

**DETEKSI *GENUINE INTERGENERIC HYBRID* PADA POPULASI HASIL
PERSILANGAN ANTAR GENUS TEBU VARIETAS PS 862 (*Saccharum*
spp. hybrid) DENGAN *Erianthus arundinaceus* KLON IJ76-375
MENGUNAKAN SPACER 5S rRNA**

Oleh :

SINDY PARAMITHASARI



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERTANIAN
JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN
MALANG
2010**

**DETEKSI *GENUINE INTERGENERIC HYBRID* PADA
POPULASI HASIL PERSILANGAN ANTAR GENUS
TEBU VARIETAS PS 862 (*Saccharum* spp. hybrid)
DENGAN *Erianthus arundinaceus* KOLON IJ76-375
MENGUNAKAN SPACER 5S rRNA**

Oleh:

Sindy Paramithasari

0610470033-47

Skripsi

Disampaikan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana
Pertanian Strata (S-1)

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERTANIAN
JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN**

MALANG

2010

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala berkah dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian yang berjudul “**Deteksi *genuine intergeneric hybrid* pada populasi hasil persilangan antar genus tebu varietas PS 862 (*Saccharum spp. hybrid*) dengan *Erianthus arundinaceus* klon IJ76-375 menggunakan spacer 5S rRNA**”. Penyusunan laporan penelitian ini ditujukan sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan studi S1 di Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang.

Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Ir. Lita Soetopo, Phd. selaku pembimbing utama, Dr. Ir. Damanhuri, MS. selaku pembimbing kedua serta Ir. Wiwit Budi Widyasari, MSi. selaku pembimbing ketiga yang telah membimbing penulis hingga skripsi ini dapat terselesaikan.
2. Ir. Sri Lestari Purnamaningsih, MS. selaku dosen pembahas yang telah memberi masukan yang baik dalam penelitian ini
3. Pihak instansi Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P3GI) Pasuruan yang telah memberikan kesempatan penulis untuk melaksanakan kegiatan penelitian di tempat tersebut.
4. Kedua orang tua penulis serta keluarga untuk segala dukungan dan semangatnya.
5. Para sahabat dan teman-teman Pemuliaan Tanaman '06 yang telah memberikan motivasi kepada penulis. Serta semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan penulisan penelitian ini yang tidak dapat disebutkan satu-persatu.

Akhir kata penulis selalu berharap semoga tulisan ini akan bermanfaat bagi penulis serta semua pihak. Amin.

Malang, 24 Juli 2010

Penulis

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Malang tanggal 19 Desember 1987 dari Ayah bernama Sutrisno Yudi Hartono dan Ibu bernama Endang Suprihatin.

Penulis menyelesaikan pendidikan sekolah dasar di SDN Ngaglik 1 Batu pada tahun 1999. Selanjutnya meneruskan ke sekolah menengah pertama di SLTPN 1 Batu pada tahun kelulusan 2002, dan menyelesaikan sekolah menengah atas di SMAN 1 Batu pada tahun kelulusan 2005.

Pada tahun 2010 penulis telah berhasil menyelesaikan pendidikannya di Universitas Brawijaya pada Jurusan Budidaya Pertanian dengan Program Studi Pemuliaan Tanaman, Fakultas Pertanian.



RINGKASAN

SINDY PARAMITHASARI. 0610470033-47. Deteksi *Genuine Intergeneric Hybrid* Pada Populasi Hasil Persilangan Antar Genus Tebu Varietas PS 862 (*Saccharum* Spp. Hybrid) Dengan *Erianthus arundinaceus* Klon IJ76-375 Menggunakan Spacer 5S rRNA. Di bawah bimbingan Ir. Lita Soetopo Phd, Dr. Ir Damanhuri, Ms., dan Ir. Wiwit Budi Widyasari, MSi.

Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum*) ialah komoditi perkebunan yang dapat dikembangkan secara luas di Indonesia. Tindakan yang dapat diupayakan untuk pengembangan tanaman tebu ialah dengan penyediaan varietas unggul yang dapat diperoleh dari program pemuliaan. Persilangan merupakan cara yang paling populer untuk meningkatkan variasi genetik karena murah, efektif, dan relatif mudah dilakukan. Persilangan antar genus tebu bertujuan untuk mengintroduksi gen dari *Erianthus arundinaceus* sp kepada tanaman Tebu (*Saccharum* spp. hybrid). *Erianthus arundinaceus* merupakan spesies yang sangat potensial sebagai penyumbang gen karena memiliki sifat vigor, daya tumbuh ditingkat keprasan yang baik, toleran terhadap cekaman lingkungan seperti kekeringan maupun genangan, dan tahan terhadap beberapa penyakit (Piperidis *et al.*, 2000).

Keturunan hasil persilangan dapat dideteksi melalui teknologi molekuler. Oleh karena tebu adalah tanaman menyerbuk silang, maka peluang untuk terkontaminasi dengan polen dari species atau klon lain besar. Deteksi menggunakan penanda molekuler dapat menghemat waktu, tenaga dan biaya karena dapat memberikan hasil yang lebih cepat sebab tidak terpengaruh umur tanaman, efektif dan akurat bila dibandingkan dengan ciri-ciri morfologi (Santoso *et al.*, 2006). Pada penelitian D'Hont *et al.* (1998) dan Piperidis *et al.* (2000), spacer 5S rRNA dapat digunakan untuk mendeteksi keturunan hasil persilangan antar genus tebu (*Saccharum* spp.) dengan *Erianthus arundinaceus*. Penanda molekuler ini memiliki akurasi yang tinggi sebagai alat seleksi *genuine intergeneric hybrid* hasil persilangan antar genus. Tujuan dari penelitian ini adalah mendeteksi *genuine intergeneric hybrid* di tahap semai pada populasi hasil persilangan tebu varietas PS 862 (*Saccharum* spp. hybrid) dengan *Erianthus arundinaceus* klon IJ76-375 menggunakan spacer 5S rRNA.

Penelitian ini dilaksanakan Di Laboratorium Biologi Molekuler Bioteknologi Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P3GI), Pasuruan. Penelitian dimulai bulan Juli 2009 sampai April 2010. Alat- alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : mortar, pestle, pipet, mikropipet, gelas ukur, kain kasa, tabung mikro 250 µl, tabung mikro 500 µl, tabung mikro 1000 µl, tabung mikro 2000 µl, pengering vakum, mesin spektrofotometer, mesin PCR, ultrasonic cleanser, oven konikel, vortex, timbangan analitik, stirrer, pH meter, microwave, mesin elektroforesis, water bath, mesin centrifuge, autoclave, masker dan *handgloves*. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah 18 sampel tanaman tebu yang terdiri dari tetua jantan

Erianthus sp klon IJ76-375, tetua betina Tebu varietas PS 862 (*Saccharum hybrid*) dan, F1 hasil persilangan kedua tetua tersebut. Selain itu juga digunakan beberapa bahan kimia antara lain : Manitol, buffer ekstraksi (NaCl, Tris HCL pH 7,5, EDTA), CTAB, Natrium Bisulfite, Nitrogen Cair, Chloroform, Isoamilalkohol, etanol dingin 95 % dan 70 %, etanol absolute, larutan TE steril, NaOAc, agarose, RNase, Etidium Bromide, dH₂O, Buffer PCR, MgCl₂, dNTP mix, Primer (forward and reverse), Taq polymerase, Nuclease free water, asam asetat, aquabides steril, TAE, larutan pencuci 1 (WASH1), larutan pencuci 2 (WASH2) dan sepasang primer spacer 5S rRNA.

Metode yang digunakan terdiri dari 10 tahap. Tahap pertama ialah persilangan, yang dilakukan dengan dua teknik yaitu teknik jawa dan teknik cangkokan. Selanjutnya setelah 4 minggu dilakukan panen dan sebar biji. Tahap ketiga ialah perkecambahan biji. Setelah tanaman berumur 6 minggu tanaman dipindahkan ke polibag. Tahap kelima dilakukan pengambilan sampel daun pada saat tanaman berumur ± 3 bulan. Tahap selanjutnya dilakukan isolasi DNA dengan menggunakan metode CIMMYT Laboratorium (Modifikasi 2) mengikuti prosedur Saghai-Marooif, *et al.*, (1984). Kemudian dilakukan uji kualitas dan uji kuantitas DNA dengan elektroforesis 0,8 % gel agarosa dan metode spektrometri. Tahap kesembilan ialah mendeteksi *genuine intergeneric hybrid* di tahap semai pada populasi hasil persilangan menggunakan spacer 5S rRNA. Setelah itu visualisasi hasil amplifikasi PCR dengan elektroforesis 1,5 % gel agarosa. Hasil amplifikasi pita DNA dibandingkan antara pola pita DNA keturunan hasil persilangan dengan kedua tetuanya. Pola pita *genuine intergeneric hybrid* yaitu apabila pola pita keturunan hasil persilangan tersebut mempunyai kedua pita spacer 5S rRNA dari tetua jantan dan tetua betina.

Visualisasi PCR menggunakan alat Gel Dox XR merk Biorad menunjukkan bahwa pada persilangan dengan teknik jawa, dari 7 biji yang tumbuh terdapat 5 individu yang termasuk *genuine intergeneric hybrid*. Sedangkan untuk persilangan dengan teknik cangkokan, dari 9 biji yang tumbuh semua individu termasuk *genuine intergeneric hybrid*. Hal ini ditunjukkan dengan adanya 2 pita spacer 5S rRNA dari tetua jantan dan tetua betina. Tetua jantan *Erianthus arundinaceus* klon IJ76-375 berada pada ukuran 280 bp sedangkan tetua betina tebu varietas PS 862 berada pada ukuran 420 bp. Ditemukan pula 2 individu yang hanya memiliki pita spacer 5S rRNA dari tetua betina, 2 individu ini diduga merupakan hasil selfing.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa persilangan dengan teknik Cangkokan lebih baik daripada teknik Jawa karena memiliki persentase perkecambahan yang lebih tinggi. Selain itu berdasarkan keberadaan pita 5s rRNA spacer *genuine intergeneric hybrid* yang dihasilkan dari persilangan dengan teknik Cangkokan juga lebih tinggi. Oleh karena itu disarankan persilangan dengan teknik Cangkokan lebih dianjurkan dan perlu dilakukan pengujian lebih lanjut terhadap *genuine intergeneric hybrid* yang diperoleh dengan parameter yang lain yaitu komponen produksi.

DAFTAR ISI

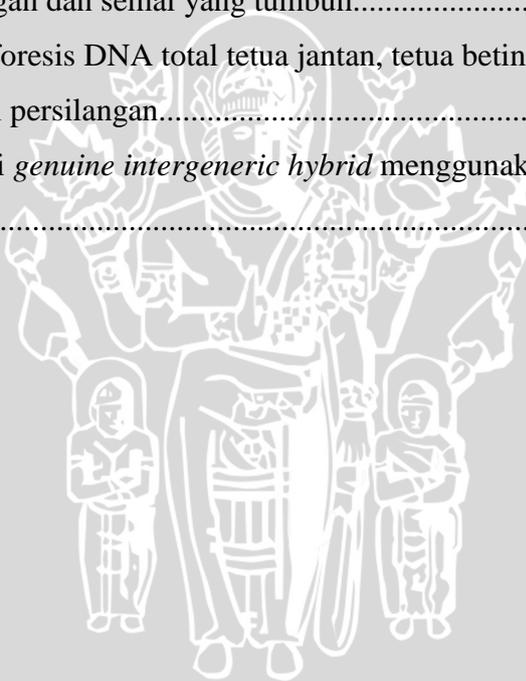
	Halaman
LEMBAR PERSETUJUAN.....	i
RINGKASAN.....	ii
KATA PENGANTAR	iv
RIWAYAT HIDUP.....	v
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan.....	2
1.3 Hipotesis.....	3
1.4 Manfaat penelitian.....	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Taksonomi Tebu dan <i>Erianthus</i>	4
2.2 Reproduksi Tanaman Tebu.....	5
2.3 Persilangan Tebu (<i>Saccharum</i> spp.....	7
2.4 Persilangan antar genus.....	9
2.5 Perkecambahan Biji	10
2.6 Proses perkecambahan biji tebu.....	13
2.7 Ribosomal RNA (rRNA).....	17
2.8 Spacer 5S rRNA / <i>intergenic spacer</i> (IGS).....	18
3. BAHAN DAN METODE	
3.1 Tempat dan waktu pelaksanaan	20
3.2 Alat dan bahan.....	20
3.3 Metode penelitian.....	21



3.3.1 Persilangan tebu PS 862 dengan <i>Erianthus arundinaceus</i> IJ76-375.....	21
3.3.2 Panen dan sebar biji.....	23
3.3.3 Perkecambahan biji.....	23
3.3.4 Pemindahan tanaman ke polibag.....	24
3.3.5 Pengambilan sampel.....	24
3.3.6 Isolasi DNA.....	24
3.3.7 Analisis Kuantitatif DNA (spektrofotometri).....	26
3.3.8 Analisis kualitatif DNA(Elektroforesis).....	26
3.3.9 Deteksi <i>genuine intergeneric hybrid</i> Pada Populasi Hasil Persilangan Menggunakan spacer 5S rRNA	27
3.3.10 Interpretasi data	28
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil.....	29
4.1.1 Persilangan dan sebar biji.....	29
4.1.2 Isolasi DNA.....	30
4.1.2 Kualitas dan kuantitas DNA (elektroforesis dan spektrofotometri).....	30
4.1.4 Deteksi <i>genuine intergeneric hybrid</i> dengan PCR.....	32
4.2 Pembahasan.....	33
4.2.1 Persilangan dan sebar biji.....	33
4.2.2 Isolasi DNA.....	35
4.2.3 Deteksi <i>genuine intergeneric hybrid</i> menggunakan spacer 5S rRNA.....	37
5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	39
5.2 Saran.....	39
DAFTAR PUSTAKA.....	40

