,8% dibandingkan kontrol), tinggi tanaman (84,48% dibandingkan kontrol) dan volume batang (57,33% dibandingkan kontrol). Analisa molekuler yang dilakukan dengan RAPD menunjukkan bahwa terdapat polimorfisme antara tipe asal dan mutan serta antara mutan satu dengan mutan yang lain. Polimorfisme ini ditunjukkan pada beberapa primer yang digunakan yaitu OPA-I 1, OPA-12, OPO-2, OPO-4, OPO-5 dan OPO-7. Analisa polimorfisme dengan PCR yang menggunakan primer khusus gen percabangan juga menunjukkan adanya mutasi titik sesuai dengan pola substitusi nukleotida yang diakibatkan oleh EMS.

Adanya polimorfisme DNA kenaf mutan EMS yang dibuktikan melalui RAPD dan PCR untuk gen percabangan menunjukkan pengaruh EMS terhadap DNA genom kenaf dan gen yang mengkode percabangan pada tanaman kenaf. Polimorfisme gen yang menunjukkan diversitas

genetis spesies ini juga dapat diamati pada gen-gen *barcode* pada tanaman. Gen *barcode* merupakan gen yang menjadi penanda pada masing-masing individu tanaman. Gen ini biasa dimanfaatkan dalam ilmu taksonomi sebagai pembeda antar spesies. Sebagian besar gen yang dimanfaatkan sebagai *barcode* pada tanaman ialah gen-gen yang berada pada genom kloroplas. Hal ini dikarenakan rendahnya substitusi nukleotida yang terjadi pada gen-gen mitokondria tanaman (Holingsworth dkk. 2011). Selain memiliki tingkat substitusi nukleotida yang lebih tinggi dibandingkan gen mitokondria, gen gen dalam kloroplas memiliki karakter uniparental sehingga dapat dimanfaatkan dalam studi evolusioner. Gen-gen ini juga memiliki tingkat substitusi nukleotida yang lebih tinggi sehingga dapat digunakan sebagai pembeda antar spesies. Beberapa lokus gen yang menjadi kandidat *barcode* antara lain adalah *accD*, *rbcL*, *matK*, *ndhJ*, *rpoB2*, *rpoC1*, and *ycf5*. Di antara gen-gen tersebut, *matK* dan *rbcL* merupakan gen yang menjadi kandidat kuat gen *barcode* (CBOL, 2009; Kress dan Erickson, 2007).

Gen maturase K (*matK*) merupakan gen yang termasuk dalam genom kloroplas. Gen ini memiliki panjang 1570 bp dan berperan dalam mengkode protein maturase. Gen ini terletak di antara gen *trnK*, suatu gen yang mengkode tRNA^{Lys} (Yu dkk., 2011). Kelebihan dari *matK* ialah gen ini memiliki tingkat substitusi nukleotida dan asam amino yang lebih tinggi dibandingkan dengan genom kloroplas yang lainnya (Barthet dkk., 2006). Akan tetapi, tingkat substitusi yang tinggi dari gen ini juga berpengaruh terhadap kemudahan amplifikasi dan juga sekuensing. Hal ini menyebabkan *matK* tergolong gen yang cukup sulit untuk dilakukan PCR dan sekuensing pada berbagai jenis tanaman dengan menggunakan sepasang primer saja (Hollingsworth dkk. 2011). Sebagai alternatifnya, beragam primer didesain untuk mengamplifikasi gen *matK* ini.

Kandidat lain gen *barcode* ialah *rbcL*. Gen ini juga merupakan salah satu gen yang terdapat dalam genom kloroplas. Gen ini mengkode pembentukan sub unit besar dari *ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase* (Cumplings dkk. 2003). Gen *rbcL* sudah cukup banyak digunakan dalam studi taksonomi pada level famili maupun level yang lebih tinggi. *rbcL* merupakan gen yang berukuran besar (1400 bp) sehingga menyediakan banyak karakter yang dapat dimanfaatkan untuk studi filogenetik. Meskipun gen ini memiliki kemampuan diskriminasi level taksonomi yang lebih rendah dibandingkan dengan gen *matK*, *rbcL* memiliki tingkat keberhasilan

PCR dan sekuensing yang lebih tinggi dibandingkan *matK* (CBOL, 2009; Bafeel dkk., 2011). Sehingga, dalam studi taksonomi dan filogenetik seringkali disarankan menggunakan kombinasi dari dua gen ini (CBOL, 2009).

Penelitian mengenai diversitas genetik tanaman kenaf berdasarkan *matK* dan *rbcL* ini diharapkan dapat menjadi pembanding terhadap hasil analisa keragaman tanaman kenaf yang telah dilakukan sebelumnya. Secara alamiah, kedua gen tersebut memiliki tingkat mutasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan *coding gene* lain pada genom tanaman. Sehingga, informasi yang diperoleh dapat memberikan gambaran mengenai efek mutagen kimia, terutama EMS terhadap kedua gen tersebut. Selain itu, diharapkan dapat menjadi sumber informasi mengenai efek pemberian mutagen kimia, terutama EMS terhadap genom kloroplas. Hal ini diharapkan dapat dijadikan sebagai bahan pertimbangan dalam pemuliaan tanaman kenaf dengan menggunakan mutagen kimia, baik EMS maupun mutagen yang lainnya.

1.2. Rumusan Masalah

Permasalahan dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana keragaman genetik tanaman kenaf hasil mutasi EMS berdasarkan marka molekuler?
2. Bagaimana keragaman karakter morfologi dari tanaman kenaf hasil mutasi EMS berdasarkan Panduan Karakterisasi Kenaf?

1.3. Tujuan

Tujuan dalam penelitian ini adalah:

1. Mengetahui keragaman genetik tanaman kenaf hasil mutasi EMS berdasarkan marka molekuler
2. Mengetahui keragaman karakter morfologi dari tanaman kenaf hasil mutasi EMS berdasarkan Panduan Karakterisasi Kenaf

1.4. Manfaat

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah dapat memperoleh informasi mengenai keragaman kenaf hasil mutasi EMS baik secara molekuler maupun secara morfologi sehingga dapat digunakan sebagai acuan dan bahan pertimbangan dalam penggunaan mutagen kimia untuk pemuliaan tanaman kenaf.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanaman Kenaf (*Hibiscus cannabinus*)

2.1.1. Biologi Tanaman Kenaf dan Diversitasnya

Kenaf (*H. cannabinus*) merupakan tanaman yang tergolong dalam famili *Malvaceae*, genus *Hibiscus* (Tjitrosoepomo, 2007). Tanaman ini berhabitus herba semusim (*herbaceous annual*) yang bertipe tegak. Umur tanaman ini biasanya berkisar antara 60-98 hari. Berdasarkan ada tidaknya percabangan pada batangnya, kenaf dikelompokkan menjadi 3, yaitu tidak bercabang, bercabang sedikit dan bercabang banyak. Selain ditentukan oleh faktor genetik, jarak tanam antar tanaman juga mempengaruhi jumlah percabangan yang muncul. Semakin besar jarak tanam maka akan semakin banyak jumlah cabang yang muncul (Coetzer, 2004).



Gambar 1. *Hibiscus cannabinus* L. (PFAF, 2012)

Sistem perakaran yang dimiliki oleh tanaman kenaf merupakan sistem perakaran tunggang. Akar utama memiliki panjang sekitar 25 cm sedangkan akar lateral yang tegak lurus dengan akar utama memiliki panjang antara 25-30 cm. Pada saat berada pada masa perkecambahan, kondisi tergenang dapat menghambat perkembangan dan pertumbuhan tanaman ini. Tetapi, saat tanaman sudah mencapai umur 1,5-2 bulan, tanaman kenaf lebih toleran terhadap kondisi tergenang (Sastrosupadi,

1983). Bahkan menurut Krisnawati (2003), tanaman kenaf dapat bertahan hidup di lahan pasang surut dengan kondisi genangan setinggi < 1,5 meter.

Tanaman kenaf memiliki dua jenis daun yang berbeda, yaitu tunggal dan menjari. Karakter daun tunggal termasuk karakter resesif sedangkan karakter menjari merupakan karakter dominan yang dimiliki oleh tanaman kenaf tersebut. Daun tanaman ini memiliki letak yang berseling pada batang utama dengan tangkai daun yang berukuran panjang. Bunga kenaf merupakan bunga tunggal dan hermaphrodit dengan diameter sekitar 10 cm. Bunga ini tersusun atas lima helai sepal, lima helai petal, dan sejumlah tangkai sari yang tertutup oleh kepala sari. Putiknya terselubungi oleh benang sari dan tampak menonjol karena adanya tangkai putik (Coetzeer, 2004; Tjitrosoepomo, 2007).

Buah tanaman kenaf berbentuk menyerupai kerucut dengan ukuran panjang 2-2,5 cm dan diameter bagian bawah antara 1-1,5 cm. Buah ini memiliki kulit yang berambut. Jumlah buah dalam satu tanaman berkisar antara 15-100 buah. Jumlah ini dipengaruhi oleh kondisi iklim, varietas, lama penanaman dan faktor kesuburan tanah. Dalam masing-masing buah terdapat sekitar 20 biji (Coetzeer, 2004).

Menurut Coetzeer (2004), Dempsey mengelompokkan kenaf menjadi 5 varietas dan 8 tipe budidaya yang berbeda. Penggolongan varietas kenaf tersebut ialah sebagai berikut:

- Varietas simpleks
Kenaf yang tergolong varietas ini memiliki batang berwarna ungu dan berdaun tunggal dengan tangkai daun berwarna ungu
- Varietas viridis
Varietas ini memiliki batang berwarna hijau dan berdaun tunggal serta tangkai daun yang berwarna hijau
- Varietas rubber
Varietas ini merupakan kenaf yang memiliki batang bagian bawah berwarna merah dan bagian atasnya berwarna kehijauan. Daunnya menjari dengan tangkai daunnya yang berwarna hijau.
- Varietas purpureus
Varietas ini memiliki batang berwarna ungu dan berdaun menjari dengan tulang daun yang berwarna ungu. Varietas ini dibagi menjadi 2 tipe budidaya yang berbeda. Tipe pertama merupakan umur panjang, batang tipis dan tinggi, daun memiliki lobus sempit dan sedikit tercampur warna ungu dari tangkai daun serta petalnya berwarna keunguan. Tipe yang

kedua tergolong umur genjah, batang pendek dan tegap, daun berlobus lebar dan berwarna hijau.

- Varietas vulgaris

Varietas vulgaris memiliki karakter batang berwarna hijau dan daun menjari dengan tulang daun yang berwarna hijau. Varietas ini dibagi menjadi 3 tipe budidaya yang berbeda. Tipe satu merupakan tanaman kenaf varietas vulgaris yang berumur genjah, tipe dua merupakan varietas vulgaris yang berumur panjang dengan batang kecambah yang berwarna kemerahan sedangkan tipe tiga adalah varietas vulgaris yang berumur panjang serta batang kecambah yang berwarna kehijauan.

Tanaman kenaf merupakan tanaman yang memiliki beberapa karakter berbeda jika ditinjau dari segi morfologinya (Coetzeer, 2004). Departemen Pertanian (2006) menerbitkan suatu panduan untuk karakterisasi tanaman kenaf yang dibudidayakan di Indonesia serta keragaman dari karakter-karakter tersebut. Karakter – karakter yang disebutkan dalam panduan tersebut meliputi semua karakter kualitatif dan kuantitatif dari organ daun, batang, bunga, buah, biji serta karakter serat yang dihasilkan oleh tanaman kenaf. Untuk masing-masing organ tersebut, ada beberapa karakter yang diamati, antara lain:

- Daun

Karakter yang diamati pada daun meliputi warna helaian daun, warna tulang daun, warna tepi daun, warna tangkai daun, ada tidaknya bulu pada daun, bentuk daun, panjang daun, lebar daun, panjang tangkai daun, sudut daun, ada tidaknya daun penumpu serta warna daun penumpu.

- Batang

Karakter yang diamati pada organ batang meliputi tekstur batang, warna batang, keberadaan cabang pada batang, jumlah percabangan, diameter batang atas, diameter batang tengah, diameter batang bawah, diameter kayu batang bawah, tinggi tanaman, tipe batang serta jumlah nodus pada batang

- Bunga

Pengamatan pada karakter bunga dilakukan pada karakter umur pembungaan pertama, umur berbunga 50%, warna kuncup bunga, warna mahkota luar, warna mahkota dalam serta kepekaan terhadap cahaya (fotoperiode)

- Buah
Karakter buah yang termasuk dalam tabel karakteristik Departemen Pertanian meliputi karakter warna buah, tekstur buah, jumlah buah dalam satu tanaman serta posisi buku buah pertama
- Biji
Untuk organ biji, pengamatan dilakukan pada karakter warna biji, bentuk biji, ukuran biji serta tingkat kerontokan biji
- Serat
Untuk serat yang dihasilkan tanaman kenaf, terdapat dua karakter yang digunakan sebagai panduan karakterisasi. Karakter tersebut ialah karakter kandungan serat dan kekuatan serat.

2.1.2. Syarat Tumbuh Tanaman Kenaf

Tanaman kenaf membutuhkan lingkungan yang optimal untuk pertumbuhannya. Tanaman ini dapat tumbuh dengan baik pada daerah beriklim basah, dengan curah hujan yang berkisar antara 125 – 400 mm per bulan. Suhu yang dibutuhkan untuk pertumbuhannya berkisar antara 25° - 27°C. Kenaf dapat tumbuh pada semua jenis tanah tetapi paling baik jika ditanam pada tanah yang kaya akan kandungan bahan organiknya. Tanaman kenaf membutuhkan media penanaman dengan nilai pH antara 4,4 – 6,5 (Sutjipta, 2006).

2.1.3. Kenaf Varietas KR 11

Kenaf varietas KR 11 (Karangploso 11) merupakan hasil persilangan antara Hc 48 dan Hc G4. Varietas yang dilepas pada tahun 2001 ini termasuk salah satu varietas unggul yang kurang peka terhadap fotoperiode. Sehingga meskipun pada dasarnya tanaman kenaf merupakan tanaman hari pendek, KR 11 ini dapat ditanam kapan saja asalkan kebutuhan air untuk pertumbuhannya dapat tercukupi. KR 11 memiliki batang berwarna hijau dengan duri yang sedikit dan percabangan yang rudimenter banyak. Tanaman ini berdaun menjari yang berwarna hijau. Kenaf KR 11 ini tergolong varietas yang berumur dalam dengan umur berbunga pertama pada 87 – 95 hari dan umur panen berkisar antara 130 – 140 hari. Tinggi tanaman berkisar antara 278 – 420 cm dengan diameter antara 1,6 – 3,2 cm. Dalam 1 hektar lahan, KR 11 berpotensi menghasilkan serat sebanyak 2,75 – 4,2 ton.

Serat yang dihasilkan rata-rata memiliki panjang antara 260 – 376 cm dengan kekuatan serat antara 24,46 – 29, 60 g/tex (Balittas, 2011).

2.1.4. Kenaf Mutan EMS

EMS (*Ethyl Methanesulphonate*) merupakan salah satu jenis bahan kimia yang dapat menimbulkan mutasi genetik. EMS memiliki formula $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{C}_2\text{H}_5$. Senyawa dapat menyebabkan terjadinya perubahan sekuen genom akibat adanya substitusi. Sebagian besar substitusi tersebut diakibatkan oleh alkilasi guanine. Gugus ethyl yang dimiliki EMS akan berikatan dengan guanine sehingga membentuk abnormal guanine O-6-ethylguanine. Pada proses replikasi, DNA polymerase akan memperbaiki susunan tersebut dengan mengganti abnormal guanine menjadi timin. Hal ini akan menyebabkan terjadinya susunan basa, di mana pada awalnya G:C akan berubah menjadi A:T. Perubahan susunan basa ini dapat mengakibatkan terjadinya perubahan fisiologis dari organisme yang bersangkutan (Kumar dkk., 2012). Menurut Atmajayanti (2004), mutagen EMS ini dapat menyebabkan penurunan persentase perkecambahan biji kenaf dan juga menurunkan persentase hidup dari kenaf tersebut. Pada tanaman lain, mulberry contohnya, tanaman dengan induksi EMS 0.1% dan 0.3% terbukti memiliki keragaman genetik yang lebih tinggi serta karakter alel yang unik dibandingkan dengan tanaman kontrol (Kumar dkk., 2012).

Penelitian yang dilakukan Arumingtyas dkk. (2005) menunjukkan bahwa pemberian EMS pada tanaman kenaf dapat menyebabkan perubahan genotip dan fenotip dari tanaman tersebut. Perubahan genotip ini tampak dari hasil RAPD dan PCR menggunakan primer spesifik gen percabangan. Hasil RAPD menunjukkan adanya polimorfisme antara DNA kenaf kontrol dan mutan serta antar mutan pada 6 primer dari 18 primer yang digunakan. Primer yang menunjukkan adanya polimorfisme ialah OPA-I 1, OPA-12, OPO-2, OPO-4, OPO-5 dan OPO-7. Sedangkan untuk PCR dan sekuensing yang dilakukan menunjukkan bahwa terjadi mutasi titik pada tanaman kenaf mutan sesuai dengan pola mutasi yang diakibatkan oleh EMS.

Sejauh ini, informasi mengenai keragaman genetik pada kenaf mutan hanya berdasarkan analisa RAPD dan juga analisa pada gen percabangan. Perubahan genom tanaman kenaf tersebut kemungkinan tidak hanya terjadi pada gen percabangan melainkan juga pada gen – gen yang lain. Perubahan genom tersebut kemungkinan juga dapat terdeteksi pada gen *matK* dan *rbcL*. Kedua gen ini merupakan gen – gen

yang biasa digunakan dalam studi filogenetik karena tingkat substitusi yang lebih tinggi dibandingkan dengan *coding gene* yang lainnya. Kedua gen tersebut sama – sama merupakan genom kloroplas dan keduanya memiliki fungsi yang cukup penting dalam kelangsungan proses fotosintesis tanaman (Barthet, 2006; Wall dan Herbeck, 2003). Informasi mengenai mutasi EMS terhadap gen-gen tersebut dapat menunjukkan pengaruh pemberian mutagen terhadap gen yang tergolong dalam genom kloroplas.

2.2. Analisis Diversitas Genetis

2.2.1. Pengertian dan Konsep Analisis

Diversitas genetis merupakan suatu level biodiversitas yang ada dalam suatu spesies. Diversitas genetis ini mengacu pada karakter-karakter genetis yang dimiliki oleh individu-individu dalam suatu spesies. Diversitas genetis ini merupakan faktor penting yang berperan dalam kelangsungan hidup suatu spesies. Dengan adanya diversitas genetis ini, suatu spesies dapat menyesuaikan diri terhadap perubahan lingkungan sekitarnya. Adanya diversitas tersebut menyebabkan suatu spesies dapat menyeleksi karakter-karakter tertentu yang dibutuhkan dalam bertahan hidup di lingkungannya. Diversitas genetis ini memiliki keterkaitan yang cukup erat dengan biodiversitas suatu ekosistem. Semakin tinggi diversitas genetis suatu spesies, ekosistem di sekelilingnya akan semakin kompleks sehingga biodiversitas dalam ekosistem tersebut juga akan semakin tinggi (Groom dkk., 2006).

Analisis diversitas genetis dengan sekuen gen tertentu ini dilakukan dengan membandingkan sekuen baru dengan sekuen yang sudah ada. Perbandingan antara sekuen tersebut ditunjukkan dengan memberikan skor masing-masing sekuen. Semakin tinggi skor yang diperoleh menunjukkan semakin tinggi persamaan antara sekuen tersebut. Skor tersebut diberikan dengan matriks universal di mana karakter yang sama dari suatu basa atau asam amino diberi nilai 1 sedangkan karakter yang tidak sama akan ditunjukkan dengan nilai 0. Adanya gap pada suatu sekuen akan diberi nilai negatif karena gap ini pada umumnya menunjukkan adanya delesi atau insersi (Primrose dan Twyman, 2003).

