

**IDENTIFIKASI FAMILI GEN *PHYTOENE SYNTHASE* SECARA *IN SILICO* DAN VALIDASI BIOMARKER MELON (*Cucumis melo* L.)
TERHADAP CEKAMAN SALINITAS**

SKRIPSI

Oleh:

MAULANA ARIF ARSYADANI



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

IDENTIFIKASI FAMILI GEN *PHYTOENE SYNTHASE* SECARA *IN SILICO*
DAN VALIDASI BIOMARKER MELON (*Cucumis melo* L.) TERHADAP
CEKAMAN SALINITAS

Oleh:

MAULANA ARIF ARSYADANI
NIM: 23020221130036

Salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Pertanian pada Program Studi S-1 Agroekoteknologi
Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro

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

LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Maulana Arif Arsyadani
N I M : 23020221130036
Program Studi : S-1 Agroekoteknologi

dengan ini menyatakan sebagai berikut :

1. Skripsi yang berjudul: **Identifikasi Famili Gen *Phytoene Synthase* secara *in silico* dan Validasi Biomarker Melon (*Cucumis melo* L.) terhadap Cekaman Salinitas** dan penelitian yang terkait merupakan karya penulis sendiri.
2. Setiap ide atau kutipan dari karya orang lain berupa publikasi atau bentuk lainnya dalam skripsi ini, telah diakui sesuai dengan standar prosedur disiplin ilmu.
3. Penulis juga mengakui bahwa skripsi ini dapat dihasilkan berkat bimbingan dan dukungan penuh dari Pembimbing yaitu : **Bagus Herwibawa, S.P., M.P.** dan **Prof. Dr. Ir. Syaiful Anwar, M.Si.**

Apabila di kemudian hari dalam skripsi ini ditemukan hal-hal yang menunjukkan telah dilakukannya kecurangan akademik maka penulis bersedia gelar sarjana yang telah penulis dapatkan ditarik sesuai dengan ketentuan dari Program Studi S1 Agroekoteknologi, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro

Semarang, Agustus 2025
Penulis,



Maulana Arif Arsyadani

Mengetahui :

Pembimbing Utama

Bagus Herwibawa, S.P., M.P.

Pembimbing Anggota

Prof. Dr. Ir. Syaiful Anwar, M.Si.

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Judul Skripsi : IDENTIFIKASI FAMILI RESPON GEN
PHYTOENE SYNTHASE SECARA *IN*
SILICO DAN VALIDASI BIOMARKER
MELON (*Cucumis melo* L.) TERHADAP
CEKAMAN SALINITAS

Nama Mahasiswa : MAULANA ARIF ARSYADANI

Nomor Induk Mahasiswa : 23020221130036

Program Studi/Departemen : S-1 AGROEKOTEKNOLOGI/PERTANIAN

Fakultas : PETERNAKAN DAN PERTANIAN

Telah disidangkan di hadapan Tim Penguji
dan dinyatakan lulus pada tanggal **23 JUL 2025**.

Pembimbing Utama



Bagus Herwibawa, S.P., M.P.

Pembimbing Anggota



Prof. Dr. Ir. Syaiful Anwar, M.Si.

Ketua Program Studi



Dr. Ir. Eny Fuskhah, M.Si.

Ketua Panitia Ujian Akhir Program



Bagus Herwibawa, S.P., M.P.

Dekan



Prof. Sugiharto, S.Pt., M.Sc., Ph.D.

Ketua Departemen



Ahmad Ni'matullah Al-Baarri, S.Pt., M.P., Ph.D.

RINGKASAN

MAULANA ARIF ARSYADANI. 23020221130036. 2025. Identifikasi Famili Gen *Phytoene Synthase* secara *in silico* dan Validasi Biomarker Melon (*Cucumis melo* L.) terhadap Cekaman Salinitas (Pembimbing: **BAGUS HERWIBAWA** dan **SYAIFUL ANWAR**).

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji famili, struktur gen, motif, domain protein, serta analisis transkriptomik gen *Phytoene Synthase* (*PSY*) secara *in silico* dan validasi biomarker klorofil, karotenoid, serta respon pertumbuhan tanaman melon terhadap cekaman salinitas. Penelitian dilaksanakan pada Oktober 2024 – Juni 2025 di Laboratorium Fisiologi dan Pemuliaan Tanaman, Departemen Pertanian, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang.

Percobaan terdapat dua tahap yang pertama tahap identifikasi *in silico*. Hal yang diamati adalah pohon filogenetik famili gen, struktur gen, motif dan domain protein serta analisis transkriptomik gen *PSY*. Tahap kedua berupa validasi biomarker dan respon pertumbuhan. Rancangan percobaan tahap kedua disusun dalam rancangan acak lengkap (RAL) monofaktor, dengan perlakuan perbedaan lama cekaman salinitas (250mM), yaitu 0 hari (L0), 1 hari (L1), 2 hari (L2), 3 hari (L3), dan 4 hari (L4). Masing-masing perlakuan disusun dengan 4 ulangan, sehingga terdapat 20 unit percobaan. Parameter yang diamati meliputi kadar klorofil a (mg/g), kadar klorofil b (mg/g), total klorofil (mg/g), karotenoid (mg/g), panjang akar (cm), dan tinggi tanaman (cm). Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis ragam (ANOVA) dan diuji lanjut menggunakan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

Hasil identifikasi *in silico* diperoleh bahwa terdapat pengelompokkan gen *PSY*, terdapat kesamaan struktur famili gen *PSY* pada tanaman melon, terdapat kesamaan motif dan domain protein, serta perubahan ekspresi gen *PSY* berdasarkan analisis transkriptomik. Sementara, validasi biomarker dan respon pertumbuhan menunjukkan bahwa perlakuan lama cekaman berpengaruh nyata terhadap parameter kadar klorofil a, kadar klorofil b, total klorofil, dan kadar karotenoid, namun tidak berpengaruh nyata terhadap parameter panjang akar dan tinggi tanaman.

Berdasarkan hasil penelitian, identifikasi *in silico* menunjukkan bahwa tanaman melon (*Cucumis melo* L.) memiliki gen *PSY* (*Phytoene Synthase*) yang diduga berperan dalam merespons cekaman salinitas. Analisis validasi biomarker dan pengamatan respon pertumbuhan menunjukkan bahwa lama cekaman salinitas selama 4 hari menyebabkan penurunan kadar biomarker klorofil a, klorofil b, total klorofil dan karotenoid. Hal ini mengindikasikan bahwa gen *PSY* dapat menjadi kandidat gen potensial dalam studi toleransi salinitas pada melon.

KATA PENGANTAR

Tanaman melon (*Cucumis melo* L.) merupakan komoditas hortikultura, yang dimanfaatkan karena nutrisi, tekstur, rasa, dan aroma yang disukai masyarakat. Namun akibat pemanasan global terjadi peningkatan air laut dan lahan salin semakin bertambah memiliki potensi untuk mengganggu produksi tanaman melon. Upaya perakitan varietas tahan salinitas merupakan solusi permasalahan tersebut, meskipun demikian diperlukan pemahaman mengenai mekanisme ketahanan salinitas pada tanaman melon. Eksplorasi gen ketahanan secara *in silico* mampu memprediksi fungsi gen dengan lebih murah. Penelitian terdahulu menunjukkan gen *Phytoene Synthase* (*PSY*) adalah gen utama yang merespon cekaman salin pada berbagai tanaman dan berpotensi menjadi gen yang meregulasi ketahanan tanaman terhadap cekaman salin. Penelitian bertujuan untuk mengkaji famili, struktur famili gen, motif dan domain protein *PSY*, ekspresi gen *PSY* berdasarkan analisis transkriptomik, validasi biomarker dan respon pertumbuhan pada tanaman melon terhadap cekaman salinitas

Segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas rahmat, karunia, dan ridha-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul “Identifikasi Famili Gen *Phytoene Synthase* secara *in silico* dan Validasi Biomarker Melon (*Cucumis melo* L.) terhadap Cekaman Salinitas”. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan dan memperoleh gelar Sarjana Pertanian.

Penulis menyadari bahwa penyelesaian penelitian dan penulisan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan, arahan, dan dukungan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah berkontribusi dalam memberikan dukungan moril maupun materiil hingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik :

1. Bagus Herwibawa, S.P., M.P. selaku dosen pembimbing utama, dan Prof. Dr. Ir. Syaiful Anwar, M.Si. selaku dosen pembimbing anggota, yang telah dengan penuh kesabaran memberikan ilmu, waktu, tenaga, serta bimbingan yang berharga kepada penulis, mulai dari penyusunan proposal, pelaksanaan

penelitian, hingga penulisan skripsi. Atas segala arahan dan dukungan yang diberikan, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik.

