

**KARAKTERISASI FAMILI FAKTOR TRANSKRIPSI C2H2-ZFP DAN
SITUS PENGIKATANNYA SECARA *in silico* SERTA VALIDASI
PADA TANAMAN MELON TERHADAP
CEKAMAN SALINITAS**

SKRIPSI

Oleh:

SATRIA ARDHANA KUSUMA ADI



**PROGRAM STUDI S-1 AGROEKOTEKNOLOGI
FAKULTAS PETERNAKAN DAN PERTANIAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2025**

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia merupakan negara kepulauan yang memiliki luas daerah laut yang sangat luas dan variabilitas curah hujan yang tinggi sehingga dapat menyebabkan beberapa daerah di pesisir atau daerah dekat dengan pantai memiliki air tanah yang mengandung garam. Daerah di sepanjang jalan Pantura (Pantai Utara) menjadi daerah yang memiliki kondisi salinitas cukup tinggi mencapai 6 dS/m seperti daerah Indramayu, Sindang, Cantigi, dan Losarang serta daerah di Jawa Barat (Karolinoerita dan Yusuf, 2020). Air tanah yang salin sangat berpengaruh dalam pertumbuhan tanaman melon, karena tanaman melon sensitif dengan cekaman salinitas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan tanaman, hasil buah, kadar air relatif, kerapatan stomata, dan kandungan klorofil pada tanaman melon mengalami penurunan setelah diberikan perlakuan cekaman dibandingkan dengan tanpa cekaman salinitas (Kaya *et al.*, 2007).

Upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan produksi melon pada kondisi tanah dan air irigasi yang menyebabkan cekaman salinitas, yaitu diawali dengan eksplorasi gen, faktor transkripsi, dan regulator terkait yang dapat berasosiasi dengan cekaman salinitas. Faktor transkripsi merupakan senyawa protein yang dapat berikatan dengan gen yang merespon cekaman salinitas dalam proses transkripsi sebagai koaktivator untuk mengaktifkan proses transkripsi dan korepresor untuk menekan transkripsi. Hasil penelitian pada faktor transkripsi

yang dipengaruhi oleh kokain menunjukkan bahwa faktor transkripsi dapat berperan untuk mengontrol aktivitas transkripsi banyak gen target yang terkait dengan plastisitas dan dapat berperan sebaliknya untuk mengatur sifat menguntungkan kokain dan potensi kecanduannya (Gonzalez-Nunez and Rodriguez, 2017).

Kegiatan eksplorasi faktor transkripsi dapat dilakukan secara komputasi (*in silico*) dengan menggunakan beberapa aplikasi dan situs untuk memprediksi fungsi suatu faktor transkripsi. metode *in silico* merupakan metode yang merujuk pada eksperimen atau analisis yang dilakukan melalui simulasi komputer untuk memprediksi atau menganalisis proses biologi. Dalam konteks identifikasi famili faktor transkripsi, analisis *in silico* dapat mencakup berbagai teknik komputasi untuk mengidentifikasi dan mengklasifikasikan faktor transkripsi, prediksi interaksi gen target, hingga analisis ekspresi gen. Dalam penelitian terkait salah satu anggota faktor transkripsi C2H2-ZFP yaitu MmZFP1 terekspresi pada tanaman *Mikania micrantha* pada kondisi kekeringan dan salinitas tinggi (Zhou *et al.* 2015).

Eksplorasi faktor transkripsi dapat dilakukan dengan menggunakan sekuen faktor transkripsi yang sudah terbukti mampu meregulasi gen yang merespon salinitas seperti pada tanaman *Citrus clementina*. Faktor transkripsi C2H2-ZFP yang mampu untuk meregulasi gen yang merespon cekaman salinitas salah satunya yaitu faktor transkripsi CicleC2H2ZFP1 (Ciclev10001255m) (Xie *et al.*, 2017). Faktor transkripsi target dapat ditentukan kesamaan fungsi dengan faktor transkripsi pembanding dengan cara melihat hubungan kekerabatan dan kemiripan

pada motif sekuen proteinnya. Faktor transkripsi atau gen yang berada dalam subfamili dengan garis keturunan yang sama dan memiliki kemiripan pada motif proteinnya terindikasi memiliki fungsi yang serupa (Shen et al., 2019).

Faktor transkripsi C2H2-ZFP yang salah satunya berasal dari tanaman *Citrus clementina* dipilih karena terindikasi mampu meningkatkan ketahanan tanaman terhadap cekaman salinitas dengan cara meregulasi gen yang dapat merespon cekaman salinitas seperti gen yang berperan dalam sintase gula, antioksidan, dan berperan dalam regulasi pembukaan stomata. Faktor transkripsi C2H2-ZFP dapat meningkatkan ekspresi gen pada tanaman padi yang terlibat dalam sistem detoksifikasi ROS, seperti superoksida dismutase, peroksidase, dan katalase (Zhang *et al.*, 2022). Faktor Transkripsi C2H2-ZFP juga memainkan peran dalam meningkatkan akumulasi osmolit, seperti prolin, betain, dan gula yang kompatibel pada tanaman padi (Huang *et al.*, 2022). Faktor transkripsi C2H2-ZFP juga dapat meregulasi gen pada tanaman melalui jalur MAPK yang memainkan peran mengatur keseimbangan ion dan eksresi ion Na⁺ seperti *SOS1*. Gen *SOS1* pada tanaman *Arabidopsis thaliana* sangat penting untuk homeostatis Na⁺ dan K⁺ dalam kondisi cekaman garam tinggi (Shi *et al.*, 2000).