2.2.2. *matK* Sebagai Salah Satu Gen untuk *Barcode*

DNA Barcoding merupakan suatu usaha yang dilakukan untuk mengidentifikasi suatu spesies berdasarkan sekuen DNA yang dimiliki.

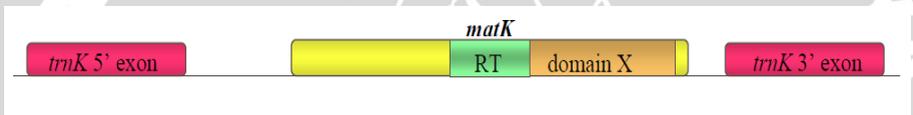
Sekuen DNA yang dimaksud tentu bukan sekuen dari DNA *whole genome* melainkan sekuen dari gen-gen tertentu. Ada beberapa karakter gen yang dapat digunakan sebagai *barcode* pada tanaman. Karakter tersebut adalah universalitas, kualitas sekuen serta kemampuan membedakan individu (*discriminatory power*). Universalitas merupakan karakter yang menunjukkan tingkat kemudahan amplifikasi dan sekuensing terhadap gen tersebut. Kualitas sekuen merupakan karakter yang menunjukkan kualitas hasil sekuensing gen yang dilakukan dari dua arah, yaitu *forward* dan *reverse*. Sedangkan karakter terakhir merupakan kemampuan gen tersebut dalam membedakan individu-individu tanaman yang ada (Hollingsworth dkk, 2011). Penentuan *barcode* untuk tanaman memang masih tergolong sulit untuk dilakukan karena kandidat-kandidat gen tersebut memiliki kelemahan di salah satu syarat yang telah ditentukan. Salah satu kandidat terkuat sebagai *barcode* pada tanaman adalah *matK* (CBOL, 2009).

Gen *matK* pada awalnya dikenal sebagai *orfK*, yaitu sebuah *open reading frame* yang terletak pada gen *trnK*, tetapi saat ini *matK* lebih sering disebut sebagai gen. Gen ini merupakan gen yang terletak pada genom kloroplas. Gen *matK* ini terletak di antara ujung 5' dan ujung 3' dari gen *trnK* dengan panjang sekitar 1500 bp. Gen *trnK* merupakan pengkode terbentuknya *tRNA* Lysin. ORF (*Open Reading Frame*) dari *matK* ini mengkode sekitar 500 asam amino yang nantinya akan ditranslasikan menjadi protein. Gen ini memiliki tingkat substitusi nukleotida tiga kali lebih tinggi dibandingkan dengan *ribulose biphosphate oxygenase/carboxylase Large (rbcL)*. *rbcL* merupakan gen pengkode rubisco unit besar yang juga merupakan kandidat kuat gen yang dapat digunakan sebagai marker secara molekuler. Selain tingkat substitusi nukleotidanya yang lebih tinggi, gen ini juga mengalami substitusi asam amino enam kali lebih banyak dibandingkan kandidat gen lainnya. Meskipun gen ini memiliki tingkat substitusi yang tinggi, tetapi substitusi yang terjadi pada gen ini terjadi dengan tetap menjaga struktur kimia dan juga fungsi dari asam amino yang dihasilkan (Barthet, 2006).

Gen *matK* tidak hanya mengalami tingkat substitusi yang tinggi, melainkan juga mengalami indel (insersi dan delesi) dengan jumlah dan ukuran yang bervariasi. Indel yang terjadi pada *matK* ini biasa terjadi dengan kelipatan 3 sehingga dapat menjaga *reading frame* dari *matK* tersebut. Keunikan lain dari gen ini adalah adanya *conserved region* sepanjang 448 bp dari ujung 3' *matK*. Area ini tidak mengalami indel sebagaimana yang terjadi pada area *matK* yang lain. Area ini juga

memiliki homologi dengan Domain X dari pengkode maturase pada mitokondria. Area yang biasa digunakan dalam kajian polimorfisme gen ialah area di luar dari domain X tersebut (Barthet, 2006).

Gen *matK* merupakan satu-satunya gen yang diduga memiliki domain pengkode maturase dalam kloroplas. Maturase merupakan enzim yang dibutuhkan dalam proses pemotongan intron atau *splicing intron*. Dalam kloroplas, ada sekitar 15 gen yang memiliki 16 intron grup II. Intron yang tergolong dalam grup II merupakan intron yang membutuhkan maturase dalam proses *splicing*. Meskipun dalam proses *splicing* tersebut dapat menggunakan maturase yang berasal dari nukleus, tetapi terdapat beberapa gen, yaitu *trnK*, *atpF*, *trnI*, *trnA*, *rpl2*, and *rps12 cis* yang membutuhkan maturase dari genom kloroplas dalam proses *splicing* intronnya (Barthet, 2006).



Gambar 2. Lokasi *matK* dalam genom kloroplas (Barthet, 2006)

Tingkat substitusi nukleotida yang tinggi menjadi salah satu alasan penting penggunaan *matK* sebagai salah satu gen *barcode*. Substitusi yang tinggi ini menjadi salah satu keunggulan *matK* dalam diskriminasi spesies. Gen ini memiliki kemampuan diskriminasi spesies yang lebih tinggi dibandingkan dengan kandidat gen-gen *barcode* yang lain (CBOL, 2009).

2.2.3. Penggunaan gen *rbcL*

Penggunaan gen *matK* sebagai kandidat utama dalam *DNA Barcoding* memiliki kelemahan dalam hal kemudahan amplifikasi dan sekuensing. Tingkat mutasi yang tinggi pada *matK* mengakibatkan kesulitan dalam penyusunan primer yang dapat berlaku secara universal. Sehingga, penggunaan *matK* dalam studi filogeni ataupun identifikasi pada umumnya dikombinasikan dengan gen *barcode* yang lain, salah satunya adalah *rbcL* (CBOL, 2009).

Gen *rbcL* merupakan gen yang mengkode terbentuknya delapan sub unit besar dari protein rubisco (*Ribulose biphosphate oxygenase/carboxylase*). Gen yang terletak di kloroplas ini memiliki panjang sekitar 1400 pasang basa. Mutasi yang terjadi pada *rbcL* ini tergolong lambat dibandingkan dengan gen untuk *barcoding* lainnya.

Hal ini terjadi karena *rbcL* merupakan gen pengkode terbentuknya protein yang sangat penting dalam fisiologi tanaman. Mutasi dari *rbcL* yang lambat ini memberikan keuntungan dalam studi filogenetik yang membutuhkan penggolongan mendalam mengenai evolusi tumbuhan dan kekerabatannya. Selain dapat dimanfaatkan dalam studi filogenetik, data mengenai *rbcL* juga dapat memberikan informasi mengenai protein rubisco serta sifat-sifat biokimianya (Wall dan Herbeck, 2003). Kelebihan lain yang dimiliki oleh *rbcL* sebagai salah satu gen *barcode* ialah :

- a) Memiliki tingkat universalitas yang tinggi. *rbcL* memiliki tingkat keberhasilan amplifikasi yang cukup tinggi dengan satu atau dua macam primer universal (CBOL, 2009). Menurut Fazekas dkk (2008), tingkat keberhasilan amplifikasi pada gen *rbcL* mampu mencapai 100% pada 251 spesies hanya dengan dua macam primer yang berbeda. Fungsi gen *rbcL* sebagai daerah pengkode protein rubisco menyebabkan gen ini memiliki tingkat mutasi yang cukup rendah dibandingkan dengan gen *barcode* yang lain sehingga tingkat kesamaan antar spesies cukup tinggi (Kellgogg dan Juliani, 1997)
- b) Memiliki kualitas *bidirectional sequencing* yang paling tinggi di antara kandidat gen *barcode* yang lain. *Bidirectional sequencing* ialah proses sekuensing yang dilakukan dari dua arah, yaitu dari primer *forward* maupun primer *reverse* (CBOL, 2009)
- c) Data base tentang gen *rbcL* sudah dimiliki oleh banyak spesies tanaman sehingga akan mempermudah analisa data yang diperoleh dengan membandingkan sekuen gen *rbcL* suatu spesies tanaman dengan spesies yang lain (Cummings, 2003).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan mulai Desember 2012 – Oktober 2013. Penelitian ini dilaksanakan di Rumah Kaca yang bertempat di Jalan Tirtomulyo, Malang serta Laboratorium Fisiologi, Kultur Sel dan Mikroteknik Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

3.2. Cara Kerja

3.2.1. Persiapan Media Penanaman

Media tumbuh yang digunakan dalam penelitian kali ini berupa tanah yang dicampur dengan kompos. Tanah yang akan digunakan dicampur dengan kompos dengan perbandingan tanah dan kompos sebesar 10:1 dan dilakukan pencampuran agar homogen. Selanjutnya tanah tersebut dimasukkan ke dalam pot berdiameter 30 cm dengan volume yang sama untuk masing-masing pot. Masing-masing pot berisi 10 kg tanah.

3.2.2. Pemilihan Benih

Benih kenaf yang digunakan kenaf tipe asal dan hasil mutasi pertama (M_1). Benih kenaf tipe asal yang digunakan adalah KR 11. Sedangkan benih kenaf hasil mutasi EMS mutan generasi pertama (M_1) yang digunakan meliputi tiga genotip hasil mutasi dengan konsentrasi EMS 0.05%, satu genotip hasil mutasi 0.1 % dan sisanya merupakan hasil mutasi dengan EMS 0.3%. Untuk lebih jelasnya, benih kenaf yang digunakan dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Genotip kenaf yang digunakan

No	Genotype	Nama
1.	KR 11	KR 11
2.	KR 11 M_1 0,05% (1)	Mutan 1
3.	KR 11 M_1 0,05% (2)	Mutan 2
4.	KR 11 M_1 0,05% (3)	Mutan 3
5.	KR 11 M_1 0,1%	Mutan 4
6.	KR 11 M_1 0,3%	Mutan 5

Penelitian ini menggunakan tiga genotip mutan 0.05% yang berbeda karena kemampuan perkecambahan mutan 0.05% yang lebih tinggi dibandingkan mutan yang lain. Tiga genotip tersebut merupakan genotip yang berhasil berkecambah ketika dilakukan uji viabilitas. Sedangkan untuk genotip dari mutan yang lain hanya satu jenis genotip saja yang berhasil berkecambah.

3.2.3. Penanaman Benih dan Pemupukan

Penanaman benih kenaf ini diawali dengan pembuatan lubang (tugal) pada media tanam sedalam 2 cm sejumlah 5 lubang pada masing-masing pot. Masing-masing lubang diisi dengan 1 biji kenaf dan ditutup dengan tanah kembali. Penanaman kenaf dilakukan saat tanah dalam kondisi kering. Setelah biji dimasukkan dalam tanah kemudian tanah disiram secukupnya. Penyiraman untuk kenaf dilakukan setiap dua hari sekali karena kondisi tanah yang terlalu basah dapat menghambat perkecambahan biji kenaf tersebut. Penjarangan dilakukan dengan menyisakan dua tanaman pada masing-masing pot saat tanaam berumur 28 HST. Penjarangan dilakukan dengan memotong pangkal batang tanaman (Arisah, 2004). Ulangan yang digunakan untuk masing-masing genotip ialah sebanyak 5 ulangan. Kelima ulangan ini tersebar dalam lima pot yang berbeda, dengan dua tanaman untuk masing-masing potnya.

Pemupukan tanaman kenaf dilakukan dengan memberikan tiga pupuk utama, yaitu urea, SP 36 dan juga KCl. Dosis pupuk untuk masing-masing polybag dihitung menggunakan rumus seperti di bawah ini:

$$\text{Pupuk/polybag} = \frac{\text{Dosis pupuk/hektar} \times \text{bobot,}}{\text{Bobot tanah 1 ha dengan kedalaman 20 cm}}$$

Menurut Krisnawati (2003), dosis pupuk untuk tanaman kenaf seluas 1 hektar ialah 200 kg urea, 100 kg SP 36 dan 100 kg KCl. Berdasarkan dosis dan rumus di atas, dengan bobot tanah 1 ha sebesar 2000 ton, diperoleh dosis pupuk urea sebanyak 1 gram/polybag, SP 36 0,5 gram/polybag dan KCl 0,5 gram/polybag. Pemupukan tanaman kenaf ini dilakukan untuk mencukupi kebutuhan nutrisi yang dibutuhkan tanaman tersebut selama pertumbuhannya. Masing-masing pupuk merupakan pupuk tunggal yang mengandung makronutrien yang dibutuhkan oleh

tanaman. Pupuk urea memiliki kandungan unsur nitrogen sebesar 46% dari keseluruhan massa pupuk. Pupuk KCl merupakan pupuk dasar yang mengandung kalium sedangkan pupuk SP36 merupakan pupuk dasar dengan fosfat sebagai kandungan utamanya (Sutejo, 2002).

3.2.4. Isolasi DNA Total

Prosedur isolasi DNA dilakukan berdasarkan prosedur dari Doyle dan Doyle (1990) modifikasi Ermawati (2003). Langkah kerjanya ialah sebagai berikut: masing-masing sampel daun kenaf seberat 0.1 gram ditambah dengan 1 mL buffer ekstraksi (2% CTAB, 100 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1.4 M NaCl, 2% polyvinylpyrrolidone (PVP)-40, 20 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) pH 8.0, kemudian ditambahkan 20 μ L/ml β -mercaptoethanol sesaat sebelum digunakan) dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 65°C pada *waterbath incubator* (Grant). Sampel kemudian disentrifugasi menggunakan sentrifugator (*Eppendorf Centrifuge 5810 R*) dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatant dipisahkan dari pellet dan ditambahkan PCI sesuai volume supernatant yang diperoleh. Sentrifugasi dilakukan kembali dengan kecepatan dan waktu yang sama pada suhu 4°C. Supernatant yang terbentuk pada bagian paling atas dipisahkan pada *microtube* baru dan ditambahkan CI sesuai volume dan divortex dengan *Vortex Mixer VM-2000* sebelum dilakukan sentrifugasi. Sentrifugasi berikutnya dilakukan dengan kondisi yang sama. Supernatant yang diperoleh dipisahkan pada tube yang baru kemudian ditambahkan ammonium asetat sebanyak 0.1x volume supernatant dan etanol absolute sebanyak 2.5x volume. Dilakukan mix gentle kembali dan diinkubasi pada suhu -20 °C selama 1 jam. Setelah itu, dilakukan sentrifugasi kembali dengan kecepatan 12000 rpm 4°C selama 15'. Pelet yang diperoleh ditambah dengan 500 μ L etanol 70% dan ditempatkan pada suhu ruang selama 2 menit. Setelah itu dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan dan suhu yang sama selama 10 menit. Pellet yang terbentuk dipisahkan dan dikeringkan dalam suhu ruang sampai benar-benar kering. Selanjutnya dilarutkan dalam ddH₂O dan disimpan pada suhu -20 °C sampai digunakan.

Setelah dilakukan isolasi DNA, selanjutnya dilakukan uji kualitatif dan uji kuantitatif. Uji kualitatif dilakukan menggunakan elektroforesis gel agarose dengan konsentrasi 1%. Uji kualitatif diawali dengan pembuatan gel agarose. Bubuk agarose sebanyak 0.15 gram ditambah dengan 15 mL TBE dan dipanaskan dalam *microwave*

(*National NN-MX20WF*) selama 2 menit. Selanjutnya ditambahkan EtBr sebanyak 0.5 μL . Campuran ini kemudian dituangkan ke dalam *plate* yang telah dipasang dengan sisiran. *Plate* ini sebelumnya harus dipastikan berada dalam kondisi dengan permukaan rata agar gel yang terbentuk memiliki ketebalan yang sama. Campuran tersebut kemudian didiamkan sekitar 30 menit hingga mengeras. Gel agarose yang telah mengeras kemudian dipindahkan ke dalam elektroforesis chamber dan ditambahkan TBE hingga seluruh permukaan gel tergenangi oleh buffer TBE. Setelah itu, DNA sampel hasil isolasi dicampur dengan *loading dye* (1:2) dan dimasukkan ke dalam sumuran gel yang terbentuk. *Loading dye* yang digunakan memiliki komposisi yang terdiri dari glycerol 87% sebanyak 0.575 ml, 2 μL EDTA 0.5 M, 4 mg bromophenol blue dan akuades steril hingga 1 mL. Jika sudah siap, proses running dilakukan pada tegangan 80 V selama kurang lebih 15 - 30 menit. Hasil running kemudian dipapar dengan sinar UV dan difoto dengan *Geldoc Imajor Science UVDI* untuk mengetahui keberhasilan proses isolasi DNA tersebut. Sedangkan untuk uji kuantitatif diawali dengan melakukan kalibrasi pada spektrofotometer menggunakan Buffer TE sebanyak 3 ml dengan panjang gelombang 260. Selanjutnya isi cuvet diganti dengan DNA hasil isolasi sebanyak 5 μL dalam 2995 buffer TE. Absorbansi dilakukan dengan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm pada *Jenway 6320 Spectrophotometer*. Selanjutnya diukur rasio panjang gelombang A 260/280. Rasio ini akan menunjukkan tingkat kemurnian DNA hasil isolasi yang diperoleh. DNA hasil isolasi yang baik ditunjukkan oleh nilai yang berkisar antara 1.8 – 2. Nilai yang menunjukkan angka di bawah 1.8 menunjukkan kontaminan protein dan polisakarida yang tinggi. Sebaliknya nilai di atas dua menunjukkan kontaminan RNA yang cukup tinggi pada hasil isolasi tersebut (Sambrook dan Russell, 1989).. Konsentrasi DNA ditentukan dengan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Konsentrasi DNA} = A_{260} * \text{Faktor pengencer} * 50 (\mu\text{g/mL})$$

Nilai 50 merupakan konstanta dari suatu larutan yang memiliki nilai absorbansi 1 pada panjang gelombang A_{260} nm dan sebanding dengan 50 $\mu\text{g/ml}$ untai ganda DNA.

3.2.5. Amplifikasi Gen *matK*

Program PCR dilakukan sesuai dengan modifikasi metode dari CBOL (2009) menggunakan gradient PCR yaitu pada *GeneAmp[®] PCR*

System 9700 dengan siklus PCR sebagai berikut: denaturasi awal dengan 94°C selama 3 menit; dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari denaturasi 94°C selama 1 menit; annealing pada suhu 60.8°C selama 45 detik; ekstensi pada 72°C selama 1 menit; selanjutnya ekstensi akhir dengan 72°C selama 5 menit. Primer yang digunakan dalam program PCR ini merupakan primer alternatif yang disarankan oleh CBOL berdasarkan Cuenoud, dkk (2002) yaitu **matK390F (5'-CGATCTATTCATTCAATATTTTC-3')** dan **matK1326R (5'-TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT-3')**. PCR *mix reaction* yang digunakan ialah BSA 2µL, 1 µL untuk masing-masing primer 100 pmol, master mix PCR sebanyak 5 µL serta DNA sampel sebanyak 1 µL.

Amplifikasi untuk gen *matK* ini juga menggunakan pasangan primer MG1 (5'-CTACTGCAGAACTAGTCCGGATGGA GTAGAT-3') dan MG15 (5'-ATCTGGGTTGCTAACTCAATG -3') sebagai alternatif jika dengan pasangan primer sebelumnya tidak memperoleh hasil yang positif. Primer ini didesain oleh Hilu dan Liang (1996) untuk mengamplifikasi area gen *matK* dari tanaman padi. Program PCR yang digunakan untuk pasangan primer ini meliputi pre denaturasi dengan suhu 96°C selama 5 menit; 35 siklus amplifikasi yang terdiri dari denaturasi 96°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 64°C selama 45 detik, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit; selanjutnya diakhiri dengan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Hasil PCR kemudian divisualisasi dengan melakukan elektroforesis gel agarose 1,5% menggunakan ethidium bromide sebagai pewarna.