2. Prof. Sugiharto, S.PT, M.Sc., Ph.D. Dekan Fakultas Peternakan dan Pertanian beserta jajarannya, Ahmad Ni'matullah Al – Baari, S.Pt., M.P., Ph.D. selaku Ketua Departemen Pertanian, Dr. Ir. Eny Fuskhah, M.Si. selaku Ketua Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Peternakan dan Pertanian atas kesempatan untuk menempuh Pendidikan sarjana di Program Studi S–1 Agroekoteknologi.
3. Prof. Dr. Ir. Florentina Kusmiyati, M.Sc. selaku Koordinator Laboratorium Fisiologi dan Pemuliaan Tanaman, serta Dr. Ir. Susilo Budiyanto, M.Si. selaku Koordinator Laboratorium Ekologi dan Produksi Tanaman, atas segala bimbingan, arahan, dan dukungan yang telah diberikan kepada penulis selama masa studi.
4. Muhammad Iqbal Fauzan, S.P., M.Si. selaku dosen wali, yang telah dengan penuh dedikasi membimbing penulis selama menjalani masa studi di Program Studi S–1 Agroekoteknologi.
5. Prof. Dr. Ir. Syaiful Anwar, M.Si., Prof. Ir. Didik Wisnu Widjajanto, MScRes., Ph.D., Prof. Dr. Ir. Florentina Kusmiyati, M.Sc., Dr. Ir. Susilo Budiyanto, M.Si., Ir. Karno, M.Appl.Sc. Ph.D., Dr. Ir. Eny Fuskhah, M.Si., Bagus Herwibawa S.P. M.P., Rosyida, S.P., M.Sc., Aisyah Surya Bintang, S.P. M.Sc., Muhammad Ghazi Agam Sas S.P., M.Si., Fajrin Pranama Putra, S.P., M.Sc., Septrial Arafat S.P., M.P., Muhammad Iqbal Fauzan, S.P., M.Si., Dr. Dian Safitri, S.P., M.Si., Albertus Fajar Irawan, S.P., M.Agr., Ph.D., Anasrullah, S.P., M.S., Chaieydhha Noer Afiefah, S.P., M.Sc., Nani Kitti Sihalohe, S.P., M.P., Prof. Dr. Ir Dwi Retno Lukiwati, M.S. (purnatugas), Dr. Ir. Adriani Darmawati S.P., M.Sc. (purnatugas), Dr. Ir. Budi Adi Kristanto, M.S. (purnatugas), Dr. Ir. Endang Dwi Purbajanti, M.S. (purnatugas), dan Dr. Ir. Sutarno, M.S. (purnatugas) selaku dosen dan seluruh staf tenaga kependidikan Program Studi S–1 Agroekoteknologi Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro yang telah memberikan ilmu, pengalaman, dan bimbingan selama perkuliahan.

6. Ahmad Baroha, S.Pt. selaku Pranata Laboratorium Program Studi S–1 Agroekoteknologi, yang telah membantu penulis selama melaksanakan kegiatan di laboratorium, Sri Bima Arya Teja, A.Md. selaku Tenaga Kependidikan Program Studi S–1 Agroekoteknologi. Serta Iskandar, A.Md selaku tenaga teknis. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada seluruh staf administrasi dan pegawai di lingkungan Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro atas bantuan dan dukungan dalam pengurusan administrasi selama masa studi.
7. Nur Afifudin dan Chamidah, selaku kedua orang tua penulis, serta keluarga penulis yang senantiasa memberikan dukungan, kasih sayang, dan doa yang tak terhingga sejak awal masa perkuliahan hingga saat ini. Dukungan yang tiada henti ini menjadi sumber semangat dan motivasi penulis dalam menuntut ilmu, meskipun masa perkuliahan telah usai.
8. Seluruh teman-teman penulis yang selalu memberikan dukungan kepada penulis
9. Seluruh pihak lain yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas segala bantuan, baik secara langsung maupun tidak langsung, yang telah diberikan untuk menyelesaikan tugas akhir ini.
10. Dan yang terakhir ucapan terimakasih kepada penulis, yang telah berhasil menyelesaikan segala yang dia mulai dan tetap memegang janjinya.

Semoga hasil penelitian ini memiliki manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan mendatang.

Semarang, Agustus 2025

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR ILUSTRASI	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	5
1.3. Hipotesis Penelitian	6
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1. Melon (<i>Cucumis melo</i> L.)	8
2.2. Cekaman Salinitas	10
2.3. Mekanisme Respon Tanaman terhadap Cekaman Salinitas	11
2.4. Karakterisasi gen <i>Phytoene Synthase</i>	12
2.5. Respon gen <i>Phytoene Synthase</i> terhadap Salinitas.....	16
2.6. Biomarker Cekaman Salinitas	19
BAB III. MATERI DAN METODE.....	22
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	22
3.2. Materi Penelitian.....	22
3.3. Metode Penelitian	23
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	33
4.1. Identifikasi Famili Gen <i>PSY</i>	33
4.2. Analisis Kekerabatan Famili Gen <i>PSY</i>	38

4.3. Struktur Famili Gen <i>PSY</i>	41
4.4. Motif dan Domain Famili Protein Gen <i>PSY</i>	43
4.5. Analisis Transkriptomik	46
4.6. Kompilasi Analisis Ragam	48
4.7. Biomarker Klorofil a, Klorofil b, Total Klorofil, Karotenoid	49
4.8. Respon Pertumbuhan Melon terhadap Cekaman Salinitas	52
 BAB V. SIMPULAN DAN SARAN	 54
4.1.Simpulan	54
4.2.Saran	54
 DAFTAR PUSTAKA	 55
 LAMPIRAN.....	 62
 DAFTAR RIWAYAT HIDUP.....	 144

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Hasil Identifikasi Famili Gen <i>PSY</i>	33
2. Rekapitulasi Hasil Analisis Biomarker dan Pertumbuhan Melon .	48

DAFTAR ILUSTRASI

Nomor	Halaman
1. Respon Gen <i>PSY</i> terhadap Salinitas	18
2. Tahap Identifikasi Famili Gen <i>PSY</i> secara <i>In Silico</i>	23
3. Tahap identifikasi famili gen <i>PSY</i>	24
4. Tahap Analisis Kekerabatan Famili Gen <i>PSY</i>	25
5. Tahap Identifikasi Struktur Famili Gen <i>PSY</i>	26
6. Tahap Identifikasi Motif dan Domain Famili Protein <i>PSY</i> . (A) Identifikasi motif famili protein <i>PSY</i> , (B) Identifikasi domain famili protein <i>PSY</i>	27
7. Tahap Analisis Transkriptomik Famili Gen <i>PSY</i>	28
8. Pohon Filogenetik Famili Gen <i>PSY</i>	38
9. Struktur Famili Gen <i>PSY</i> (A) <i>CmPSY1</i> (B) <i>CmPSY2</i> (C) <i>CmPSY</i>	41
10. Struktur Protein <i>PSY</i> . (A) struktur motif famili protein <i>PSY</i> (B) struktur domain protein famili protein <i>PSY</i>	44
11. Grafik ekspresi gen <i>PSY</i> tanaman melon.....	46
12. Validasi Biomarker terhadap Salinitas	49
13. Respon Pertumbuhan terhadap Salinitas	52

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Identifikasi Famili Gen <i>PSY</i>	62
2. Analisis <i>Multiple Sequence Alignment</i>	64
3. Analisis Data Transkriptomik.....	82
4. Layout Percobaan Tahap Validasi Biomarker	83
5. Analisis Data Klorofil A.....	84
6. Analisis Data Klorofil B	93
7. Analisis Data Klorofil Total	102
8. Analisis Data Karotenoid.....	111
9. Analisis Data Panjang Akar.....	120
10. Analisis Data Tinggi Tanaman	128
11. Dokumentasi Kegiatan.....	132

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Salinitas menjadi ancaman bagi sektor budidaya melon, diperparah dengan kondisi iklim menyebabkan intrusi air laut ke daratan akibat pemanasan global, serta pencemaran tanah dan air akibat penggunaan pupuk kimia dan irigasi yang tidak tepat. Tanah salin tersebar seluas 20 juta hektar di Asia Tenggara, diperkirakan total luas lahan salin di Indonesia sebesar 440.300 hektar (Karolinoerita dan Annisa, 2020). Kondisi tersebut menciptakan akumulasi ion garam seperti Na^+ dan Cl^- pada tanah/air yang disebut sebagai kondisi salin. Tanah salin memiliki kandungan NaCl , Na_2CO_3 , Na_2SO_4 serta memiliki nilai *Electrical Conductivity* (EC) > 2 dS/m atau lebih (Karolinoerita, dan Annisa, 2020). Efek dari salin akan berdampak buruk bagi tanaman, mengganggu fungsionalitas tanaman, Salinitas berefek pada penurunan pertumbuhan penurunan penyerapan air dan hara akibat stres osmotik, stres ionik dari akumulasi ion Na^+ dan Cl^- menyebabkan toksisitas pada tanaman, serta penurunan fotosintesis menyebabkan terbentuknya ROS (stres oksidatif) (Balasubramaniam *et al.*, 2023).