Peran faktor transkripsi dalam meregulasi gen dapat dilihat dari adanya keberadaan situs pengikatan faktor transkripsi tersebar pada promotor gen target. Salah satu anggota faktor transkripsi C2H2-ZFP yaitu ZNF764 menunjukkan pola pengikatan yang luas dengan TFBS terdistribusi pada 50–500 kb dari (*Transcription Start Site*) TSS pada reseptor glukokortikoid (Fadda *et al.*, 2017). Kajian adanya persamaan fungsi suatu faktor transkripsi dapat diketahui dengan

ditemukannya kesamaan motif antar faktor transkripsi. Famili faktor transkripsi C2H2-ZFP seperti AZF1, AZF2, AZF3, dan ZAT10 secara khusus mengikat pada elemen pengatur cis yang terdiri dari pengulangan ikatan basa A(G/C)T pada wilayah promotor suatu gen target (Han *et al.*, 2020).

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengkaji tentang hubungan kekerabatan dan kesamaan motif faktor transkripsi C2H2-ZFP pada tanaman melon dengan faktor transkripsi pembanding CicleC2H2ZFP1.
2. Mengkaji tentang keberadaan situs pengikatan dan elemen pengatur cis faktor transkripsi C2H2-ZFP pada gen yang diregulasi pada tanaman melon yang merespon cekaman salinitas.
3. Mengkaji tentang peran faktor transkripsi C2H2-ZFP dalam meningkatkan toleransi terhadap cekaman salinitas pada tanaman terhadap lama cekaman salinitas.

1.3. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Mendapat informasi tentang hubungan kekerabatan dan motif faktor transkripsi C2H2-ZFP pada tanaman melon dengan faktor transkripsi pembanding CicleC2H2ZFP1.
2. Mendapat informasi tentang keberadaan situs pengikatan dan elemen pengatur cis faktor transkripsi C2H2-ZFP pada gen yang diregulasi pada tanaman melon.
3. Mendapat informasi peran faktor transkripsi C2H2-ZFP dalam meningkatkan toleransi terhadap cekaman salinitas pada tanaman terhadap lama cekaman salinitas.

1.4. Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah:

1. Terdapat hubungan kekerabatan dan kesamaan motif faktor transkripsi C2H2-ZFP pada tanaman melon dengan faktor transkripsi pembanding CicleC2H2ZFP1.
2. Terdapat situs pengikatan dan elemen pengatur cis faktor transkripsi C2H2-ZFP pada gen yang diregulasi pada tanaman melon.
3. Faktor transkripsi C2H2-ZFP berperan dalam meningkatkan toleransi cekaman salinitas pada tanaman melon berdasarkan fungsi gen yang teregulasi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Melon (*Cucumis melo* L.)

Melon (*Cucumis melo* L.) merupakan salah satu komoditas hortikultura buah-buahan yang digemari masyarakat Indonesia, karena daging buahnya yang manis, segar, tekstur daging buah yang lembut dan memiliki kandungan air yang banyak, serta aromanya yang khas dan menarik. Buah melon tidak hanya diminati karena rasanya yang lezat, tetapi juga karena kandungan nutrisi yang baik untuk kesehatan karena dalam Hasil penelitian menyatakan bahwa buah melon mengandung karotenoid dengan total mencapai 706,61 µg/100g dan vitamin C mencapai 16,50 mg/100g (Daryono *et al.*, 2016). Klasifikasi tanaman melon menurut Linnaeus (1753) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Divisi : Tracheophyta

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Cucurbitales

Famili : Cucurbitaceae

Genus : *Cucumis* L.

Spesies : *Cucumis melo* L.

Melon (*Cucumis melo* L.) merupakan tanaman semusim yang tumbuh merambat dengan sulur, berbatang lunak, dan memiliki tunas lateral yang muncul dari setiap pangkal tangkai daun. Berdasarkan pengamatan morfologi didapatkan

hasil bahwa batang tanaman dalam famili Cucurbitaceae memiliki sifat berair dengan bentuk segilima dan berwarna hijau muda hingga hijau tua (Zuraida *et al.*, 2019). Daun tanaman melon tumbuh berselang seling pada batangnya dengan tulang daun menjari dan tepi yang bergerigi. Berdasarkan pengamatan karakter morfologi tanaman melon memiliki daun tanaman melon adalah permukaan daunnya berbulu, tulang daunnya menjari, bersudut 5, duduk berselang seling pada batang utama, serta tepinya bergerigi (Bambang *et al.*, 2021).