3.2.6. Amplifikasi Gen *rbcL*

Amplifikasi untuk gen *rbcL* dilakukan menggunakan primer *forward* **rbcLa_f (5'- ATGTCACCACAAACAGAAAC-3')** dan primer *reverse* **5'-TCGCATGTACCTGCAGTAGC-3'**. Primer *forward* yang digunakan merupakan desain dari Kress dan Erickson (2007) sedangkan primer *reverse* yang digunakan merupakan hasil desain dari Fay dkk. (1997). Siklus PCR yang dilakukan ialah sebagai berikut: denaturasi awal dengan 95°C selama 5 menit; dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari denaturasi 95°C selama 45 detik; *annealing* pada suhu 60.8°C selama 45 detik; ekstensi pada 72°C selama 45 menit; selanjutnya ekstensi akhir dengan 72°C selama 10 menit. Hasil PCR gen *rbcL* ini juga divisualisasi dengan melakukan elektroforesis gel agarose 1,5% menggunakan ethidium bromide sebagai pewarna.

3.2.7. Sekuensing

Hasil PCR yang diperoleh dikirimkan ke Macrogen, Korea untuk dilakukan sekuensing. Macrogen ini menggunakan prinsip *capillary sequencing* yang merupakan salah satu teknik dalam *new generations sequencing*.

3.2.8. Pengamatan Karakter Morfologis

Pengamatan karakter morfologis ini dilakukan saat tanaman kenaf panen (umur \pm 4 bulan). Masa panen tanaman kenaf ditandai dengan persentase buah yang masak telah mencapai 75-90%. Pemanenan tidak dilakukan dengan menunggu kematangan buah hingga 100% karena dikhawatirkan buah yang sudah masak akan pecah padahal buah yang masak di awal diasumsikan memiliki kualitas yang lebih baik dibandingkan dengan buah yang masak di akhir (Rustini, 2009). Pengamatan karakter morfologis ini mengacu pada karakteristik pengujian tanaman kenaf dari Departemen Pertanian (2006) yang meliputi karakter tinggi tanaman, batang, daun, buah dan biji.

a. Tinggi tanaman

Pengamatan tinggi tanaman ini dilakukan pada saat tanaman kenaf panen. Pengukuran tinggi ini dilakukan mulai batang terbawah yang menyentuh tanah hingga bagian batang paling ujung yang menghasilkan nodus termasuk semua buku yang terdapat bunga. Tinggi tanaman kenaf ini digolongkan menjadi 5, yaitu sangat pendek (\pm 75.0 cm), pendek (75.1 - 150.0 cm), sedang (150.1 - 225.0 cm), tinggi (225.1 - 300 cm) dan sangat tinggi (> 300 cm)

b. Batang

Pengamatan batang tanaman kenaf dilakukan pada beberapa karakter, yaitu:

- Diameter batang

Pengukuran diameter batang ini dilakukan saat panen tanaman kenaf. Pengukuran diameter ini meliputi diameter batang atas, tengah, bawah dan diameter kayu. Diameter atas diukur pada ujung terakhir batang yang menghasilkan nodus. Diameter tengah diukur pada batang bagian tengah. Pengukuran diameter bawah dilakukan pada bagian batang yang berada tepat di atas permukaan tanah. Sedangkan diameter kayu diukur dengan

mengelupas pada bagian batang yang berada tepat di atas permukaan tanah dengan mengelupas kulit kayunya terlebih dahulu.

- Warna batang

Pengamatan warna batang tanaman kenaf dilakukan pada saat tanaman berumur 60 hari Berdasarkan tabel karakteristik tanaman kenaf, warna batang tanaman kenaf meliputi warna hijau, hijau kemerahan, hijau kecoklatan, merah, coklat

- Tekstur batang

Tekstur batang diamati dengan mengamati permukaan luar dari batang tanaman kenaf tersebut. Pengamatan ini juga dilakukan saat panen tanaman kenaf. Karakter tekstur batang tanaman kenaf dapat dibagi menjadi halus, berbulu atau berduri

- Jumlah percabangan

Karakter ini diamati dengan menghitung cabang yang muncul dari batang utama tanaman kenaf

- Jumlah buku yang terdapat pada tanaman dewasa

Pengamatan ini dilakukan dengan menghitung buku yang terdapat pada batang utama tanaman kenaf termasuk buku yang terdapat bunga. Karakter ini dapat digolongkan menjadi 5 yaitu sangat sedikit (± 30 buku), sedikit (31 – 60 buku), sedang (61 – 90 buku), banyak (91 – 120 buku) dan sangat banyak (> 120 buku).

c. Daun

Pengamatan daun tanaman kenaf ini dilakukan pada saat pertama kali muncul kuncup bunga. Karakter daun tanaman kenaf yang diamati meliputi:

- Warna helaian : hijau, merah, hijau tua

- Warna tulang daun : hijau, hijau kemerahan, hijau kecoklatan, merah, coklat

- Warna tangkai : hijau, hijau kemerahan, hijau kecoklatan, merah, coklat

- Ada tidaknya daun penumpu

- Bentuk daun : berlekuk menjari, bercangap menjari, berbagi menjari, oval

- Sudut daun

Karakter sudut daun ini diperoleh dengan menghitung besar sudut antara batang dengan pusat pertulangan daun. Pengukuran

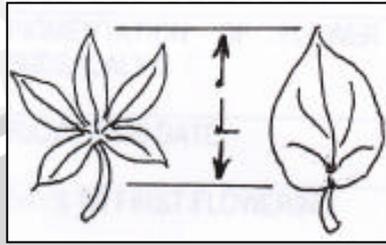
sudut ini dilakukan pada 10 daun dimulai dari daun ke- 6 dari ujung atas batang utama. Karakter ini dibagi menjadi 9 golongan, yaitu tegak ($0-20^\circ$), agak tegak ($21 - 40^\circ$), intermediet ($41 - 60^\circ$), agak intermediet ($61 - 80^\circ$), mendatar ($81 - 100^\circ$), agak mendatar ($101 - 120^\circ$), merunduk ($121 - 140^\circ$), agak merunduk ($141 - 160^\circ$) dan menggantung ($161 - 180^\circ$).

- Panjang daun

Panjang daun ditentukan dengan menghitung panjang daun mulai pangkal daun hingga bagian paling ujung dari daun tersebut (Gambar 3). Pengukuran panjang daun ini sedikit berbeda dengan Panduan Karakterisasi Kenaf oleh Departemen Pertanian yang menunjukkan bahwa pengukuran panjang untuk daun berbentuk menjari dilakukan mulai pertengahan tangkai daun hingga ujung daun terpanjang (Gambar 4). Daun yang diukur panjangnya berjumlah minimal 10 daun mulai daun ke-6 dari ujung atas batang utama tanaman. Berdasarkan panjang daunnya, daun kenaf dikelompokkan menjadi 3 yaitu pendek (≤ 7 cm), sedang ($7.1 - 11.0$ cm) dan panjang (> 11 cm).



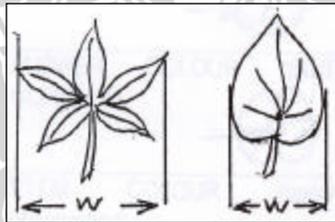
Gambar 3. Pengukuran panjang daun tanaman kenaf



Gambar 4. Ketentuan panjang daun untuk tanaman kenaf dari Departemen Pertanian

- Lebar daun

Lebar daun diukur mulai ujung paling kanan hingga ujung paling kiri dari permukaan daun tersebut. Daun yang diukur lebarnya berjumlah minimal 10 daun mulai daun ke-6 dari ujung atas batang utama tanaman. Berdasarkan lebar daunnya, daun kenaf dikelompokkan menjadi 3 yaitu sempit (± 7 cm), sedang (7.1 – 11.0 cm) dan lebar (> 11 cm).



Gambar 5. Lebar daun tanaman kenaf (Deptan, 2006)

- Panjang tangkai daun

Panjang tangkai daun juga diukur mulai daun ke-6 dari ujung atas batang utama sejumlah minimal 10 daun.

- Ada tidaknya bulu pada daun

d. Bunga

Pengamatan mengenai karakter bunga ini dilakukan saat bunga pada tanaman sudah muncul sebanyak 50% dari total bunga

- Warna kuncup : hijau, kuning, merah, ungu

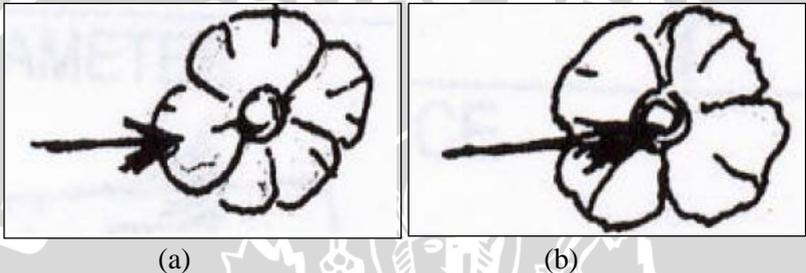
- Umur bunga pertama

umur bunga pertama ini ditentukan pada saat bunga pertama membuka. Berdasarkan umur bunga pertama ini, tanaman kenaf

dikelompokkan menjadi sangat genjah (40 hari), genjah (41 – 60 hari), sedang (61 – 80 hari), dalam (81 – 100 hari) dan sangat dalam (> 100 hari)

- Warna mahkota bagian luar : krem, merah muda, ungu
- Warna mahkota bagian dalam : kuning, merah, ungu

Berikut ini ialah gambar mengenai letak mahkota bagian luar dan mahkota bagian dalam pada bunga kenaf (Gambar 6) dan contoh bunga tanaman kenaf (Gambar 7).



Gambar 6. Letak mahkota bagian luar (a) dan mahkota bagian dalam (b) (Deptan, 2006)



Gambar 7. Contoh bunga tanaman kenaf (Deptan, 2006)

e. Buah

Pengamatan untuk organ buah dilakukan pada karakter-karakter yang meliputi:

- Tekstur : halus, berbulu halus, berbulu kasar
- Jumlah : sedikit, sedang, banyak

Karakter ini ditentukan dengan menghitung jumlah buah berisi (bernas) dalam satu tanaman. Ada 3 kelompok berdasarkan

jumlah buah ini, yaitu sedikit (20 buah), sedang (20 – 40 buah) dan banyak (> 40 buah)

- Posisi buah buku pertama
Karakter ini ditentukan dengan menghitung urutan nodus dari buah kenaf yang muncul dari ujung bawah
- Warna buah : hijau, kuning, merah

f. Biji

- Bentuk : ginjal, agak ginjal, bersudut
- Ukuran : kecil, sedang, besar
- Berat
Karakter berat ini diukur pada 1000 biji dari buah kenaf. Berat yang diukur merupakan berat basah dari biji tersebut.

Karakter – karakter morfologi yang diamati pada penelitian ini meliputi karakter kualitatif dan karakter kuantitatif. Untuk pengolahan data berikutnya, kedua data ini diubah menjadi data biner terlebih dahulu. Penyusunan data ini hingga menjadi data biner sedikit berbeda antara data kualitatif dan data kuantitatif. Untuk data kualitatif, karakter yang muncul diberi nilai 1 dan nilai 0 untuk karakter yang tidak muncul. Untuk karakter kuantitatif, penyusunan data biner dilakukan berdasarkan Panduan Karakterisasi Kenaf yang dikeluarkan oleh Departemen Pertanian (Lampiran 2).

3.2.9. Analisis Molekuler dan Morfologi

Analisis data dimulai dengan memasukkan hasil sekuensing yang diperoleh pada program *Clustal W* pada software Mega5. Hal ini dilakukan untuk melakukan pensejajaran (*alignment*). Setelah itu, dilakukan penghitungan dan pengamatan mengenai jumlah mutasi yang terjadi. Hasil analisa tersebut disusun dalam bentuk dendogram menggunakan *software* Mega5. Dendogram disusun menggunakan analisa *Neighbour Joining* berdasarkan model *Jukes Contor*. Hasil dari dendogram ini akan menunjukkan kedekatan hubungan secara molekuler antara sampel kenaf yang digunakan dan juga menunjukkan sejauh mana perbedaan genetik yang terjadi antara tanaman kenaf kontrol dan tanaman mutan. Selain itu, juga dilakukan penghitungan mutasi yang terjadi dengan analisa *Maximum Likelihood* dengan model *Kimura-2-parameter*. *Maximum Likelihood* merupakan metode analisis

yang dapat mengakomodasi perbedaan kecepatan (*rates of changes*) dari setiap mutasi yang terjadi (Foster, 2009). Sedangkan data morfologi akan diubah menjadi data biner dan juga dilakukan penyusunan dendrogram sebagai pembanding dari analisis molekuler. Penyusunan dendrogram untuk karakter morfologi menggunakan software *Clad97* sehingga dapat diketahui nilai similaritas antar genotip yang digunakan. Selain itu, hasil pengamatan karakter morfologi, terutama karakter kuantitatif, juga dianalisa menggunakan software SPSS untuk mengetahui kecenderungan yang terjadi antara tanaman kontrol dan tanaman mutan. Analisis dilakukan menggunakan ANOVA (jika data berdistribusi normal dan homogen) dan menggunakan Uji *Brown Forsythe* yang dilanjutkan dengan Uji *Games Howell* untuk data berdistribusi normal tetapi tidak homogen.

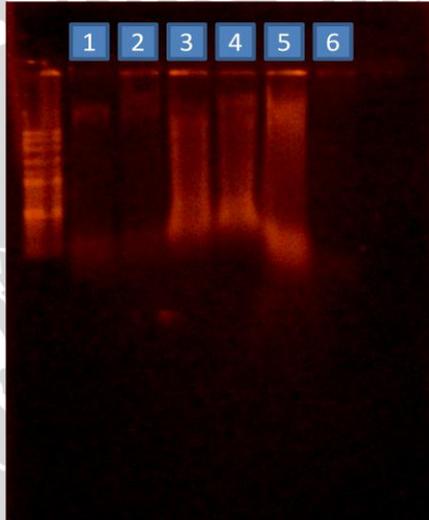


BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Analisa molekuler

4.1.1. Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan menggunakan metode dari Ermawati (2003) yang merupakan modifikasi dari metode Doyle dan Doyle (1990). Metode ini merupakan metode ekstraksi DNA yang khusus digunakan pada tanaman kenaf.



Gambar 8. Hasil elektroforesis DNA dengan agarose 1% (1 = KR 11; 2 = Mutan 1; 3 = Mutan 2; 4 = Mutan 3; 5 = Mutan 4; 6 = Mutan 5)

Hasil elektroforesis yang dilakukan pada 6 genotip tanaman kenaf berhasil menunjukkan hasil yang positif pada semua sampel yang diekstraksi. Meskipun demikian, sebagian besar hasil isolasi menunjukkan adanya *smear* yang cukup tebal, terutama pada bagian bawah dari sumuran (Gambar 8). Hasil ini menunjukkan banyaknya kontaminasi RNA pada hasil isolasi yang dilakukan. Untuk menghilangkan kontaminasi RNA tersebut dapat digunakan RNase yang ditambahkan pada proses ekstraksi.

Hasil ini diperkuat dengan uji kuantitatif yang ditunjukkan melalui nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Nilai panjang gelombang 260 nm yang lebih tinggi menunjukkan bahwa terdapat kontaminasi RNA yang cukup tinggi pada sampel hasil isolasi

yang diperoleh. Sedangkan perbandingan nilai absorbansi panjang gelombang 260 dan 280 yang kurang dari 1.8 menunjukkan banyaknya kontaminan protein dan polisakarida pada proses isolasi yang dilakukan (Sambrook dan Russell, 1989). Hasil penghitungan menunjukkan bahwa DNA hasil isolasi memiliki konsentrasi yang cukup rendah, yaitu hanya berkisar antara 390 hingga 930 ng. Hal ini diharapkan tidak berpengaruh terhadap analisa yang dilakukan pada tahap berikutnya karena PCR tidak membutuhkan konsentrasi DNA yang terlalu tinggi.

Tabel 2. Hasil uji kuantitatif dan nilai konsentrasi DNA

Sampel	260	280	260/280	Konsentrasi DNA (ng)
KR 11	0.031	0.027	1.15	930
Mutan 1	0.017	0.011	1.55	510
Mutan 2	0.015	0.006	2.50	450
Mutan 3	0.013	0.006	2.17	390
Mutan 4	0.019	0.008	2.38	570
Mutan 5	0.014	0.005	2.80	420

4.1.2. Amplifikasi Gen *matK*

Amplifikasi gen *matK* yang dilakukan menunjukkan hasil negatif pada keenam sampel kenaf yang digunakan. Hasil tersebut ditunjukkan melalui elektroforesis menggunakan agarose dengan konsentrasi 1.5% yang tidak memperlihatkan adanya pita DNA pada area yang diinginkan. Kegagalan amplifikasi gen *matK* ini kemungkinan disebabkan oleh tidak sesuainya primer yang digunakan sehingga primer tersebut tidak mampu mengenali *site* dari gen *matK* dari DNA template. Hal ini sesuai dengan pernyataan yang dikeluarkan oleh CBOL (2009) yaitu kelemahan dari gen *matK* ialah terletak pada universalitas gen yang cukup rendah sehingga menyebabkan kesulitan proses amplifikasi dan juga proses sekuensing menggunakan primer yang ada. Tingkat mutasi dari *matK* yang sangat tinggi, yaitu tiga kali lebih cepat dibandingkan dengan *rbcL*, menyebabkan gen ini cukup sulit diamplifikasi dengan satu macam primer universal. Menurut Li dkk. (2011) yang tergabung dalam China BOL Group, *matK* memiliki tingkat keberhasilan amplifikasi pada *Angiospermae* paling rendah (72.5%) dibandingkan dengan *rbcL* (89.2%) dan *trnH-psbA* (100%) ketika hanya menggunakan satu macam primer saja. Hal serupa juga dinyatakan oleh

Fazekas dkk. (2008) bahwa persentase kesuksesan amplifikasi pada gen *matK* hanya sebesar 88% dengan menggunakan 10 pasang primer yang berbeda sedangkan *rbcL* mampu mencapai kesuksesan amplifikasi sebesar 100% hanya menggunakan dua pasang primer saja.

Primer utama yang digunakan dalam penelitian ini ialah primer 390F dan 1326R. Primer ini merupakan salah satu primer yang disarankan oleh CBOL sebagai primer universal untuk amplifikasi gen *matK*. Meskipun ditetapkan menjadi primer universal, primer ini tidak berhasil melakukan amplifikasi pada semua sampel yang diujikan. Kombinasi hasil PCR dengan primer ini dilakukan dengan beberapa cara, mulai mengganti pelarut dengan BSA hingga mengubah konsentrasi primer maupun suhu annealing yang digunakan (Tabel 1).

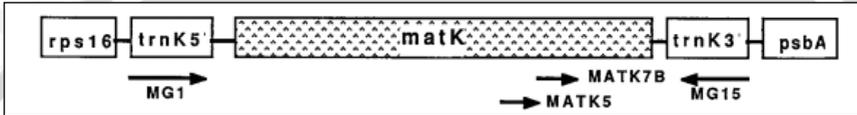
Tabel 3. Kombinasi PCR dengan primer 390F dan 1326R

Jenis Primer	PCR mix	Konsentrasi Primer	Pelarut	Suhu annealing	Hasil
390F - 1326R	i-Taq Intron Biotechnology	100 pmol	ddH ₂ O BSA	61.3	-
				61.3	-
		30 pmol	BSA	61.3	-
				62	-
				63	-

Ketidaksesuaian primer diduga menjadi salah satu faktor utama yang menyebabkan kegagalan proses amplifikasi tersebut. Seperti halnya primer universal yang disusun untuk amplifikasi *matK* lainnya, primer ini juga memiliki universalitas yang tergolong rendah sehingga ketidaksesuaian antara primer dengan DNA template sangat mungkin terjadi. Penelitian yang dilakukan oleh Yu dkk. (2011) menunjukkan bahwa tingkat universalitas dari primer 390F dan 1326R ini hanya mencapai 25.9% dari keseluruhan sampel *Angiospermae* yang digunakan.