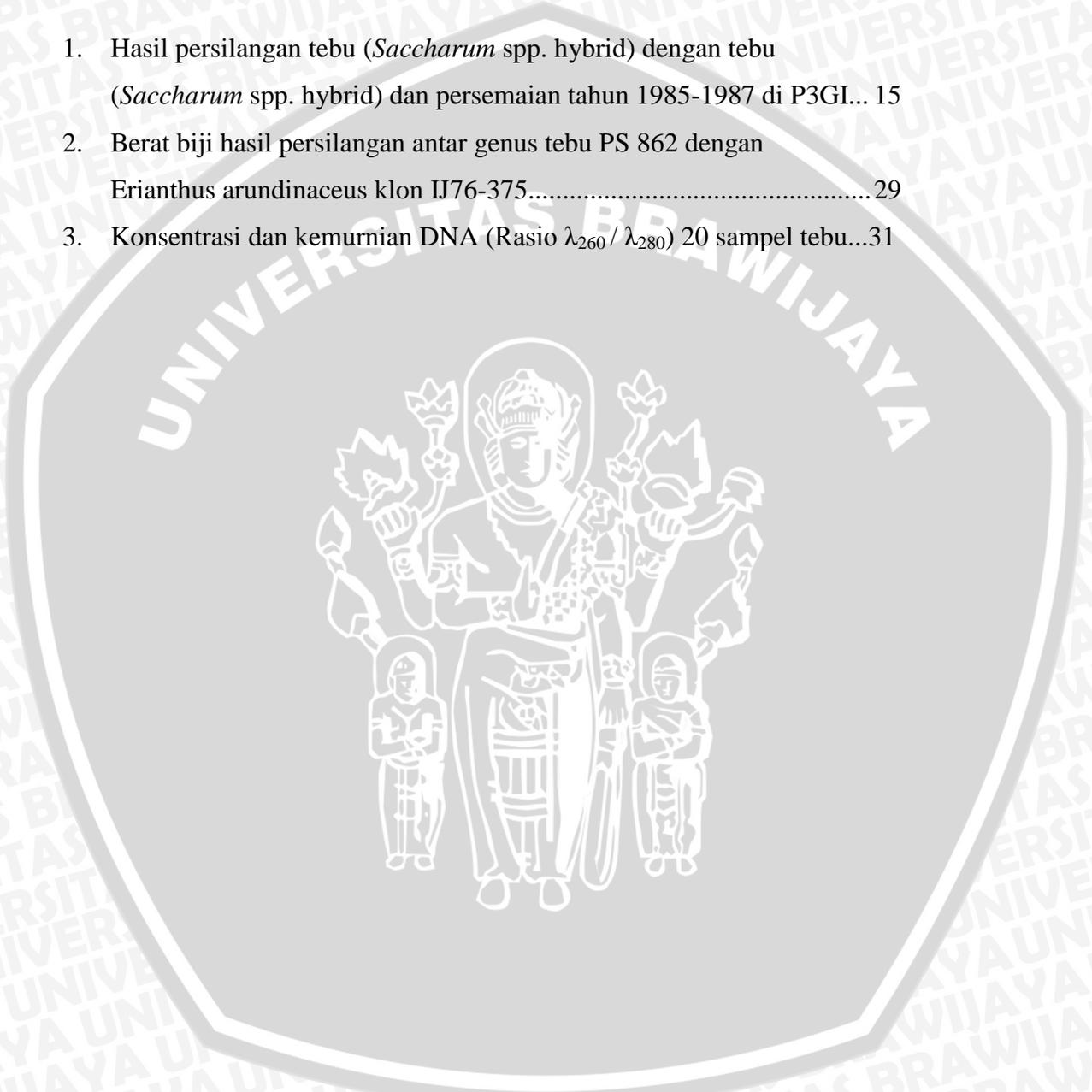
DAFTAR GAMBAR

No.	Teks	Halaman
1.	A. bunga tebu B. letak stigma dan anther.....	7
2.	Tahap-tahap perkecambahan biji tebu.....	14
3.	Biji (Fuzz) tebu.....	16
4.	proses perkecambahan epigeal dan hipogeal.....	16
5.	Posisi daerah Intergenic spacer yang mengapit 5S rRNA pada tanaman.....	18
6.	Biji hasil persilangan dan semai yang tumbuh.....	29
7.	Foto hasil elektroforesis DNA total tetua jantan, tetua betina dan 16 keturunan hasil persilangan.....	31
8.	Visualisasi deteksi <i>genuine intergeneric hybrid</i> menggunakan spacer 5S rRNA	32



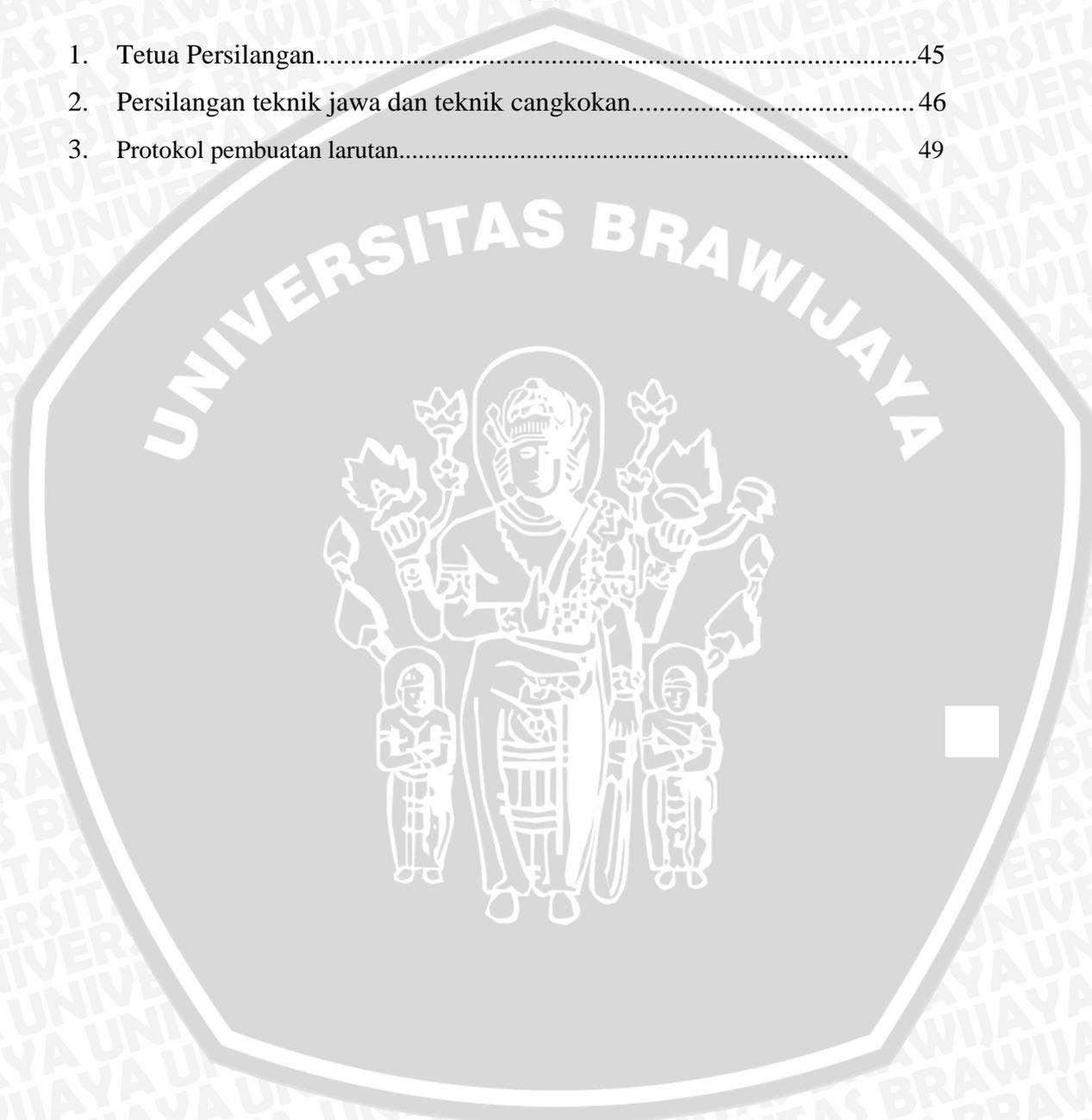
DAFTAR TABEL

No.	Teks	Halaman
1.	Hasil persilangan tebu (<i>Saccharum</i> spp. hybrid) dengan tebu (<i>Saccharum</i> spp. hybrid) dan persemaian tahun 1985-1987 di P3GI...	15
2.	Berat biji hasil persilangan antar genus tebu PS 862 dengan <i>Erianthus arundinaceus</i> klon IJ76-375.....	29
3.	Konsentrasi dan kemurnian DNA (Rasio $\lambda_{260} / \lambda_{280}$) 20 sampel tebu...	31



DAFTAR LAMPIRAN

No.	Teks	Halaman
1.	Tetua Persilangan.....	45
2.	Persilangan teknik jawa dan teknik cangkakan.....	46
3.	Protokol pembuatan larutan.....	49



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman tebu (*Saccharum* spp.) merupakan komoditi perkebunan yang dapat dikembangkan secara luas di Indonesia. Hal ini dikarenakan Indonesia memiliki iklim yang sesuai untuk pertumbuhan tanaman tebu. Indonesia ialah negara yang mempunyai areal lahan yang sangat luas, sayangnya potensi pertanian dan perkebunan belum dimanfaatkan secara maksimal. Tindakan yang dapat diupayakan untuk pengembangan tanaman tebu ialah dengan penyediaan varietas unggul yang dapat diperoleh dari program pemuliaan tanaman.

Persilangan merupakan salah satu cara yang paling populer untuk meningkatkan variasi genetik karena murah, efektif, dan relatif mudah dilakukan. Persilangan antar genus bermanfaat untuk memperluas keragaman genetik, mendapatkan karakter komersial dan menghasilkan keturunan yang vigor (Tai, 1989). Menurut Zhang *et al.* (2009), identifikasi hasil persilangan antar genus tebu (*Saccharum* spp.) dengan *Erianthus fulvus* berusaha mendapatkan *genuine intergeneric hybrid* dengan harapan keturunan hasil persilangan tersebut mempunyai karakter agronomi yang baik seperti tahan kering, tahan genangan, dapat beradaptasi pada lahan yang tandus dan mempunyai kadar gula yang tinggi. Persilangan pada tanaman tebu dapat dilakukan dengan dua teknik, yaitu teknik jawa dan teknik cangkokan (Darmodjo, 1989).

Dengan berhasilnya persilangan antar genus tersebut, maka para pemulia tanaman tebu semakin terpacu untuk melakukan persilangan antar genus khususnya dengan kerabat dekat tebu yang lain seperti *Erianthus* dan *Miscanthus*. Persilangan antar genus tebu berusaha mendapatkan kombinasi genetik yang diinginkan dan stabil. Penetapan tetua induk persilangan didasarkan pada keunggulan yang dimilikinya. Persilangan antar genus tebu (*Saccharum* spp. hybrid) dengan *Erianthus arundinaceus* bertujuan untuk memasukkan sifat-sifat menguntungkan dari *Erianthus arundinaceus* ke tanaman tebu (*Saccharum* spp. hybrid). *Erianthus arundinaceus* merupakan spesies yang sangat potensial sebagai penyumbang gen karena memiliki sifat vigor, daya tumbuh ditingkat keprasan

yang baik, toleran terhadap cekaman lingkungan seperti kekeringan dan genangan serta tahan terhadap beberapa penyakit akar (Piperidis *et al.*, 2000). Introduksi gen dari *Erianthus arundinaceus* kepada tanaman tebu (*Saccharum spp. hybrid*) dapat dilakukan dengan cara persilangan.

Keturunan hasil persilangan dapat dideteksi secara dini melalui teknologi molekuler. Tebu adalah tanaman menyerbuk silang, maka peluang untuk terkontaminasi dengan polen dari species atau klon lain sangat besar. Disamping itu, tebu juga mempunyai kemampuan selfing (*self compatibility*) karena morfologi bunga tebu termasuk bunga sempurna. Oleh karena itu diperlukan suatu metode untuk mendeteksi *genuine intergeneric hybrid* secara dini dan akurat agar dapat menghemat waktu seleksi, mengingat pemuliaan tebu untuk mendapatkan varietas tebu unggul memerlukan waktu yang cukup lama antara 10 – 13 tahun (James, 2004). Identifikasi dini menggunakan penanda molekuler memberikan hasil yang lebih cepat sebab tidak terpengaruh umur tanaman, efektif dan akurat bila dibandingkan dengan ciri- ciri morfologi (Santoso *et al.*, 2006).

Pada penelitian D'Hont *et al.* (1998) dan Piperidis *et al.* (2000), spacer 5S rRNA dapat digunakan untuk mendeteksi keturunan hasil persilangan antar genus tebu (*Saccharum spp.*) dengan *Erianthus arundinaceus*. Penanda molekuler ini memiliki akurasi yang tinggi sebagai alat seleksi *genuine intergeneric hybrid* hasil persilangan antar genus. Sedangkan deteksi menggunakan penanda berdasarkan ciri-ciri morfologi atau sifat agronomis membutuhkan waktu lebih lama karena harus dilakukan pada tanaman dewasa dan dilakukan secara berulang-ulang untuk meminimalkan pengaruh lingkungan.

1.2 Tujuan

Mendeteksi *genuine intergeneric hybrid* di tahap semai pada populasi hasil persilangan tebu varietas PS 862 (*Saccharum spp. hybrid*) dengan *Erianthus arundinaceus* klon IJ76-375 pada teknik jawa dan teknik cangkakan menggunakan spacer 5S rRNA.

1.2 Hipotesis

Diduga spacer 5S rRNA dapat digunakan untuk mendeteksi *genuine intergeneric hybrid* hasil persilangan tebu (*Saccharum* spp. hybrid) dengan *Erianthus arundinaceus* pada persilangan teknik jawa dan teknik cangkokan .

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi bahwa spacer 5S rRNA dapat digunakan sebagai alat deteksi dini *genuine intergeneric hybrid* pada populasi hasil persilangan antar genus tebu (*Saccharum* spp. hybrid) dengan *Erianthus arundinaceus*.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Taksonomi Tebu dan *Erianthus*

Tebu ialah kingdom *Plantae*, dengan divisi *Spermatophyta*, sub-divisi *Angiospermae*, kelas *Monocotyledoneae*, ordo *Glumiflora*, dalam rumpun *Andropogoneae* dan famili rumput-rumputan atau *Poaceae*. Taksonomi dan filogeni tanaman tebu mempunyai susunan yang rumit, terdiri dari 5 genus berdasarkan karakteristik yang berhubungan erat dan membentuk kelompok *interbreeding* yang disebut *Saccharum complex* dan terdiri dari *Saccharum*, *Erianthus* section *Ripidium*, *Miscantus* section *Diandra*, *Narenga* dan *Sclerostachya* (Daniels and Roach, 1987). Genus *Saccharum* ini terdiri atas tujuh species yaitu *S. spontaneum*, *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. edule*, *S. barberi*, *S. Sinense*, *S. officinarum* (D'Hont *et al.*, 1998).