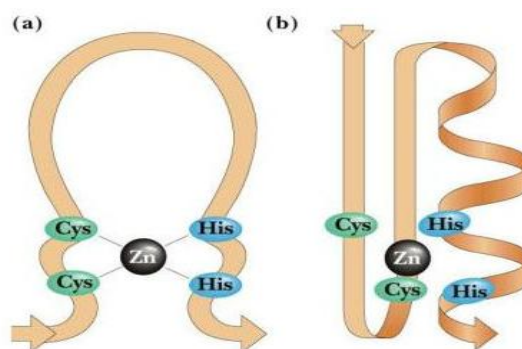
Bunga tanaman melon biasanya memiliki tipe bunga yaitu bunga tidak sempurna atau alat kelamin jantan tidak berada pada bunga yang sama dengan alat kelamin betina. Bunga betina pada tanaman melon berada di ketiak daun pertama dan kedua pada cabang lateral, sedangkan bunga jantan pada tanaman melon terbentuk pada batang utama (Bambang *et al.*, 2021). Tanaman melon memiliki buah yang rasanya manis, berbentuk bulat sampai lonjong, berwarna hijau hingga oranye, serta memiliki biji yang berbentuk pipih dan banyak dalam 1 buah melon. Buah tanaman melon berbentuk bulat sampai lonjong dengan biji pipih berwarna coklat muda berukuran panjang $\pm 0,9$ mm dan diameter $\pm 0,4$ mm dan bertekstur keras (Zuraida, *et al.*, 2019).

Tanaman melon cocok ditanam di daerah dataran rendah sampai dataran tinggi bersuhu hangat. Ketinggian tempat yang optimal untuk melon berkisar 200 – 900 mdpl dengan curah hujan antara 1.500 – 2.500 mm/tahun dan bersuhu 25 °C – 30 °C (Sobir dan Siregar, 2010). Tanah yang cocok untuk budidaya melon adalah tanah yang memiliki tingkat porositas tinggi dengan pH yang netral berkisar antara 5,8 – 7,2. Berdasarkan penelitian didapatkan hasil bahwa berat

buah melon tidak dapat mencapai berat maksimalnya dikarenakan terhambatnya serapan unsur P karena kondisi pH media tanam yang rendah (Bariyyah *et al.*, 2015).

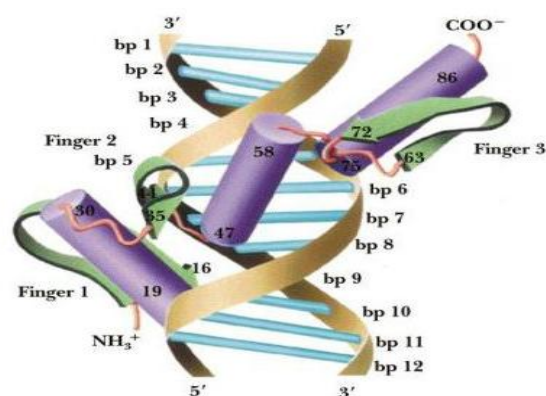
2.2. Faktor Transkripsi C2H2-ZFP

Faktor transkripsi C2H2-ZFP merupakan salah satu faktor transkripsi yang berperan dalam berbagai proses biologis pada tanaman yang memiliki jari-jari seng sebagai tangan untuk mengikat pada suatu DNA. Faktor transkripsi C2H2-ZFP adalah anggota dari keluarga protein jari-jari seng yang luas, yang berperan penting dalam berbagai proses biologis seperti pertumbuhan tanaman, perkembangan tanaman, dan respon terhadap stres lingkungan seperti replikasi DNA, reparasi, transkripsi gen, dan regulasi ekspresi gen (Ma *et al.*, 2016). Faktor transkripsi C2H2-ZFP terdiri dari 2 residu asam amino Cys (Cystein) dan 2 residu asam amino (His) Histidine yang berikatan dengan ion *zinc* pada sisi β -sheet untuk Cystein dan α -helix untuk Histidine. Faktor transkripsi C2H2-ZFP seperti namanya memiliki domain yang terdiri dari dua residu Cys dan dua His yang berkoordinasi dengan ion Zn^{2+} membentuk struktur $\beta\beta\alpha$ (dua heliks β dan satu heliks α) (Ilustrasi 1.) (Garrett dan Grisham, 1999).



Ilustrasi 1. Struktur Faktor Transkripsi C2H2-ZFP

Mekanisme kerja faktor transkripsi C2H2-ZFP dalam meningkatkan toleransi tanaman terhadap cekaman salinitas yaitu dengan beregulasi dengan beberapa gen yang dipengaruhi oleh garam dengan mengikat pada elemen pengatur cis di daerah promotor gen tersebut. Berdasarkan hasil penelitian ditemukan fakta bahwa protein C2H2-ZFP berpartisipasi aktif dalam respon tanaman untuk meningkatkan toleransi garam dengan memengaruhi gen yang diatur oleh garam (Han *et al.*, 2020). Situs pengikatan faktor transkripsi atau *Transcription Factor Binding Site* (TFBS) yaitu lokasi pada suatu DNA tempat faktor transkripsi berikatan yang biasanya mencakup motif DNA yang spesifik yang terdistribusi pada *upstream* atau *downstream* suatu DNA yang terletak 1 hingga 1000 ikatan basa dari suatu gen. Faktor transkripsi ZNF764 yang merupakan anggota C2H2-ZFP menunjukkan pola pengikatan yang luas, dengan TFBS terdistribusi pada 50–500 kb dari *Transcription Start Site* (TSS) (Fadda *et al.*, 2017).