Tanaman dalam rangka untuk bertahan hidup akan melakukan mekanisme pertahanan seperti mengekspresi gen tertentu yang salah satunya gen *PSY*, Gen *PSY* (*Phytoene Synthase*) merupakan gen pengkode enzim pada biosintesis karotenoid yang berperan dalam respon tanaman terhadap cekaman atau stres. Penelitian pada tanaman wortel menunjukkan kenaikan ekspresi gen *PSY* diikuti peningkatan

karotenoid dan ABA (Simpson *et al.*, 2018). Pendekatan untuk mengetahui dan memprediksi fungsi gen *PSY* dapat dilakukan dengan metode *in silico*. Analisis *in silico* memungkinkan identifikasi, karakterisasi, dan pemetaan ekspresi gen secara komputasional memberikan gambaran awal akan mekanisme suatu gen dalam merespon kondisi tertentu. Karakterisasi sudah dilakukan secara *in silico* pada tanaman melon (*Cucumis melo*) mengidentifikasi dua gen *PSY*, yaitu *CmPSY1* yang terekspresi di bunga dan buah, serta *CmPSY2* yang terekspresi di akar (Qin *et al.*, 2011).

Metode *in silico* memungkinkan analisis dan prediksi fungsi suatu gen dengan biaya yang lebih murah dan mudah, salah satu pendekatannya dengan pembuatan pohon filogenetik untuk mengetahui kedekatan antar gen tanaman. Penelitian gen *PSY* pada 34 tanaman menunjukkan 3 kluster berdasar pada pohon filogenetik yang menunjukkan kesamaan gen satu sama lain (Han *et al.*, 2015), penelitian gen *PSY* pada tanaman famili solanaceae dan tanaman outgroup (*Arabidopsis thaliana*) menunjukkan terbentuknya 2 kluster dimana pengelompokan terjadi antara gen *PSY* pada tanaman famili solanaceae dalam 1 kluster yang terpisah dengan tanaman *Arabidopsis thaliana* pada kluster lainnya (Efremov *et al.*, 2020)

Struktur gen juga salah satu pendekatan *in silico*, yang menunjukkan kemiripan antar gen yang dimiliki tanaman dan menjadi indikasi kemiripan fungsi gen tersebut, gen *PSY* menunjukkan kemiripan struktur dalam jumlah ekson dan intron pada antar gen homolog. Penelitian pada tanaman *Dunaliella parva* menunjukkan terdapatnya 5 ekson dan 4 intron dalam gen *PSY* (Shang *et al.*, 2018), penelitian pada *Manihot esculenta* menunjukkan terdapatnya 6 ekson dan 5 intron

dalam gen *PSY* (Arango *et al.*, 2010), penelitian pada melon menunjukkan adanya variasi pada famili gen *PSY* yakni terdapat varian yang memiliki 6 ekson dan 5 intron serta varian yang memiliki 4 ekson dan 3 intron (Qin *et al.*, 2011), hal serupa juga ditemui pada tanaman semangka yang memiliki varian gen *PSY* dengan 5 ekson dan 4 intron serta varian yang memiliki 6 ekson dan 5 intron (Wu *et al.*, 2020).

Motif menjadi indikator kesamaan urutan asam amino yang dimiliki tanaman semakin mirip urutan asam amino yang dimiliki berarti semakin sama mekanisme dan cara kerja suatu protein. Penelitian pada gen *PSY* tanaman *Citrullus lanatus* menunjukkan terdapatnya 3 motif protein yang terbentuk (Wu *et al.*, 2020), penelitian pada tanaman famili *solanaceae* menunjukkan adanya 10 motif protein hasil translasi gen *PSY* (Efremov *et al.*, 2020). Domain merupakan unit fungsional yang terdapat pada urutan asam amino, pada protein hasil translasi gen *PSY* terdapat domain enzim *PSY* di dalamnya menunjukkan ada fungsi protein sebagai katalisator sintesis karotenoid. Domain protein *squalene/phytoene synthase* dan *isoprenoid synthase* ditemukan pada gen *DcPSY2* pada tanaman wortel (Acevedo *et al.*, 2023).

Gen *PSY* yang telah banyak dilaporkan merespon dan meningkatkan ketahanan tanaman terhadap cekaman salin dengan meningkatkan produksi karotenoid. Penelitian pada tanaman *Manihot esculenta* yang mendapat perlakuan salin 250 mM selama 2, 6, dan 12 jam menunjukkan peningkatan ekspresi gen *PSY* (Arango *et al.*, 2010). Penelitian pada tanaman *Daucus carota* menunjukkan peningkatan ekspresi gen *PSY* cekaman salin 250mM menunjukkan peningkatan pada lama cekaman 2,4, dan 6 jam (Simpson *et al.*, 2018). Penelitian pada tanaman

melon dengan cekaman 250mM pada taraf lama cekaman 0, 6, 12, 24, dan 48 jam menunjukkan perbedaan ekspresi gen secara menyeluruh (Liu *et al.*, 2023).

Tanaman yang mengalami cekaman salin akan berdampak pada penutupan stomata menurunkan laju fotosintesis dan peningkatan ROS sebagai gantinya tanaman merespon dengan mensintesis antioksidan seperti karotenoid (Arif *et al.*, 2020). Karotenoid merupakan molekul pigmen yang dapat berperan dalam menetralkan molekul ROS yang berbahaya bagi tanaman. Karotenoid berperan sebagai antioksidan non enzimatis yang menetralkan molekul ROS mengubahnya menjadi molekul stabil (Nowicka *et al.*, 2021).

Stress salin mengakibatkan gangguan pada biosintesis molekul–molekul penting pada tanaman seperti klorofil a, klorofil b, dan total klorofil (biomarker). Penelitian pada tanaman tomat cekaman salin 100mM selama 3 hari menunjukkan penurunan klorofil a, klorofil b, dan total klorofil (Venu *et al.*, 2021) dan penelitian pada tanaman melon dengan cekaman salin 50 mM selama 5 hari, 100 mM selama 5 hari, dan 150 mM selama 10 hari menunjukkan penurunan kadar klorofil dan karotenoid (Yarsi *et al.*, 2017). Kadar klorofil yang tidak normal mengganggu proses fotosintesis dan berakibat pertumbuhan tanaman yang tidak optimal, dampaknya terlihat dari pertumbuhan morfologi seperti panjang akar dan tinggi tanaman yang lebih buruk penelitian pada tanaman melon dengan cekaman salin 50 mM selama 5 hari, 100 mM selama 5 hari, dan 150 mM selama 10 hari menunjukkan penurunan panjang akar dan tajuk (Yarsi *et al.*, 2017).

Berdasarkan uraian diatas penelitian dibagi menjadi 2 tahap, tahap pertama adalah identifikasi secara *in silico*, bertujuan untuk mengidentifikasi famili gen *PSY*

pada tanaman melon, menganalisis kekerabatan yang terbentuk, menganalisis struktur gen, motif dan domain protein dari PSY, serta mengetahui ekspresi gen *PSY* pada cekaman salin berdasar analisis transkriptomik. Tahap kedua adalah validasi biomarker, bertujuan untuk mengetahui respon biomarker dan pertumbuhan tanaman akibat pengaruh cekaman salin

1.2. Tujuan dan Manfaat Penelitian

Tujuan penelitian tahap identifikasi *in silico*, sebagai berikut :

1. Mengkaji kekerabatan famili gen *Phytoene Synthase (PSY)* pada melon dan tanaman pembanding.
2. Mengkaji perbedaan struktur famili gen *Phytoene Synthase (PSY)* pada tanaman melon.
3. Mengkaji perbedaan motif dan *domain* protein gen *Phytoene Synthase (PSY)* pada tanaman melon.
4. Mengkaji perbedaan ekspresi famili gen *Phytoene Synthase (PSY)* pada tanaman melon secara transkriptomik.

Tujuan penelitian tahap validasi biomarker, sebagai berikut :

1. Mengkaji pengaruh lama cekaman salinitas terhadap biomarker kadar klorofil a, kadar klorofil b, total klorofil, dan kadar karotenoid pada tanaman melon.
2. Mengkaji pengaruh lama cekaman salinitas terhadap respon pertumbuhan panjang akar dan tinggi tanaman tanaman melon.

Manfaat penelitian tahap identifikasi *in silico*, sebagai berikut :

1. Memperoleh informasi tentang kekerabatan famili gen *Phytoene Synthase (PSY)* pada tanaman melon dan tanaman pembanding.
2. Memperoleh informasi tentang struktur famili gen *Phytoene Synthase (PSY)* pada tanaman melon.
3. Memperoleh informasi tentang motif dan domain protein *Phytoene Synthase (PSY)* pada tanaman melon.
4. Memperoleh informasi tentang ekspresi famili gen *Phytoene Synthase (PSY)* pada tanaman melon cekaman salin secara transkriptomik.

Manfaat penelitian tahap validasi biomarker, sebagai berikut :

1. Memperoleh informasi tentang pengaruh lama cekaman salinitas terhadap biomarker kadar klorofil a, kadar klorofil b, total klorofil, dan kadar karotenoid pada tanaman melon.
2. Memperoleh informasi tentang pengaruh lama cekaman salinitas terhadap respon pertumbuhan panjang akar dan tinggi tanaman tanaman melon.

1.3. Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian tahap identifikasi *in silico*, sebagai berikut :

1. Terbentuk 3 pengelompokan famili gen *Phytoene Synthase (PSY)* pada melon dan tanaman pembanding.

2. Terdapat kemiripan jumlah ekson dan intron pada struktur famili gen *Phytoene Synthase (PSY)* pada tanaman melon yakni 6 ekson dan 5 intron.
3. Terdapat kemiripan motif dan domain protein *Phytoene Synthase (PSY)* pada tanaman melon yakni 10 motif protein dan domain *squalene/phytoene synthase*.
4. Terdapat peningkatan ekspresi famili gen *Phytoene Synthase (PSY)* tanaman melon pada lama cekaman salin 6 jam dari analisis transkriptomik.