Pasangan primer lain yang digunakan dalam penelitian ini adalah MG1 dan MG15. Primer ini mengamplifikasi area gen *trnK* secara keseluruhan dengan memanfaatkan letak gen *matK* yang berada di antara gen *trnK* tersebut. Gen *trnK* merupakan gen yang mengkode terbentuknya tRNA^{Lys} (Yu dkk., 2011). Penyusunan primer pada *coding region* dari *trnK* diharapkan dapat mempermudah proses amplifikasi

karena *trnK* merupakan gen yang cenderung terjaga (*conserve*) pada semua spesies tanaman dan memiliki substitusi nukleotida yang lebih rendah dibandingkan dengan *matK* (Hilu dan Liang, 1997). Primer ini digunakan pertama kali pada DNA tanaman padi (Liang dan Hilu, 1996) dan kemudian mulai digunakan untuk tanaman-tanaman lain sebagai primer alternatif dari gen *matK*.



Gambar 9. Letak pasangan primer MG1 + MG15 dalam *trnK* (Hilu dan Liang, 1997)

Penggunaan pasangan primer MG15 dan MG1 pada DNA kenaf juga memberikan hasil yang sama dengan pasangan primer sebelumnya. Amplifikasi yang dilakukan juga menunjukkan hasil yang negatif pada semua sampel dengan berbagai variasi kondisi yang dilakukan. Kombinasi perlakuan PCR dilakukan dengan mengubah konsentrasi primer, DNA sampel serta suhu *annealing* ketika melakukan PCR (Tabel 2). Penggunaan primer dan *DNA template* dengan konsentrasi yang rendah akan mengurangi efisiensi proses amplifikasi. Sebaliknya, penggunaan keduanya dengan konsentrasi yang terlalu tinggi akan memacu terjadinya *mispriming* dan akumulasi produk yang tidak diinginkan. Akumulasi produk-produk yang tidak diinginkan ini biasanya akan menyebabkan rendahnya produk utama yang diinginkan. Pada umumnya primer yang digunakan dalam reaksi PCR memiliki konsentrasi yang berkisar antara 10 – 50 pmol. Penentuan suhu aneling juga merupakan faktor yang sangat berpengaruh terhadap hasil PCR. Suhu *annealing* yang digunakan akan menentukan keberhasilan penempelan primer dengan *DNA template* pada lokasi yang diinginkan. Suhu *annealing* biasanya berada 5°C di bawah *melting point*. Peningkatan suhu *annealing* dapat meningkatkan spesifikasi terhadap penempelan primer pada DNA template dan juga mengurangi terjadinya misekstensi pada nukleotida yang terletak pada ujung 3' primer tersebut. Pada umumnya, suhu *annealing* yang berkisar antara 55 - 72°C dapat memberikan hasil amplifikasi yang maksimal. Primer universal pada umumnya memiliki range suhu *annealing* yang cukup lebar untuk meningkatkan keberhasilan amplifikasi dari berbagai spesies (Innis dan

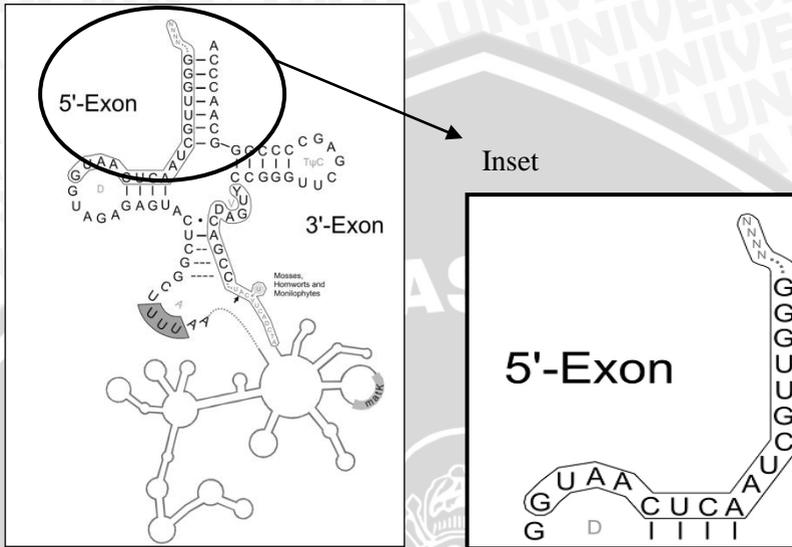
Gelfand, 1990). Tetapi, variasi pada tiga faktor di atas ternyata masih belum memberikan hasil yang memuaskan.

Tabel 4. Kombinasi PCR dengan primer MG15 dan MG1

Jenis Primer	PCR mix	Konsentrasi primer	Konsentrasi sampel	Suhu annealing	Hasil		
MG1 dan MG15	Taq Go Green	30 pmol	Tanpa diencerkan	61.3	-		
				64	-		
	i-Taq Intron Bio-technology	30 pmol	Tanpa diencerkan	60.8	-		
				61.3	-		
				62	-		
				64	-		
				60.8	-		
				61.3	-		
			Pengenceran 5x	62	-		
				64	-		
				Pengenceran 10x	61.3	-	
					62	-	
					60.8	-	
					61.3	-	
			Tanpa diencerkan		61.6	-	
					62	-	
				64	-		
				10 pmol	Tanpa diencerkan	40	-
						42	-
						46	-
	48	-					
	50	-					
	52	-					
	Pengenceran 5x	54	-				
		56	-				
		58	-				
		60	-				
		62	-				
64		-					

Kemampuan primer MG15 dan MG1 untuk mengamplifikasi gen *trnK* pada berbagai spesies tumbuhan dipengaruhi oleh letak dari kedua primer tersebut. Primer MG1, yang merupakan primer *reverse*, terletak pada bagian *exon-intron junction* pada ujung 3. Daerah *exon-intron junction* ini mengalami *mononucleotide indel* berupa basa timin yang hanya dimiliki oleh kelompok lumut hati, lumut daun serta tumbuhan paku. *Mononucleotide indel* ini akan menyebabkan terjadinya *mismatches* sehingga primer tersebut tidak dapat menempel pada *DNA template* dari kelompok lumut hati, lumut daun dan juga tumbuhan paku dengan maksimal. Primer yang tidak mampu menempel dengan maksimal tentunya akan berpengaruh terhadap keberhasilan reaksi amplifikasi yang dilakukan (Wicke dan Quandt, 2009).

Kendala serupa juga terjadi pada primer MG15 yang merupakan primer *forward* dari pasangan ini. Primer ini terletak pada daerah 5'-ekson *trnK*, tepatnya pada *exon-spacer junction* di ujung 5 tersebut. Area *exon-spacer junction* yang terletak pada 5'ekson memiliki variasi nukleotida yang cukup tinggi antar spesies tanaman sehingga dapat menyebabkan ketidakcocokan (*mismatches*) antara primer MG15 dengan *DNA template* yang digunakan (Gambar 10). Meskipun demikian, keberadaan gugus hidroksil yang *conserve* diharapkan dapat mengoptimalkan reaksi PCR yang dilakukan jika dikombinasikan dengan suhu *annealing* yang lebih rendah (Wicke dan Quandt, 2009). Tetapi, hasil PCR yang dilakukan pada rentang suhu 40°C - 60°C pada penelitian ini juga tidak memberikan hasil yang diharapkan. Adanya *mismatches* yang cukup banyak pada primer *forward* diduga menjadi penyebab tidak menempelnya primer dengan *DNA template* sehingga reaksi amplifikasi tidak dapat berlangsung.

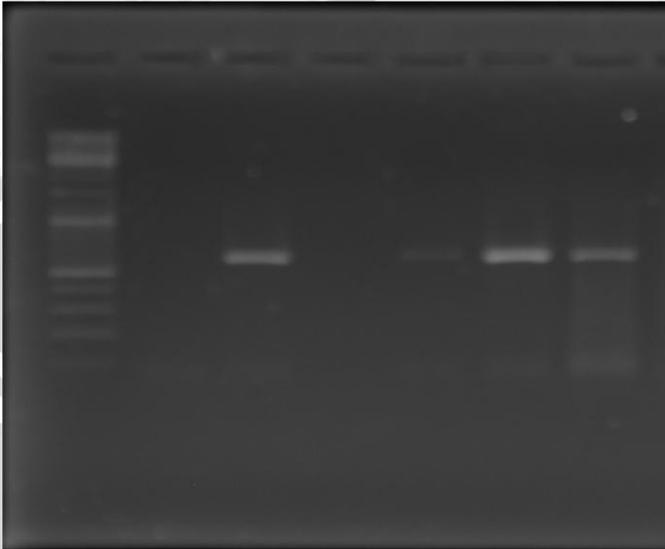


Gambar 10. Struktur Gen *trnK* serta letak pasangan primer MG15 dan MG1. Area yang menunjukkan tingginya variasi nukleotida disimbolkan oleh 4 huruf N yang berurutan (Wicke dan Quandt, 2009)

4.1.3. Amplifikasi Gen *rbcL*

Amplifikasi menggunakan gen *matK* yang tidak berhasil dilakukan menunjukkan perlunya dilakukan usaha amplifikasi sekuen gen lain yang dapat digunakan untuk mengetahui polimorfisme genom pada tanaman mutan. Sebagai alternatif, gen *rbcL* dipilih sebagai marka molekuler pengganti gen *matK* tersebut. Gen ini dipilih karena *rbcL* memiliki tingkat universalitas yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan *matK* sehingga diharapkan proses amplifikasi lebih mudah untuk dilakukan. Selain itu, data mengenai sekuen *rbcL* pada berbagai jenis tanaman sudah tersedia sehingga akan mempermudah analisa polimorfisme yang akan dilakukan (Cumings, 2003).

Hasil elektroforesis dari amplifikasi gen *rbcL* menunjukkan bahwa tidak semua sampel menunjukkan hasil yang positif. Gen *rbcL* hanya teramplifikasi pada 4 sampel yang berasal dari tiga genotip berbeda. Sampel yang menunjukkan hasil positif ialah KR 11, Mutan 2 serta dua sampel dari genotip KR 11 mutan 5.

M**KR 11****Mutan
2****Mutan
5_1****Mutan
5_2**

Gambar 11. Hasil elektroforesis PCR dengan primer *rbcL*

Hasil positif yang diperoleh dari amplifikasi gen *rbcL* ini dilanjutkan dengan proses sekuensing untuk mengetahui susunan basa serta mutasi yang terjadi pada masing-masing sampel. Analisa yang dilakukan menggunakan software MEGA5 menunjukkan bahwa sampel KR 11 memiliki sekuen gen yang identik dengan sekuen gen *rbcL Hibiscus cannabinus* L. yang diambil dari GenBank NCBI. Hal ini membuktikan bahwa KR 11 yang digunakan merupakan salah satu varietas dari tanaman kenaf. Sedangkan untuk ketiga sampel lainnya, yaitu sampel dari genotip mutan 2 dan mutan 5 menunjukkan adanya 22 kejadian mutasi pada sekuen gen *rbcL* tersebut. Sebagian besar mutasi terjadi pada nukleotida nomer 504 – 536 (Gambar 12). Dari 22 kejadian mutasi yang terjadi, sebagian besar merupakan substitusi (19 kejadian) dan sisanya adalah delesi. Substitusi yang terjadi pada gen *rbcL* dari mutan 2 maupun mutan 5 sebagian besar merupakan transversi (86%) Transversi merupakan substitusi nukleotida dari basa purin menjadi basa pirimidin maupun sebaliknya (Campbell, 2008).

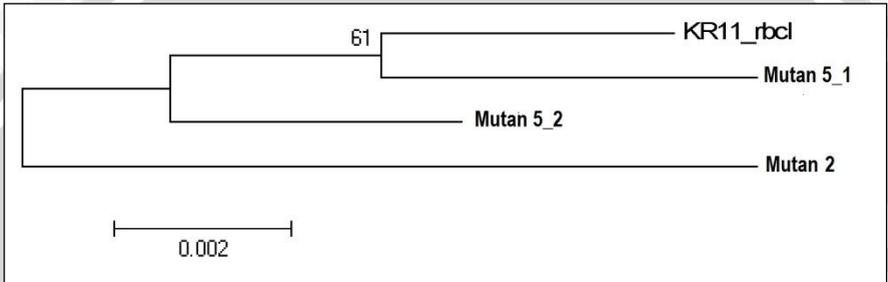
	1																			15	
KR11_rbcl	C	C	T	C	A	A	T	A	T	G	A	A	G	T	C						
Mutan 2	C	C	T	C	A	A	A	A	T	G	A	A	G	T	C						
Mutan 5_1	C	C	T	C	A	A	T	A	T	G	A	A	G	T	C						
Mutan 5_2	C	C	T	C	A	A	T	A	T	G	A	A	G	T	C						
	504																			520	
KR11_rbcl	T	G	G	C	T	T	G	A	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	A
Mutan 2	T	G	G	A	C	T	G	G	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	-
Mutan 5_1	T	G	G	A	T	T	T	G	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
Mutan 5_2	T	G	G	A	T	T	G	A	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	521																				537
KR11_rbcl	A	A	A	A	A	A	A	A	T	T	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
Mutan 2	-	A	C	A	A	A	A	A	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	A
Mutan 5_1	C	A	A	A	A	A	A	A	T	T	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	A
Mutan 5_2	A	A	A	A	A	A	A	A	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T

Gambar 12. Mutasi pada gen *rbcl* dari 3 individu kenaf mutan

Dari keseluruhan transversasi yang terjadi, terdapat tiga kejadian transversasi yang menunjukkan perubahan basa guanin menjadi timin. Substitusi ini merupakan substitusi yang umum terjadi pada hasil mutan EMS. Menurut Kumar dkk. (2012), gugus ethyl yang dimiliki EMS akan berikatan dengan guanin sehingga membentuk abnormal guanin O-6-ethylguanine. Sehingga pada proses replikasi, DNA polymerase akan memperbaiki susunan tersebut dengan mengganti abnormal guanine menjadi timin. Hal inilah yang akan menyebabkan terjadinya perubahan susunan basa, di mana pada awalnya G:C akan berubah menjadi A:T.

Kenaf bergenotip mutan 2, yang merupakan salah satu hasil mutasi dengan konsentrasi 0.05%, menunjukkan diversitas paling tinggi dengan KR 11 berdasarkan sekuen gen *rbcl* (Gambar 13). Mutan ini juga menunjukkan substitusi nukleotida pada gen *rbcl* lebih banyak dibandingkan dengan 2 individu dari mutan 5. KR 11 memiliki diversitas paling rendah dengan individu mutan 5_1. Berdasarkan dendogram yang terbentuk, tampak bahwa dua individu dari mutan 5 memiliki perbedaan karakter meskipun keduanya termasuk dalam mutan

dengan konsentrasi EMS 0.3%. Perbedaan antar individu dalam satu genotip ini menunjukkan diversitas genetik yang ada dalam satu spesies. Kedua genotip mutan 5 tersebut juga menunjukkan similaritas yang lebih tinggi terhadap KR 11 yang merupakan tanaman kontrol dibandingkan dengan genotip mutan 2 yang termasuk mutan EMS 0.05%.



Gambar 13. Dendrogram *Neighbor Joining* kenaf berdasarkan sekuen gen *rbcL*

Analisis lanjutan yang dilakukan berdasarkan *Maximum Likelihood Method* menunjukkan bahwa gen *rbcL* tersebut memiliki nilai rata – rata transisi sebesar 5.75 sedangkan nilai untuk rata – rata transversi ialah sebesar 9.62. Nilai ini menunjukkan bahwa transversi yang terjadi pada tanaman kenaf mutan EMS lebih tinggi dibandingkan jumlah transisi. Hasil ini sedikit berbeda dengan pendapat Carr (2013) yang menyatakan bahwa transisi pada genom pada umumnya dua kali lipat dibandingkan jumlah transversi yang terjadi. Substitusi nukleotida secara transisi memiliki efek yang lebih sedikit terhadap perubahan asam amino dibandingkan dengan transversi. Semakin tinggi transversi yang terjadi dapat meningkatkan kemungkinan perubahan asam amino yang dihasilkan.

Data molekuler yang diperoleh berdasarkan sekuen gen *rbcL* berhasil menunjukkan similaritas antara mutan 2 dan mutan 5 terhadap tanaman kontrol (Gambar13). Tetapi, kegagalan amplifikasi pada tiga genotip yang lain, yaitu mutan 1, 3 dan 4 menyebabkan hasil ini tidak dapat menggambarkan pengaruh EMS terhadap similaritas sekuen gen *rbcL* secara menyeluruh. Hasil yang menyeluruh memungkinkan adanya perubahan nilai similaritas yang diperoleh, baik antara tanaman kontrol dengan mutan maupun antar genotip tanaman mutan. Demikian juga mengenai hasil analisa mutasi yang terjadi pada gen *rbcL* tersebut.

Adanya sampel yang tidak berhasil diamplifikasi dan disekuensing menyebabkan adanya *missing data* sehingga data yang diperoleh belum dapat menggambarkan karakter mutasi yang disebabkan oleh EMS secara keseluruhan. Data mengenai gen *rbcL* dari tanaman kenaf mutan ini dapat memberikan gambaran awal mengenai efek EMS terhadap gen *rbcL* tetapi perlu dilakukan upaya lanjutan untuk memperoleh data yang utuh sehingga dapat dilakukan analisa secara menyeluruh mengenai gen *rbcL* ini.

4.2. Analisa Keragaman Morfologi

Karakter morfologi merupakan karakter yang teramati hasil dari faktor genetik dan juga faktor lingkungan. Secara umum, karakter morfologi dapat dikelompokkan menjadi dua bagian, yaitu karakter kualitatif dan karakter kuantitatif. Karakter kualitatif merupakan karakter yang diturunkan secara monogenetik sehingga faktor lingkungan memiliki pengaruh yang sangat kecil terhadap karakter ini. Sebaliknya, karakter kuantitatif merupakan karakter yang diturunkan secara poligenetik. Karakter ini merupakan efek dari interaksi berbagai gen yang ada dalam suatu individu (IHH, 2013).

Pengamatan karakter morfologi pada penelitian pada awalnya akan dilakukan pada karakter daun, bunga, batang, buah dan biji. Tetapi, kondisi yang terjadi di lapang tidak memungkinkan untuk melakukan pengamatan karakter buah dan biji. Hal ini dikarenakan adanya beberapa hal, antara lain:

- Serangan hama kutu putih (*Ferrisia virgata*) yang muncul pada saat tanaman hampir memasuki waktu berbunga. Serangga ini menyerang pucuk tanaman kenaf dengan menghisap cairan sel sehingga tanaman tampak layu dan kering. Serangan serangga ini menyebabkan pertumbuhan tanaman kenaf menjadi terhambat. Hama ini biasanya menyerang pada saat musim kemarau atau musim kering. Ditambah lagi, serangga ini diselubungi oleh lapisan kutikula sehingga cukup sulit untuk diberantas menggunakan insektisida (Sunarto dkk., 2008). Hama kutu putih ini menyerang hampir semua tanaman sehingga banyak tanaman yang mati sebelum memasuki masa pengamatan. Penanganan yang terlambat dapat menyebabkan kematian tanaman yang terserang kutu putih tersebut.



(a)

(b)

Gambar 14. Tanaman kenaf saat mulai terserang kutu putih (a) dan penanganan terlambat (b)

- Tanaman mengalami layu dan kematian secara mendadak. Penyebab utama kematian tanaman ini tidak dapat diketahui secara pasti. Tetapi, diduga penyebabnya ialah busuk akar yang akibat jamur sejenis *Fusarium* spp. Hal ini ditunjukkan oleh kondisi tanaman yang layu serta pangkal batang yang membusuk. Menurut Yulianti dan Supriyono (2007), penyakit ini ditandai dengan pembusukan akar hingga pangkal batang tanaman kenaf sehingga pangkal batang hingga bagian pembuluhnya berwarna kecoklatan. Jamur ini akan berkembang dengan cepat pada tanah dengan kelembapan tinggi, suhu tanah sedang dan kenaf yang telah terkena serangan nematoda *Meloidogyne* terlebih dahulu.



Gambar 15. Kondisi pangkal batang tanaman kenaf yang diduga terserang *Fusarium* spp.