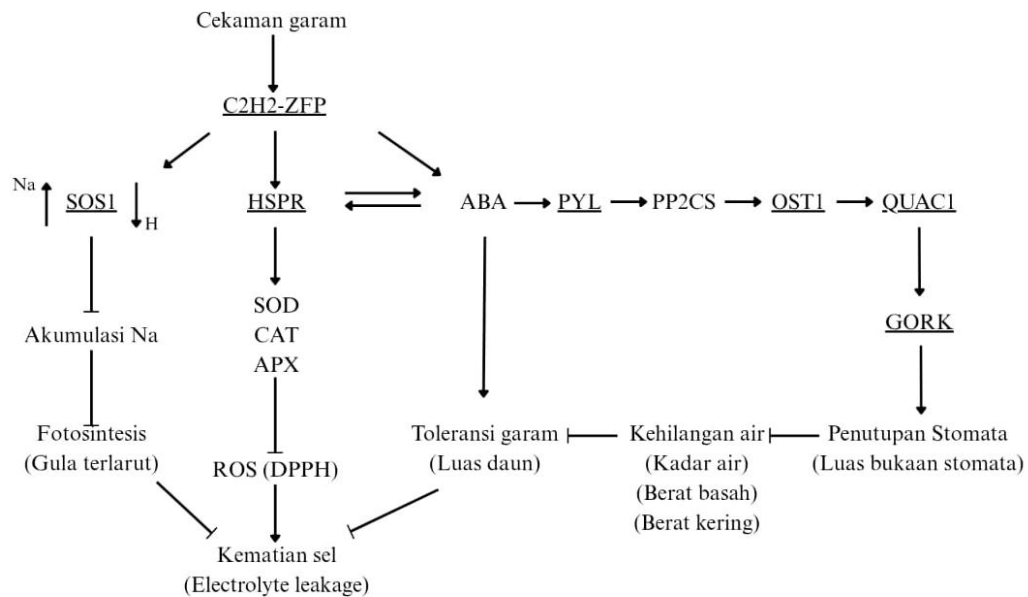
Ilustrasi 2. Mekanisme Pengikatan Faktor Transkripsi C2H2-ZFP

Penentuan situs pengikatan faktor transkripsi dapat dilakukan dengan melakukan pencarian motif suatu faktor transkripsi yang sama pada lokasi

upstream dan *downstream* suatu gen. Penentuan situs pengikatan faktor transkripsi dapat dilakukan dengan menggunakan sekuen DNA dan motif yang biasanya berisi informasi terkait elemen pengatur cis pada suatu gen. Elemen pengatur cis berperan sebagai platform pengikatan faktor transkripsi, dan kombinasi motif dalam elemen pengatur cis dapat memprediksi pengikatan faktor transkripsi yang spesifik terhadap konteks tertentu (Yáñez-Cuna, *et al.*, 2014).

2.3. Gen Peningkatan Toleransi Cekaman Salinitas

Cekaman abiotik terutama cekaman salinitas yang sudah akut seringkali menyebabkan peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dapat merusak sel pada jaringan tanaman terutama pada daun. Faktor transkripsi C2H2-ZFP dapat meningkatkan ekspresi gen yang terlibat dalam sistem detoksifikasi ROS, seperti superoksida dismutase, peroksidase, dan katalase melalui jaringan stomata pada daun (Zhang *et al.*, 2022). Faktor Transkripsi C2H2-ZFP juga memainkan peran dalam meningkatkan akumulasi osmolit, seperti prolin, betain, dan gula yang kompatibel pada jaringan daun tanaman (Huang *et al.*, 2022). Osmolit ini membantu dalam osmoregulasi dan perlindungan sel, memungkinkan tanaman mempertahankan turgor sel dan melindungi struktur selular dalam kondisi cekaman salinitas. Faktor transkripsi C2H2-ZFP juga dapat meregulasi gen yang mengatur keseimbangan ion dan eksresi ion Na⁺ seperti *SOS1*. Gen *SOS1* pada tanaman *Arabidopsis thaliana* sangat penting untuk homeostatis Na⁺ dan K⁺ dalam kondisi cekaman garam tinggi (Shi *et al.*, 2000).