S. officinarum mempunyai kadar sukrosa yang tinggi, namun ketahanan terhadap penyakitnya sangat rendah. *S. officinarum* memiliki jumlah kromosom $2n=80$ dengan jumlah kromosom dasar (x) 10 sehingga spesies ini termasuk polyploid yaitu kondisi dimana terdapat lebih dari 2 set kromosom. *S. officinarum* bukanlah poliploidi yang sederhana namun merupakan hibrida kompleks dari spesies yang berbeda dan dapat disebut autopoliploid (menunjukkan bahwa ploidi hanya melibatkan set-set kromosom homolog) dan juga allopoliploid (menunjukkan terlibatnya kromosom non homolog, biasanya melibatkan dua spesies) (Sreenivasan *et al.*, 1987). Hal ini mengindikasikan bahwa keseluruhan kromosom dari *S. officinarum* homolog dengan *Miscanthus* dan *Erianthus* section *Ripidium* (Daniels and Roach, 1987).

Erianthus arundinaceus (Retz.) Jeswiet termasuk dalam genus *Erianthus* section *Ripidium* dan termasuk juga dalam *Saccharum complex*, mempunyai jumlah kromosom $2n = 60$ dengan jumlah kromosom dasar (x) 10 (Mukherjee, 1957). Spesies ini merupakan spesies yang sangat potensial sebagai penyumbang gen karena memiliki sifat vigor, daya tumbuh ditingkat keprasan yang baik, toleran terhadap cekaman lingkungan seperti kekeringan dan genangan serta tahan terhadap beberapa hama dan penyakit (Piperidis *et al.*, 2000).

2.2 Reproduksi Tanaman Tebu

Bunga tebu merupakan bunga majemuk yang tersusun atas malai yang berbentuk piramida dan mengandung ribuan bunga kecil. Panjang bunga majemuk antara 70-90 cm. Bunga tebu merupakan malai yang terbuka. Morfologi malai secara umum khas untuk tiap species dan klon. Bentuk malai ini dicirikan oleh bentuk derajat percabangan dan ukuran. Menurut Mulyana (1983) tanaman tebu berbunga pada bulan Maret sampai April, namun hanya sedikit yang dapat berbunga.

Kuncup bunga akan keluar dari malai yang terletak pada pelepah daun. Pada bunga yang masak, benang sari panjang sehingga kepala sari menggantung keluar dari tajuk bunga (Sastrowijono, 1998). Pembungaan suatu spesies tanaman perlu diketahui dan dipahami karena di dalam pemuliaan tanaman, pembungaan berhubungan erat dengan sistem dan strategi pemuliaan yang akan dilakukan. Pada tebu, hampir semua spesies dari genus *Saccharum* tidak akan berbunga pada panjanghari lebih dari 12 jam, kecuali *S. spontaneum* yang memang merupakan tanaman hari panjang. Umumnya dibutuhkan paling sedikit 10 jam dan paling banyak 12,5 jam dan suhu malam 20 - 25⁰ C untuk terjadinya inisiasi bunga. Tanda awal tanaman tebu siap kawin yaitu saat munculnya seludang daun yang panjang tetapi helai daunnya pendek (disebut dengan daun bendera) pada umur 5-6 bulan. Seludang daun menutupi panikel yang masih muda. Akhirnya batang tebu memanjang dan mendorong panikel bunga keluar (Dillewijn, 1952).

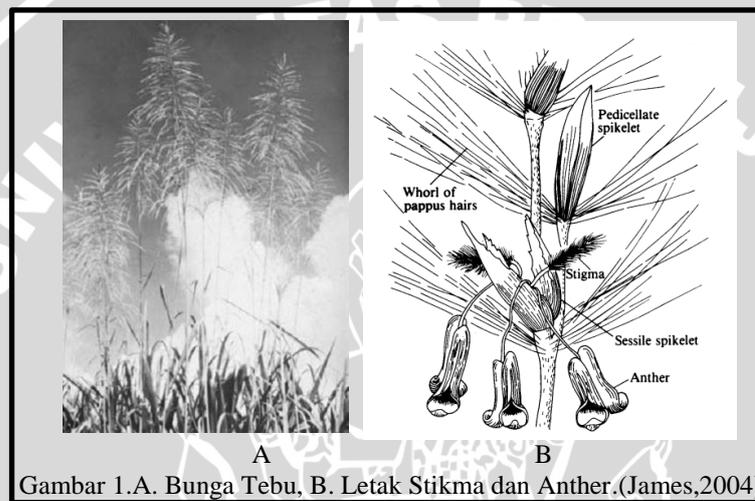
Cabang utama malai lurus dan merupakan kelanjutan batang tebu. Dari cabang utama, malai bercabang tingkat satu, dua dan tiga. Derajat percabangan bagian bawah lebih besar dan mengecil pada ujung malai. Setiap malai mengandung sekitar 100.000 bunga kecil (spikelet). Tiap spikelet dikelilingi bulu panjang didasarnya dan terdiri atas tangkai sari (filamentum) dan kepala sari (anthera) yang berisi tepung sari (pollen). Setiap bunga mempunyai 3 daun kelopak, 1 daun mahkota, 3 benang sari dan 2 kepala putik (Tim Penulis PS, 1992). Bagian inilah yang sangat penting bagi para pemulia untuk kegiatan persilangan. Pada dasar dari tangkai malai membengkak dan ditutupi dengan rambut pendek yang halus berwarna putih (James, 2004).

Bunga tebu secara visual berbentuk seperti panah, sehingga sering pada literatur bunga tebu disebut *arrow*. Spikelet membuka pada malam hari hingga pagi buta, dimulai dari panikel bagian atas selanjutnya ke arah bawah. Pollen viabel hanya pada waktu sekitar tiga jam. Menurut James (1980), anthesis terjadi saat malai tebu mulai muncul dari daun bendera. Kelembaban udara yang tinggi dapat memperlambat anthesis (Blackburn, 1984). Setelah anthesis anther akan gugur dari filamen sebaliknya stigma tetap reseptif. Stigma reseptif ketika bunga membuka. Reseptivitas stigma adalah suatu periode di mana kepala putik berada dalam kondisi siap untuk menerima serbuk sari. Secara visual, dalam kondisi ini kepala putik mengeluarkan ekstrak bergula sehingga lengket (Ashari, 2002).

Penyerbukan atau polinasi adalah transfer serbuk sari atau polen ke kepala putik atau stigma. Kejadian ini merupakan tahap awal dari proses reproduksi (Ashari, 2002). Secara alami pada tanaman tebu terjadi dengan bantuan angin sehingga keberhasilan penyerbukan hanya tergantung pada kondisi cuaca pada saat itu. Tanaman tebu termasuk tanaman yang menyerbuk silang. Penyerbukan silang ialah penyerbukan yang terjadi jika serbuk sari yang jatuh di kepala putik berasal dari bunga tumbuhan lain tetapi masih tergolong dalam jenis yang sama (Tjitrosoepomo, 1986).

Pada tanaman tebu, tepung sari yang menempel pada kepala putik mengalami dehidrasi yang menyebabkan leburnya dinding luar (*exine*). Hal ini diakibatkan sekresi yang dihasilkan oleh kepala putik. Pada lubang kecambah tepung sari (*germinal pore*) tepung sari yang hanya mempunyai kulit dalam (*intine*) tersebut tumbuh ke luar, menonjol dan membentuk tabung sari (*pollen tube*) (Ashari, 2002). Tabung sari ini berada di dalam tangkai putik. Di dalam tabung sari terdapat tiga inti haploid, yaitu inti saluran serbuk sari terdapat di depan dan dua inti sperma mengikuti di belakangnya. Inti saluran serbuk memasuki ovarium lewat mikropil. Kedua inti sperma masuk ke kandung lembaga. Salah satu sperma bersatu dengan inti sel telur dan membentuk zigot diplod, yang kemudian akan berkembang menjadi embrio. Inti sperma lainnya bersatu dengan inti diploid yang merupakan persatuan dari dua inti kutub dan menghasilkan inti triplod ($3n$) yang akan membentuk jaringan endosperm (Suryo,

2005). Endosperm mengandung nutrisi khusus dan hormon yang mengatur dan mendorong pertumbuhan embrio. Waktu yang diperlukan bagi zigot mulai berkembang, semenjak fusi berkisar antara 4-6 jam. Perkembangan biji dimulai dari pertumbuhan dan perkembangan sel-sel yang terdapat di daerah *khalaza*. Perkembangan sel di daerah *khalaza* ini merupakan perkembangan selepas fertilisasi (Ashari, 2005). Setelah terjadi penyerbukan dan pembuahan, dibutuhkan 21 – 25 hari untuk pengisian dan pemasakan biji (James, 2004).



2.3 Persilangan Tebu (*Saccharum spp.*)

Persilangan merupakan perkawinan antar berbagai spesies, suku, ras, atau varietas tumbuhan atau hewan yang bertujuan memperoleh organisme baru yang diinginkan. Persilangan tebu merupakan salah satu upaya untuk mendapatkan varietas tebu unggul melalui teknik penyerbukan antara bunga jantan dan bunga betina dari tetua-tetua terpilih yang memiliki sifat unggul tertentu. Tujuan umum dari persilangan dalam program pemuliaan tanaman adalah untuk meningkatkan keragaman genetik dari populasi seleksi. Tujuan khusus dari persilangan adalah untuk mengkombinasikan sifat-sifat unggul dari dua tetua, sehingga dapat dihasilkan varietas yang lebih unggul daripada kedua tetuanya (Darmodjo, 1989).

Persilangan akan dihasilkan klon-klon baru yang nantinya akan di seleksi secara bertahap dengan harapan agar terpilih beberapa varietas yang memiliki kriteria unggul seperti yang di kehendaki. Untuk mendapatkan varietas unggul

diperlukan waktu kurang lebih 6 - 8 tahun dihitung dari mulai dilakukannya persilangan, mengingat klon-klon yang dihasilkan harus di seleksi secara bertahap (Mulyana, 1983).

Persilangan diawali dengan pemilihan tetua, tanaman yang dipilih sebagai tetua hendaknya memiliki sifat-sifat unggul yang diinginkan. Selain itu tanaman tersebut harus mempunyai tangkai malai yang kuat yang berasal dari tanaman yang vigor dan sehat yang tidak terserang hama dan penyakit (Ammal, 1939). Setelah memilih tetua, dilanjutkan dengan emaskulasi. Emaskulasi merupakan pembuangan organ generatif biasanya organ jantan pada tetua betina dengan maksud untuk menghindari kontaminasi pada saat persilangan (Poehlman, 1969).

Menurut Darmodjo (1989), persilangan tebu dapat dilakukan dengan dua teknik, antara lain:

(1) Sistem Jawa, teknik yang disebut sistem Jawa ini, sesuai dengan namanya, memang berasal dari Jawa. Pada teknik jawa, kedua tetua yang akan disilangkan tidak diemaskulasi karena pada teknik ini persilangan dilakukan pada tanaman tebu yang masih ditanam di kebun, sehingga proses emaskulasi dengan perendaman malai bunga pada larutan ethanol 57 % tidak dapat dilakukan. Persilangan dilakukan dengan memotong dua batang tanaman sebagai bunga jantan yang siap kawin, pangkalnya dimasukkan ke dalam tabung bambu yang diisi dengan Larutan Hawaii (150 ppm larutan SO_2 dan 85 ppm H_3PO_3). Tanaman yang siap kawin ditandai dengan munculnya daun bendera (seludang daun yang panjang tetapi helai daunnya pendek). Selanjutnya, malai tetua jantan disangga pada posisi sekitar malai tetua betina tanaman tebu dan diikat kemudian dibiarkan di kebun. Pada saat tertentu malai tetua jantan perlu diganti yang baru. Penggunaan larutan Hawaii tersebut diterapkan pertama kali di Jawa pada tahun 1956 sebagai pengganti air untuk mengawetkan malai tetua jantan. Setelah terjadi penyerbukan sempurna, kedua malai tetua jantan dan betina diselubungi dengan kelambu untuk mencegah hilangnya biji.

(2) Sistem Cangkokan, teknik yang disebut cangkokan ini merupakan hasil modifikasi dari sistem India. Pada waktu tanaman tebu akan berbunga, batangnya dicangkok untuk menstimulir pertumbuhan akar. Proses emaskulasi dilakukan

dengan merendam malai bunga betina pada ethanol 57 % selama 10 menit, kemudian ditiriskan dan direndam dalam air selama 2-3 menit. Kemudian kedua malai yang siap kawin diikat berdekatan satu dengan yang lain dan diselubungi dengan kelambu selanjutnya diletakkan di bangsal persilangan. Setelah terjadi penyerbukan sempurna kemudian malai tua jantan dibuang. Teknik ini dilakukan sebagai persilangan biparental. Selama \pm 4 minggu setelah penyerbukan, biji-biji akan masak.

2.4 Persilangan Antar Genus

Persilangan antar genus ialah perkawinan antar genus yang berbeda tetapi masih dalam kerabat dekat (Darmono, 2004). Persilangan bertujuan untuk memperoleh kombinasi genetik yang diinginkan melalui persilangan dua atau lebih tua yang berbeda genotipnya (Poespodarsono, 1988).

Persilangan antar genus menghasilkan keturunan yang sangat penting dalam pemuliaan tanaman. Dengan demikian, maka kombinasi antar karakter yang diinginkan dapat dicapai. Berdasarkan hasil penelitian Piperidis *et al.* (2000), telah dilakukan persilangan antar genus tebu (*Saccharum officinarum*) dengan *Erianthus arundinaceus*. Dengan penanda spacer 5S rRNA dari 45 semai yang tumbuh terdapat 34 individu *genuine intergeneric hybrid* atau sebanyak 75,5 %. Individu *genuine intergeneric hybrid* merupakan individu yang benar-benar merupakan keturunan hasil persilangan dari tua jantan dan betina. Berdasarkan penanda spacer 5S rRNA, *genuine intergeneric hybrid* dapat diketahui dengan adanya pita/ alel dari tua jantan dan tua betina pada individu keturunan hasil persilangan tersebut seperti pada penelitian pada tanaman tebu yang telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya oleh D'Hont (1998), Piperidis (2000) dan Harvey (1998).

Pada penelitian Zhang *et al.* (2009), persilangan antar genus juga dilakukan antara tebu (*Saccharum spp.*) dengan *Erianthus fulvus* berdasarkan penanda molekuler ITS dan menghasilkan 94 individu *genuine intergeneric hybrid* dari total semai 126 atau sebanyak 74,6%. Adanya *genuine intergeneric hybrid* tersebut dibuktikan dengan adanya *paternal-specific band* (pita spesifik

tetua jantan) pada ukuran 950 bp dan *maternal-specific band* (pita spesifik tetua betina) pada ukuran 200 bp.