- Pertumbuhan yang lambat pada beberapa individu tanaman. Pertumbuhan yang lambat ini teramati pada mutan genotip 0.1%. Beberapa individu pada genotip ini tidak dapat menghasilkan bunga hingga akhir masa pengamatan padahal sebagian besar tanaman dengan genotip lain sudah memasuki masa berbunga. Sehingga individu tanaman tersebut hanya dapat diamati karakter batang saja. Pertumbuhan tanaman kenaf yang lambat, kerdil dan tidak responsif terhadap pemberian pupuk maupun insektisida diduga disebabkan oleh serangan nematoda pada bagian akar kenaf. Kenaf yang terserang nematoda ini biasanya memiliki bintil – bintil pada bagian akarnya (Thirdyawati, 2013).



Gambar 16. Akar tanaman kenaf yang diduga terserang nematoda (a) dan akar yang sehat (b)

Adanya beberapa karakter yang tidak dapat teramati serta beberapa individu yang tidak dapat diamati menyebabkan terjadinya *missing data* dalam analisa karakter morfologi yang dilakukan. Seperti halnya *missing data* dalam analisa molekuler, *missing data* yang terjadi ini dapat menyebabkan perbedaan pada hasil analisa yang dilakukan. Meskipun demikian, hasil analisa morfologi ini dapat memberikan gambaran sementara mengenai keragaman karakter morfologi antara tanaman kenaf mutan EMS dengan tanaman kontrolnya.

Pengamatan yang dilakukan pada karakter batang, daun dan bunga dengan menggunakan Panduan Karakterisasi Kenaf sebagai acuan menunjukkan bahwa varietas KR 11 tergolong kenaf bertipe tinggi dengan tinggi rata-rata 274 cm. Batang kenaf ini berwarna hijau dengan adanya pigmentasi pada bagian ujungnya serta memiliki duri-duri kecil pada permukaannya. Tanaman ini memiliki daun berbagi menjari dengan warna hijau, mulai helaian, tepi, tulang daun, tangkai

daun hingga daun penumpunya. Helai daunnya halus dan tidak terdapat bulu pada permukaan. Berdasarkan sudut daunnya, kenaf varietas KR 11 tergolong bersudut daun mendatar dengan besar sudut $84,43^\circ$. Tanaman ini memiliki rata-rata panjang daun sebesar 17,68 cm dan lebar daun sebesar 25,5 cm sehingga dikategorikan daun yang panjang dan lebar (> 11 cm). Tangkai daunnya memiliki rata-rata sebesar 240 mm sehingga dikategorikan tangkai daun yang sangat panjang (> 200 mm). Kenaf KR 11 memiliki kuncup bunga berwarna hijau dan bunga dengan mahkota bagian luar berwarna putih serta mahkota bagian dalam yang berwarna merah. Kenaf varietas ini memiliki jumlah nodus yang tergolong sedikit, yaitu sekitar 58 nodus pada satu tanaman. Batang kenaf KR 11 bertipe mengerucut yang dibuktikan dengan ukuran diameter atas lebih kecil dibandingkan dengan diameter tengah dan bawahnya. Tanaman ini tergolong berdiameter kecil jika dilihat dari diameter atas dan tengahnya. Tetapi, jika berdasarkan diameter bawah dan diameter kayunya, tanaman ini masuk dalam kategori diameter sedang. Karakter lain dari tanaman ini ialah memiliki percabangan bertipe rudimenter (siwilan) banyak. Hasil pengamatan ini sebagian besar sesuai dengan karakter kenaf varietas KR 11 yang dideskripsikan oleh Balittas (2011). Perbedaannya terletak pada karakter warna mahkota bunga, baik bagian luar dan dalam. Berdasarkan deskripsi Balittas, KR 11 memiliki bunga berwarna kuning, tetapi hasil pengamatan yang dilakukan menunjukkan bahwa KR 11 memiliki bunga yang berwarna putih di bagian luar dan merah di bagian dalam.

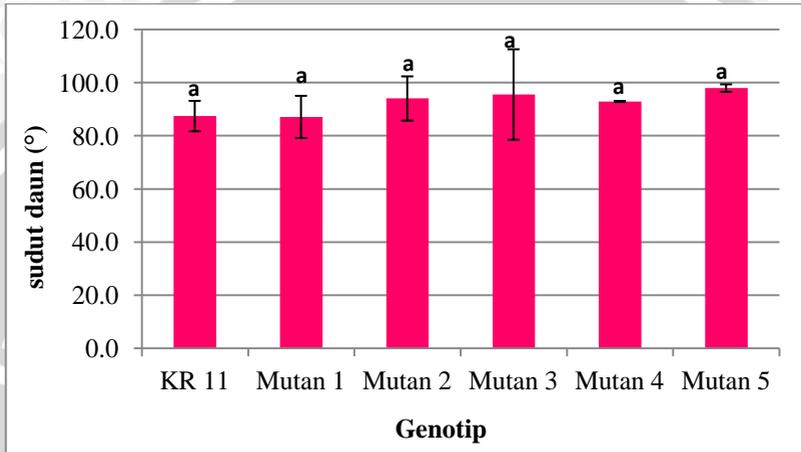
Mutan KR 11 hasil mutasi EMS yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu mutan 1 hingga mutan ke-5 memiliki persamaan pada semua karakter kualitatif yang diamati, mulai karakter batang yang meliputi warna batang, tipe batang dan tekstur batang, karakter daun yang terdiri dari warna helaian, tepi, tangkai, tulang daun dan daun penumpu serta karakter bunga yang meliputi warna kuncup bunga, warna mahkota bagian luar dan warna mahkota bagian dalam.



Gambar 17. Warna batang tanaman kenaf 6 genotip berbeda (a) KR 11; (b) mutan 1; (c) mutan 2; (d) mutan 3; (e) mutan 4; (f) mutan 5

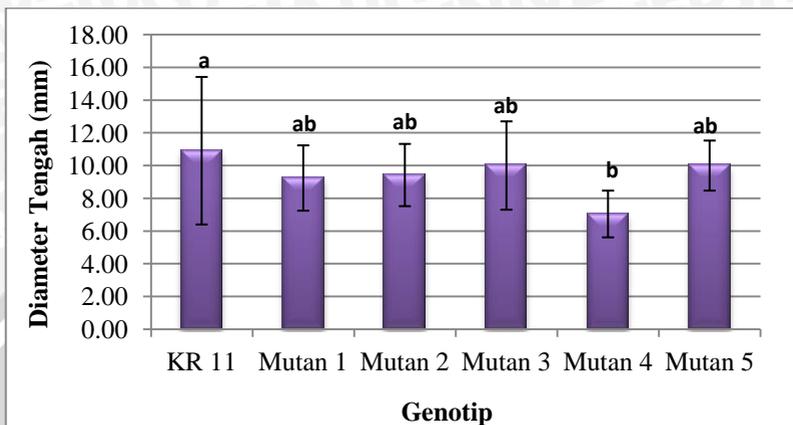
Hasil yang sedikit berbeda teramati pada karakter kuantitatif dari keenam genotip tanaman kenaf tersebut. Dari 10 karakter kuantitatif yang diamati, hanya dua karakter sama yang dimiliki oleh keenam genotip tersebut (Tabel 5). Karakter tersebut ialah karakter sudut daun dan diameter batang tengah tanaman kenaf. Keenam genotip kenaf yang digunakan tergolong tanaman bersudut daun mendatar, meskipun empat dari lima genotip kenaf mutan yang digunakan, yaitu mutan 2 hingga mutan 5 menunjukkan adanya kenaikan nilai sudut daun dibandingkan dengan tanaman kontrol (Gambar 18). Menurut Djumali (2011), sudut daun berkaitan dengan kemampuan tanaman dalam menyerap energi cahaya matahari semaksimal mungkin. Semakin besar ukuran sudut daun maka akan semakin besar pula penyerapan cahaya yang mampu dilakukan oleh tanaman. Perbedaan ukuran sudut daun akan mempengaruhi kemampuan penyerapan cahaya sehingga akan berpengaruh terhadap kemampuan dan laju fotosintesis tumbuhan tersebut. Ukuran sudut daun yang cukup besar memungkinkan terjadinya peningkatan suhu daun akibat banyaknya cahaya yang diterima. Peningkatan suhu daun ini dapat menghambat proses

fotosintesis (*photoinhibition*) (Taiz dan Zeiger, 2002). Meskipun peningkatan sudut daun yang terjadi tidak signifikan, tetapi hal ini diduga dapat menjadi salah satu faktor yang menyebabkan perbedaan pertumbuhan antara tanaman kontrol dan tanaman mutan.



Gambar 18. Perbandingan ukuran sudut daun dari 6 genotip kenaf (Huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan berdasarkan Uji *Brown Forsythe* dan uji lanjutan *Games Howell*, $\alpha = 5\%$. Bar menunjukkan standar deviasi)

Hal sebaliknya teramati pada karakter diameter batang tengah dari sampel yang digunakan. Semua sampel dalam penelitian ini tergolong kenaf dengan diameter batang tengah berukuran kecil, yaitu kurang dari 13 mm. Hanya saja, kelima genotip mutan menunjukkan penurunan ukuran diameter tengah antara 8 – 35 % dibandingkan tanaman kontrol (Gambar 19). Penurunan ukuran diameter ini sesuai dengan yang disebutkan oleh Arumingtyas dkk. (2005) yang menyatakan bahwa kenaf hasil mutasi oleh EMS mengalami penurunan volume batang sebesar 57,33% dibandingkan dengan tanaman kontrol. Perbedaan ukuran diameter batang serta volume batang tanaman mutan ini dapat disebabkan terjadinya perbedaan kemampuan fotosintesis yang dimiliki oleh tanaman mutan sehingga berpengaruh terhadap volume dan biomassa yang dihasilkan.



Gambar 19. Perbandingan rata-rata diameter tengah 6 genotip kenaf (Huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan berdasarkan Uji *Brown Forsythe* dan uji lanjutan *Games Howell*, $\alpha = 5\%$. Bar menunjukkan standar deviasi)

Tanaman kenaf Mutan 1 dan Mutan 2 memiliki perbedaan satu karakter antar genotip, yaitu karakter diameter kayu batang bawah. Mutan 1 memiliki diameter kayu yang tergolong sedang dan mengalami penyusutan sebesar 14.19% dibandingkan dengan tanaman kontrol. Dua genotip tanaman mutan tersebut memiliki panjang tangkai daun yang lebih pendek dibandingkan tanaman kontrol. Panjang tangkai daun dari dua genotip mutan tersebut berkisar antara 150 – 200 mm sehingga termasuk dalam kategori panjang. Berbeda dengan dua genotip di atas, mutan 3 memiliki tiga *character state* yang berbeda jika dibandingkan dengan KR 11. Seperti halnya dua mutan sebelumnya, mutan genotip ini juga mengalami penurunan panjang tangkai daun sebesar 42.5% sehingga tangkai daunnya tergolong sedang. Tetapi karakter batang atas mutan 3 menunjukkan diameter yang lebih besar dibandingkan dengan mutan genotip lain maupun tanaman kontrol. Peningkatan ukuran diameter sebesar 16% dari tanaman kontrol menggolongkan diameter mutan genotip ini ke dalam kategori sedang (5.1 – 8 mm). Jumlah nodus genotip ini juga 10% lebih banyak dibandingkan dengan tanaman kontrol. Perbedaan karakter dari ketiga genotip mutan 0.05% yang digunakan menunjukkan bahwa konsentrasi EMS sebagai mutagen bukan merupakan satu-satunya hal yang mempengaruhi karakter genotip dan fenotip dari tanaman kenaf tersebut. Faktor yang memiliki pengaruh penting lainnya ialah variasi genetik yang dimiliki masing-masing

individu. Variasi genetik individu dalam satu spesies memiliki peranan penting terhadap kemampuan spesies tersebut untuk beradaptasi terhadap kondisi lingkungan. Adanya variasi genetik dalam individu akan menghasilkan respon individual yang berbeda terhadap kondisi lingkungan yang sama (USDA, 2006).

Mutan 4 yang merupakan hasil mutasi EMS sebesar 0.1 % memiliki perbedaan pengelompokan *character state* paling banyak dengan tanaman kontrol dibandingkan genotip yang lain. Genotip ini menunjukkan penurunan yang cukup tinggi pada semua karakter beda yang dimiliki. Perbedaan tersebut mulai dari karakter tinggi yang mengalami penurunan sebesar 23.9% dibanding kontrol sehingga tinggi mutan 4 tergolong sedang. Perbedaan tinggi tanaman ini tidak hanya tampak antara mutan 4 dengan tanaman kontrol tetapi juga antara mutan 4 dengan genotip lain (Gambar 20). Perbedaan karakter yang lain nampak pada karakter diameter batang bawah dan kayu yang tergolong kecil dengan penyusutan ukuran sebesar 33.8% dan 29% dibandingkan tanaman kontrol. Kondisi serupa juga teramati pada karakter panjang daun, lebar daun serta panjang tangkai daun yang menyusut sebesar 47.6%, 56.8% dan 39% sehingga tergolong sedang. Penyusutan tinggi tanaman, ukuran batang hingga daun pada genotip mutan 4 ini dapat disebabkan pertumbuhan dari mutan 4 yang lebih lambat dibandingkan dengan genotip lainnya. Pertumbuhan yang lambat ini juga diikuti dengan perkembangan organ reproduksi yang terlambat pula. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa lebih dari 50% populasi dari genotip mutan 4 ini tidak menghasilkan bunga hingga waktu pengambilan data berakhir (waktu panen). Pertumbuhan dan perkembangan yang lambat ini diduga akibat kondisi mutan 4 yang lebih rentan terhadap serangan hama dibandingkan dengan genotip lainnya.

Mutan 3



Mutan 4

Gambar 20. Perbandingan tinggi tanaman kenaf genotip mutan 3 dan mutan 4

Berbeda dengan mutan 4 yang mengalami penurunan pada semua karakter beda yang dimiliki, genotip mutan 5 memiliki jumlah nodus 5% lebih banyak dibandingkan dengan tanaman kontrol. Populasi dari genotip ini memang lebih bervariasi dibandingkan dengan genotip mutan 4. Sebagian individu dalam populasi mengalami kematian akibat serangan kutu putih tetapi beberapa tanaman yang tersisa mampu bertahan hidup hingga masa panen dengan kisaran tinggi tanaman yang hampir sama dengan tanaman kontrol. Demikian pula ukuran diameter tanaman yang terbentuk, baik diameter atas, tengah maupun diameter bawah dan diameter kayu. Keempat karakter diameter dari genotip mutan 5 tersebut memiliki penggolongan *character state* yang sama dengan tanaman kontrol meskipun masing-masing karakter tersebut menunjukkan penurunan jika dibandingkan dengan tanaman kontrol. Rata-rata panjang, lebar dan panjang tangkai daun yang dimiliki genotip mutan 5 juga menunjukkan penurunan yang cukup besar (48.3%, 69% dan 31.6%) dibandingkan dengan tanaman kontrol.

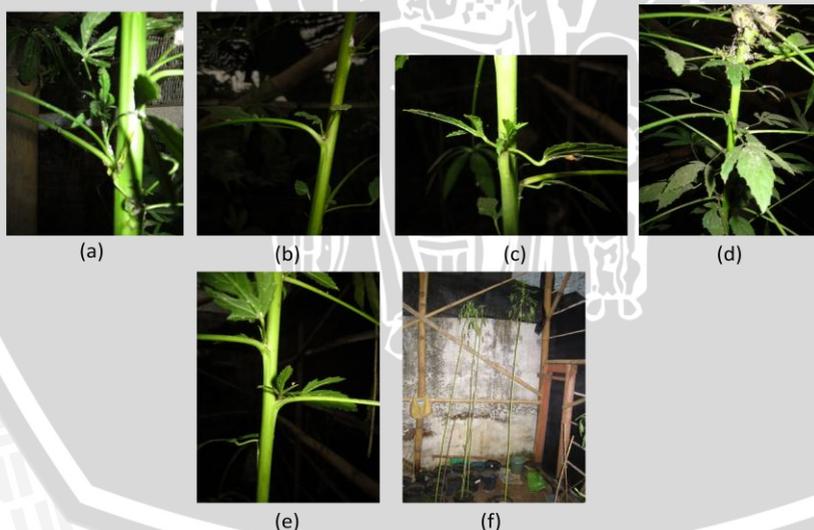
Tabel 5. Karakter kuantitatif yang diamati pada 6 genotip kenaf

Karakter	KR 11	Mutan 1	Mutan 2	Mutan 3	Mutan 4	Mutan 5
Tinggi tanaman	T	T	T	T	Sdg	T
Diameter atas	K	K	K	Sdg	K	K
Diameter tengah	K	K	K	K	K	K
Diameter bawah	Sdg	Sdg	Sdg	Sdg	K	Sdg
Diameter kayu	Sdg	Sdg	Sdg	Sdg	K	Sdg
Jumlah nodus	Sdk	Sdk	Sdk	Sdg	Sdk	Sdg
Panjang daun	P	P	P	P	Sdg	Sdg
Lebar daun	L	L	L	L	Sdg	Sdg
Panjang tangkai daun	SP	P	P	P	Sdg	Sdg
Sudut daun	Mdt	Mdt	Mdt	Mdt	Mdt	Mdt

Keterangan : T = Tinggi; K = Kecil; Sdg = Sedang; Sdk = Sedikit; SP = Sangat Panjang; P = Panjang; L = Lebar; Mdt = Mendatar (Penggolongan untuk masing-masing karakter dapat dilihat di Lampiran 1)

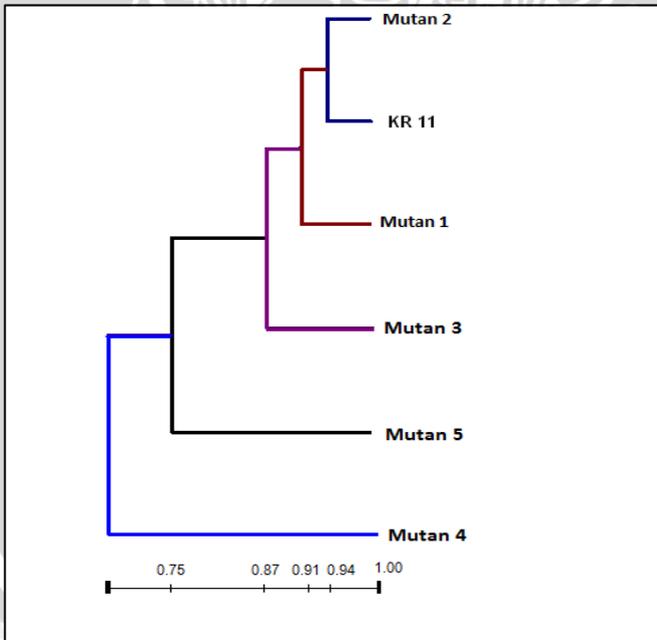
Karakter lain yang cukup menonjol di antara tanaman kontrol dan mutan EMS ialah karakter percabangannya. KR 11 sebagai tanaman kontrol memiliki karakter tidak bercabang tetapi hanya memiliki siwilan (rudimenter) pada ketiak daunnya. Adanya rudimenter tersebut menunjukkan bahwa karakter percabangan merupakan karakter morfologi yang secara alamiah tidak muncul pada varietas KR 11. Arumingtyas dkk. (2005) menyatakan bahwa mutasi oleh EMS dapat mengakibatkan polimorfisme pada genom tanaman kenaf dan menyebabkan perubahan pada karakter percabangan dari varietas KR 11 tersebut. Mutasi oleh EMS terbukti mampu meningkatkan panjang

cabang yang dimiliki oleh tanaman kenaf hingga mencapai 167% dibandingkan tanaman kontrol. Tetapi, dalam penelitian ini, karakter percabangan pada tanaman kenaf kontrol dan mutan tidak dapat teramati. Hal ini dikarenakan pertumbuhan yang tidak maksimal sehingga seluruh tanaman yang digunakan tidak menghasilkan percabangan. Pertumbuhan dari tanaman kenaf tersebut hanya mampu menghasilkan siwilan pada beberapa ketiak daunnya. Siwilan yang terdapat pada tanaman mutan memiliki ukuran yang lebih kecil dibandingkan pada tanaman kontrol (Gambar 21). Pertumbuhan tanaman yang tidak maksimal pada sebagian besar individu yang digunakan diduga menyebabkan karakter percabangan tersebut tidak dapat teramati. Percabangan merupakan salah satu pertumbuhan sekunder pada tumbuhan. Sehingga pertumbuhan ini hanya akan terjadi jika kebutuhan untuk pertumbuhan primer sudah terpenuhi secara maksimal. Menurut Willaume dkk. (2004), struktur percabangan yang dimiliki suatu tanaman merupakan hasil interaksi berbagai proses fisiologi dalam tanaman tersebut. Proses fisiologi ini dipengaruhi faktor internal dan eksternal dari tanaman tersebut. Pertumbuhan tanaman yang terhambat akibat serangan patogen atau serangga juga berpengaruh terhadap fisiologi tanaman sehingga dapat menghambat munculnya percabangan.