Ilustrasi 3. Pathway Faktor Transkripsi C2H2-ZFP

Faktor transkripsi C2H2-ZFP dapat mengaktivasi gen-gen tersebut secara tidak langsung melalui jalur ABA atau sinyal ROS yang menginduksi gen untuk memproduksi gula sebagai antioksidan dan menghindari kematian sel. Faktor transkripsi C2H2-ZFP juga dapat meregulasi gen pada tanaman melalui jalur MAPK yang memainkan peran mengatur keseimbangan ion dan eksresi ion Na⁺ seperti *SOS1* (Liu *et al.*, 2022). Kandungan gula yang berlebih menghasilkan peningkatan H₂O₂ sitosol melalui jalur metabolisme yang berfungsi melindungi kerusakan oksidatif kloroplas (Nadarajah, 2020). Kebocoran elektrolit dan kandungan Na⁺ pada tanaman berkurang secara signifikan yang dimana merupakan efek modulasi transkrip gen *SOS1* (Rao *et al.* 2021).

Faktor transkripsi C2H2-ZFP dapat meregulasi gen yang mampu meningkatkan aktivitas antioksidan pada tanaman yang tercekam salinitas. Faktor transkripsi C2H2-ZFP seperti ZFP245 diketahui mampu menginduksi ekspresi gen antioksidan seperti *SOD* (*superoxide dismutase*), *CAT* (*catalase*), dan *POD*

(*peroxidase*) serta gen *HSP* (*heat shock protein*) (Liu *et al.*, 2022). Gen *CAT*, *SOD*, dan *HSP* merupakan gen yang berfungsi untuk detoksifikasi ROS dengan memproduksi senyawa antioksidan (Nadarajah, 2020). Faktor transkripsi C2H2-ZFP juga berperan dalam upaya mengurangi kehilangan air melalui mekanisme penutupan stomata dengan cara beregulasi dengan gen *PYL4*, *OST1*, *SLAC1*/*GORK* telah aktif. Faktor transkripsi C2H2-ZFP seperti ZFP179 mampu meningkatkan toleransi cekaman oksidatif dan salinitas dengan mengatur penutupan stomata dan mengurangi kerapatan stomata (Liu *et al.*, 2022). Gen *GORK* pada tanaman *Arabidopsis* berperan dalam mengendalikan gerakan stomata untuk memungkinkan tanaman mengurangi kehilangan air (Hosy *et al.*, 2003).

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2024 – Juni 2025 di Laboratorium Fisiologi dan Pemuliaan Tanaman, Departemen Pertanian, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang.

3.2. Materi Penelitian

Materi penelitian ini terdiri atas alat dan bahan. Bahan yang digunakan pada penelitian ini yakni melon varietas greeniegal, NaCl 250 mM, AB mix, DPPH 50 μ M, *anthrone* 0,1%, glukosa anhidrat, etanol 80%, H₂SO₄, akuades, kutek, dan selotip, kaca objek. Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu wadah semai, bak perendaman, lemari pendingin, timbangan analitik, alu, penumbuk, tabung reaksi, kaca objek, mikroskop, spektrofotometer, *vortex*, autoklaf, oven, kamera (ponsel), EC meter, pipet (mikropipet), latar belakang foto berupa kain hitam, dan komputer.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian dilaksanakan dalam dua tahapan, tahap pertama yaitu analisis secara *in silico* dan tahap kedua yaitu validasi peran faktor transkripsi C2H2-ZFP pada tanaman melon terhadap cekaman salinitas untuk validasi keberadaan faktor

transkripsi dalam tanaman melon yang berperan dalam regulasi gen peningkatan ketahanan terhadap cekaman salinitas.

3.3.1. Penelitian tahap pertama

Tahap pertama dilaksanakan dengan identifikasi famili faktor transkripsi C2H2-ZFP, visualisasi kekerabatan faktor transkripsi C2H2-ZFP, identifikasi motif faktor transkripsi C2H2-ZFP pembanding dan target, identifikasi gen teregulasi faktor C2H2-ZFP yang dipicu oleh cekaman salinitas untuk penentuan situs pengikatan dan elemen pengatur cis faktor transkripsi C2H2-ZFP, kemudian dilanjutkan dengan analisis situs pengikatan faktor transkripsi C2H2-ZFP target pada gen yang teregulasi, dan analisis elemen pengatur cis faktor transkripsi C2H2-ZFP berdasarkan situs pengikatan faktor transkripsi C2H2-ZFP.

3.3.1.1. Identifikasi famili faktor transkripsi C2H2-ZFP

Identifikasi famili faktor transkripsi C2H2-ZFP dilakukan pada data sekuen genom tumbuhan yang pada situs *Plant Transcription Factor Database* (PlantTFDB) (<https://planttfdb.gao-lab.org/>) berdasarkan TF id dari artikel yang sudah ada pada tanaman *Citrus clementina* yaitu Ciclev10001255m (Xie *et al.*, 2017). BLASP digunakan untuk identifikasi sekuen gen homolog faktor transkripsi C2H2-ZFP yang telah didapatkan. Sekuen gen yang telah teridentifikasi homolog atau mirip dengan faktor transkripsi C2H2-ZFP diunduh dan disalin pada *notepad* untuk dijadikan data yang akan digunakan dalam visualisasi hubungan kekerabatan dengan faktor transkripsi pembanding