Hipotesis penelitian tahap validasi biomarker, sebagai berikut :

1. Lama cekaman salinitas 3 hari menurunkan kadar klorofil terhadap biomarker kadar klorofil a, kadar klorofil b, total klorofil, dan kadar karotenoid pada tanaman melon.
2. Lama cekaman salinitas 3 hari menurunkan pertumbuhan panjang akar dan tinggi tanaman tanaman melon.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Melon (*Cucumis melo* L.)

Melon (*Cucumis melo* L.) merupakan tanaman hortikultura berciri warna buah hijau, kuning, bahkan putih ini menawarkan nutrisi, rasa manis dan tekstur unik yang bernilai ekonomi tinggi sehingga menjadi komoditas menarik untuk dibudidayakan di Indonesia. Tanaman melon memiliki kandungan karotenoid dan kandungan vitamin C (Daryono *et al.*, 2016). Kebutuhan dan permintaan konsumen akan melon melonjak bersamaan dengan kenaikan penduduk tidak dibarengi dengan peningkatan produksi melon. Produksi tahunan tanaman melon terus menurun pada tahun 2021 hingga 2023 dalam ton sebesar 129.147, 118.696, dan 117.794 (BPS, 2024). Penurunan sektor produksi melon erat kaitannya dengan faktor lingkungan yang memiliki pengaruh cukup besar dalam produktivitas melon seperti satu diantaranya adalah salinitas.

Klasifikasi tanaman melon adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Divisi : Tracheophyta

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Cucurbitales

Famili : Cucurbitaceae

Genus : *Cucumis* L.

Spesies : *Cucumis melo* L. (ITIS, 2024)

Tanaman melon diperkirakan berasal dari daerah perbatasan Asia barat dengan Eropa dan Afrika, mulai disebarluaskan mulai abad ke-14 hingga akhirnya menyebar di daerah tropis dan sub tropis. Melon di Indonesia dikenal pada tahun 1980-an, melon yang merupakan buah impor mulai ditanam dan dikembangkan di Indonesia mengakibatkan pada tahun 1990 mulai bermunculan sentra melon di wilayah Jakarta, Jawa barat, Jawa tengah serta Jawa timur (Daryono dan Maryanto, 2018). Melon merupakan tanaman dataran rendah–menengah, membutuhkan media dengan pH netral, beriklim hangat. Melon dapat tumbuh pada ketinggian optimal di 300 mdpl namun dapat tumbuh pada ketinggian maksimal 900 mdpl, media yang baik untuk pertumbuhan tanaman melon adalah tanah bertipe lempung berpasir dengan kandungan bahan organik yang mencukupi serta pH berkisar antara 5,5 hingga 7,0 dan tidak ada genangan, suhu lingkungan yang dibutuhkan tanaman melon 25–30°C dan tingkat kelembaban >60% dan <80% (Tarigan *et al*, 2016).

Tanaman melon merupakan tanaman semusim keluarga cucurbitaceae satu keluarga dengan tanaman semangka, labu, dan timun. Tanaman melon memiliki batang berbentuk segi lima, berwarna hijau tua, dan berair, daun bertipe tulang menjari, berwarna hijau tua, dan berbulu kasar pada permukaannya, bunga berwarna kuning dengan petal menempel, terpisah antara bunga jantan dan betina, buah berwarna hijau tanpa bercak, berbentuk bulat dengan ujung buah rata, warna buah bervariasi hijau, putih dan oranye serta memiliki kulit yang keras, memiliki biji berbentuk pipih, memiliki permukaan yang halus, bertepi tebal, dan berwarna putih (Zuraida, 2019).

2.2. Cekaman Salinitas

Salinitas merupakan kondisi cekaman abiotik akibat kandungan garam yang berpengaruh bagi pertumbuhan tanaman. Tanah salin didefinisikan sebagai tanah yang mengandung ion Cl^- dan Na^+ dalam kadar yang tinggi (Imadi *et al.*, 2016). Tanah salin terbentuk akibat faktor alam seperti pelapukan batuan, kenaikan air laut, ataupun campur tangan manusia seperti irigasi dengan air berkualitas buruk. Tanah dengan nilai EC 0–2 dS/m (non salin), 2–4 dS/m (salin sedang), 4–8 dS/m (salin kuat), >16 dS/m (salin ekstrem), Hal ini disebabkan oleh faktor primer seperti pelapukan batuan, rendahnya curah hujan dan suhu yang tinggi, atau faktor sekunder seperti irigasi tidak tepat tanpa drainase yang baik (Yuvaraj *et al.*, 2021).

Tanah salin berdampak buruk bagi pertumbuhan tanaman bahkan tanaman dapat mati. Tingkat salinitas 50–60 mM berpengaruh buruk bagi pertumbuhan tanaman melon (Yang *et al.*, 2023). Tanaman yang mengalami stres salinitas akan mengalami stres osmotik (penurunan serapan air), ionik (toksisitas ion Cl^- dan Na^+), dan oksidatif (peningkatan produksi radikal bebas yang dapat merusak membran sel, protein, dan DNA). Paparan garam yang berlebihan dapat menyebabkan stres ionik dan osmotik, yang kemudian memicu stres oksidatif pada tanaman, sehingga mengganggu keseimbangan seluler dan menghambat pertumbuhan serta perkembangan secara keseluruhan (Balasubramaniam *et al.*, 2023).

2.3. Mekanisme Respon Tanaman terhadap Cekaman Salinitas

Salinitas memiliki pengaruh buruk pada tanaman cekaman salinitas merupakan salah satu cekaman abiotik yang mempengaruhi pertumbuhan tanaman. Dalam menghadapinya tanaman memunculkan berbagai respon baik morfologis, fisiologis, biokimia, maupun molekuler yang dapat dijadikan sebagai indikasi kondisi tanaman terhadap cekaman salin. Salinisasi memiliki efek buruk terhadap tanaman, memberikan perubahan negatif dan menghambat proses fisiologi dan biokimia tanaman (Shahid *et al.*, 2020). Pengaruh yang disebabkan oleh salinitas dapat menyebabkan gangguan osmotik, ionik, dan oksidatif. Akumulasi paparan garam pada tanaman memicu gangguan ionik dan osmotik, yang selanjutnya menyebabkan peningkatan stres oksidatif, merusak keseimbangan seluler, dan akhirnya menurunkan laju pertumbuhan serta perkembangan tanaman secara keseluruhan (Balasubramaniam *et al.*, 2023).

Mekanisme gangguan osmotik pada tanaman disebabkan karena adanya akumulasi ion yang berlebih sehingga penyerapan air dan hara terganggu karena tekanan osmotik yang tidak normal. Pergerakan air didorong oleh gradien air dari pekat ke encer (tanah ke tanaman), namun pada kondisi lingkungan yang tidak stabil dapat terjadi sebaliknya dimana kondisi tanah lebih pekat dibandingkan pada tanaman (Yu *et al.*, 2024). Tanaman dalam kondisi stres osmotik akan mensintesis molekul osmoprotektan untuk menetralkan tekanan osmotik sehingga penyerapan air kembali normal. Kondisi yang tidak baik seperti dingin, panas, salin, kering menyebabkan stres osmotik terjadi, tanaman akan mensintesis molekul seperti prolin, gula, dan alkohol sebagai mekanisme pertahanan (Mishra *et al.*, 2022).

Gangguan ionik terjadi akibat akumulasi ion garam seperti Na^+ dan Cl^- yang terserap tanaman dan dapat menyebabkan toksisitas pada tanaman. Kandungan NaCl yang tinggi pada tanah menyebabkan berkurangnya serapan ion K^+ yang merupakan ion penting untuk tanaman (Zhou *et al.*, 2024). Akumulasi ion Na^+ pada sel akan dinetralkan oleh tanaman melalui mekanisme pembuangan ion Na^+ . Tanaman mengatasi stres ionik pada salinitas tinggi dengan cara mengekskresikan atau menyekuestrasi Na^+ melalui antiporter Na^+/H^+ (Xiao dan Zhou, 2023).

Stres ionik dan osmotik akan menyebabkan kebocoran elektron dan elektron tersebut akan bereaksi menjadi senyawa ROS yang dapat merusak sel. Molekul ROS dapat terbentuk di kloroplas, kebocoran elektron yang terjadi akibat reaksi fotosintesis yang terganggu membentuk molekul ROS (Nowicka *et al.*, 2021). ROS yang berpotensi merusak harus dinetralkan, mekanisme penetralan molekul ROS dapat dilakukan oleh molekul antioksidan. Tanaman yang mengalami stres oksidatif akan berusaha menetralkan ROS dengan mensintesis molekul antioksidan enzimatis seperti *superoxide dismutase*, *catalase*, *ascorbate peroxidase* dan antioksidan non enzimatis seperti asam askorbat, karotenoid, flavonoid, dan prolin (Das dan Roychoudhury, 2014).