Namun demikian, persilangan antar spesies maupun antar genus tanaman sering kurang berhasil karena terdapat kendala antara lain seperti (1) kegagalan polen untuk berkecambah pada stigma asing akibat ketidakserasian yang disebabkan faktor genetik atau hambatan fisiologi oleh substansi yang dikeluarkan oleh stigma, (2) kegagalan polen untuk tumbuh cukup cepat ke tangkai putik untuk menghasilkan pembuahan, sebelum pembentuk lapisan absisik di tangkai bunga. Kadang-kadang dapat diatasi dengan menyemprot hormon tertentu untuk mencegah pembentukan lapisan absisik, (3) kegagalan fertilisasi akibat hancurnya jaringan endosperm dan aborsi embrio muda, dapat diatasi dengan kultur embrio, (4) kegagalan sistem reproduksi tanaman hibrida akibat ketidakaturan meiosis atau kesulitan menentukan pasangan kromosom, dapat diatasi dengan pemberian kolkisin, (5) kegagalan progeni F_1 untuk tumbuh normal akibat efek mematikan dari ketidakseimbangan kromosom (Anonymous, 2008).

2.5 Perkecambahan Biji

Perkecambahan biji dapat diartikan sebagai dimulainya proses pertumbuhan embrio dari benih yang sudah matang (Taiz and Zeiger 1998). Biji dapat berkecambah bila tersedia faktor-faktor pendukung selama terjadinya proses perkecambahan. Perkembangan biji dipengaruhi oleh faktor dalam (internal) dan faktor luar (eksternal). Faktor dalam yang mempengaruhi perkecambahan biji antara lain :

a. Tingkat kemasakan biji

Biji yang dipanen sebelum tingkat kemasakan fisiologisnya tercapai tidak mempunyai viabilitas yang tinggi karena belum memiliki cadangan makanan yang cukup serta pembentukan embrio belum sempurna (Sutopo, 2002). Pada umumnya sewaktu kadar air biji menurun dengan cepat sekitar 20 persen, maka biji tersebut juga telah mencapai masak fisiologis atau masak fungsional dan pada saat itu biji mencapai berat kering maksimum, daya tumbuh maksimum (vigor)

dan daya kecambah maksimum (viabilitas) atau dengan kata lain benih mempunyai mutu tertinggi (Kamil, 1979).

b. Ukuran biji

Biji yang berukuran besar dan berat mengandung cadangan makanan yang lebih banyak dibandingkan dengan yang kecil pada jenis yang sama. Cadangan makanan yang terkandung dalam jaringan penyimpan digunakan sebagai sumber energi bagi embrio pada saat perkecambahan (Sutopo, 2002). Berat biji berpengaruh terhadap kecepatan pertumbuhan dan produksi karena berat biji menentukan besarnya kecambah pada saat permulaan dan berat tanaman pada saat dipanen (Blackman, dalam Sutopo, 2002).

c. Dormansi

Biji dikatakan dormansi apabila biji tersebut sebenarnya hidup tetapi tidak berkecambah walaupun diletakkan pada keadaan yang secara umum dianggap telah memenuhi persyaratan bagi suatu perkecambahan atau juga dapat dikatakan dormansi biji menunjukkan suatu keadaan dimana biji-biji sehat (viabel) namun gagal berkecambah ketika berada dalam kondisi yang secara normal baik untuk berkecambah, seperti kelembaban yang cukup, suhu dan cahaya yang sesuai (Lambers 1992).

d. Penghambat perkecambahan

Menurut Kuswanto (1996), penghambat perkecambahan biji dapat berupa kehadiran inhibitor baik dalam biji maupun di permukaan biji, adanya larutan dengan nilai osmotik yang tinggi serta bahan yang menghambat lintasan metabolik atau menghambat laju respirasi.

Faktor luar yang mempengaruhi perkecambahan diantaranya :

a. Air

Penyerapan air oleh biji dipengaruhi oleh sifat biji itu sendiri terutama kulit pelindungnya dan jumlah air yang tersedia pada media di sekitarnya, sedangkan jumlah air yang diperlukan bervariasi tergantung kepada jenis bijinya, dan tingkat pengambilan air turut dipengaruhi oleh suhu (Sutopo, 2002). Perkembangan biji tidak akan dimulai bila air belum terserap masuk ke dalam biji hingga 80 sampai 90 persen (Darjadi, 1972) dan umumnya dibutuhkan kadar air

biji sekitar 30 sampai 55 persen (Kamil, 1979). Biji mempunyai kemampuan kecambah pada kisaran air tersedia. Pada kondisi media yang terlalu basah akan dapat menghambat aerasi dan merangsang timbulnya penyakit serta busuknya benih karena cendawan atau bakteri (Sutopo, 2002).

Menurut Kamil (1979), kira-kira 70 persen berat protoplasma sel hidup terdiri dari air dan fungsi air antara lain untuk melembabkan kulit biji sehingga menjadi pecah atau robek agar terjadi pengembangan embrio dan endosperm, untuk memberikan fasilitas masuknya oksigen kedalam biji, untuk mengencerkan protoplasma sehingga dapat mengaktifkan berbagai fungsinya, dan sebagai alat transport larutan makanan dari endosperm atau kotiledon ke titik tumbuh, dimana akan terbentuk protoplasma baru.

b. Suhu

Suhu optimal adalah yang paling menguntungkan berlangsungnya perkecambahan biji dimana presentase perkembangan tertinggi dapat dicapai yaitu pada kisaran suhu antara 26.5 sd 35°C (Sutopo, 2002). Suhu juga mempengaruhi kecepatan proses permulaan perkecambahan dan ditentukan oleh berbagai sifat lain yaitu sifat dormansi biji, cahaya dan zat tumbuh giberilin.

c. Oksigen

Saat berlangsungnya perkecambahan, proses respirasi akan meningkat disertai dengan meningkatnya pengambilan oksigen dan pelepasan CO₂, air dan energi panas. Terbatasnya oksigen yang dapat dipakai akan menghambat proses perkecambahan biji (Sutopo, 2002). Kebutuhan oksigen sebanding dengan laju respirasi dan dipengaruhi oleh suhu, mikro-organisme yang terdapat dalam biji (Kuswanto. 1996). Menurut Kamil (1979) umumnya biji akan berkecambah dalam udara yang mengandung 29 persen oksigen dan 0.03 persen CO₂. Namun untuk biji yang dorman, perkecambahannya akan terjadi jika oksigen yang masuk ke dalam biji ditingkatkan sampai 80 persen, karena biasanya oksigen yang masuk ke embrio kurang dari 3 persen.

d. Cahaya

Kebutuhan biji akan cahaya untuk perkecambahannya bervariasi tergantung pada jenis tanaman (Sutopo, 2002). Adapun besar pengaruh cahanya

terhadap perkecambahan tergantung pada intensitas cahaya, kualitas cahaya, lamanya penyinaran (Kamil, 1979). Menurut Adriance and Brison dalam Sutopo (2002) pengaruh cahaya terhadap perkecambahan biji dapat dibagi atas 4 golongan yaitu golongan yang memerlukan cahaya mutlak, golongan yang memerlukan cahaya untuk mempercepat perkecambahan, golongan dimana cahaya dapat menghambat perkecambahan, serta golongan dimana benih dapat berkecambah baik pada tempat gelap maupun ada cahaya.

e. Media

Media yang baik untuk perkecambahan harus memiliki sifat fisik yang baik, gembur, mempunyai kemampuan menyerap air dan bebas dari organisme penyebab penyakit terutama cendawan (Sutopo, 2002). Pengujian viabilitas biji dapat digunakan media antara lain substrat kertas, pasir dan tanah.

2.6 Proses Perkecambahan Biji Tebu

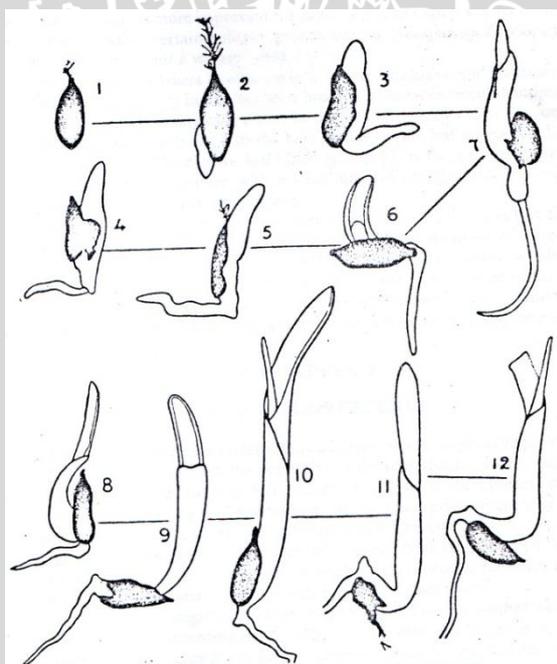
Perkecambahan adalah tumbuhnya embrio dalam biji secara perlahan menjadi tumbuhan dewasa (Babu, 1979). Menurut Alexander (1973), proses perkecambahan melibatkan proses fisika dan kimiawi. Proses fisika terjadi ketika biji menyerap air (imbibisi) akibat dari potensial air rendah pada biji yang kering. Sedangkan untuk proses kimiawi diawali dengan penyerapan air dari lingkungan sekitar biji, baik tanah, udara, maupun media lainnya. Perubahan yang teramati adalah membesarnya ukuran biji yang disebut tahap imbibisi (berarti "minum"). Biji menyerap air dari lingkungan sekelilingnya, baik dari tanah maupun udara (dalam bentuk embun atau uap air. Efek yang terjadi adalah membesarnya ukuran biji karena sel biologi. sel-sel embrio membesar dan biji melunak.

Kehadiran air di dalam sel mengaktifkan sejumlah enzim perkecambahan awal. Fitohormon asam absisat menurun kadarnya, sementara giberelin meningkat. Berdasarkan kajian ekspresi gen, diketahui bahwa pada perkecambahan lokus-lokus yang mengatur pemasakan embrio, seperti ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3), FUSCA 3 (FUS3), dan LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1) menurun perannya (downregulated) dan sebaliknya lokus-lokus yang mendorong perkecambahan meningkat perannya (upregulated),

seperti GIBBERELIC ACID 1 (GA1), GA2, GA3, GAI, ERA1, PKL, SPY, dan SLY (Alexander, 1973).

Diketahui pula bahwa dalam proses perkecambahan yang normal sekelompok faktor transkripsi yang mengatur auksin (disebut Auxin Response Factors, ARFs) diredam oleh miRNA. Perubahan pengendalian ini merangsang pembelahan sel di bagian yang aktif melakukan mitosis, seperti di bagian ujung radikula. Akibatnya ukuran radikula makin besar dan kulit atau cangkang biji terdesak dari dalam, yang pada akhirnya pecah. Pada tahap ini diperlukan prasyarat bahwa cangkang biji cukup lunak bagi embrio untuk dipecah.

Menurut Dillewijn (1952), proses perkecambahan biji ditandai dengan biji yang membengkak dan terjadi perubahan warna pada biji yang nampak setelah 24 jam. Satu hari kemudian, akar primer terbentuk dan mulai menembus lapisan biji selanjutnya daun pertama mulai tumbuh.



Gambar 2. Tahap- tahap perkecambahan biji tebu (Dillewijn, 1952)

Biji hasil pembungaan merupakan biji caryopsis dari satu karpel, perikarpnya menyatu dengan testa. Biji berbentuk ovate, berwarna coklat kekuning-kuningan dan berukuran amat kecil sekitar 1 mm panjangnya. Biji hasil persilangan harus disimpan pada kondisi yang tepat karena persilangan merupakan pekerjaan yang tidak mudah.

Biji dapat disimpan pada aluminium foil di dalam freezer pada suhu $< -20^{\circ}\text{C}$ dan kelembaban 15-25%. Biji tersebut dengan cepat kehilangan viabilitasnya, tetapi bila disimpan dalam suhu rendah dapat dipertahankan paling tidak selama tiga tahun (James, 2004).

Memperkirakan fertilitas biji secara kuantitatif sangatlah penting bagi pemuliaan tebu seperti yang dipaparkan oleh James (2004) sebagai berikut : Infloresens “arrow” terdiri dari 25 000 spikelet, tetapi jumlah yang dibuahi dan fertile hanya sekitar 3 – 33 %, yaitu sekitar 700 spikelet yang akan berkembang menjadi biji. Biji tebu tidak mengalami dormansi, perkecambahan biji membutuhkan waktu 2 – 8 hari pada suhu 35°C . Kecambah muda sangat lambat pertumbuhannya hingga fase empat daun, tetapi selanjutnya pertumbuhan berjalan dengan cepat (James, 2004).

Menurut laporan P3GI tahun 1985- 1987, jumlah biji dari hasil persilangan tebu (*Sacharum spp. hybrid*) dengan tebu (*Saccharum spp. hybrid*) yang dapat berkecambah tiap malai bervariasi baik pada hasil persilangan dengan teknik Jawa maupun Cangkokan. Hasil persilangan dan persemaian tebu tahun 1985- 1987 dapat dilihat pada Tabel 1. di bawah ini :

Tabel 1. Hasil Persilangan tebu (*Sacharum spp. hybrid*) dengan tebu (*Saccharum spp. hybrid*) dan Persemaian Tahun 1985-1987 di P3GI

No	Teknik Persilangan	Tahun 1985			Tahun 1986			Tahun 1987		
		Jumlah malai yang disebar	Jumlah malai yang berkecambah	Jumlah semai yang tumbuh tiap malai	Jumlah malai yang disebar	Jumlah malai yang berkecambah	Jumlah semai yang tumbuh tiap malai	Jumlah malai yang disebar	Jumlah malai yang berkecambah	Jumlah semai yang tumbuh tiap malai
1	Jawa	983	932	358	665	605	300	832	701	284
2	Cangkokan	499	413	182	351	322	167	363	245	386

(Anonymous, 1985., Anonymous, 1986., Anonymous, 1987)

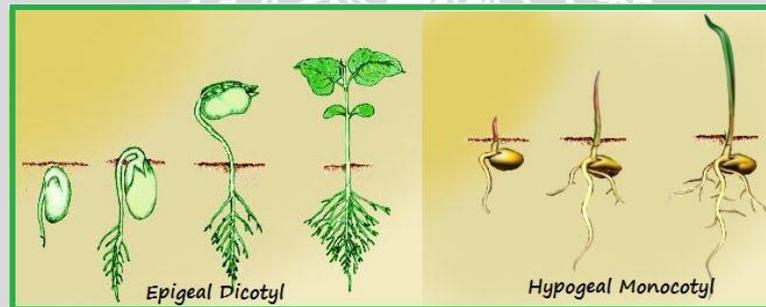
Biji yang telah masak mempunyai berat bersih biji 0,4-0,5 mg dan hanya terdapat 35% dari biji merupakan biji yang terisi sempurna. Viabilitas biji akan cepat menurun pada kondisi lingkungan tropis. Persemaian biji tebu dilakukan pada bak persemaian yang didalamnya terdapat tanah yang subur dan steril serta kelembabannya terjaga. Semai ini dapat di transplantasi setelah ± 6 minggu setelah perkecambahan (James, 2004).