CicleC2H2ZFP1 (Ciclev10001255m). Langkah-langkah secara detail terkait metode diatas dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.3.1.2. Visualisasi hubungan kekerabatan dengan pohon filogenetik

Seluruh sekuen faktor transkripsi C2H2-ZFP yang telah diunduh kemudian dilakukan penyejajaran untuk analisis kesamaan sekuen atau asam nukleotida dari setiap sekuen faktor transkripsi C2H2-ZFP dengan situs web ClustalO (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>). Data penyejajaran kemudian diunduh dengan opsi *The alignment in FASTA format converted by Seqret*. Data tersebut kemudian diolah menggunakan IQTREE (iqtree.org) dengan cara ketik (“Lokasi iqtree” -s “lokasi file hasil clustalo”), hasil yang diperoleh dalam format file (txt.treefile) kemudian divisualisasikan dengan menggunakan i-TOL (<https://itol.embl.de/>). Data hasil penyejajaran diunggah pada situs i-TOL pada menu *upload*. Hasil pohon filogenetik yang ditampilkan selanjutnya diunduh dan disajikan dalam laporan. Langkah-langkah secara detail terkait metode diatas dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.3.1.3. Identifikasi motif faktor transkripsi C2H2-ZFP

Faktor transkripsi C2H2-ZFP pembanding dan yang telah ditetapkan sebagai kandidat yang akan digunakan kemudian diunduh protein sekuennya dengan cara unduh satu persatu sekuen proteinnya pada bagian menu *download* di situs web PlanTFDB (<https://planttfdb.gao-lab.org/>) kemudian motif protein diidentifikasi dan divisualisasikan dengan MEME-suite (<https://meme->

suite.org/meme/tools/meme) setelah itu gambar diunduh dalam format svg dan disajikan dalam laporan. Langkah-langkah secara detail terkait metode diatas dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.3.1.4. Identifikasi gen teregulasi pada tanaman melon

Gen yang terindikasi dapat diregulasi oleh faktor transkripsi C2H2-ZFP pada tanaman diunduh sekuen CDS nya lalu dicari sekuen homolognya pada tanaman melon dengan fitur BLAST pada situs web EnsemblPlants (<https://plants.ensembl.org>) untuk identifikasi gen pada tanaman melon yang sekuen CDS pada gen tersebut serupa dengan gen yang diregulasi oleh faktor transkripsi C2H2-ZFP. Sekuen *upstream* (ikatan basa sebelum TSS atau 5') dan *downstream* (ikatan basa setelah 3') diunduh satu persatu dengan cara klik *download* dan atur 5' *flanking sequence* menjadi 1000 dan 3' *flanking sequence* menjadi 600 lalu salin sekuen tersebut dan satukan pada notepad untuk dianalisis situs pengikatannya. Langkah-langkah secara detail terkait metode diatas dapat dilihat pada Lampiran 4.

3.3.1.5. Analisis situs pengikatan faktor transkripsi C2H2-ZFP

Sekuen protein faktor transkripsi C2H2-ZFP target dianalisis sekuen domain pengikatan DNA pada faktor transkripsi C2H2-ZFP kandidat pada web cis-BP Database (cis-BP Database: Catalog of Inferred Sequence Binding Preferences) kemudian sekuen domain pengikat DNA dianalisis motif dari sekuen proteinnya dengan fitur *motif discovery* pada situs web MEME-suite (<https://meme->

suite.org/meme/tools/meme) kemudian hasil motif tersebut didownload dalam format teks (txt.) untuk diinput saat akan dianalisis situs pengikatannya. Seluruh sekuen *upstream* dan *downstream* dan motif protein faktor transkripsi target yang sudah di download sebelumnya diinput pada situs web FIMO (<https://meme-suite.org/meme/tools/fimo>) motif sekuen protein dari domain pengikat DNA diinput pada kolom motif dan sekuen *upstream* dan *downstream* gen homolog pada tanaman melon diinput pada kolom *sequences*. Seluruh hasil disalin pada tabel dan disajikan dalam laporan. Langkah-langkah secara detail terkait metode diatas dapat dilihat pada Lampiran 5.

3.3.1.6. Analisis elemen pengatur cis faktor transkripsi C2H2-ZFP

Seluruh sekuen situs pengikatan faktor transkripsi yang teridentifikasi pada gen yang teregulasi oleh faktor transkripsi C2H2-ZFP disalin pada *notepad* kemudian diinput pada situs web New PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) untuk dianalisis elemen pengatur cis faktor transkripsinya. Seluruh hasil dicatat dan disajikan dalam bentuk diagram batang untuk mengetahui jumlah elemen pengatur cis yang paling banyak teridentifikasi dan disajikan dalam laporan. Langkah-langkah secara detail terkait metode diatas dapat dilihat pada Lampiran 6.