2.4. Karakterisasi gen *Phytoene Synthase*

Gen *phytoene synthase* (*PSY*) merupakan salah satu gen pengkode enzim kunci dalam biosintesis karotenoid. Karotenoid berperan penting dalam berbagai fungsi fisiologis tanaman. Enzim *PSY* mengkatalisis jalur pertama dari biosintesis karotenoid dengan mengkonversi molekul *geranylgeranyl pyrophosphate* (GGPP)

menjadi *phytoene*. Penelitian pada *Arabidopsis thaliana* menyebutkan bahwa ekspresi gen *PSY* mempengaruhi sintesis karotenoid setelah dicekam salinitas (Ruiz-Sola *et al.*, 2014). Karotenoid memiliki peran sebagai pigmen pelindung dan penangkap cahaya serta sebagai prekursor fitohormon seperti asam absisat (ABA). Biosintesis karotenoid diawali dari konversi dua molekul *geranylgeranyl pyrophosphate* (GGPP) menjadi molekul karotenoid *phytoene* oleh *Phytoene Synthase* (*PSY*) yang menjadi prekursor hormon ABA (Rosas-Saavedra dan Stange, 2016).

In silico menganalisis data yang telah ada kemudian memberikan gambaran awal yang akan dihasilkan (prediksi), hasil yang diberikan berupa analisis kekerabatan berdasar pohon filogenetik, struktur gen, motif dan domain protein serta analisis transkriptomik. Metode *in silico* (bioinformatika) membantu menganalisis gen yang berasosiasi dengan respon stress dan fungsinya terhadap kondisi tertentu, membawa wawasan baru mengenai bagaimana mekanisme respon tanaman (Kishor *et al.* 2014).

Analisis kekerabatan berdasar pohon filogenetik merupakan pendekatan *in silico* yang memperhitungkan kemiripan gen/organisme. Pohon filogenetik dapat berfungsi untuk memprediksi fungsi suatu gen yang belum diketahui fungsinya berdasar kemiripan dengan gen yang telah diteliti fungsinya (Zhang *et al.*, 2020). Pohon filogenetik menunjukkan kedekatan/kekerabatan dari sekuen gen yang ditunjukkan dari kedekatan antar cabang yang terbentuk dan pengelompokkan yang terjadi. Sekuen gen yang berasal dari organisme yang sama menunjukkan terbentuknya pengelompokkan (Lisboa *et al.*, 2022). Pohon filogenetik dari *PSY*

menunjukkan terbentuknya 3 kelompok yang berdasar dari kesamaan urutan antar sekuen. Analisis kekerabatan berdasar pohon filogenetik dari 34 sekuen famili *PSY* menunjukkan adanya 3 kelompok besar yang terbentuk (Han *et al.*, 2015)

Struktur gen terdiri atas ekson dan intron, dapat menjadi indikasi kemiripan gen satu sama lain dan berkaitan dengan prediksi fungsi gen yang sama. Kesamaan struktur gen dapat mencerminkan kemiripan fungsi antar gen, kemiripan struktur ekson/intron dalam suatu gen mengindikasikan pengelompokan dalam pohon filogenetik dan berkorelasi terhadap kedekatan gen/ fungsi gen (Sheng *et al.*, 2022). Ekson merupakan segmen di dalam gen yang mengkode suatu protein atau yang akan melalui proses translasi, sementara intron adalah segmen dalam gen yang tidak mengkode protein. Ekson adalah daerah yang akan terekspresi menjadi protein sementara intron adalah daerah yang tidak terekspresi menjadi protein (Cotton dan Murray, 2018). *Upstream* merupakan segmen yang terletak pada sebelum titik awal transkripsi dan *downstream* merupakan segmen yang terletak setelah titik awal transkripsi. *Upstream* terletak pada segmen sebelum titik transkripsi (Bansal *et al.*, 2014) dan *downstream* merupakan segmen yang berada pada titik setelah titik transkripsi (Yochum *et al.*, 2008)

Pendekatan identifikasi motif dan domain protein dapat memberikan wawasan mengenai peran dan fungsi protein yang mirip. Motif dan domain protein berkorelasi dengan *conserved sequence* yang mengindikasikan peran paralel antar protein yang teridentifikasi (Wen *et al.*, 2021). Motif protein adalah pola yang sama yang muncul pada beberapa sekuen protein, hal ini mengindikasikan adanya urutan asam amino yang sama yang dipertahankan. Motif protein adalah pola pendek

berulang pada sekuen protein yang muncul di berbagai protein, menunjukkan segmen penting yang dipertahankan dan berperan dalam memahami mekanisme biologisnya (Bailey *et al.*, 2015). Domain protein merupakan bagian dari protein yang memiliki fungsi tertentu, dengan mengetahui domain protein dari sekuen dapat memahami dan memastikan karakteristik protein secara fungsional. Identifikasi domain protein pada sekuen protein tertentu dapat digunakan sebagai pendekatan untuk mengetahui peran dari protein tersebut (Marchler-Bauer *et al.*, 2010)

Analisis transkriptomik memberikan gambaran mengenai ekspresi gen dalam ruang lingkup molekuler, Analisis transkriptomik merupakan pendekatan analisis yang memungkinkan untuk mengukur dan membandingkan ekspresi gen pada kondisi/ jaringan yang berbeda serta membantu melihat level ekspresi gen pada cekaman abiotik (Bordbar *et al.*, 2023). Analisis transkriptomik menunjukkan ekspresi gen pada dua kondisi (kontrol dan perlakuan), yang ditunjukkan pada nilai logfoldchange. Analisis transkriptomik dilakukan menggunakan DESeq2 menunjukkan nilai logfoldchange dimana nilai 0 menunjukkan ekspresi gen tidak terpengaruh oleh perlakuan (Love *et al.*, 2014).

Pendekatan *in silico* berhasil mengidentifikasi gen *PSY* pada beberapa spesies tanaman, gen *PSY* menunjukkan variasi baik dalam urutan nukleotida maupun jumlah kelompok gen *PSY* pada spesies tanaman. Variasi gen memungkinkan suatu organisme memiliki lebih dari satu gen yang sama dengan mekanisme ekspresi yang berbeda satu sama lain. Tanaman melon (*Cucumis melo*) diidentifikasi memiliki 2 gen *PSY* yakni gen *CmPSY1* yang terekspresi tinggi pada bunga dan

buah terutama buah berusia 40 hari setelah polinasi sementara *CmPSY2* terekspresi tinggi di akar dan berperan dalam biosintesis karotenoid, perbedaan ekspresi yang terjadi dapat disebabkan oleh redundansi (Qin *et al.*, 2011).

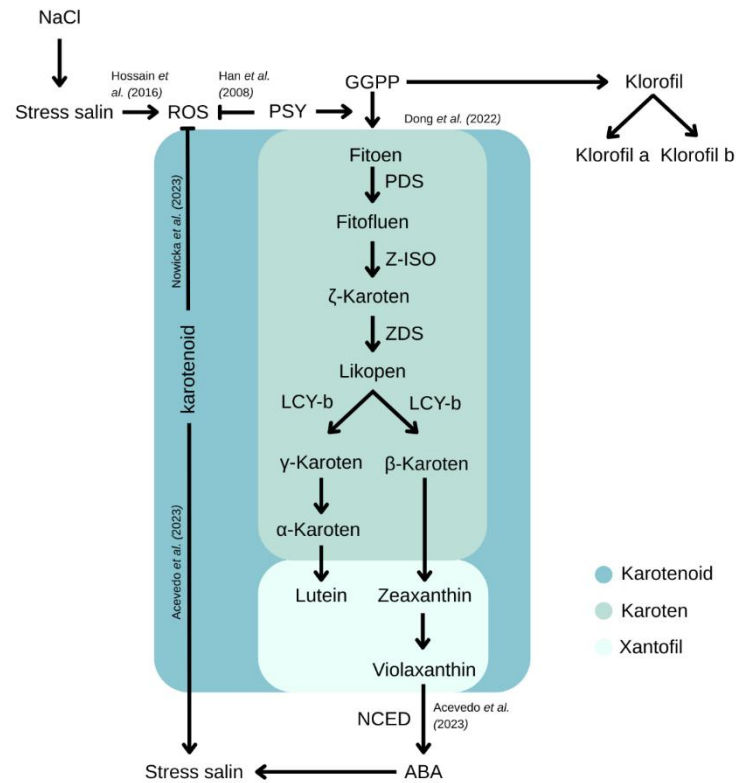
2.5. Respon gen *Phytoene Synthase* terhadap Salinitas

Gen *PSY* merupakan gen pengkode enzim PSY yang mengkatalisis konversi *geranylgeranyl pyrophosphate* (GGPP) menjadi *phytoene*. Gen *PSY* menjadi gen pertama dalam biosintesis karotenoid dengan mengubah dua molekul *geranylgeranyl pyrophosphate* (GGPP) menjadi *phytoene* (Rosas-Saavedra dan Stange, 2016). Karotenoid menjadi antioksidan non enzimatis yang menetralkan ROS menjadi bentuk yang lebih stabil dan tidak berpotensi merusak sel. Karotenoid berperan sebagai antioksidan non enzimatis dengan menetralkan ROS dengan cara bereaksi dengan ROS menerima energi atau elektron dari ROS dan melepaskan energi tersebut menjadi panas sementara ROS menjadi netral dan lebih tidak reaktif (Das dan Roychoudhury, 2014).