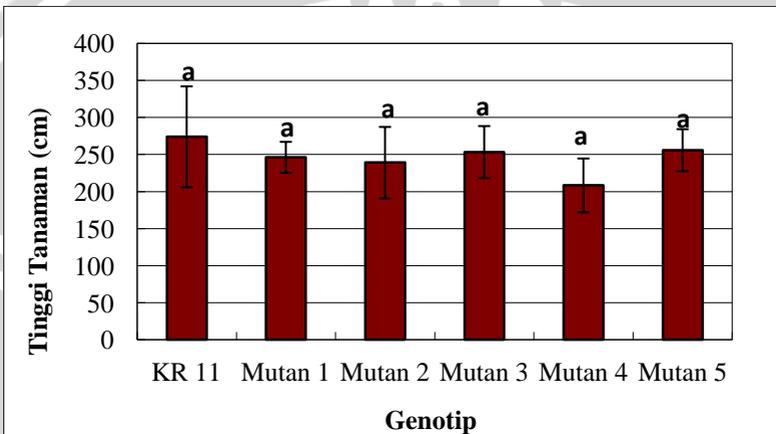
Gambar 21. Percabangan kenaf (a) KR 11 (b) Mutan 1; (c) Mutan 2; (d) Mutan 3; (e) Mutan 4 (f) Mutan 5

Di antara enam genotip kenaf yang digunakan, mutan 4 merupakan genotip dengan diversitas paling tinggi dibandingkan dengan genotip lainnya (Gambar 22). Perbedaan mutan 4 terhadap KR 11 terdapat pada sebagian besar karakter kuantitatif yang diamati, yaitu tinggi tanaman, diameter atas, diameter bawah, diameter kayu, panjang daun, lebar daun serta panjang tangkai daun. Ketiga mutan 0.05% yang digunakan, yaitu mutan 1, mutan 2 dan 3, memiliki perbedaan antar genotip pada karakter diameter atas. Mutan 1 dan 2 memiliki diameter atas yang tergolong kecil sedangkan mutan 3 memiliki diameter bagian atas berukuran sedang. Hal ini menunjukkan bahwa tiga genotip tersebut memiliki genetik yang berbeda meskipun ketiganya mendapat perlakuan EMS yang sama. Di antara ketiga mutan tersebut, mutan 1 dan 2 memiliki perbedaan satu karakter dengan KR 11, yaitu karakter panjang tangkai daun sedangkan mutan 3 memiliki perbedaan pada dua karakter, yaitu diameter atas dan panjang tangkai daun. Mutan 5 memiliki perbedaan jumlah nodus, panjang daun, lebar daun dan panjang tangkai daun jika dibandingkan dengan tanaman kontrol.



Gambar 22. Dendrogram similaritas karakter 6 genotip kenaf

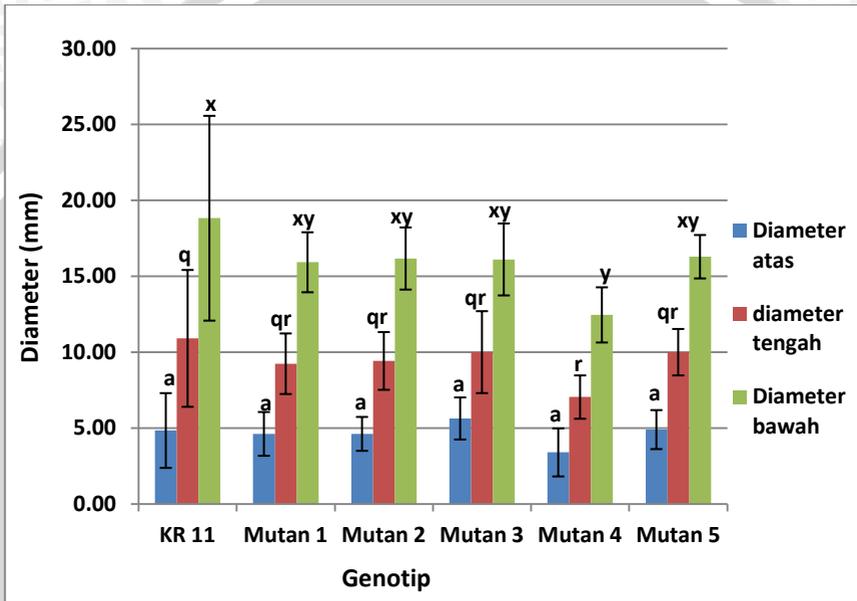
Pengamatan yang dilakukan pada karakter morfologi menunjukkan adanya perbedaan pertumbuhan antara tanaman kontrol dan juga tanaman mutan. Tanaman kontrol memiliki pertumbuhan yang cenderung lebih baik dibandingkan dengan tanaman mutan. Hal ini dapat dilihat dari rata-rata tinggi tanaman mutan yang cenderung lebih rendah dibandingkan dengan tanaman kontrol (Gambar 23).



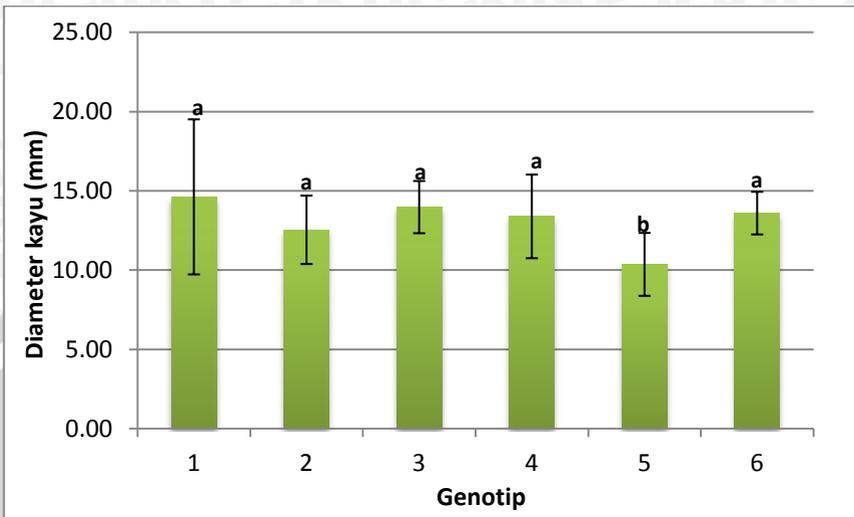
Gambar 23. Perbandingan tinggi tanaman kenaf (Notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan berdasarkan Uji *Games Howell*, $\alpha = 5\%$. Bar vertikal menunjukkan standar deviasi)

Kondisi serupa juga teramati pada ukuran diameter yang terbentuk, baik diameter atas, tengah dan diameter bawah (Gambar 24). Penurunan tinggi tanaman serta ukuran diameter ini mengindikasikan terjadinya penurunan biomassa atau serat kenaf yang dihasilkan karena ukuran diameter berpengaruh terhadap produksi serat. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa kecenderungan penurunan juga teramati pada karakter diameter kayu (Gambar 25). Kayu merupakan sumber utama penghasil serat berjenis *core fiber* pada tanaman kenaf. Kulit kayu kenaf yang tersusun atas serat berjenis *bast fiber* menghasilkan sepertiga dari total biomassa tanaman. Sehingga serat *core fiber* yang dihasilkan oleh kayu kenaf dapat mencapai dua kali dari *bast fiber* yang dihasilkan (Bastfiber, 2007). Sudjindro (2010) menyebutkan bahwa tanaman kenaf merupakan tanaman serbaguna yang dapat dimanfaatkan daun, batang maupun bijinya. Tetapi, serat merupakan produk utama

dari budidaya tanaman kenaf. Penurunan biomassa yang berakibat pada penurunan produksi serat yang dihasilkan menunjukkan bahwa kenaf hasil mutasi EMS tersebut kurang sesuai jika digunakan sebagai tanaman budidaya penghasil serat.



Gambar 24. Perbandingan diameter batang atas, tengah dan bawah tanaman kenaf (Perbandingan antar genotip untuk diameter atas dinotasikan dengan *abc*, diameter tengah dinotasikan dengan *qrs* dan diameter bawah dinotasikan dengan *xyz*. Notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan berdasarkan Uji Brown Forsythe dan uji lanjutan *Games Howell*, $\alpha = 5\%$. Bar vertikal menunjukkan standar deviasi)



Gambar 25. Perbandingan diameter kayu tanaman kenaf (Notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan berdasarkan Uji *Brown Forsythe* dan uji lanjutan *Games Howell*, $\alpha = 5\%$. Bar vertikal menunjukkan standar deviasi)

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah:

1. Dua jenis primer *matK* yang digunakan dalam penelitian ini tidak berhasil mengamplifikasi gen *matK* pada tanaman kenaf.
2. Polimorfisme gen teramati pada gen *rbcL* dengan adanya 22 kejadian mutasi dan 19 di antaranya merupakan substitusi dari genotip mutan 2 dan mutan 5. Sebagian besar mutasi yang terjadi merupakan transversasi (86%) dan tiga di antaranya menunjukkan substitusi basa yang menjadi ciri khas mutasi oleh EMS, yaitu substitusi basa guanin menjadi timin.
3. Keragaman morfologi tanaman kenaf kontrol dan mutan hanya teramati pada beberapa karakter kuantitatif batang dan daun. Berdasarkan Panduan Karakterisasi Kenaf, perbedaan *character state* terjadi pada karakter tinggi tanaman, diameter batang atas, diameter batang bawah, diameter kayu bawah, jumlah nodus, panjang daun, lebar daun dan panjang tangkai daun. Mutan yang memiliki diversitas tertinggi dengan KR 11 ialah mutan 4 dengan nilai similaritas sebesar 67.5.

5.2. Saran

Saran yang diberikan untuk penelitian berikutnya adalah:

1. Pengamatan diversitas genetik dilakukan menggunakan marka molekuler lain yang memiliki kemampuan diskriminasi spesies yang tinggi dan kemudahan amplifikasi yang tinggi pula
2. Dilakukan penelitian pada kenaf hasil mutasi EMS pada keturunan kedua dan ketiga sehingga diharapkan dapat memperoleh hasil yang lebih stabil dalam menggambarkan efek EMS sebagai mutagen
3. Dilakukan penelitian mengenai karakter fisiologis, terutama yang berkaitan dengan kemampuan fotosintesis dari tanaman kontrol dan tanaman mutan

DAFTAR PUSTAKA

- Arisah, H. 2004. **Pengaruh Genetik dan Hubungan Antar Karakter Morfofisiologi dan Hasil pada Galur-Galur Kenaf**. Skripsi. Jurusan Budidaya Pertanian. Fakultas Pertanian. Universitas Brawijaya.
- Arumingtyas E.L., A. Munawarti dan S. Indriyani. 2005. Konstruksi Varietas Baru Kenaf (*Hibiscus Cannabinus* L.) Melalui Teknik Induksi Mutasi dengan *Ethyl Methane Sulfonate* (EMS). *J. Ilmu-Ilmu Hayati* 17(1): 21-26.
- Atmajayanti, Y. 2004. **Respon Morfologi Tanaman Kenaf (*Hibiscus cannabinus*) terhadap Perlakuan Mutagen Kimia *Ethyl Mthanesulphonate* (EMS)**. Jurusan Biologi. Fakultas MIPA. Universitas Brawijaya.
- Bafeel, S. O., I. A. Arif, M. A. Bakir, H. A. Khan, A. H. Al Farhan, A. Al Homaidan, A Ahamed dan J. Thomas. 2011. Comparative Evaluation of PCR Succes with Universal Primers of Maturase K (matK) and Ribulose-1.5-Biphosphate Carboxylase Oxygenase Large Subunit (*rbcl*) for Barcoding of Some Arid Plants. *Plant Omics Journal* 4(4): 195:198.
- Balittas. 2010. Kenaf. http://balittas.litbang.deptan.go.id/ind/index.php?option=com_ccontent&view=category&layout=blog&id=47&Itemid=69. Tanggal akses 17 Desember 2012.
- Barthet, M. M. 2006. **Expression and Function of the Chloroplast-encoded Gene *matK***. Dissertation submitted to the faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Bastfiber. 2007. What are Bast Fiber? <http://bastfibersllc.com/whatarebastfibers.html>. ?Tanggal akses 6 Desember 2013.
- Campbell, N. A., J. B. Reece, L.A. Urry, M. L. Cain. S. A. Wasserman, P. V. Minorsky dan R. B. Jackson. 2008. **Biology 8th Edition**. Pearson Education Inc. UK.
- CBOL. 2009. A DNA *barcode* for land plants. *PNAS* 106 (31).
- Coetzeer, R. 2004. **Characterization Of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) Cultivars In South Africa**. Faculty of Natural and Agricultural Sciences Department of Plant Sciences: Plant Breeding. University of the Free State. Bloemfontein.
- Cuenoud P., V. Savolainen, L. W. Chatrou, M. Powell, R. J. Grayer dan M. W. Chase. 2002. Molecular phylogenetics of Caryophyllales

- based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* DNA sequences. *American Journal of Bot.* 89: 132–144.
- Cummings, M.P., J. M. Nugent, R. G. Olmstead dan J. D. Palmer. 2003. Phylogenetic Analysis Reveals Five Independent Transfers of the Chloroplast Gene *rbcL* to the Mitochondrial Genome in Angiosperms. *Curr Genet* 43 : 131 – 138.
- Departemen Pertanian Republik Indonesia. 2006. Panduan Pengujian Individual Kebaruan, Keunikan, Keseragaman Dan Kestabilan : Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.).
- Djumali. 2011. Karakter Agronomi yang Berpengaruh terhadap Hasil dan Mutu Rajangan Kering Tembakau Temanggung. *Buletin Tanaman Tembakau, Serat dan Minyak Industri* 3(1):17 – 19.
- Doyle, J. J., dan J. L. Doyle (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Fay, M. F., S. M. Swensen dan M.W. Chase. 1997. Taxonomic Affinities of *Medusagyne oppositifolia* (Medusagynaceae). *Kew Bulletin*, 52 (1): 111-120.
- Fazekas, A. J., K. S. Burgess, P. R. Kesanakurti, S. W. Graham, S. G. Newmaster, B. C. Husband, D. M. Percy, M. Hajibabaei dan S. C. H. Barrett. 2008. Multiple Multilocus DNA *Barcodes* from the Plastid Genome Discriminate Plant Species Equally Well. *PlosOne* 3(7): e2802.
- Foster, P. G. 2009. Maximum Likelihood and Bayesian Analysis in Molecular Phylogenetics. Rio de Janeiro. Brazil.
- Groom, M. J., G. K. Meffe dan C. R. Carroll. 2006. **Principles of Conservation Biology (3rd edition)**. Sinauer Associates. Sunderland. UK.
- Hilu, K. W. dan H. Liang. 1997. The *MatK* Gene: Sequence Variation and Application in Plant Systematic. *American Journal of Bot.* 84 (6) : 830 - 839.
- Hollingsworth, P. M., S. W. Graham dan D. P. Little. 2011. Choosing and Using a Plant DNA *Barcode*. *PlosOne* (6) e19254.
- Hossain, M. D., M. M. Hanafi, H. Jol dan A. H. Hazandy. 2011. Growth, yield and fiber morphology of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) grown on sandy bris soil as influenced by different levels of carbon. *African Journal of Biotech.* 10(50) : 10087 – 10094.

- IHH. 2013. Quantitative and Qualitative Traits. <http://www.ihh.kvl.dk/hkm/kc/popgen/genetics/1/1/sld001.htm>. Tanggal akses 12 Mei 2013.
- Innis, M. A dan D. H. Gelfand. 1990. **PCR Protocol: A Method to PCR Optimization**. Academic Press Inc.
- Kellgog, E. A dan N. D. Juliano. 1997. The Structure and Function Of Rubisco and Their Implications for Systematic Studies. *American Journal of Bot.* 84(3): 413–428.
- Kress, W. J. dan D. L. Erickson. 2007. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcl* Gene Complements the Non-Coding *trnHpsbA* Spacer Region. *PLoS ONE* 2(6): e508.
- Krisnawati, A. 2003. Usahatani Kenaf di Lahan Pasang Surut Kalimantan Tengah. Prosiding Seminar Hasil-Hasil Penelitian dan Pengkajian Teknologi Pertanian.
- Kumar, H. V. A., T. S. Muralidhar dan Munirajappa. 2012. RAPD Analysis of EMS mutagenised Mulberry genotype RFS135. *Scholar Journal of Biotech* 1(1), pp. 1-7.
- Liang, H., dan K. W. Hilu. 1996. Application of the *matK* Gene Sequences to Grass Systematics. *Canadian Journal of Botany* 74: 125–134.
- Li, D. Z., L. M. Gao, H. T. Li, H. Wang, X. J. Ge, J. Q. Liu, Z. D. Chen, S. L. Zhou, S. L. Chen, J. B. Yang, C. X. Fu, C. X. Zeng, H. F. Yan, Y. J. Zhu, Y. S. Shun, S. Y. Chen, L. Zhao, K. Wang, T. Yang dan G. W. Duan. 2011. Comparative Analysis of a Large Dataset Indicates that Internal Transcribed Spacer (ITS) should be Incorporated into the Core Barcode for Seed Plants. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1104551108. Tanggal akses 26 Oktober 2013.
- Mostofa, M. G., M. R. Islam, A. T. M. M. Alam, S. M. M. Ali dan M. A. F. Mollah. 2002. Genetic Variability, Heritability and Correlation Studies in Kenaf (*Hibiscus cannabinus*). *Online Journal of Bio. Sci.* 2 (6) : 422 – 424
- PFAF. 2012. *Hibiscus cannabinus*. <http://www.pfaf/user/edibleuses/H.cannabinus.aspx>. Tanggal akses 9 September 2012.
- Primrose, S. B. dan R. M. Twyman. 2003. **Principles of Genome Analysis and Genomics Third Edition**. Blackwell Publishing. Oxford. UK.