(Anonymous, 2010a)

Gambar 3. Biji (fuzz) tebu

Berdasarkan posisi kotiledon dalam proses perkecambahan dikenal perkecambahan hipogeal dan epigeal. Hipogeal adalah pertumbuhan memanjang dari epikotil yang menyebabkan plumula keluar menembus kulit biji dan muncul di atas tanah. Kotiledon relatif tetap posisinya. Contoh tipe ini terjadi pada kacang kapri dan jagung. Pada epigeal hipokotil yang tumbuh memanjang, akibatnya kotiledon dan plumula terdorong ke permukaan tanah. Perkecambahan tipe ini misalnya terjadi pada kacang hijau dan jarak (Anonymous, 2010b).



Gambar 4. Proses perkecambahan epigeal dan hypogeal (Anonumus, 2010)

Tipe perkecambahan biji tanaman tebu ialah hypogeal. Pada perkecambahan hipogeal, terjadi pertumbuhan memanjang dari epikotil (bakal batang) yang menyebabkan plumula keluar menembus kulit biji dan muncul di atas tanah. Kotiledon (keping biji) tetap berada di dalam tanah. Singkatnya, biji tidak terdorong ke atas tanah dan tetap berada di dalam tanah. Tebu merupakan salah satu monokotil, yang artinya memiliki akar serabut. Hampir sebagian besar tanaman - tanaman monokotil memiliki cara perkecambahan tipe hypogeal, termasuk tanaman tebu (Anonymous, 2010c).

2.7 Ribosomal RNA (rRNA)

Selain DNA, kebanyakan organisme prokaryotik dan eukaryotik memiliki asam nukleat lain yang mempunyai peran yang sangat penting pula, yang dinamakan RNA (asam ribonukleat). Seperti halnya dengan DNA, RNA adalah suatu polimer asam nukleotida dari empat ribonukleotida (Sardjoko, 1991). Tiap nukleotida terdiri dari gula pentose (*D-ribosa*), molekul gugusan pospat dan sebuah basa nitrogen. Berbeda dengan DNA, basa timin dari golongan pirimidin tidak terdapat dalam RNA, melainkan digantikan oleh basa urasil. Molekul RNA dapat berbentuk pita tunggal atau pita dobel tetapi tidak berpilin sebagai spiral seperti molekul DNA. Setiap pita RNA adalah polinukleotida, artinya terdiri dari banyak ribonukleotida. Dalam pita polinukleotida dari RNA, tersusun atas deretan ribose dan pospat.

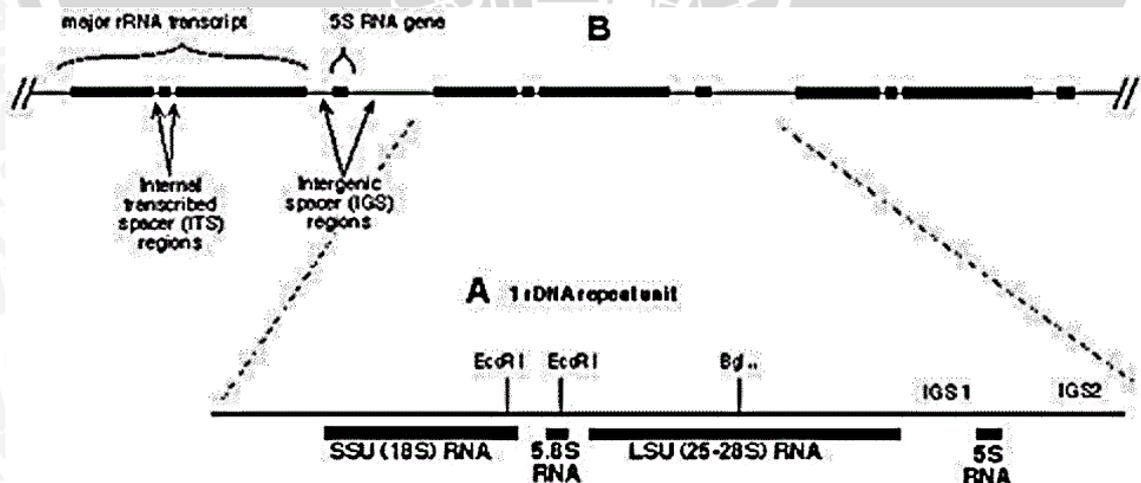
Menurut Suryo (2005), terdapat 2 macam RNA, yaitu RNA genetik dan RNA non-genetik. RNA genetik terdapat pada beberapa virus yang tidak memiliki DNA melainkan hanya mempunyai RNA saja sebagai keseluruhan molekul genetik. Sedangkan untuk RNA non-genetik, berdasarkan tempat terdapatnya serta fungsinya dapat dibedakan menjadi 3 macam, yaitu :

1. RNA duta atau RNAd (*messenger RNA = mRNA*), RNAd berbentuk pita tunggal yang terdapat di dalam nucleus dan dibuat (dicetak) oleh DNA dalam proses transkripsi. Fungsi RNAd ialah untuk membawa keterangan genetic yang diterima dari DNA.
2. RNA pemindah atau RNAp (*transfer RNA = tRNA / soluble RNA = sRNA*), Seperti halnya RNAd, molekul RNAp juga dicetak di nukleus, sebelum menempatkan diri di dalam sitoplasma. Fungsi dari RNAp yaitu untuk mengikat asam amino di dalam sitoplasma.
3. RNA ribosom atau RNAr (*ribosomal RNA = rRNA*), RNAr terutama terdapat di dalam ribosom, meskipun dibuat di dalam nukleus. Molekulnya berupa pita tunggal, tak bercabang dan fleksibel. Sel- sel yang mempunyai inti sejati (eukaryotik) memiliki 3 macam RNAr, yaitu 28S RNAr, 18S RNAr, dan 5S RNAr. Sedangkan sel- sel yang mempunyai inti tidak sejati (prokaryotik) juga memiliki 3 macam molekul RNAr, yaitu 23S RNAr, 16S RNAr, dan 5S RNAr.

Fungsi molekul RNAr sampai sekarang masih sedikit diketahui, tetapi diduga mempunyai peranan penting pada sintesa protein yaitu bertugas memasangkan kodon mRNA dengan anticodon tRNA dan menggeser rantai- rantai agar terbentuk polipeptida (protein) pada saat sintesa protein (Sardjoko, 1991).

2.8 Spacer 5S rRNA / Intergenic Spacer (IGS)

Berbagai metode analisis DNA yang bertujuan untuk mendeteksi *genuine intergeneric hybrid* telah banyak diperkenalkan antara lain seperti Mikrosatelit / SSR (Pan, 2006), RAPD (Pan, 2004), ITSs (Zhang *et al.*, 2009), RFLP pada gen penyandi 5S rRNA (Glaszmann *et al.*, 1989) dan *intergenic spacer regions/ IGS* (Chen, 2000). Pada organisme eukaryotik, lokus genetik rRNA terdiri atas 3 sub unit gen rRNA, yaitu 28S rRNA, 18S rRNA, dan 5S rRNA dan setiap gen terpisah oleh *intergenic spacer* / IGS. Molekul spacer 5S nrRNA memiliki urutan basa yang lebih pendek daripada 28S rRNA dan 18S rRNA sehingga akan mempermudah dalam segi analisa. Di antara berbagai teknik yang dapat digunakan, spacer 5S rRNA / *intergenic spacer* merupakan penanda molekuler yang banyak digunakan untuk menganalisa hubungan filogenetik dan menganalisa suatu ekosistem. Penanda ini banyak digunakan karena memiliki akurasi yang tinggi dan fungsi yang identik pada seluruh organisme (Pangastuti, 2006).



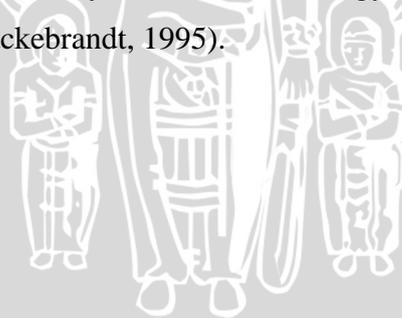
(Anonymous, 2010e)

Gambar 5. A. Posisi daerah *Intergenic spacer* yang mengapit 5S rRNA pada tanaman.

Menurut penelitian Piperidis *et al.*, (2000) spacer 5S rRNA untuk genus *Erianthus arundinaceus* dapat terdeteksi pada ukuran 420 bp, sedangkan untuk

genus *Saccharum officinarum* berada pada ukuran 280 bp. Molekul spacer 5S rRNA memiliki beberapa daerah yang memiliki urutan basa yang relatif konservatif dan beberapa daerah urutan basanya variatif. Perbandingan urutan basa yang konservatif berguna untuk mengkonstruksi pohon filogenetik universal karena mengalami perubahan relatif lambat dan mencerminkan kronologi evolusi. Sebaliknya, urutan basa yang bersifat variatif dapat digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan galur-galur dalam satu spesies. Jika urutan basa spacer 5S rRNA menunjukkan derajat kesamaan yang rendah antara dua taksa, deskripsi suatu takson baru dapat dilakukan tanpa hibridisasi DNA-DNA (Stackebrandt dan Goebel, 1995).

Biasanya jika derajat kesamaan urutan basa gen penyandi 5S rRNA kurang dari 97% dapat dianggap sebagai spesies baru. Analisis gen penyandi 5S rRNA praktis untuk definisi spesies, karena molekul ini bersifat ubikuitus, sehingga dapat dirancang suatu primer yang universal untuk seluruh kelompok. Penentuan spesies baru pun dapat dilakukan tanpa mengisolasi organisme yang bersangkutan. Taksa baru yang ditetapkan hanya berdasarkan data molekular oleh The International Committee on Systematic Bacteriology diberi status provisional candidatus (Murray dan Stackebrandt, 1995).



3. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Kebun Persilangan P3GI Sempalwadak yang terletak 400 m diatas permukaan laut dan Laboratorium Bioteknologi Pusat Penelitian dan Perkebunan Gula Indonesia (P3GI) Pasuruan Jawa Timur selama bulan Juli 2009 sampai April 2010.

3.2 Alat dan Bahan

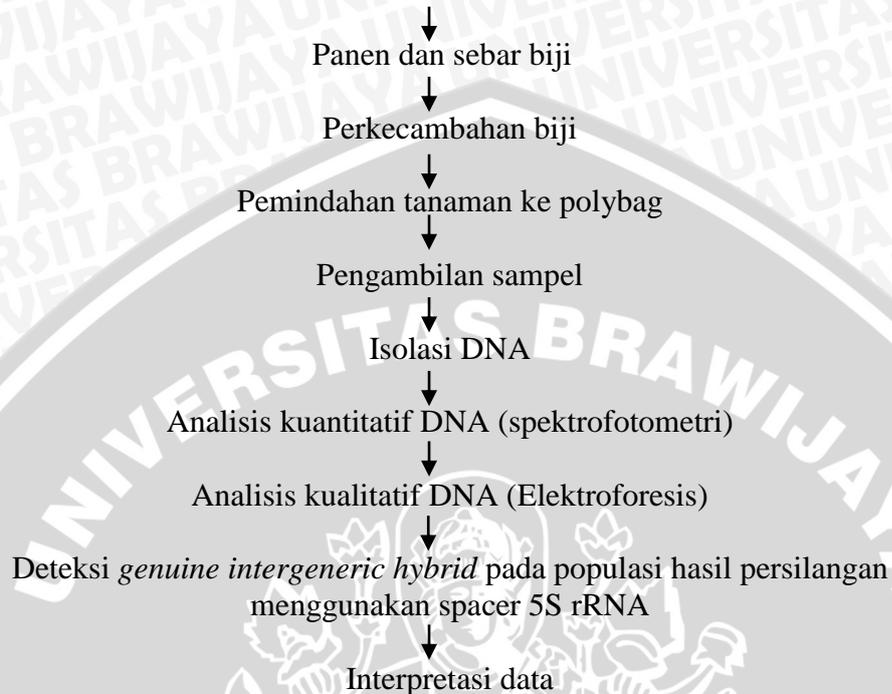
Alat- alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain terdiri atas alat untuk persilangan yaitu : bak air, tabung bambu, sabit, tangga, kain kerodong, gembor, kantong kertas, kertas manila, dan gunting, tali raffia. Sedangkan alat untuk deteksi yaitu : mortar, pestle, pipet, mikropipet, gelas ukur, kain kasa, tabung mikro 250 μ l, tabung mikro 500 μ l, tabung mikro 1000 μ l, tabung mikro 2000 μ l, mesin spektrofotometer, mesin PCR, vortex, timbangan analitik, stirrer, pH meter, *microwave*, mesin elektroforesis, *water bath incubation* (inkubator air), mesin sentrifugasi, autoclave, masker dan *handgloves* (sarung tangan).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah 18 sampel tanaman tebu yang terdiri dari tetua jantan *Erianthus arundinaceus* klon IJ76-375, tetua betina tebu varietas PS 862 (*Saccharum* spp. hybrid) dan, keturunan hasil persilangan kedua tetua tersebut yang diperoleh dari persilangan dua teknik yaitu teknik jawa dan cangkakan.

Selain itu juga digunakan beberapa bahan kimia antara lain : Manitol, buffer ekstraksi (NaCl, Tris HCL pH 7,5, EDTA), CTAB, Natrium Bisulfite, Nitrogen Cair, Chloroform, Isoamilalkohol, etanol dingin 95 % dan 70 %, etanol absolute, larutan TE steril, NaOAc, agarose, Etidium Bromide, dH₂O, Buffer PCR, MgCl₂, dNTP mix, Primer, Taq polymerase, Nuclease free water, asam asetat, aquabides steril, TAE, larutan pencuci 1 (WASH1), larutan pencuci 2 (WASH2) dan sepasang primer spacer 5S rRNA.