Gen *PSY* juga telah diidentifikasi merespon cekaman salin dengan menunjukkan peningkatan ekspresi. Penelitian menunjukkan bahwa cekaman NaCl 250 mM merangsang ekspresi gen *PSY* pada tanaman wortel (*Daucus carota*) dengan peningkatan yang terdeteksi pada durasi cekaman 2, 4, dan 6 jam (Simpson *et al.*, 2018). Hal serupa juga ditemukan pada tanaman *Arabidopsis thaliana*, di mana cekaman salinitas 200 mM NaCl selama 2 jam menyebabkan peningkatan ekspresi gen *PSY* di akar (Ruiz-Sola *et al.*, 2014). Uji ekspresi pada kondisi *salinity up-shock stress* dengan konsentrasi NaCl 0,5M-1,5M selama 48 jam, ekspresi gen

PSY mengalami penurunan pada alga (*Dunaliella parva*) (Shang *et al.*, 2018). *Manihot esculenta* kondisi salinitas 250mM menunjukkan peningkatan ekspresi gen *MePSY1* dan *MePSY2* di akar pada 2,6, dan 12 jam setelah perlakuan dan tertinggi pada 6 jam, pada daun *MePSY1* menunjukkan peningkatan ekspresi pada 2,6, dan 12 jam dengan tertinggi pada 2 jam serta *MePSY2* mengalami peningkatan pada 2 dan 12 jam, selain itu konsentrasi ABA juga meningkat baik pada akar maupun pada daun (Arango *et al.* 2010). Peningkatan ekspresi dari *IbPSY* terjadi pada daun muda dan batang tanaman *Ipomoea batatas* yang mendapatkan perlakuan salin 300mM selama 2 dan 11 hari (Shao *et al.*, 2019). Penelitian terhadap tanaman *Solanum villosum* menunjukkan peningkatan signifikan terhadap *SvPSY2* pada cekaman NaCL 100mM (Ben–Abdallah *et al.*, 2019).

Penelitian menunjukkan respon gen *PSY* terhadap salinitas, penelitian lanjutan menerapkan penyisipan gen *PSY* pada tanaman dan menunjukkan peningkatan toleransi terhadap salinitas. Penelitian tanaman transgenik *Nicotiana tabacum* yang disisipkan gen *PSY* dari wortel (*Daucus carota*) menunjukkan toleransi cekaman (Acevedo *et al.*, 2023), *Arabidopsis thaliana* transgenik dengan gen *PSY* dari *Salicornia europaea* (Han *et al.*, 2008), tanaman transgenik *Arabidopsis thaliana* yang disisipkan gen *PSY* tanaman *Salicornia europaea* menunjukkan (Rehman *et al.*, 2017), gen *PSY* tanaman *Citrus paradisi* yang disisipkan pada tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*) menunjukkan nilai yang lebih baik dibandingkan tanaman kontrol (Cidade *et al.*, 2012). Penelitian terdahulu juga menjelaskan bagaimana keterkaitan dan mekanisme *PSY* membantu ketahanan tanaman akibat salinitas, terlihat pada ilustrasi 1.



Ilustrasi 1. Respon Gen *PSY* terhadap Salinitas

Penelitian sebelumnya menunjukkan adanya peningkatan level ekspresi serta ketahanan pada tanaman yang disisipi gen *PSY*, hal ini memberikan indikasi kuat antara gen *PSY* dan ketahanan tanaman terhadap cekaman salin, peningkatan level ekspresi yang terjadi. Gen *PSY* terekspresi lebih tinggi pada cekaman salin (Simpson *et al.* 2018). Gen *PSY* merupakan gen yang mengkode enzim PSY yang berfungsi dalam biosintesis karotenoid. Hal ini sesuai dengan yang menyatakan bahwa enzim *PSY* berfungsi sebagai katalis GGPP menjadi *phytoene* (Dong *et al.* 2022)

Molekul karotenoid merupakan molekul pigmen yang dapat berfungsi sebagai respon tanaman terhadap cekaman salin, molekul ini juga merupakan

prekursor dari hormon ABA. Hal ini sesuai dengan Acevedo *et al.* (2023) yang menyatakan bahwa tanaman yang disisipi gen *DcPSY2* memiliki kandungan karotenoid dan hormon ABA yang lebih tinggi serta menunjukkan ketahanan yang lebih baik terhadap salinitas. Gen *PSY* yang menjadi katalis pertama sintesis karotenoid terbukti dapat menekan kerusakan oksidatif. Hal ini sesuai dengan Han *et al.* (2008) yang menyatakan bahwa tanaman transgenik gen *PSY* pada cekaman salin menunjukkan akumulasi ROS yang lebih sedikit bersamaan dengan peningkatan kadar karotenoid.

Molekul karotenoid dapat berperan sebagai antioksidan non enzimatis yang dapat menetralkan ROS. Hal ini sesuai Nowicka *et al.* (2021) yang menyatakan bahwa karotenoid dapat menekan aktivitas ROS dengan cara menyerap energi dari molekul ROS membuatnya menjadi molekul yang lebih stabil dan tidak merusak. Karotenoid merupakan molekul pigmen yang dapat berfungsi sebagai respon tanaman terhadap cekaman salin. ROS sendiri merupakan molekul yang dapat merusak sel, terbentuk akibat kebocoran elektron karena stres. Hal ini sesuai dengan Hossain *et al.* (2016) yang menyatakan bahwa stres salin meningkatkan kadar ROS pada tanaman.

2.6. Biomarker Cekaman Salinitas

Salinitas berpengaruh pada proses pembentukan molekul penting pada tanaman (*biomarker*). Biosintesis molekul penting seperti klorofil yang perannya esensial pada proses fotosintesis tanaman dapat terganggu akibat cekaman salin. Kadar klorofil a dan b mengalami tren negatif akibat cekaman salinitas (Yarsi *et*

al., 2017). Tingginya ion garam pada lingkungan sekitar tanaman mengakibatkan terhambatnya penyerapan Mg^{2+} yang merupakan ion penyusun klorofil. Tanaman akan mengalami kekurangan Mg^{2+} sebagai ion penting pembentuk klorofil (Liu *et al.*, 2024).

Tanaman dalam kondisi salin akan mensintesis beberapa molekul ketahanan sebagai respon akan kondisi stres. Cekaman salinitas pada tanaman menyebabkan penutupan stomata yang menurunkan fotosintesis dan meningkatkan ROS, sehingga tanaman merespons dengan mensintesis prolin, gula, dan antioksidan seperti karotenoid (Arif *et al.*, 2020). Molekul karotenoid tersintesis lebih tinggi pada kondisi cekaman salin menandakan respon tanaman terhadap salinitas. Penelitian menunjukkan bahwa cekaman NaCl 250 mM merangsang peningkatan sintesis karotenoid pada lama cekaman 4 dan 6 jam (Simpson *et al.*, 2018). Karotenoid molekul yang proses biosintesisnya dikatalisis oleh gen *PSY* memiliki peran antagonis terhadap ROS, karotenoid dapat menetralkan molekul ROS sehingga tidak merusak sel. Karotenoid berperan sebagai antioksidan non enzimatis yang menetralkan molekul ROS mengubahnya menjadi molekul stabil (Nowicka *et al.*, 2021).

Karotenoid juga merupakan prekursor dari ABA, sebuah hormon yang berkaitan dengan ketahanan tanaman terhadap stres. Karotenoid berperan sebagai prekursor dalam biosintesis hormon asam absisat (ABA), yang berfungsi penting dalam meningkatkan ketahanan tanaman terhadap cekaman abiotik, termasuk salinitas (Acevedo *et al.*, 2023). Akumulasi tinggi hormon asam absisat sebagai respon terhadap stres mengakibatkan hambatan pertumbuhan akar. Asam absisat

mengatur proses replikasi DNA, pembelahan dan pemanjangan sel, serta berperan dalam menghambat pertumbuhan akar primer (Sun *et al.*, 2018).

Pengaruh dari salinitas dapat mencakup gangguan pertumbuhan tanaman yang berdampak pada panjang akar dan tinggi tanaman. Perlakuan salinitas menyebabkan perbedaan yang nyata terhadap tinggi tanaman dan panjang akar dibandingkan dengan tanaman pada kondisi kontrol (Smolko *et al.*, 2021). Pertumbuhan yang terganggu disebabkan oleh terjadinya stres osmotik, ionik, dan oksidatif pada tanaman. Salinitas tinggi dapat menghambat proses pemanjangan akar dan batang akibat penyerapan air dan unsur hara yang melambat (Puvanitha dan Mahendran, 2017).

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi dan Pemuliaan Tanaman, Departemen Pertanian, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang. Penelitian dilakukan selama 9 bulan yaitu pada bulan Oktober 2024 – Juni 2025.