- Purwati, R. D. 2004. Plasma Nutfah Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). **Monograf Balittas**. Departemen Pertanian.
- Rivas, J. D. L., J. J. Lozano dan A. R. Ortiz. 2002. Comparative Analysis of Chloroplast Genomes: Functional Annotation, Genome-Based Phylogeny, and Deduced Evolutionary Patterns. *Genome Res.* 12: 567-583.
- Rustini, S. 2009. Kenaf: Teknologi Pembenihan Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). **Monograf Balittas**. Departemen Pertanian.
- Sambrook, J. dan D. W. Russell. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Edition**. Laboratory Pr. New York.
- Sastrosupadi, A. 1983. Pengaruh Umur dan Lama Penggenangan terhadap Pertumbuhan, Produksi dan Kualitas Kenaf Hc G4. Balai Penelitian Tanaman Industri, Malang.
- Sudjindro. 2007. Kenaf (*Hibiscus cannabinus*) Sebagai Alternatif Bahan Baku Pulp. Tabloid Sinar Tani.
- Sudjindro. 2010. Tanaman Penghasil Mobil. Trubus 483 - Februari 2010/XLI.
- Sunarto, D. A., D. Soetopo dan Sujak. 2008. Hama KEnaf dan Pengendaliannya. **Monograf Balittas**. Departemen Pertanian.
- Sutejo, M. M. 2002. **Pupuk dan Cara Pemupukan**. Penerbit Rineka Cipta. Jakarta.
- Sutjipta, B. D. 2006. Analisis Biaya, Produksi dan R/C Usahatani Kenaf pada Lahan Bonorowo di Desa Pesanggrahan, Kecamatan Laren, Kabupaten Lamongan. *Jurnal Eks.* 3(2) : 205 – 215.
- Taiz, L. dan E. Zeiger. 2004. **Plant Physiology**. Sinauer Publishing. London.
- Thirdayawati, N. S. 2013. **Pengendalian Nematoda Puru Akar (*Meloidogyne* spp.) Hama Tanaman Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) dengan Rotasi Tanaman dan Bakteri Antagonis**. Skripsi. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya.
- Tjitrosoepomo, G. 2007. **Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)**. UGM Press. Yogyakarta.
- USDA. 2006. Why in Genetic Diversity Important?. Why We Care about Genetic Vol. 1. National Forest Genetic Laboratory. USDA Forest Service. USA.
- Wall, D. P. dan J. T. Herbeck. Evolutionary Pattern of Codon Usage in the Chloroplast Gen *rbcl*. *Journal Mol. And Evo.* 56:63:688.

- Wicke, S. dan D. Quandt. 2009. Universal Primers for the Amplification of the Plastid *trnK/matK* region in Land Plants. *Anales Jard. Bot. Madrid* 66(2): 285 - 288.
- Willaume, M., P.E. Lauri dan H. Sinoquet . 2004. Light Interception in Apple Trees Influenced by Canopy Architecture Manipulation. *Trees* 18: 705– 713.
- Yu, J., J. H. Xue dan S.L. Zhou. 2011. New Universal *matK* Primers for DNA Barcoding Angiosperm. *Journal of Syst. and Evo.* 49 (3): 176 – 181.
- Yulianti, T. dan Supriyono. 2007. Penyakit Kenaf dan Pengendaliaanya. **Monograf Balittas**. Departemen Pertanian.



LAMPIRAN

1. Komposisi Bahan

- a. CTAB Buffer ekstrak

CTAB 2%	1 ml
0.1 M TrisCl pH 8	1 ml
3.5 M NaCl	7 ml
PVP 2%	1 ml
20 mM Na ₂ EDTA	0.4 ml
β-mercaptoethanol	200 ul (2% dari volume total)

- b. PCI

Phenol	25 ml
Chloroform	24 ml
Isoamyl alcohol	1 ml

- c. CI

Chloroform	24 ml
Isoamyl alcohol	1 ml

- d. TBE

Tris base	6.05 gram
Na ₂ EDTA	0.372 gram
Boric acid	3.085 gram
Akuades	sampai 1 Liter

- e. TE

Tris base	0.065 gram
Na ₂ EDTA	0.086 gram
Akuades	sampai 50 mililiter

- f. Ammonium asetat 7.5 M

Ammonium asetat	5.78 gram
Akuades	sampai 10 ml

- b. Loading dye

Glycerol 87%	0.5747 ml
Bromophenol blue	0.004 gram
Na ₂ EDTA 0.5 M	0.002 ml
Akuades steril	sampai 1 ml

2. LT1. Penggolongan Karakter Kuantitatif Kenaf

No	Karakter	Ukuran	<i>Character state</i>
1.	Tinggi tanaman	± 75.0 cm 75.1 - 150.0 cm 150.1 – 225.0 cm 225.1 – 300 cm > 300 cm	Sangat pendek Pendek Sedang Tinggi Sangat tinggi
2.	Jumlah nodus	± 30 buku 31 – 60 buku, 61 – 90 buku 91 – 120 buku > 120 buku	Sangat sedikit Sedikit Sedang Banyak Sangat banyak
3.	Sudut daun	(0-20°) (21 - 40° 41 - 60° 61 - 80° 81 - 100° 101 – 120° 121 - 140° 141 - 160° 161 - 180°	Tegak Agak tegak Intermediet Agak intermediet Mendatar Agak mendatar Merunduk Agak merunduk Menggantung
4.	Panjang daun	± 7 cm 7.1 – 11.0 cm > 11 cm	Pendek Sedang Panjang
5.	Lebar daun	± 7 cm 7.1 – 11.0 cm > 11 cm	Sempit Sedang Lebar
6.	Panjang tangkai daun	± 50 mm 50 – 100 mm 101 – 150 mm 151 – 200 mm > 200 mm	Sangat pendek Pendek Sedang Panjang Sangat panjang
7.	Diameter batang atas	< 5 mm 5.1 – 8 mm > 8 mm	Kecil Sedang Besar

Lanjutan

No	Karakter	Ukuran	<i>Character state</i>
8.	Diameter batang tengah	< 13 mm 13.1 – 27 mm > 27 mm	Kecil Sedang Besar
9.	Diameter batang bawah	< 15 mm 15.1 – 30 mm > 30 mm	Kecil Sedang Besar
10.	Diameter batang kayu	< 13 mm 13.1 – 25 mm > 25 mm	Kecil Sedang Besar
11.	Umur berbunga pertama	40 hari 41 – 60 hari 61 – 80 hari 81 – 100 hari > 100 hari	Sangat genjah Genjah Sedang Dalam Sangat dalam
12.	Umur berbunga 50%	± 50 hari 51 – 100 hari 101 – 150 hari 151 – 200 hari > 200 hari	Sangat genjah Genjah Sedang Dalam Sangat dalam
13.	Jumlah buah	< 20 buah 21 – 40 buah > 40 buah	Sedikit Sedang Banyak
14.	Posisi buku buah pertama	< 15 buku 16 – 30 buku > 30 buku	Bawah Tengah Atas
15.	Ukuran biji	< 20 gram 20 – 25 gram > 25 gram	Kecil Sedang besar
16.	Kandungan serat	< 4.0 4.1 – 5 > 5	Rendah Sedang tinggi
17.	Kekuatan serat	20 gram/tex 20 – 24 gram/tex > 24 gram/tex	Rendah Sedang tinggi

3. LT2. Penggolongan Karakter Kualitatif Kenaf

No	Karakter	<i>Character state</i>
1.	warna batang	Hijau Hijau kemerahan Hijau kecoklatan Merah Coklat
2.	tekstur batang	Halus Berbulu Berduri
3.	warna helaian daun	Hijau Hijau kemerahan Hijau kecoklatan Merah Coklat
4.	warna tulang daun	Hijau Hijau kemerahan Hijau kecoklatan Merah Coklat
5.	warna tepi daun	Hijau Hijau kemerahan Hijau kecoklatan Merah Coklat
6.	warna tangkai daun	Hijau Hijau kemerahan Hijau kecoklatan Merah Coklat
7.	Keberadaan daun penumpu	Ada Tidak ada
8.	Keberadaan bulu daun	Ada Tidak ada
9.	Bentuk daun	Berlekuk menjari Bercangap menjari Berbagi menjari oval

Lanjutan

No	Karakter	Character state
10.	Keberadaan cabang	Ada Tidak ada
11.	warna kuncup bunga	Hijau Kuning Merah Ungu
12.	Warna mahkota bagian luar	Krem Merah Ungu
13.	Warna mahkota bagian dalam	Kuning Merah Ungu
14.	Tipe Batang	Silindris Kerucut
15.	Tekstur buah :	Halus Berbulu halus Berbulu kasar
16.	Warna buah	Hijau Kuning Merah
17.	Bentuk biji	Ginjal Agak ginjal Bersudut
18.	Warna biji	abu-abu coklat coklat kemerahan ungu biru
19.	Kepekaan terhadap cahaya	Tidak peka Agak peka peka

4. LT3. Rata-rata Data Kuantitatif Karakter Morfologi

Karakter	KR 11	Mutan 1	Mutan 2	Mutan 3	Mutan 4	Mutan 5
Tinggi tanaman (cm)	274	246.35	239.15	253.44	208.5	256
Diameter atas (mm)	4.84	4.62	4.63	5.63	3.40	4.90
Diameter tengah (mm)	10.91	9.24	9.42	10.06	7.04	10.02
Diameter bawah (mm)	18.82	15.92	16.17	16.11	12.46	16.29
Diameter kayu (mm)	14.62	12.55	13.98	13.39	10.37	13.60
Jumlah nodus (buah)	58	55	51	64	37	61
Panjang daun (cm)	17.68	12.99	12.58	11.83	9.26	9.13
Lebar daun (cm)	25.49	17.34	17.52	14.20	11	7.79
Panjang tangkai daun (cm)	24.00	18.28	17.03	13.80	14.62	16.4
Sudut daun (°)	87.43	87.13	94.07	95.57	92.95	98

5. Skoring Karakter Kuantitatif

No	Karakter	Ukuran	<i>Character state</i>	KR 11	Mutan 1	Mutan 2	Mutan 3	Mutan 4	Mutan 5
1.	Tinggi tanaman	± 75.0 cm	Sangat pendek	0	0	0	0	0	0
		75.1 - 150.0 cm	Pendek	0	0	0	0	0	0
		150.1 – 225.0 cm	Sedang	0	0	0	0	1	0
		225.1 – 300 cm	Tinggi	1	1	1	1	0	1
		> 300 cm	Sangat tinggi	0	0	0	0	0	0
2.	Jumlah nodus	± 30 buku	Sangat sedikit	0	0	0	0	0	0
		31 – 60 buku,	Sedikit	1	1	1	0	1	0
		61 – 90 buku	Sedang	0	0	0	1	0	1
		91 – 120 buku	Banyak	0	0	0	0	0	0
		> 120 buku	Sangat banyak	0	0	0	0	0	0
3.	Sudut daun	(0-20°)	Tegak	0	0	0	0	0	0
		(21 - 40°)	Agak tegak	0	0	0	0	0	0
		41 - 60°	Intermediet	0	0	0	0	0	0
			Agak intermediet	0	0	0	0	0	0
		61 - 80°	Mendatar	1	1	1	1	1	1
		81 - 100°	Agak mendatar	0	0	0	0	0	0
		101 – 120°	Merunduk	0	0	0	0	0	0
		121 - 140°	Agak merunduk	0	0	0	0	0	0
		141 - 160°	Menggantung	0	0	0	0	0	0
161 - 180°									

Lanjutan

No	Karakter	Ukuran	<i>Character state</i>	KR 11	Mutan 1	Mutan 2	Mutan 3	Mutan 4	Mutan 5
4.	Panjang daun	± 7 cm	Pendek	0	0	0	0	0	0
		7.1 – 11.0 cm	Sedang	0	0	0	0	1	1
		> 11 cm	Panjang	1	1	1	1	0	0
5.	Lebar daun	± 7 cm	Sempit	0	0	0	0	0	0
		7.1 – 11.0 cm	Sedang	0	0	0	0	1	1
		> 11 cm	Lebar	1	1	1	1	0	0
6.	Panjang tangkai daun	± 50 mm	Sangat pendek	0	0	0	0	0	0
		50 – 100 mm	Pendek	0	0	0	0	0	0
		101 – 150 mm	Sedang	0	0	0	0	1	1
		151 – 200 mm	Panjang	0	1	1	1	0	0
		> 200 mm	Sangat panjang	1	0	0	0	0	0
7.	Diameter batang atas	< 5 mm	Kecil	1	1	1	0	1	1
		5.1 – 8 mm	Sedang	0	0	0	1	0	0
		> 8 mm	Besar	0	0	0	0	0	0
8.	Diameter batang tengah	< 13 mm	Kecil	1	1	1	1	1	1
		13.1 – 27 mm	Sedang	0	0	0	0	0	0
		> 27 mm	Besar	0	0	0	0	0	0
9.	Diameter batang bawah	< 15 mm	Kecil	0	0	0	0	1	0
		15.1 – 30 mm	Sedang	1	1	1	1	0	1
		> 30 mm	Besar	0	0	0	0	0	0

Lanjutan

No	Karakter	Ukuran	<i>Character state</i>	KR 11	Mutan 1	Mutan 2	Mutan 3	Mutan 4	Mutan 5
10.	Diameter batang kayu	< 13 mm 13.1 – 25 mm > 25 mm	Kecil Sedang Besar	0 1 0	0 1 0	0 1 0	0 1 0	1 0 0	0 1 0



6. Skoring Karakter Kualitatif

No	Karakter	Character state	KR 11	Mutan 1	Mutan 2	Mutan 3	Mutan 4	Mutan 5
1.	warna batang	Hijau	1	1	1	1	1	1
		Hijau kemerahan	0	0	0	0	0	0
		Hijau kecoklatan	0	0	0	0	0	0
		Merah	0	0	0	0	0	0
		Coklat	0	0	0	0	0	0
2.	tekstur batang	Halus	0	0	0	0	0	0
		Berbulu	0	0	0	0	0	0
		Berduri	1	1	1	1	1	1
3.	warna helaian daun	Hijau	1	1	1	1	1	1
		Hijau kemerahan	0	0	0	0	0	0
		Hijau kecoklatan	0	0	0	0	0	0
		Merah	0	0	0	0	0	0
		Coklat	0	0	0	0	0	0
4.	warna tulang daun	Hijau	1	1	1	1	1	1
		Hijau kemerahan	0	0	0	0	0	0
		Hijau kecoklatan	0	0	0	0	0	0
		Merah	0	0	0	0	0	0
		Coklat	0	0	0	0	0	0
5.	warna tepi daun	Hijau	1	1	1	1	1	1
		Hijau kemerahan	0	0	0	0	0	0
		Hijau kecoklatan	0	0	0	0	0	0
		Merah	0	0	0	0	0	0

Lanjutan

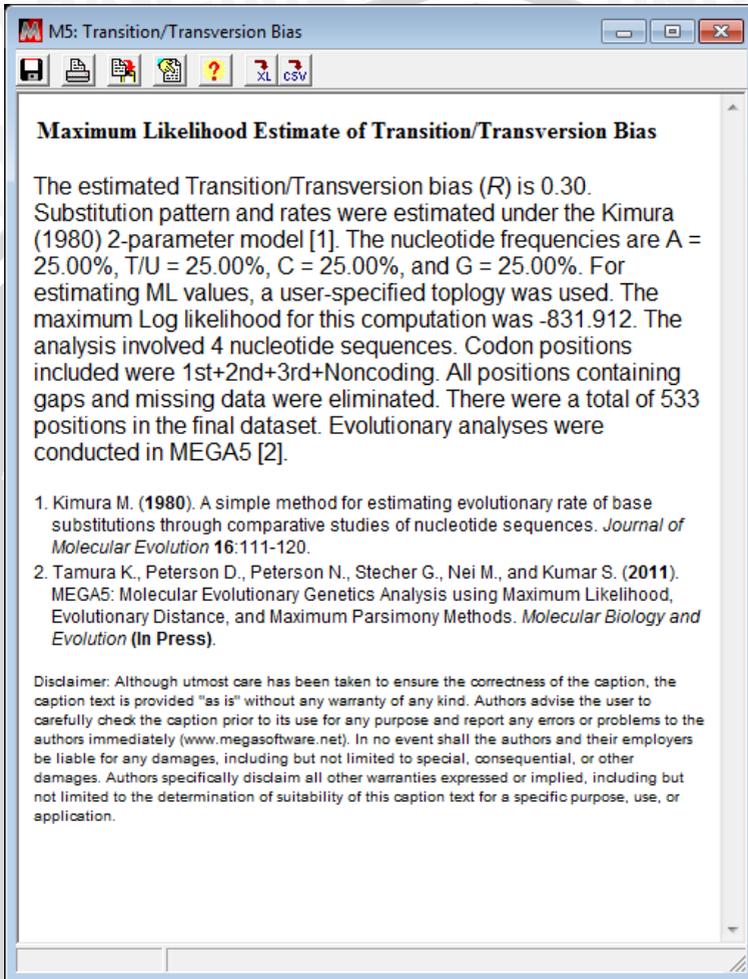
No	Karakter	Character state	KR 11	Mutan 1	Mutan 2	Mutan 3	Mutan 4	Mutan 5
6.	warna tangkai daun	Hijau	1	1	1	1	1	1
		Hijau kemerahan	0	0	0	0	0	0
		Hijau kecoklatan	0	0	0	0	0	0
		Merah	0	0	0	0	0	0
		Coklat	0	0	0	0	0	0
7.	Keberadaan daun penumpu	Ada	1	1	1	1	1	1
		Tidak ada	0	0	0	0	0	0
8.	Keberadaan bulu daun	Ada	0	0	0	0	0	0
		Tidak ada	1	1	1	1	1	1
9.	Bentuk daun	Berlekuk menjari	0	0	0	0	0	0
		Bercangap menjari	0	0	0	0	0	0
		Berbagi menjari	1	1	1	1	1	1
		oval	0	0	0	0	0	0
10.	Keberadaan cabang	Ada	0	0	0	0	0	0
		Tidak ada	1	1	1	1	1	1
11.	warna kuncup bunga	Hijau	1	1	1	1	1	1
		Kuning	0	0	0	0	0	0
		Merah	0	0	0	0	0	0
		Ungu	0	0	0	0	0	0

Lanjutan

No	Karakter	<i>Character state</i>	KR 11	Mutan 1	Mutan 2	Mutan 3	Mutan 4	Mutan 5
12.	Warna mahkota bagian luar	Krem	0	0	0	0	0	0
		Merah	0	0	0	0	0	0
		Ungu	0	0	0	0	0	0
		Putih*	1	1	1	1	1	1
13.	Warna mahkota bagian dalam	Kuning	0	0	0	0	0	0
		Merah	1	1	1	1	1	1
		Ungu	0	0	0	0	0	0
14.	Tipe Batang	Silindris	0	0	0	0	0	0
		Kerucut	1	1	1	1	1	1

Keterangan : * tidak terdaftar dalam Panduan Karakterisasi Kenaf, Departemen Pertanian

7. Hasil Analisa Molekuler



M5: Substitution Matrix

Maximum Likelihood Estimate of Substitution Matrix

	A	T/U	C	G
A	-	<i>9.62</i>	<i>9.62</i>	5.75
T/U	<i>9.62</i>	-	5.75	<i>9.62</i>
C	<i>9.62</i>	5.75	-	<i>9.62</i>
G	5.75	<i>9.62</i>	<i>9.62</i>	-

NOTE.-- Each entry is the probability of substitution (r) from one base (row) to another base (column). Substitution pattern and rates were estimated under the Kimura (1980) 2-parameter model [1]. Rates of different transitional substitutions are shown in **bold** and those of transversionsal substitutions are shown in *italics*. Relative values of instantaneous r should be considered when evaluating them. For simplicity, sum of r values is made equal to 100. The nucleotide frequencies are A = 25.00%, T/U = 25.00%, C = 25.00%, and G = 25.00%. For estimating ML values, a user-specified topology was used. The maximum Log likelihood for this computation was -831.912. The analysis involved 4 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 533 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5 [2].

1. Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
2. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (In Press).

Disclaimer: Although utmost care has been taken to ensure the correctness of the caption, the caption text is provided "as is" without any warranty of any kind. Authors advise the user to carefully check the caption prior to its use for any purpose and report any errors or problems to the authors immediately (www.megasoftware.net). In no event shall the authors and their employers be liable for any damages, including but not limited to special, consequential, or other damages. Authors specifically disclaim all other warranties expressed or implied, including but not limited to the determination of suitability of this caption text for a specific purpose, use, or application.

8. Analisa Statistik Data Morfologi

1. Sudut Daun

1.1. Uji normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		sudut_daun
N		20
Normal Parameters ^a	Mean	92.2850
	Std. Deviation	9.38843
Most Extreme Differences	Absolute	.115
	Positive	.115
	Negative	-.082
Kolmogorov-Smirnov Z		.516
Asymp. Sig. (2-tailed)		.953

a. Test distribution is Normal.