3.3 Metode Penelitian

Persilangan Tebu PS 862 dengan *Erianthus arundinaceus* IJ76-375



3.3.1 Persilangan Tebu PS 862 dengan *Erianthus arundinaceus* IJ76-375

Persilangan diawali dengan pemilihan kedua tetua yang akan disilangkan. Tebu varietas PS 862 (*Saccharum* spp. hybrid) digunakan sebagai tetua betina. PS 862 merupakan varietas tebu unggul komersial yang sampai sekarang masih dikembangkan oleh industri gula dan petani. Sebagai tetua jantan yaitu *Erianthus arundinaceus* klon IJ76-375, yang diperoleh dari hasil ekspedisi yang dilakukan oleh P3GI pada tahun 1976 di daerah Papua (Lampiran 1). Tanaman tebu siap disilangkan jika malai bunga mulai membuka. Untuk tetua betina, pilih tanaman tebu dengan kondisi malai bunga yang telah terbuka seludang daunnya, tetapi malai masih belum mekar. Sedangkan untuk tetua jantan, di pilih tanaman yang kondisi malai bunganya sudah mulai mekar (1/4 bagian).

Persilangan tebu dilakukan dengan dua teknik, yaitu teknik jawa yang dilakukan di kebun persilangan dan teknik cangkakan yang dilakukan di bangsal persilangan.

- Teknik Jawa yang dimodifikasi

Pada teknik jawa, kedua tetua yang akan disilangkan tidak diemaskulasi karena pada teknik ini persilangan dilakukan pada tanaman tebu yang masih ditanam di kebun, sehingga proses emaskulasi dengan perendaman malai bunga pada larutan ethanol 57 % tidak dapat dilakukan sehingga peluang terjadinya selfing sangat tinggi. Persilangan dilakukan dengan memotong dua batang *Erianthus arundinaceus* yang siap kawin kemudian pangkal bantangnya dimasukkan ke dalam tabung bambu yang berisi Larutan Hawaii yaitu 150 ppm larutan SO_2 dan 85 ppm H_3PO_3 (Lampiran 2). Tanaman yang siap kawin ditandai dengan munculnya daun bendera (seludang daun yang panjang tetapi helai daunnya pendek). Selanjutnya, malai tetua jantan disangga pada posisi sekitar malai tetua betina kemudian keduanya diikat. Modifikasi yang dilakukan yaitu kedua malai tetua jantan dan betina langsung dikerodong dengan kain untuk mencegah kontaminasi pollen dari varietas lain. Pengamatan dilakukan setiap hari untuk mengetahui bagaimana kondisi malai tetua jantan. Apabila kondisi malai jantan mulai terlihat lapuk, maka perlu diganti dengan malai baru yang masih segar. Biasanya penggantian malai tetua jantan ini dilakukan setiap 2 -3 hari.

-Teknik cangkokan

Pada saat tanaman tebu yang dijadikan tetua siap kawin, tanaman tersebut dicangkok untuk menstimulir pertumbuhan akar. Setelah akar terbentuk, kemudian batang dipotong untuk di bawa ke bangsal persilangan dan dilakukan emaskulasi. Proses emaskulasi dilakukan dengan merendam malai bunga betina pada ethanol 57 % selama 10 menit, kemudian ditiriskan dan direndam dalam air selama 2-3 menit (Lampiran 2). Kedua malai tetua jantan dan betina yang siap kawin diikat berdekatan satu dengan yang lain dan dikerodongi dengan kain kemudian diberi label. Persilangan dengan teknik ini dilakukan di bangsal persilangan. Untuk tetua betina, malai tetua betina yang siap kawin ditandai dengan telah membukanya seludang daun penutup malai namun malai bunga yang sudah mekar sedangkan untuk tetua jantan, digunakan malai bunga yang telah mekar $\frac{1}{4}$ bagian. Setelah terjadi penyerbukan sempurna, malai tetua jantan dibuang. Penyerbukan sempurna ditandai jika semua serbuk sari telah menyatu

dengan putik. Teknik ini dilakukan sebagai persilangan biparental. Selama ± 4 minggu setelah penyerbukan, biji-biji akan masak (Darmodjo, 1989).

3.3.2 Panen dan Sebar Biji

Panen biji hasil persilangan dapat dilakukan ± 4 minggu setelah penyerbukan. Panen biji dilakukan dengan cara memotong malai bunga dan dijemur selama 3 hari agar kering. Setelah malai kering, biji pada malai dirontokkan dan mulai digosok-gosokkan pada kain karpet untuk menghilangkan bulu-bulu yang menempel pada biji. Setelah biji bersih dari bulu, kemudian biji ditimbang dan dimasukkan ke dalam kantong kertas dan diberi label, selanjutnya dipindah ke wadah alumunium foil untuk disimpan pada suhu -20°C sampai akan disemaikan. Penyimpanan pada suhu -20°C ini dilakukan untuk mempertahankan fertilitas biji, karena biji tebu akan tetap fertil pada suhu dingin (James, 2004).

Persemaian biji, dapat dilakukan melalui kegiatan sebagai berikut:

1. Disiapkan tanah persemaian yang terdiri atas campuran pasir, tanah liat dan pupuk kandang dengan perbandingan 2:1:1 yang sudah disterilisasi dengan Basamid 40 gr/m^2 untuk menghindari cendawan busuk akar kemudian masukkan ke dalam bak-bak plastik untuk persemaian
2. Timbang berat total biji
3. Timbang 2 gram benih untuk disebar
4. Biji disebaran diatas permukaan tanah yang sudah disiapkan sebelumnya
5. Tutup kembali dengan tanah dan disiram.

3.3.3 Perkecambahan Biji

Biji tebu yang baik akan berkecambah pada 4-5 hari setelah persemaian. Perkecambahan biji ini ditandai dengan munculnya daun kecil yang menyerupai rumput yang terdapat pada bak persemaian. Selanjutnya dilakukan pengamatan dan penghitungan jumlah biji yang berkecambah. Biji-biji yang telah berhasil berkecambah kemudian dihitung persentase perkecambahannya dengan cara :

$$\% \text{ perkecambahan} = \frac{\sum \text{ biji yang tumbuh}}{\sum \text{ biji yang disebar}} \times 100 \%$$

3.3.4 Pemindahan Tanaman ke Polibag

Setelah berumur empat sampai enam minggu, sebagian semai dipindahkan ke dalam polibag tunggal untuk menguatkan perakarannya. Polibag yang digunakan berdiameter ± 10 cm dan diisi tanah yang juga telah disterilkan dengan menggunakan Basamid dengan dosis 40 gr/m². Pemindahan ini dilakukan dengan cara :

1. Cabut tanaman dari bak persemaian
2. Potong masing-masing daun dan sebagian akarnya (potongan daun dapat dimanfaatkan untuk sampel)
3. Tanam ke dalam polibag dan disiram

Selanjutnya dilakukan pemeliharaan yang intensif dengan diberikan pupuk urea dengan dosis 50 gr/10 liter air pada 10 hari setelah tumbuh dan pada 3 minggu setelah pupuk pertama, menyiangi gulma serta dilakukan penyiraman setiap hari.

3.3.5 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel daun dilakukan di kebun pembibitan Pusat Penelitian dan Perkebunan Gula Indonesia (P3GI) Pasuruan Jawa Timur. Sampel yang digunakan ialah daun yang berumur empat sampai enam minggu. Pengambilan sampel dilakukan pada saat pemindahan semai ke polybag dengan cara memotong daun. Setelah itu daun dibersihkan dengan Manitol, ditimbang 0,3 gram dan disimpan dalam tangki nitrogen cair (-196°C) sampai digunakan untuk analisis selanjutnya.

3.3.6 Isolasi DNA

Metode isolasi DNA yang digunakan dalam penelitian ini ialah metode CIMMYT Laboratorium (Modifikasi 2). Metode ini mengikuti prosedur Saghai-Maroo, *et al.*, (1984) dengan menggunakan modifikasi didalamnya. Modifikasi yang dilakukan ialah dengan mengurangi satu siklus untuk presipitasi, yaitu DNA dipresipitasi tanpa didiamkan semalam pada suhu ruang dan hanya didiamkan selama 60 menit dalam suhu -20°C. Buffer ekstraksi yang digunakan sama dengan

buffer ekstraksi pada metode CIMMYT modifikasi 1 dimana buffer ini sama dengan metode CIMMYT (asli) yang dimodifikasi dengan mengurangi satu komponen buffer ekstraksi yaitu dengan tidak menggunakan BME (β Mercapto Etanol) dan mengurangi masa inkubasi dari 90 menit menjadi 60 menit. Isolasi DNA dilakukan sebagai berikut :

1. Sampel diambil dari daun tebu sebanyak 0,3 gram dihaluskan dengan mortar dengan bantuan nitrogen cair sampai menjadi bubuk
2. Sampel dimasukkan ke dalam tabung ependorf dan ditambahkan 1 ml buffer ekstraksi
3. Larutan diinkubasi dalam waterbath pada suhu 65°C selama 60 menit dengan dibolak-balik setiap 15 menit, selanjutnya didinginkan selama 10 menit
4. Ditambahkan larutan CIA (Chloroform Isoamilakohol 24:1) sebanyak 250 μl dan dihomogenkan dengan vortex selama 1 menit
5. Larutan disentrifuge selama 10 menit pada suhu 4°C , dengan kecepatan 6000 rpm
6. Supernatan diambil dan dipindahkan dalam tabung mikro steril yang baru, ditambahkan isopropanol dingin 500 μl dan dibolak-balik sehingga DNA terpresipitasi (mengendap)
7. DNA disimpan dalam freezer (-20°C) selama 60 menit
8. DNA disentrifuge pada 5000 rpm dengan suhu 4°C selama 8 menit
9. Supernatan dibuang sehingga hanya terdapat DNA yang berada di tabung mikro
10. DNA dicuci dengan larutan Wash 1 dan Wash 2 masing-masing 60 menit sebanyak 500 μl
11. Sampel dikeringkanginkan selama 20 menit dan ditambahkan buffer TE sebanyak 100 μl
12. Stok DNA yang diperoleh disimpan dalam lemari pendingin -80°C sampai digunakan.

3.3.7 Analisis Kuantitatif DNA (Spektrofotometri)

Analisis secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan alat UV-VIS spektrofotometer U-1800 merk Hitachi. Tujuan dari analisis ini ialah untuk mengestimasi konsentrasi dan kemurnian DNA sampel. Cara kerja analisis ini ialah sebagai berikut:

1. Kuvert quart diisi dengan ddH₂O sebanyak 3000 µl sebagai larutan blanko.
2. Untuk mengakurasi alat, larutan blanko yang digunakan sebagai kontrol harus menunjukkan nilai konsentrasi DNA nol pada panjang gelombang 260 nm.
3. Larutan blanko diganti dengan larutan DNA sampel, yaitu dengan cara larutan DNA sebanyak 10 µl dimasukkan dalam kuvert yang telah berisi 2990 µl larutan blanko, kemudian dihomogenkan. Melalui alat spektrofotometri, nilai absorbansi (A) pada panjang gelombang 260 dan 280 nm dapat dilihat.

Kemurnian DNA dapat diketahui melalui perbandingan nilai λ 260/ λ 280. DNA dikatakan murni jika memiliki nilai perbandingan sebesar 1,7-1,9 (Sambrook, 1989). Sedangkan untuk konsentrasi DNA (µg/ ml) dapat dihitung dengan rumus (Answorth *et al.*, 1991) sebagai berikut :

$$\text{Konsentrasi DNA} = \lambda 260 \times \text{faktor pengenceran} \times 50 \mu\text{g/ ml}$$

Keterangan :

λ 260	= nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm
faktor pengenceran	= nilai perbandingan DNA yang digunakan dengan volume akhir larutan.
50	= konstanta 260 nm suatu larutan yang nilai absorbansi 1 sebanding dengan 50 µg/ ml DNA untai ganda/ ml

3.3.8 Analisis Kualitatif DNA (Elektroforesis)

Elektroforesis dengan alat dan tangki elektroforesis merk Biorad bertujuan untuk mengetahui kualitas hasil isolasi DNA dan mengetahui hasil amplifikasi PCR. Adapun prosedur dari proses ini ialah sebagai berikut:

1. Dibuat gel agarose dengan mencampurkan agarose (0,8% untuk mengetahui kualitas hasil isolasi DNA dan 1,5% untuk mengetahui hasil amplifikasi PCR) dengan TAE 1x (dari Tri Base dan Glacial Acetid Acid 10x).

2. Campuran kemudian dihomogenkan dalam microwave sampai mencair penuh. Setelah didinginkan ± 10 menit, gel dituang dalam plate yang telah dipasang sisir kemudian gel dibiarkan mengeras.
3. Setelah mengeras, gel diletakkan pada perangkat elektroforesis dan direndam dalam buffer TAE 1x, larutan DNA dan loading dye (Glycerol 90%, EDTA 0,5 M, Bromophenol Blue) dicampur dan dimasukkan pada sumur yang telah direndam oleh larutan buffer TAE 1x. untuk mengetahui kualitas hasil isolasi, 5 μ l larutan DNA dicampur dengan 2 μ l loading dye. Sedangkan untuk mengetahui hasil PCR, 10 μ l produk PCR dicampur dengan 1 μ l loading dye.
4. Setelah seluruh campuran DNA dan loading dye dimasukkan dalam sumur, perangkat elektroforesis dihubungkan dengan sumber tegangan 50 volt. Adapun waktu yang dibutuhkan untuk mengetahui kualitas hasil isolasi DNA selama ± 1 jam, sedangkan untuk mengetahui produk PCR selama $\pm 2,5$ jam.
5. Setelah proses elektroforesis selesai dilakukan, hasil elektroforesis sustaining dalam rendaman Ethidium Bromide selama ± 15 menit, kemudian dibilas dengan air beberapa kali.
6. Untuk visualisasi hasil, gel yang telah direndam dalam Ethidium Bromide didokumentasikan dengan alat DNA Gel Dox XR merk Biorad yang divisualisasikan dengan print film Mitsubishi.

3.3.9 Deteksi *genuine intergeneric hybrid* Pada Populasi Hasil Persilangan Menggunakan spacer 5S rRNA

DNA hasil isolasi dari varietas tebu PS 862, *Erianthus arundinaceus* klon IJ76-375 dan 16 sampel DNA individu hasil persilangan di deteksi dengan penanda spacer 5S rRNA untuk mendapatkan *genuine intergeneric hybrid* dari hasil persilangan tersebut. Selain itu juga digunakan bulk tetua yang berfungsi sebagai kontrol positif *genuine intergeneric hybrid*. Sebelum melakukan PCR, terlebih dahulu dilakukan pembuatan bulk tetua dengan cara membuat campuran antara DNA tetua jantan dan tetua betina. Setelah itu dilakukan pembuatan campuran reaksi.