3.2. Materi Penelitian

Materi penelitian tahap identifikasi secara *in silico* terdiri atas bahan. Bahan yang digunakan pada penelitian ini yakni: data sekuen gen, *coding sequence* (cds), dan protein famili *PSY* dari beragam tanaman meliputi *ingroup* sekuen gen, cds, protein, dan mRNA *PSY* dari enam kultivar *Cucumis melo*, yakni kultivar charmono, DHL92, harukei-3, IVF77, payzawat, dan P148460, *outgroup* sekuen gen, cds, dan protein *PSY* dari tanaman yang sudah diteliti sebelumnya meliputi *Arabidopsis thaliana*, *Mannihot esculenta*, *Salicornia europaea*, *Solanum villosum*, *Citrus paradisiaca*, *Daucus carota*, *Dunaliella parva*, dan data *sequencing* cDNA (PRJNA987131).

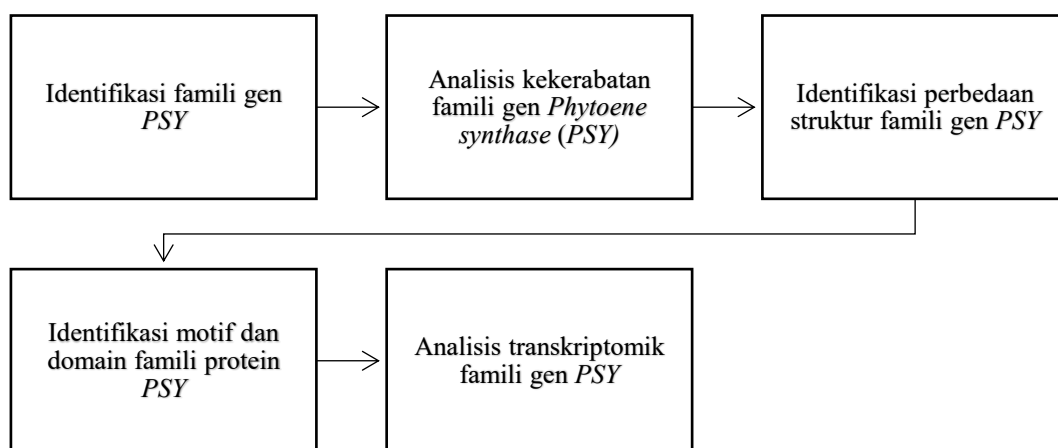
Materi penelitian tahap validasi biomarker terdiri atas alat dan bahan. Bahan yang digunakan pada penelitian ini yakni: benih melon varietas greeniegal, aseton, kertas saring, aquades, plastik klip, NaCl *for analysis*, dan tisu. Alat yang digunakan

pada penelitian ini antara lain: wadah semai, bak, kamera, latar belakang foto, lemari pendingin, timbangan analitik, *mortar*, *pestle*, spektrofotometer, tabung erlenmeyer, dan kuvet.

3.3. Metode Penelitian

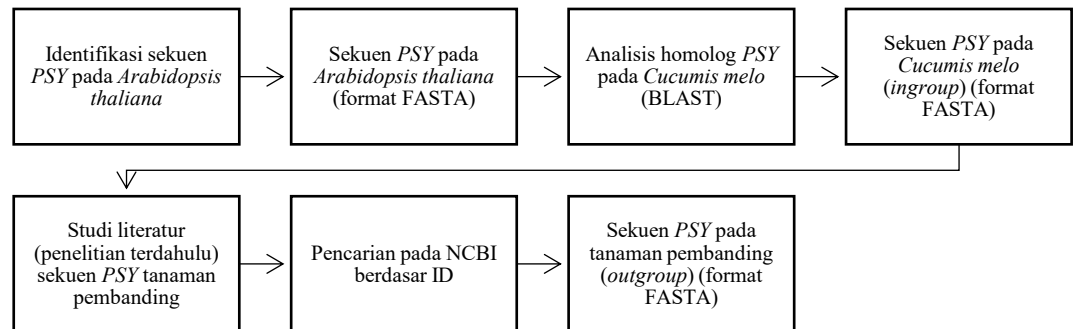
3.3.1. Identifikasi famili gen *PSY* secara *In Silico*

Prosedur penelitian. Prosedur penelitian yang dilakukan terdiri dari 5 tahap yakni analisis kekerabatan famili gen *Phytoene Synthase (PSY)*, identifikasi perbedaan struktur famili gen *PSY* pada tanaman melon, identifikasi perbedaan motif dan domain famili protein *PSY* pada tanaman melon dan analisis transkriptomik famili gen *PSY* secara *in silico*. Tahapan identifikasi secara *in silico* terdapat beberapa tahap (Ilustrasi 2.).



Ilustrasi 2. Tahap Identifikasi Famili Gen *PSY* secara *In Silico*

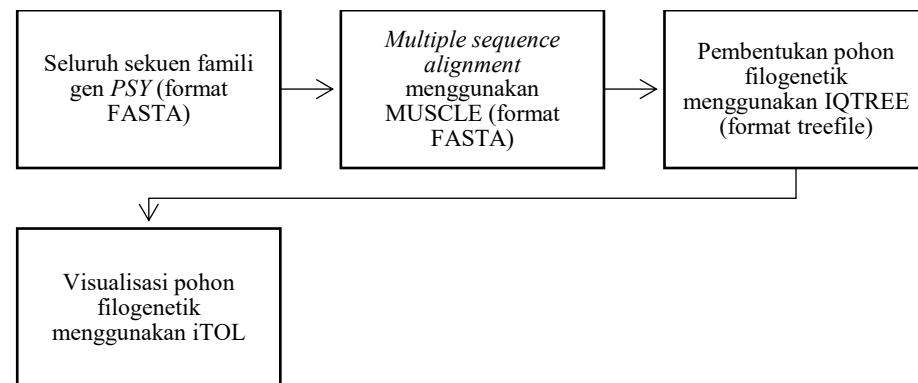
1. Identifikasi famili gen *PSY*.



Ilustrasi 3. Tahap identifikasi famili gen *PSY*

Identifikasi famili gen *PSY* dilakukan pada data sekuen gen tumbuhan yang dideposit di laman *The Arabidopsis Information* (TAIR) (<https://www.arabidopsis.org/>), *Cucurbit Genomic Database* (CuGenDBV2) (<http://cucurbitgenomics.org/v2/>), dan *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sekuen *PSY* (dalam format FASTA) didapatkan dari tanaman model *Arabidopsis thaliana* (*outgroup*) melalui TAIR, dilanjutkan dengan pencarian sekuen homolog *PSY* pada tanaman melon (*ingroup*) dilakukan pada laman CuGenDBV2 menggunakan alat BLAST dengan dasar sekuen protein *Arabidopsis thaliana* hingga didapatkan sekuen dalam format FASTA. Pencarian sekuen homolog *PSY* pada tanaman pembanding (*outgroup*) dilakukan berdasarkan studi literatur dan pencarian pada NCBI dan disimpan dalam format FASTA. Tahap Identifikasi famili gen *PSY* dilakukan sesuai lampiran 11..

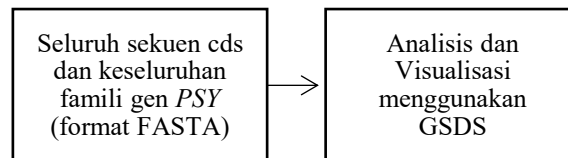
2. Analisis kekerabatan famili gen *PSY*



Ilustrasi 4. Tahap Analisis Kekerabatan Famili Gen *PSY*

Seluruh gen *PSY* yang telah didapatkan dan diunduh kemudian dilakukan penyejajaran (*multiple sequence alignment*). Penyejajaran dilakukan menggunakan laman MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/muscle>) dengan cara mengunggah sekuen gen. Penyejajaran akan menunjukkan bagian nukleotida yang sama pada masing-masing gen yang sebelumnya telah diidentifikasi. Data penyejajaran (dalam format FASTA) kemudian diunduh dengan opsi *The alignment in FASTA format converted by Seqret*. Data tersebut kemudian dianalisis menggunakan IQTREE untuk membentuk pohon filogenetik paling sesuai (dalam format treefile) serta divisualisasikan dengan menggunakan iTOL (<https://itol.embl.de/>), data divisualisasikan dengan mengunggah data penyejajaran kemudian menandai *ingroup sequence* (warna hijau) dan *outgroup sequence* (warna hitam). Tahap analisis kekerabatan famili gen *PSY* dilakukan sesuai lampiran 11.

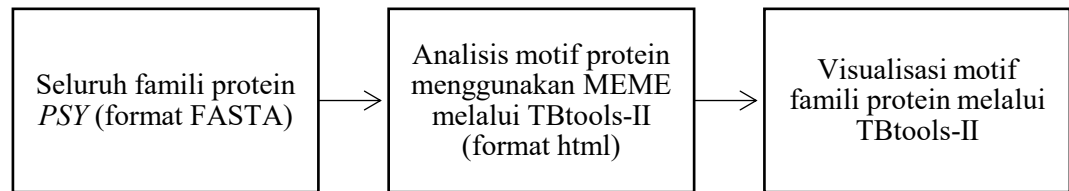
3. Identifikasi struktur gen famili gen *PSY*



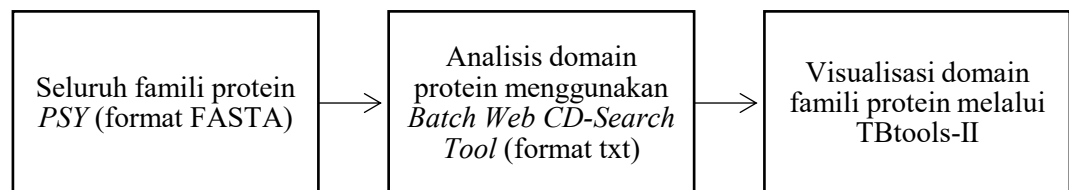
Ilustrasi 5. Tahap Identifikasi Struktur Famili Gen *PSY*

Gen *PSY* yang telah didapatkan sebelumnya kemudian diunduh sekuen cds (dalam format FASTA) dan keseluruhan gennya, kemudian struktur gennya dianalisis dan divisualisasikan dengan GSDS (<https://gsds.gao-lab.org/>). Gen keseluruhan dan cds *PSY* dideposit pada laman tersebut kemudian akan divisualisasikan struktur gennya. Tahap identifikasi struktur famili gen *PSY* dilakukan sesuai lampiran 11.