1.2. Uji homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

sudut_daun

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.338	5	14	.014

1.3. Uji Beda

Robust Tests of Equality of Means

sudut_daun	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Brown-Forsythe	.817	5	6.594	.576

a. Asymptotically F distributed.

Multiple Comparisons

sudut_daun
Games-Howell

(I) Genotype	(J) Genotype	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KR 11	0.05 (3) 1	.30417	5.40694	1.000	-27.3244	27.9328
	0.05 (3) 2	-6.63250	4.70356	.722	-24.5257	11.2607
	0.05 (4)	-8.13750	8.98830	.925	-52.8614	36.5864
	0.1	-5.51250	2.87108	.519	-21.7640	10.7390
	0.3	-10.56250	2.86715	.150	-26.8568	5.7318
0.05 (3) 1	KR 11	-.30417	5.40694	1.000	-27.9328	27.3244
	0.05 (3) 2	-6.93667	5.90909	.832	-33.2688	19.3954
	0.05 (4)	-8.44167	9.67385	.937	-52.0008	35.1175
	0.1	-5.81667	4.58660	.790	-43.7789	32.1456
	0.3	-10.86667	4.58415	.430	-48.9032	27.1699
0.05 (3) 2	KR 11	6.63250	4.70356	.722	-11.2607	24.5257
	0.05 (3) 1	6.93667	5.90909	.832	-19.3954	33.2688
	0.05 (4)	-1.50500	9.29902	1.000	-44.7846	41.7746
	0.1	1.12000	3.73168	.999	-16.5458	18.7858
	0.3	-3.93000	3.72866	.878	-21.6119	13.7519
0.05 (4)	KR 11	8.13750	8.98830	.925	-36.5864	52.8614
	0.05 (3) 1	8.44167	9.67385	.937	-35.1175	52.0008
	0.05 (3) 2	1.50500	9.29902	1.000	-41.7746	44.7846
	0.1	2.62500	8.52006	.999	-45.7731	51.0231
	0.3	-2.42500	8.51874	.999	-50.8377	45.9877
0.1	KR 11	5.51250	2.87108	.519	-10.7390	21.7640
	0.05 (3) 1	5.81667	4.58660	.790	-32.1456	43.7789
	0.05 (3) 2	-1.12000	3.73168	.999	-18.7858	16.5458
	0.05 (4)	-2.62500	8.52006	.999	-51.0231	45.7731
	0.3	-5.05000	.15000	.042	-9.3359	-.7641
0.3	KR 11	10.56250	2.86715	.150	-5.7318	26.8568
	0.05 (3) 1	10.86667	4.58415	.430	-27.1699	48.9032
	0.05 (3) 2	3.93000	3.72866	.878	-13.7519	21.6119
	0.05 (4)	2.42500	8.51874	.999	-45.9877	50.8377
	0.1	5.05000	.15000	.042	.7641	9.3359

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

2. Tinggi Tanaman

2.1. Uji normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Tinggi_tanaman
N		53
Normal Parameters ^a	Mean	246.0189
	Std. Deviation	46.41348
Most Extreme Differences	Absolute	.087
	Positive	.087
	Negative	-.048
Kolmogorov-Smirnov Z		.632
Asymp. Sig. (2-tailed)		.820

a. Test distribution is Normal.

2.2. Uji homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Tinggi_tanaman

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.539	5	47	.009

2.3. Uji Beda

Robust Tests of Equality of Means

Tinggi_tanaman

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Brown-Forsythe	2.490	5	32.848	.051

a. Asymptotically F distributed.

Multiple Comparisons

Tinggi_tanaman
Games-Howell

(I) Genotype	(J) Genotype	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KR 11	0.05% 3(1)	27.65000	26.40350	.895	-57.2836	112.5836
	0.05% 3(2)	34.85000	22.53738	.645	-42.4250	112.1250
	0.05% (4)	20.56250	24.86668	.957	-61.0069	102.1319
	0.1%	65.50000	24.71403	.148	-15.5493	146.5493
	0.3%	17.33333	24.46767	.978	-63.7970	98.4636
0.05% 3(1)	KR 11	-27.65000	26.40350	.895	-112.5836	57.2836
	0.05% 3(2)	7.20000	16.64033	.998	-48.4883	62.8883
	0.05% (4)	-7.08750	19.68041	.999	-70.5500	56.3750
	0.1%	37.85000	19.48718	.413	-24.6918	100.3918
	0.3%	-10.31667	19.17377	.993	-73.2086	52.5753
0.05% 3(2)	KR 11	-34.85000	22.53738	.645	-112.1250	42.4250
	0.05% 3(1)	-7.20000	16.64033	.998	-62.8883	48.4883
	0.05% (4)	-14.28750	14.07507	.903	-62.3999	33.8249
	0.1%	30.65000	13.80359	.294	-15.4045	76.7045
	0.3%	-17.51667	13.35749	.773	-65.8760	30.8427
0.05% (4)	KR 11	-20.56250	24.86668	.957	-102.1319	61.0069
	0.05% 3(1)	7.08750	19.68041	.999	-56.3750	70.5500
	0.05% 3(2)	14.28750	14.07507	.903	-33.8249	62.3999
	0.1%	44.93750	17.34812	.160	-11.4894	101.3644
	0.3%	-3.22917	16.99531	1.000	-60.4103	53.9520
0.1%	KR 11	-65.50000	24.71403	.148	-146.5493	15.5493
	0.05% 3(1)	-37.85000	19.48718	.413	-100.3918	24.6918
	0.05% 3(2)	-30.65000	13.80359	.294	-76.7045	15.4045
	0.05% (4)	-44.93750	17.34812	.160	-101.3644	11.4894
	0.3%	-48.16667	16.77117	.109	-104.1010	7.7677
0.3%	KR 11	-17.33333	24.46767	.978	-98.4636	63.7970
	0.05% 3(1)	10.31667	19.17377	.993	-52.5753	73.2086
	0.05% 3(2)	17.51667	13.35749	.773	-30.8427	65.8760
	0.05% (4)	3.22917	16.99531	1.000	-53.9520	60.4103
	0.1%	48.16667	16.77117	.109	-7.7677	104.1010

3. Diameter Atas
3.1. Uji normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Diameter_atas
N		53
Normal Parameters ^a	Mean	4.6658
	Std. Deviation	1.69632
Most Extreme Differences	Absolute	.101
	Positive	.075
	Negative	-.101
Kolmogorov-Smirnov Z		.739
Asymp. Sig. (2-tailed)		.646

a. Test distribution is Normal.

3.2. Uji homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Diameter_atas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.476	5	47	.009

3.3. Uji Beda

Robust Tests of Equality of Means

Diameter_atas	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Brown-Forsythe	1.826	5	36.621	.132

a. Asymptotically F distributed.

Multiple Comparisons

Diameter_atas
Games-Howell

(I) Genotype	(J) Genotype	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KR 11	0.05% 3(1)	.31700	.85528	.999	-2.5347	3.1687
	0.05% 3(2)	.31800	.90267	.999	-2.6275	3.2635
	0.05% (4)	-.69750	.91980	.970	-3.6972	2.3022
	0.1%	1.53722	.94087	.590	-1.5069	4.5813
	0.3%	-.05667	.93872	1.000	-3.1396	3.0263
0.05% 3(1)	KR 11	-.31700	.85528	.999	-3.1687	2.5347
	0.05% 3(2)	.00100	.57711	1.000	-1.8458	1.8478
	0.05% (4)	-1.01450	.60355	.565	-3.0073	.9783
	0.1%	1.22022	.63521	.429	-.8583	3.2988
	0.3%	-.37367	.63201	.989	-2.5927	1.8454
0.05% 3(2)	KR 11	-.31800	.90267	.999	-3.2635	2.6275
	0.05% 3(1)	-.00100	.57711	1.000	-1.8478	1.8458
	0.05% (4)	-1.01550	.66901	.659	-3.1815	1.1505
	0.1%	1.21922	.69771	.522	-1.0234	3.4619
	0.3%	-.37467	.69480	.993	-2.7180	1.9686
0.05% (4)	KR 11	.69750	.91980	.970	-2.3022	3.6972
	0.05% 3(1)	1.01450	.60355	.565	-.9783	3.0073
	0.05% 3(2)	1.01550	.66901	.659	-1.1505	3.1815
	0.1%	2.23472	.71973	.065	-.1037	4.5731
	0.3%	.64083	.71691	.940	-1.7902	3.0719
0.1%	KR 11	-1.53722	.94087	.590	-4.5813	1.5069
	0.05% 3(1)	-1.22022	.63521	.429	-3.2988	.8583
	0.05% 3(2)	-1.21922	.69771	.522	-3.4619	1.0234
	0.05% (4)	-2.23472	.71973	.065	-4.5731	.1037
	0.3%	-1.59389	.74376	.328	-4.0804	.8926
0.3%	KR 11	.05667	.93872	1.000	-3.0263	3.1396
	0.05% 3(1)	.37367	.63201	.989	-1.8454	2.5927
	0.05% 3(2)	.37467	.69480	.993	-1.9686	2.7180
	0.05% (4)	-.64083	.71691	.940	-3.0719	1.7902
	0.1%	1.59389	.74376	.328	-.8926	4.0804

4. Diameter Tengah

4.1. Uji normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Diameter_tengah
N		53
Normal Parameters ^a	Mean	9.4274
	Std. Deviation	2.80518
Most Extreme Differences	Absolute	.149
	Positive	.149
	Negative	-.094
Kolmogorov-Smirnov Z		1.087
Asymp. Sig. (2-tailed)		.188

a. Test distribution is Normal.

4.2. Uji homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Diameter_tengah

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6.816	5	47	.000

4.3. Uji Beda

Robust Tests of Equality of Means

Diameter_tengah

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Brown-Forsythe	2.414	5	27.251	.062

a. Asymptotically F distributed.

Multiple Comparisons

Diameter_tengah
Games-Howell

(I) Genotype	(J) Genotype	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KR 11	0.05% 3(1)	1.66700	1.54763	.881	-3.5238	6.8578
	0.05% 3(2)	1.48600	1.55940	.924	-3.7240	6.6960
	0.05% (4)	.90525	1.71598	.994	-4.6699	6.4804
	0.1%	3.86678	1.50334	.184	-1.2631	8.9966
	0.3%	.82567	1.55644	.994	-4.4034	6.0547
0.05% 3(1)	KR 11	-1.66700	1.54763	.881	-6.8578	3.5238
	0.05% 3(2)	-.18100	.87193	1.000	-2.9527	2.5907
	0.05% (4)	-.76175	1.12833	.982	-4.5429	3.0194
	0.1%	2.19978	.76718	.095	-.2626	4.6622
	0.3%	-.84133	.86663	.919	-3.7300	2.0474
0.05% 3(2)	KR 11	-1.48600	1.55940	.924	-6.6960	3.7240
	0.05% 3(1)	.18100	.87193	1.000	-2.5907	2.9527
	0.05% (4)	-.58075	1.14443	.995	-4.3950	3.2335
	0.1%	2.38078	.79066	.074	-.1622	4.9237
	0.3%	-.66033	.88749	.972	-3.6054	2.2847
0.05% (4)	KR 11	-.90525	1.71598	.994	-6.4804	4.6699
	0.05% 3(1)	.76175	1.12833	.982	-3.0194	4.5429
	0.05% 3(2)	.58075	1.14443	.995	-3.2335	4.3950
	0.1%	2.96153	1.06678	.140	-.7182	6.6413
	0.3%	-.07958	1.14039	1.000	-3.9465	3.7874
0.1%	KR 11	-3.86678	1.50334	.184	-8.9966	1.2631
	0.05% 3(1)	-2.19978	.76718	.095	-4.6622	.2626
	0.05% 3(2)	-2.38078	.79066	.074	-4.9237	.1622
	0.05% (4)	-2.96153	1.06678	.140	-6.6413	.7182
	0.3%	-3.04111	.78481	.026	-5.7495	-.3327
0.3%	KR 11	-.82567	1.55644	.994	-6.0547	4.4034
	0.05% 3(1)	.84133	.86663	.919	-2.0474	3.7300
	0.05% 3(2)	.66033	.88749	.972	-2.2847	3.6054
	0.05% (4)	.07958	1.14039	1.000	-3.7874	3.9465
	0.1%	3.04111	.78481	.026	.3327	5.7495

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

5. Diameter Bawah

5.1. Uji normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Diameter_bawah
N		53
Normal Parameters ^a	Mean	15.9989
	Std. Deviation	3.80356
Most Extreme Differences	Absolute	.126
	Positive	.126
	Negative	-.068
Kolmogorov-Smirnov Z		.915
Asymp. Sig. (2-tailed)		.373

a. Test distribution is Normal.

5.2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Diameter_bawah

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
14.591	5	47	.000

5.3. Uji Beda

Robust Tests of Equality of Means

Diameter_bawah

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Brown-Forsythe	3.665	5	17.575	.019

a. Asymptotically F distributed.

Multiple Comparisons

Diameter_bawah
Games-Howell

(I) Genotype	(J) Genotype	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KR 11	0.05% 3(1)	2.90000	2.22972	.779	-4.7509	10.5509
	0.05% 3(2)	2.65100	2.22331	.831	-4.9930	10.2950
	0.05% (4)	2.71300	2.29245	.836	-5.0275	10.4535
	0.1%	6.36633	2.21814	.121	-1.2735	14.0062
	0.3%	2.52800	2.21215	.853	-5.1113	10.1673
0.05% 3(1)	KR 11	-2.90000	2.22972	.779	-10.5509	4.7509
	0.05% 3(2)	-.24900	.89969	1.000	-3.1086	2.6106
	0.05% (4)	-.18700	1.05908	1.000	-3.6617	3.2877
	0.1%	3.46633	.88684	.012	.6296	6.3031
	0.3%	-.37200	.87175	.998	-3.2462	2.5022
0.05% 3(2)	KR 11	-2.65100	2.22331	.831	-10.2950	4.9930
	0.05% 3(1)	.24900	.89969	1.000	-2.6106	3.1086
	0.05% (4)	.06200	1.04552	1.000	-3.3794	3.5034
	0.1%	3.71533	.87060	.006	.9303	6.5004
	0.3%	-.12300	.85522	1.000	-2.9488	2.7028
0.05% (4)	KR 11	-2.71300	2.29245	.836	-10.4535	5.0275
	0.05% 3(1)	.18700	1.05908	1.000	-3.2877	3.6617
	0.05% 3(2)	-.06200	1.04552	1.000	-3.5034	3.3794
	0.1%	3.65333	1.03448	.034	.2270	7.0797
	0.3%	-.18500	1.02157	1.000	-3.6355	3.2655
0.1%	KR 11	-6.36633	2.21814	.121	-14.0062	1.2735
	0.05% 3(1)	-3.46633	.88684	.012	-6.3031	-.6296
	0.05% 3(2)	-3.71533	.87060	.006	-6.5004	-.9303
	0.05% (4)	-3.65333	1.03448	.034	-7.0797	-.2270
	0.3%	-3.83833	.84169	.006	-6.6465	-1.0302
0.3%	KR 11	-2.52800	2.21215	.853	-10.1673	5.1113
	0.05% 3(1)	.37200	.87175	.998	-2.5022	3.2462
	0.05% 3(2)	.12300	.85522	1.000	-2.7028	2.9488
	0.05% (4)	.18500	1.02157	1.000	-3.2655	3.6355
	0.1%	3.83833	.84169	.006	1.0302	6.6465

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

6. Diameter Kayu Batang Bawah

6.1. Uji normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Diameter_kayu
N		53
Normal Parameters ^a	Mean	13.0928
	Std. Deviation	3.02125
Most Extreme Differences	Absolute	.101
	Positive	.101
	Negative	-.074
Kolmogorov-Smirnov Z		.735
Asymp. Sig. (2-tailed)		.653

a. Test distribution is Normal.

6.2. Uji homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Diameter_kayu

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.987	5	47	.000

6.3. Uji Beda

Robust Tests of Equality of Means

Diameter_kayu	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Brown-Forsythe	2.871	5	25.757	.034

a. Asymptotically F distributed.

Multiple Comparisons

Diameter_kayu
Games-Howell

(I) Genotype	(J) Genotype	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KR 11	0.05% 3(1)	2.07600	1.63179	.794	-3.4872	7.6392
	0.05% 3(2)	.64100	1.69001	.999	-5.0070	6.2890
	0.05% (4)	1.22850	1.80589	.981	-4.6766	7.1336
	0.1%	4.25433	1.68194	.189	-1.3842	9.8929
	0.3%	.95100	1.64091	.990	-4.6363	6.5383
0.05% 3(1)	KR 11	-2.07600	1.63179	.794	-7.6392	3.4872
	0.05% 3(2)	-1.43500	.85844	.567	-4.1840	1.3140
	0.05% (4)	-.84750	1.06865	.963	-4.4798	2.7848
	0.1%	2.17833	.84243	.159	-.5436	4.9003
	0.3%	-1.12500	.75722	.679	-3.6531	1.4031
0.05% 3(2)	KR 11	-.64100	1.69001	.999	-6.2890	5.0070
	0.05% 3(1)	1.43500	.85844	.567	-1.3140	4.1840
	0.05% (4)	.58750	1.15560	.995	-3.2234	4.3984
	0.1%	3.61333	.95031	.015	.5733	6.6534
	0.3%	.31000	.87566	.999	-2.5645	3.1845
0.05% (4)	KR 11	-1.22850	1.80589	.981	-7.1336	4.6766
	0.05% 3(1)	.84750	1.06865	.963	-2.7848	4.4798
	0.05% 3(2)	-.58750	1.15560	.995	-4.3984	3.2234
	0.1%	3.02583	1.14375	.154	-.7693	6.8210
	0.3%	-.27750	1.08253	1.000	-3.9776	3.4226
0.1%	KR 11	-4.25433	1.68194	.189	-9.8929	1.3842
	0.05% 3(1)	-2.17833	.84243	.159	-4.9003	.5436
	0.05% 3(2)	-3.61333	.95031	.015	-6.6534	-.5733
	0.05% (4)	-3.02583	1.14375	.154	-6.8210	.7693
	0.3%	-3.30333	.85997	.020	-6.1561	-.4506
0.3%	KR 11	-.95100	1.64091	.990	-6.5383	4.6363
	0.05% 3(1)	1.12500	.75722	.679	-1.4031	3.6531
	0.05% 3(2)	-.31000	.87566	.999	-3.1845	2.5645
	0.05% (4)	.27750	1.08253	1.000	-3.4226	3.9776
	0.1%	3.30333	.85997	.020	.4506	6.1561

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

9. Foto Pengamatan

9.1. Batang bawah tanaman kenaf 6 genotip



9.2. Bentuk daun kenaf





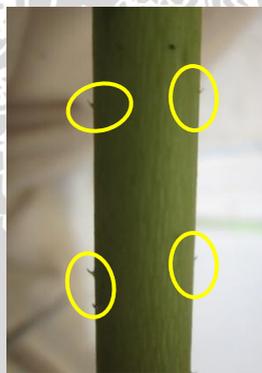
9.3. Daun penumpu tanaman kenaf



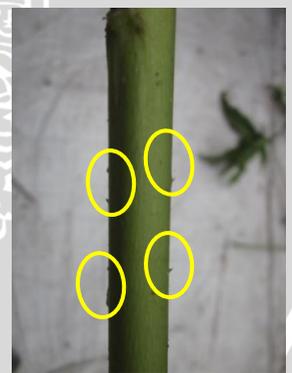
9.4. Duri pada batang tanaman kenaf



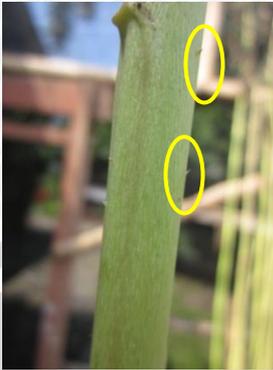
KR 11



Mutan 1



Mutan 2



Mutan 3



Mutan 4



Mutan 5

9.5. Bunga kenaf



9.6. Buah dan biji kenaf



9.7. Tanaman kenaf sebelum serangan hama



9.8. Tanaman kenaf setelah serangan hama