Campuran reaksi terdiri dari buffer Thermophilic DNA 10x, 10 mM/ μ l PCR Nucleotida, 25 mM $MgCl_2$, 2 unit/ μ l Taq DNA polymerase, 50 ng/ μ l template DNA, 10 p Mol/ μ l untuk masing- masing primer (primer 1 dan primer 2) serta Nuclease Free Water pada volume akhir sebesar 25 μ l.

Program PCR yang digunakan yaitu 35 siklus, suhu denaturasi awal 94°C selama 5 menit. Masing-masing siklus terdiri dari denaturasi selama 30 detik pada suhu 94°C, *primer annealing* pada suhu 55°C selama 15 detik dan *primer extension* selama 30 detik pada suhu 72°C, serta pasca PCR selama 5 menit pada suhu 4°C menggunakan mesin PCR tipe P-1600 merk Biorad.

Produk dari amplifikasi kemudian dipisahkan melalui gel agarose 2% selama sekitar 1 jam pada tegangan 50V. Berat molekul pita DNA hasil amplifikasi diduga dengan menggunakan DNA standart 100 bp DNA ladder (Promega). Setelah itu produk amplifikasi divisualisasikan dengan dielektroforesis pada tangki elektroforesis merk Biorad pada tegangan 50 volt selama 45 menit dan direndam pada Ethidium Bromide selama \pm 45 menit, kemudian dibilas dengan air beberapa kali dan selanjutnya didokumentasikan dengan alat Gel Dox XR merk Biorad. Dokumen tersebut digunakan untuk menganalisa produk amplifikasi.

3.3.10 Interpretasi Data

Hasil amplifikasi pita DNA dibandingkan antara pola pita DNA keturunan hasil persilangan dengan kedua tetuanya. Pola pita *genuine intergeneric hybrid* yaitu apabila pola pita keturunan hasil persilangan tersebut mempunyai kedua pita spacer 5S rRNA dari tetua jantan dan tetua betina. Jika keturunan hasil persilangan hanya mempunyai alel tetua betina saja, maka dianggap sebagai hasil selfing sedangkan apabila pada keturunan hasil persilangan mempunyai alel tetua betina dan alel lain selain alel tetua jantan maka keturunan tersebut merupakan hasil kontaminasi.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Persilangan dan Sebar Biji

Berdasarkan hasil penelitian, didapatkan hasil berupa biji yang dipanen dari malai tetua betina. Data hasil pengamatan disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Berat biji hasil persilangan antar genus tebu PS 862 dengan *Erianthus arundinaceus* klon IJ76-375

No.	Teknik Persilangan	Berat Total Biji (gr)	Jumlah 2 gr Biji Yang Disebar	Jumlah Biji Yang Tumbuh	Persentase Perkecambahan (%)
1	Jawa	8,76	5926	7	0,118
2	Cangkokan	12,42	5021	9	0,179



Gambar 6. A. Biji hasil persilangan tebu dengan *Erianthus arundinaceus*, B. Semai yang tumbuh

Dari hasil persilangan antar genus tebu PS 862 (*Saccharum* spp. hybrid) dengan *Erianthus arundinaceus* klon IJ76-375 dihasilkan 2 malai bunga yaitu malai yang dipanen dari persilangan dengan teknik jawa dan cangkokan. Hasil persilangan dengan teknik jawa diperoleh biji sebanyak 8,76 gr. Dari 2 gram biji yang disebar diketahui terdapat 5926 biji, dan dari 5926 biji dan dihasilkan 8 semai. Hasil persilangan dengan teknik cangkokan diperoleh biji sebanyak 12,42 gr. Dari 2 gram biji yang disebar diketahui terdapat 5021 biji dan dihasilkan 10 semai. Persentase perkecambahan yang diperoleh yaitu 0,118 % untuk teknik persilangan jawa dan 0,179 % untuk teknik persilangan cangkokan. Biji hasil persilangan yang dihasilkan sebagian besar hampa.

4.1.2 Isolasi DNA

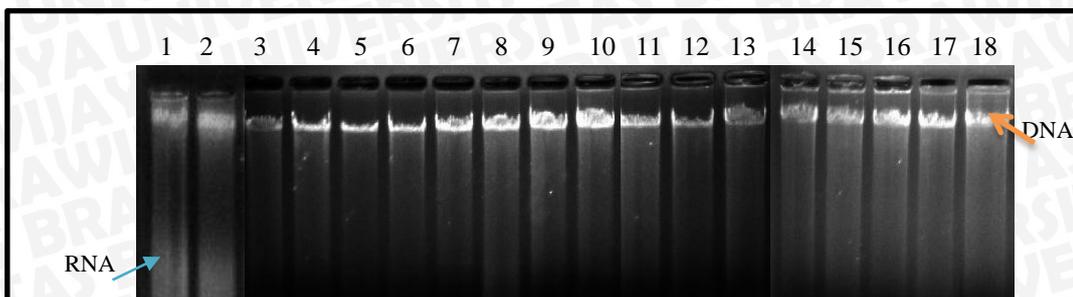
Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan metode CIMMYT Laboratorium (Modifikasi 2). Metode ini mengikuti prosedur Sanghai-Maroo, *et al.*, (1984) dengan menggunakan modifikasi mengurangi satu siklus untuk presipitasi, yaitu DNA dipresipitasi tanpa didiamkan semalam pada suhu ruang dan hanya didiamkan selama 60 menit dalam suhu -20°C . Klon yang kontaminasi protein memiliki rasio $< 1,8$ dan klon yang kontaminasi RNA $> 2,0$, sedangkan DNA dikatakan murni jika rasionya antara $1,8-2,0$ (CYMMYT, 2005).

Berdasarkan dengan hasil analisis kuantitas dengan mesin spektrofotometer, terdapat 2 sampel DNA yang terkontaminasi RNA, yaitu PS 862 dan IJ76-375. Sampel DNA yang terkontaminasi oleh protein yaitu BS 5, BS 6, BS 8, BS 10, KB 1, KB 3, KB 4, KB 5, KB 6, dan KB 8. Sampel DNA yang murni yaitu BS 1, BS 2, BS 3, BS 4, BS 7, dan KB 2 (Tabel 3).

Hasil isolasi DNA juga dilihat secara visual melalui analisis kualitas dengan mesin elektroforesis. Berdasarkan elektroforesis hasil isolasi DNA, hanya terdapat 2 sampel yang terkontaminasi RNA yaitu PS 862 dan IJ76-375. Selain dari kedua sampel tersebut, keseluruhan sampel hasil isolasi yang dielektroforesis tampak bersih (Gambar 7).

4.1.3 Kualitas dan Kuantitas DNA (Elektroforesis dan Spektrofotometri)

DNA hasil isolasi selanjutnya dianalisa kualitasnya menggunakan mesin elektroforesis dengan menggunakan gel agarose 1,5 % dalam buffer TAE 1x dengan beda potensial 60 volt selama 2 jam. Visualisasi hasil elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 7.



Keterangan:

- | | | |
|-----------------|-----------|----------|
| 1. PS 862 (♀) | 7. BS 5 | 13. KB 2 |
| 2. IJ76-375 (♂) | 8. BS 6 | 14. KB 3 |
| 3. BS 1 | 9. BS 7 | 15. KB 4 |
| 4. BS 2 | 10. BS 8 | 16. KB 5 |
| 5. BS 3 | 11. BS 10 | 17. KB 6 |
| 6. BS 4 | 12. KB 1 | 18. KB 8 |
- BS = keturunan hasil persilangan dengan teknik cangkakan
 - KB = keturunan hasil persilangan dengan teknik jawa

Gambar 7. Foto hasil Elektroforesis DNA total tetua jantan, tetua betina dan 16 keturunan hasil persilangan antar genus tebu dengan *Erianthus srundinaceus*.

Setelah DNA dianalisis secara kualitatif, selanjutnya dilakukan analisis kuantitas dengan mengukur konsentrasi dan tingkat kemurnian DNA dengan menggunakan alat UV Spektrofotometer (Tabel 3). Hasil Isolasi DNA menunjukkan bahwa dari 18 individu yang diisolasi DNA, diperoleh 10 individu yang tergolong murni yaitu berada pada kisaran rasio 1,7-1,9.

Tabel 3. Konsentrasi dan Kemurnian DNA (Rasio $\lambda_{260} / \lambda_{280}$) 18 Sampel Tebu

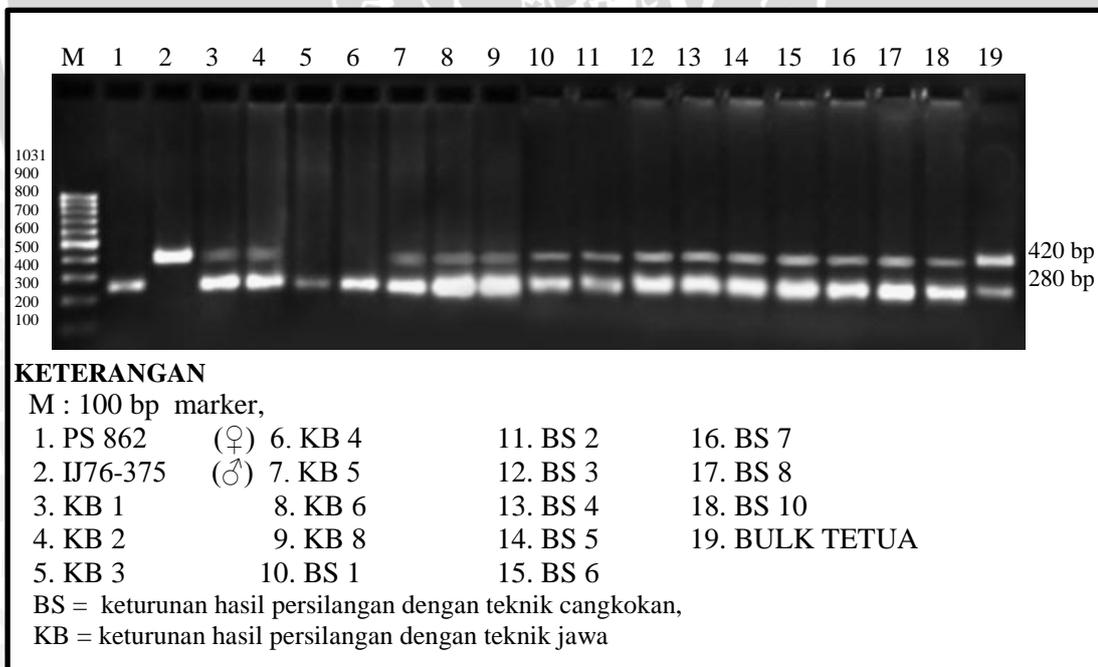
No.	Sampel	Rasio	[DNA]($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	No.	Sampel	Rasio	[DNA]($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
1	PS 862	2,216	1,230	10	BS 8	1,652	0,570
2	IJ76-375	2,222	2,400	11	BS 10	1,690	0,735
3	BS 1	1,923	0,750	12	KB 1	1,733	0,390
4	BS 2	1,806	0,840	13	KB 2	1,860	1,200
5	BS 3	1,889	0,765	14	KB 3	1,708	0,615
6	BS 4	1,809	0,570	15	KB 4	1,607	0,675
7	BS 5	1,571	0,660	16	KB 5	1,619	0,510
8	BS 6	1,741	0,705	17	KB 6	1,783	0,615
9	BS 7	1,915	1,350	18	KB 8	1,652	0,570

Konsentrasi DNA berkisar antara 0,390 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ sampai dengan 2,400 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dengan rata- rata 0,822 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Rasio $\lambda_{260} / \lambda_{280}$ hasil pengukuran dengan spektrofotometer berkisar antara 1,571 sampai 2,22

4.1.4 Deteksi *Genuine Intergeneric Hybrid* dengan PCR

DNA dari 18 sampel yang terdiri dari 2 tetua, 16 keturunan hasil persilangan dan *bulk* selanjutnya dideteksi dengan analisis PCR menggunakan sepasang primer spacer 5S rRNA. Produk PCR kemudian dielektroforesis pada gel agarose 2 % dengan buffer elektroforesis TAE 1X. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 50 volt selama 45 menit. Panjang gel yang digunakan kurang lebih 8 cm.

Visualisasi PCR menggunakan alat Gel Dox XR merk Biorad menunjukkan bahwa pada persilangan dengan teknik jawa, dari 7 biji yang tumbuh terdapat 5 individu yang termasuk *genuine intergeneric hybrid*. Sedangkan untuk persilangan dengan teknik cangkakan, dari 9 biji yang tumbuh semua individu termasuk *genuine intergeneric hybrid*. Hal ini ditunjukkan dengan adanya 2 pita spacer 5S rRNA dari tetua jantan dan tetua betina. Tetua jantan *Erianthus arundinaceus* klon IJ76-375 berada pada ukuran 280 bp sedangkan tetua betina tebu varietas PS 862 berada pada ukuran 420 bp. Ditemukan pula 2 individu yang hanya memiliki pita spacer 5S rRNA dari tetua betina, 2 individu ini diduga merupakan hasil selfing.



Gambar 8. Visualisasi deteksi *genuine intergeneric hybrid* menggunakan spacer 5S rRNA

4.1 Pembahasan

4.2.1 Persilangan dan Sebar biji

Persilangan merupakan salah satu upaya untuk mendapatkan varietas unggul melalui teknik penyerbukan antara bunga jantan dan bunga betina dari tetua-tetua terpilih yang mempunyai sifat unggul tertentu (Darmono, 2004). Persilangan dapat disebut sebagai perkawinan antar berbagai spesies, genus atau varietas tanaman yang bertujuan memperoleh organisme baru dengan sifat-sifat yang diinginkan. Persilangan antar genus menghasilkan keturunan yang sangat penting dalam pemuliaan tanaman.

Berdasarkan hasil persilangan yang dilakukan dengan teknik jawa dan teknik cangkakan, diperoleh berat total biji 8,76 gr untuk persilangan dengan teknik jawa dan 12,42 gr untuk persilangan dengan teknik cangkakan (Tabel 1). Menurut James (2004), Infloresens “arrow” terdiri dari 25 000 spikelet, tetapi jumlah yang dibuahi dan fertile hanya sekitar 3 – 33 %, yaitu sekitar 700 spikelet yang akan berkembang menjadi biji. Artinya tingkat pembentukan biji pada tanaman tebu relatif rendah. Selain mempunyai tingkat pembentukan biji yang rendah, biji- biji tersebut dihasilkan dari persilangan antar genus. Pada persilangan antar genus terdapat pula pengaruh ketidakberhasilan fertilisasi. Meskipun dapat terbentuk biji, namun beberapa biji yang terbentuk sebagian besar hampa. Biji-biji yang hampa, pada umumnya steril dan tidak dapat berkecambah (Alexander, 1973).