4. Identifikasi motif dan domain famili protein PSY



(A)



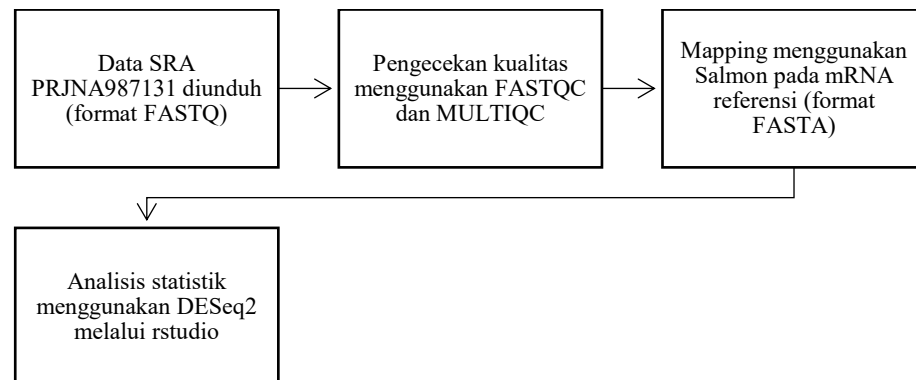
(B)

Ilustrasi 6. Tahap Identifikasi Motif dan Domain Famili Protein *PSY*. (A) Identifikasi motif famili protein *PSY*, (B) Identifikasi domain famili protein *PSY*

Identifikasi motif protein dilakukan dengan mengunggah sekuen famili protein dari *ingroup* dan *outgroup PSY* pada menu “Simple *MEME* wrapper” pada *software* TBtools-II sehingga didapatkan hasil identifikasi motif. Penyesuaian dilakukan dengan mengubah opsi “*Select the number of motifs*” menjadi 6. Hasil identifikasi motif dan sekuen famili protein *PSY* (dalam format html) kemudian divisualisasikan dengan mengunggah hasil identifikasi motif protein dan sekuen famili protein *PSY* pada menu “*Visualize MEME/MAST Motif Pattern*” melalui *software* TBtools-II. Identifikasi domain protein dilakukan dengan mengunggah sekuen famili protein *PSY* dari *ingroup* dan *outgroup PSY* pada laman *Batch Web CD-Search Tool*, penyesuaian dilakukan dengan mengubah opsi “*Search against database*”

menjadi Pfam. Hasil yang didapatkan kemudian diunduh (dalam format txt) dan dilakukan visualisasi menggunakan *software* TBtools-II. TBtools-II digunakan untuk memvisualisasikan domain protein dengan menu “*Visualize Domain Pattern (from NCBI Batch-CDD)*” kemudian dilanjutkan dengan mengunggah data sekuens protein dan CDD. Tahap identifikasi motif dan domain famili protein PSY dilakukan sesuai lampiran 11.

5. Analisis transkriptomik famili gen *PSY*.



Ilustrasi 7. Tahap Analisis Transkriptomik Famili Gen *PSY*

Analisis transkriptomik dilakukan dengan mengunduh dataset SRA berisi data *sequencing* cDNA (dalam format FASTQ) pada tanaman melon yang mendapat cekaman salin 250 mM pada 5 taraf (0, 6, 12, 24, dan 48 jam) dengan ulangan 3 kali yang dideposit pada NCBI SRA dengan nomor akses PRJNA987131 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) (Liu *et al.*, 2023). Data kemudian diuji kualitasnya melalui *software* FastQC dan MultiQC berbasis linux. Data yang telah lolos pengecekan kualitas dilanjutkan dengan analisis menggunakan Salmon berbasis linux. Analisis dilakukan dengan melakukan

indexing dari data mRNA melon DHL_92 (dalam format FASTA) yang didapat dari laman CugenDBV2, melon DHL92 digunakan sebagai referensi karena kelengkapan data yang tersedia (<http://cucurbitgenomics.org/v2/ftp/genome/melon/DHL92/v4.0/>). Analisis statistik paket DESeq2 dilakukan dengan Rstudio. Tahap analisis transkriptomik famili gen *PSY* dilakukan sesuai lampiran 11.

3.3.2. Validasi Biomarker

Rancangan penelitian. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) monofaktor yakni perlakuan lama cekaman salinitas (250 mM), yaitu : (L0 :0 hari , L1 : 1 hari, L2 :2 hari, L3 : 3 hari, L4 : 4 hari). Penelitian disusun dalam rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 ulangan, sehingga didapatkan 20 unit percobaan. Setiap unit percobaan terdiri atas 15 tanaman.

Prosedur penelitian. Prosedur penelitian yang dilakukan terdiri dari beberapa tahap yakni pengecambahan, penanaman, perlakuan, pengambilan data sesuai parameter, pengolahan data dan analisis data.

1. Tahap pengecambahan, tahap ini dilakukan dengan menanam benih pada tisu yang telah dibasahi kemudian diletakkan pada nampan selama 2-3 hari di tempat yang gelap.
2. Tahap penanaman dilakukan pada benih yang telah muncul bakal akarnya, benih tersebut dipindahkan dalam *tray* berisi media tanam kokopit kemudian dilakukan perawatan dengan cara melakukan penyiraman secara rutin selama 14 hari.

3. Tahap perlakuan dilakukan dengan memindahkan *tray* pada bak plastik berisi dengan salinitas 250 mM sebanyak 10l selama 4 hari cekaman

Pengamatan parameter. Parameter yang diamati pada penelitian ini yaitu :

1. Kandungan klorofil a (mg/g), b(mg/g), total klorofil (mg/g) dan karotenoid (mg/g)

Sebanyak satu bibit tanaman melon setiap unit sesuai perlakuan lama cekaman dipilih secara acak, kemudian sebanyak 0,25 g diambil. Sampel dihaluskan dan dilarutkan dengan menggunakan aseton 80% sebanyak 25 mL Larutan kemudian disaring melalui kertas saring, lalu dimasukkan ke dalam kuvet kemudian dilakukan uji absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV – Vis dengan panjang gelombang 480 nm, 663 nm dan 645 nm. Rumus perhitungan kadar klorofil dan kadar karotenoid berdasar dari berikut :

$$\text{Klorofil a (mg/g)} = \frac{12,7 \times A_{663\text{nm}} - 2,69 \times A_{645\text{ nm}}}{1000 \times W} \times V$$

$$\text{Klorofil b (mg/g)} = \frac{22,9 \times A_{645\text{nm}} - 4,68 \times A_{663\text{ nm}}}{1000 \times W} \times V$$

$$\text{Total Klorofil (mg/g)} = \text{Klorofil A} + \text{Klorofil B}$$

$$\text{Karotenoid (mg/g)} = \frac{[A_{480} + (0,114 \times A_{663})] - (0,638 \times A_{645})}{2500} \times V \times 10000$$

Keterangan :

A_{480} = absorbansi pada panjang gelombang 480 nm

A_{645} = absorbansi pada panjang gelombang 645 nm

A_{663} = absorbansi pada panjang gelombang 663 nm

V = volume dari ekstrak (mL)

W = berat basah dari sampel (g)

2. Tinggi tanaman (cm)

Sebanyak satu bibit tanaman melon setiap unit sesuai perlakuan lama cekaman dipilih secara acak, kemudian difoto diukur tinggi tanamannya menggunakan ImageJ.

3. Panjang akar tanaman (cm)

Sebanyak satu bibit tanaman melon setiap unit sesuai perlakuan lama cekaman dipilih secara acak, kemudian difoto diukur panjang akarnya menggunakan ImageJ.

3.3.4. Analisis Data

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

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan :

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

μ = Rata-rata umum

α_i = Pengaruh perlakuan lama cekaman salinitas sample ke-i

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

i = Perlakuan

j = Ulangan

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

Hipotesis

Hipotesis statistik yang diuji adalah:

Pengaruh lama cekaman salinitas

H_0 : $\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = \alpha_4 = \alpha_5 = 0$

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

H_1 : minimal terdapat satu $\alpha_i \neq 0$

(Terdapat pengaruh lama cekaman salinitas terhadap parameter yang diamati)

Analisis Statistik

Data hasil penelitian yang diperoleh kemudian dilakukan analisis data menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA) taraf 5% untuk mengetahui pengaruh perlakuan lama cekaman salinitas terhadap parameter yang diamati, bila terdapat perbedaan dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).