3.3.2. Penelitian tahap kedua

Penelitian tahap kedua dilaksanakan guna memvalidasi hasil penelitian tahap pertama dengan asumsi atau dugaan bahwa faktor transkripsi C2H2-ZFP

dapat beregulasi dengan gen yang mampu meningkatkan ketahanan tanaman melon terhadap cekaman salinitas. Tahap kedua dilaksanakan dengan persemaian tanaman melon hingga berumur 2 minggu, kemudian dilanjutkan dengan pemberian perlakuan dan pengamatan parameter serta analisis data.

3.3.2.1. Persemaian dan perlakuan salinitas

Rancangan Penelitian yang digunakan pada penelitian ini yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) monofaktor dengan perlakuan lama cekaman salinitas 5 taraf $W_0 = 0$ hari (tanpa perlakuan), $W_1 = 1$ hari, $W_2 = 2$ hari, $W_3 = 3$ hari, $W_4 = 4$ hari dengan konsentrasi NaCl sebanyak 250 mM yang diulang sebanyak 4 kali, sehingga didapatkan 20 satuan percobaan. Setiap satuan percobaan terdiri atas 15 tanaman. Persemaian dan perlakuan salinitas dilakukan dengan cara benih melon ditumbuhkan dengan *tray* semai yang berisi media *cocopeat* selama 2 minggu. Bibit melon yang sudah berumur 2 minggu kemudian dipindah ke dalam bak yang berisi air lalu ditambahkan larutan NaCl sesuai dengan konsentrasi yang sudah ditentukan dibiarkan hingga sesuai dengan perlakuan lama cekaman sebelum kemudian diamati. Sampel tanaman dengan perlakuan lama cekaman 0 hari diambil setelah tanaman berusia 2 minggu sebelum diberikan perlakuan cekaman salinitas untuk diamati. Tanaman sampel untuk perlakuan lama cekaman 1 hari, 2 hari, 3 hari, dan 4 hari diambil untuk diamati pengamatan parameter sesuai dengan waktu setelah pemberian perlakuan cekaman salinitas.

3.3.2.2. Parameter pengamatan

Parameter pengamatan pada penelitian ini yang akan diamati untuk validasi keberadaan faktor transkripsi pada tanaman melon yaitu seperti aktivitas antioksidan (DPPH), gula terlarut, kebocoran elektrolit, luas daun, luas bukaan stomata, bobot segar, bobot kering, dan kadar air.

3.3.2.2.1. Aktivitas antioksidan (DPPH)

Sebanyak 3 bibit segar diambil secara acak untuk setiap unit percobaan kemudian dibuang akarnya lalu dipotong-potong dan ditimbang sebanyak 0,6 gram kemudian dihaluskan dengan alu dan penumbuk hingga halus lalu. Sampel yang sudah halus kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dan tambahkan 10 mL etanol 80% kemudian tutup dengan alumunium foil dan inkubasi selama 30 menit. Sampel yang sudah diinkubasi selama 30 menit kemudian disaring dengan kertas saring hingga semua cairan dan padatan terpisah. Siapkan 3,8 ml larutan DPPH 50 μ M dengan cara melarutkan 0,075 mg bubuk dpvh dalam 3,8 mL etanol 80% kemudian siapkan larutan kontrol (pembanding) dengan cara 3,8 ml larutan DPPH 50 μ M dicampurkan dengan 0,2 etanol 80% dan diamkan di tempat gelap selama 30 menit.

Larutan ekstrak yang sudah disaring kemudian diambil sebanyak 33 μ L lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan etanol sebanyak 167 μ L, setelah itu larutan sampel ditambahkan dengan 3,8 ml larutan DPPH 50 μ M kemudian dimasukkan kedalam tabung gelap lalu didiamkan selama 30 menit. Larutan sampel yang sudah diinkubasi selama 30 menit kemudian diukur

absorbansinya pada panjang gelombang 515 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan blanko etanol 80%. Inhibisi DPPH kemudian dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Inhibisi DPPH (\%)} = \frac{A \text{ kontrol} - A \text{ sampel}}{A \text{ kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan:

A kontrol = absorbansi DPPH + etanol (tanpa ekstrak)

A sampel = absorbansi DPPH + ekstrak tanaman (Regina *et al.*, 2008).

3.3.2.2.2. Gula terlarut

Sebanyak 3 bibit segar diambil secara acak untuk setiap unit percobaan kemudian dibuang akarnya lalu dipotong-potong dan ditimbang sebanyak 0,2 gram. Sampel yang sudah dipotong-potong kemudian dihaluskan dengan alu dan penumbuk lalu ditambahkan 5 mL akuades dan 20 mL etanol 80% panas ke dalam sampel kemudian disaring menggunakan kertas saring. Larutan sampel yang didapatkan kemudian ditambahkan akuades hingga volume larutan menjadi 100 mL.

Siapkan larutan anthrone 0,1% sebanyak 5 mL dilakukan dengan cara larutkan 5 mg bubuk anthrone dalam 5 mL H₂SO₄ dan siapkan kurva standar glukosa untuk perhitungan gula terlarut. Sebanyak 1 mL larutan sampel diambil kemudian ditambahkan 1 mL akuades dan 5 mL larutan anthrone 0,1 ke dalam tabung reaksi kemudian panaskan pada suhu 100°C selama 12 menit. Absorbansi larutan diukur setelah pendinginan pada panjang gelombang 630 nm

menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Gula terlarut dihitung dengan rumus berdasarkan hasil kurva standar (Rai *et al.*, 2006).

3.3.2.2.3. Kebocoran elektrolit

Sebanyak 3 bibit segar diambil secara acak untuk setiap unit percobaan kemudian dibuang akarnya lalu dipotong-potong dan ditimbang sebanyak 0,3 gram. Sampel daun yang sudah dipotong kemudian direndam di dalam tabung reaksi berisi 10 mL akuades kemudian disimpan dalam inkubator dengan suhu 25°C selama 24 jam. Larutan sampel yang sudah diinkubasi kemudian diukur konduktivitas listrik (EC) alat konduktometer (EC meter) lalu larutan sampel dipanaskan menggunakan autoklaf pada suhu 100°C selama 15 menit, setelah suhu larutan normal konduktivitas listrik (EC) diukur kembali menggunakan EC meter. Kebocoran elektrolit kemudian diukur dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kebocoran Elektrolit (\%)} = \frac{\text{EC awal}}{\text{EC akhir}} \times 100\%$$

Keterangan:

EC awal = EC sebelum dipanaskan

EC akhir = EC setelah dipanaskan (Salvi *et al.*, 2020).

3.3.2.2.4. Luas bukaan stomata

Sebanyak 1 bibit segar dipilih secara acak untuk dianalisis luas bukaan stomata dengan cara kutek bening dioleskan tipis di permukaan bawah daun dan tunggu hingga kering. Tempelkan selotip bening di area kutek yang sudah kering dan tekan perlahan kemudian angkat selotip lalu tempelkan pada kaca objek (kaca

preparat) hingga rapat tanpa ada gelembung kemudian amati dengan menggunakan mikroskop komputer. Simpan gambar dan hitung luas menggunakan aplikasi ImageJ dengan menggunakan *tracing tool* pada bagian atau bukaan stomata yang ingin diamati (Triplett *et al.*, 2024).

3.3.2.2.5. Luas daun (cm²)

Parameter luas daun dianalisis dengan cara bibit dipilih secara acak sebanyak 1 bibit segar untuk setiap unit percobaan untuk diambil daunnya. Daun yang sudah diambil kemudian difoto lalu luas daun diukur menggunakan aplikasi ImageJ dengan menggunakan fitur *tracing tool* pada bagian daun yang ingin diamati (Negi dan Singh, 2023).

3.3.2.2.6. Berat segar tanaman (g).

Parameter berat segar dianalisis dengan cara bibit dipilih secara acak sebanyak 1 bibit segar untuk setiap unit percobaan. Bibit yang sudah dipilih kemudian dicuci hingga sisa media tanam pada akar dan tanamannya bersih lalu ditimbang untuk mengetahui bobot segarnya.

3.3.2.2.7. Berat kering tanaman (g)

Parameter berat kering tanaman dianalisis dengan cara bibit yang sudah dipilih secara acak untuk analisis bobot segar kemudian dioven di suhu 105°C hingga mencapai berat konstan. Bibit yang sudah selesai dioven hingga mencapai berat konstan kemudian ditimbang untuk mengetahui bobot keringnya.

3.3.2.2.8. Kadar air tanaman (%)

Parameter pengamatan kadar air tanaman dianalisis berdasarkan hasil berat tanaman sebelum dikeringkan dan sesudah dikeringkan. Hasil berat basah dan berat kering tanaman kemudian dihitung untuk menentukan kadar airnya dengan rumus:

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{Y - Z}{Y}$$

Keterangan:

Y = Berat sampel segar (g)

Z = Berat sampel kering (g)

3.3.3. Analisis Data

Model linier yang digunakan pada Rancangan Acak Lengkap (RAL) adalah sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Y_{ij} = Pengamatan pada suatu percobaan perlakuan lama cekaman salinitas ke-i dan ulangan ke-j

μ = Rata-rata umum

τ_i = Pengaruh perlakuan lama cekaman salinitas ke-i

ϵ_{ij} = Galat perlakuan lama cekaman salinitas ke-i ulangan ke-j

i = Perlakuan

j = Ulangan

i, j = 1, 2, 3, ..., n

3.3.4. Hipotesis Statistik

Hipotesis statistik yang diuji pada penelitian ini adalah:

Pengaruh lama cekaman salinitas

$$H_0 : \tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \tau_4 = \tau_5 = 0$$

(Tidak terdapat pengaruh lama cekaman salinitas terhadap respon yang diamati)

$$H_1 : \text{minimal terdapat satu } \tau_i \neq 0$$

(Terdapat pengaruh lama cekaman salinitas terhadap respon yang diamati)

Hasil penelitian yang diperoleh dilakukan Analisis Varian (ANOVA) atau analisis ragam. Apabila hasil analisis ragam berbeda nyata dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 5%.