Dari berat total biji hasil persilangan yang didapatkan diambil 2 gr biji dan jumlah biji yang dihasilkan untuk persilangan dengan teknik jawa lebih tinggi dari pada teknik cangkakan yaitu 5926 biji untuk persilangan dengan teknik jawa dan 5021 biji untuk teknik cangkakan. Berdasarkan data tersebut, dapat diketahui bahwa biji- biji hasil persilangan dari teknik jawa lebih ringan dari pada biji- biji hasil persilangan teknik cangkakan. Pengamatan biji secara visual menunjukkan bahwa biji- biji hasil persilangan pada teknik jawa lebih banyak yang hampa daripada biji- biji hasil persilangan pada teknik cangkakan. Hal ini dapat disebabkan karena pada persilangan dengan teknik jawa masih dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti angin sehingga keberhasilan penyerbukan tergantung

pada angina pada saat terjadi persilangan. Penyerbukan atau polinasi adalah transfer serbuk sari atau polen ke kepala putik atau stigma. Kejadian ini merupakan tahap awal dari proses reproduksi. Secara alami pada tanaman tebu terjadi dengan bantuan angin sehingga keberhasilan penyerbukan hanya tergantung pada kondisi cuaca pada saat itu (Ashari, 2002).

Dari 5926 biji tersebut yang dapat berhasil berkecambah hanya 7 biji saja sedangkan dari 5021 biji yang berhasil berkecambah yaitu 9 biji saja. Sehingga dapat dikatakan bahwa persentase perkecambahan untuk keturunan hasil persilangan antar genus ini sangat rendah yaitu hanya 0,118% dan 0,179%. Hal ini disebabkan adanya perlakuan emaskulasi pada teknik cangkakan sehingga ada kemungkinan bahwa kondisi malai tidak tahan terhadap perlakuan emaskulasi. Menurut Soeprijanto dan Soekarso (1989), kematian malai bunga ditemui dengan penggunaan ethanol yang tercemar dengan methanol dan pada beberapa varietas yang tidak tahan dengan perlakuan emaskulasi. Pada malai yang tidak tahan dengan perlakuan emaskulasi, polen mati namun stigma juga ikut mati. Karena bunga tebu adalah bunga majemuk, kemungkinan dalam satu malai bunga, polen ada yang tetap hidup dan dapat membuahi dan juga ada yang mati karena tidak tahan dengan perlakuan emaskulasi sehingga biji tetap terbentuk tapi dalam jumlah yang kurang maksimal.

Keberhasilan perkecambahan biji hasil persilangan tebu (*Sacharum* spp. hybrid) dengan tebu (*Saccharum* spp. hybrid), menurut laporan tahunan P3GI tahun 1985- 1987, pada teknik persilangan Jawa, rata-rata jumlah semai yang tumbuh tiap satu malai sebanyak 314 semai, sedangkan untuk teknik persilangan Cangkakan sebanyak 245 semai. Pada penelitian ini, hasil persilangan tebu PS 862 dengan *Erianthus arundinaceus* IJ76-375 dalam satu malai menghasilkan biji seberat 8,76 gram untuk teknik Jawa dan 12,42 gr untuk teknik Cangkakan. Oleh karena itu dapat diperkirakan jumlah semai yang dihasilkan dalam satu malai adalah 31 semai untuk teknik Jawa dan 56 semai untuk teknik Cangkakan. Jika dibandingkan dengan hasil semai per malai dari hasil persilangan dalam spesies tebu dengan tebu, persilangan antar genus ini memiliki persentase sebesar 9,8 %

dari persilangan tebu dengan tebu untuk teknik jawa dan 22,58% dari persilangan tebu dengan tebu untuk teknik cangkokan.

Piperidis (2000) melaporkan bahwa dari sembilan kombinasi persilangan, jumlah semai yang dapat berkecambah tiap satu malai hasil persilangan tebu (*Sacharum spp.*) dengan *Erianthus arundinaceus* bervariasi antara 5- 374 semai. Kemampuan berkecambah ini juga disebabkan pada biji- biji hasil persilangan antar genus terdapat pula kemungkinan kegagalan sistem reproduksi tanaman hibrida akibat ketidakaturan meiosis serta kesulitan menentukan pasangan kromosom (Sreenivasan *et al.*, 1987). Sehingga keturunan hasil persilangan sering gagal untuk berkecambah. Walaupun ada yang dapat berkecambah, pada kondisi lingkungan tidak mendukung tanaman ini akan sulit untuk tumbuh normal.

4.2.2 Isolasi DNA

Isolasi DNA pada penelitian ini menggunakan metode CIMMYT Laboratorium (Modifikasi 2). Sampel untuk di isolasi DNA diambil dari organ daun pada saat persemaian. Proses destruksi sel dilakukan secara mekanis, yaitu melalui penggerusan daun dalam Nitrogen cair menggunakan mortar dan pestel (Ainsworth, 1997). Nitrogen cair memiliki suhu yang sangat rendah yang dapat membuat sel kaku dan getas sehingga memudahkan dalam penggerusan dan dapat menghambat aktifitas nuclease. Penambahan CTAB dalam buffer ekstraksi bermanfaat dalam penghambatan nuclease dan membantu pemisahan protein dari asam nukleat (Nasir, 2002).

Proses selanjutnya yaitu inkubasi sampel dalam waterbath selama 1 jam dengan dibolak-balik setiap lima belas menit, hal ini dilakukan untuk membantu dalam mempercepat pemecahan dinding sel. Penambahan CIA 24:1 sebanyak 250 µl berfungsi untuk pemurnian DNA dan selanjutnya sampel disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C (Ermawati, 2003). Perlakuan sentrifugasi bermanfaat untuk memisahkan supernatant (larutan yang mengandung DNA) dari campurannya (kotoran dan kontaminasi). Penambahan Isopropanol dingin membantu presipitasi DNA yang dihasilkan dalam proses sebelumnya. Untuk mendapatkan DNA maka larutan tersebut di sentrifugasi kembali agar

DNA dapat menempel pada dinding eppendorf dan larutan Isopropanol dingin dibuang. Kemudian DNA dibersihkan dengan mencuci dalam larutan Wash 1 dan Wash 2 untuk membersihkan DNA dari kontaminan- kontaminan. Selanjutnya DNA yang diperoleh dilarutkan dalam larutan TE yang sebelumnya dikering anginkan selama 10 menit. Penyimpanan DNA menggunakan TE berfungsi agar sampel DNA dapat bertahan lebih lama dan disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu -80°C sampai digunakan.

Berdasarkan hasil analisis kuantitas DNA dengan spektrofotometer, terdapat 2 sampel DNA yang terkontaminasi RNA karena rasionya $> 2,0$. Hal ini disebabkan tidak dilakukan penambahan RNase, yaitu enzim yang dapat mendegradasi RNA (Sambrook *et. al*, 1989). Selain itu, terdapat 10 sampel yang terkontaminasi oleh protein karena rasionya $< 1,8$. Sampel tersebut terkontaminasi protein karena tidak ada penambahan proteinase K, yaitu suatu enzim yang dapat merusak atau mendenaturasi protein (Sambrook *et. al*, 1989). Selain itu, diduga bahwa proses pencampuran larutan yang kurang efektif pada saat penambahan CIA.

Pada penelitian ini, sampel yang kontaminasi protein maupun RNA tetap digunakan untuk analisis selanjutnya dengan mesin PCR karena pada analisis PCR menggunakan 5S rRNA spacer tidak membutuhkan DNA yang murni. Hal ini dibuktikan pada penelitian ini, meskipun sampel terkontaminasi protein dan RNA tetapi sampel tersebut masih dapat teramplifikasi pada saat proses PCR. Analisis kualitas dan kuantitas DNA tetap dilakukan karena pada beberapa metode analisis PCR seperti RAPD dan RFLP sangat sensitif dengan kemurnian DNA hasil isolasi yang menyebabkan sampel tidak dapat teramplifikasi pada saat proses PCR (Sambrook *et. al*, 1989).

Berdasarkan analisis kualitas DNA dengan elektroforesis, terdapat 2 sampel yang terkontaminasi RNA (Gambar 7). Selain dari kedua sampel tersebut, keseluruhan sampel hasil isolasi yang dielektroforesis tampak bersih.

4.2.3 Deteksi *Genuine Intergeneric Hybrid* menggunakan spacer 5S rRNA

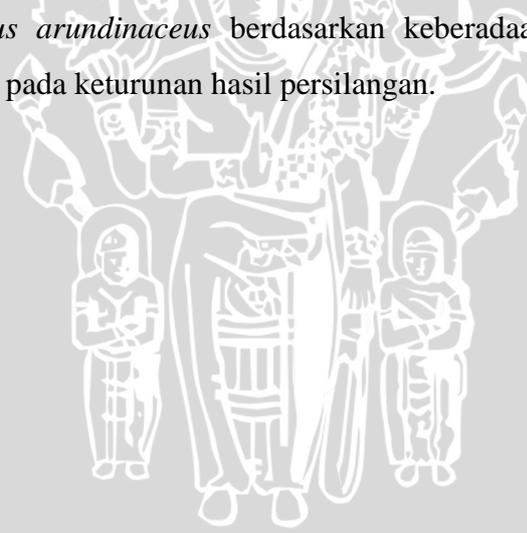
Deteksi *genuine intergeneric hybrid* mempunyai peranan yang sangat penting di dalam program pemuliaan tanaman. Deteksi *genuine intergeneric hybrid* lebih akurat apabila dilakukan dengan menggunakan penanda molekuler. Penanda molekuler yang dapat digunakan sebagai alat deteksi untuk *genuine intergeneric hybrid* antara lain RFLP pada gen penyandi 5S rRNA (Glaszmann *et al.*, 1989), *intergenic spacer regions*/ IGS (Chen, 2000), mikrosatelit / SSR (Pan, 2006), RAPD (Pan, 2004), dan ITSs (Zhang *et al.*, 2009).

Berdasarkan hasil amplifikasi PCR dengan penanda spacer 5S rRNA pada Gambar 4, diketahui bahwa tetua betina tebu varietas PS 862 (*Saccharum* spp. hybrid) memiliki spacer 5S rRNA pada ukuran kurang lebih 280 bp, sedangkan untuk tetua jantan *Erianthus arundinaceus* klon IJ76-375 memiliki ukuran sekitar 420 bp. Pada teknik persilangan jawa, dari 7 individu yang dideteksi terdapat 5 individu *genuine intergeneric hybrid* yang mempunyai spacer 5S rRNA kedua tetuanya dan 2 individu hasil selfing yang hanya mempunyai spacer 5S rRNA dari tetua betina saja. Hal ini disebabkan karena pada persilangan dengan teknik jawa tidak dilakukan emaskulasi sehingga ada peluang terjadinya selfing. Pada teknik cangkokan dari 9 individu yang dideteksi menunjukkan semua individu tersebut *genuine intergeneric hybrid* karena pada teknik persilangan ini dilakukan emaskulasi sehingga peluang terjadinya selfing kecil (Poespodarsono, 1998).

Hogarth (1980) menunjukkan efek negatif akibat selfing yang tidak disengaja pada tanaman tebu. Pada penelitian tersebut diketahui peluang selfing sebesar 20%. Hasil selfing ini diketahui dapat menyebabkan degradasi pada tanaman tebu. Karena tebu merupakan tanaman menyerbuk silang yang juga mempunyai kemampuan *self-compatibility*, sehingga akan menghasilkan selfing. *Self-compatibility* adalah suatu kondisi dimana tepung sari dapat berkecambah pada kepala putik bunga yang sama (Ashari, 2005). Apabila *self-compatibility* tidak ditekan, maka akan menghasilkan angka selfing yang tinggi. Salah satu upaya untuk mengurangi *self-compatibility* antara lain yaitu dengan melakukan emaskulasi.

Dalam metode emaskulasi, Soeprijanto dan Soekarso (1989) menunjukkan bahwa perendaman malai yang belum membuka dalam ethanol 57 % selama 10 menit mampu mematikan polen namun tetap mempertahankan vitalitas stigma. Menurut pengalaman persilangan yang dilakukan oleh P3GI tahun 1996 menunjukkan bahwa keberhasilan emaskulasi ini tampaknya ditentukan oleh kemurnian ethanol dan ketahanan varietas. Kematian malai bunga ditemui dengan penggunaan ethanol yang tercemar dengan methanol dan pada beberapa varietas lain yang tidak tahan dengan perlakuan emaskulasi (Soeprijanto dan Soekarso, 1989).

Pada penelitian ini terdapat 14 dari 16 individu atau 87,5 % yang termasuk *genuine intergeneric hybrid*. Persentase ini cukup tinggi seperti yang dicapai oleh penelitian Piperidis (2000), yang mendapatkan 34 dari 45 individu yang termasuk *genuine intergeneric hybrid* atau sebesar 75,5 % hasil persilangan antar genus tebu dengan *Erianthus arundinaceus* berdasarkan keberadaan pita spacer 5S rRNA dari kedua tetua pada keturunan hasil persilangan.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

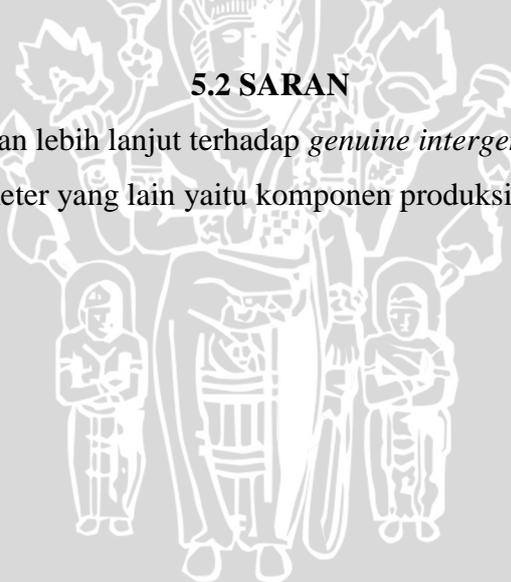
5.1 KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa :

1. Spacer 5S rRNA dapat digunakan sebagai alat untuk mendeteksi *genuine intergeneric hybrid* pada tahap semai.
2. Biji- biji hasil persilangan antar genus *Saccharum* spp. hybrid dengan *Erianthus arundinaceus* mempunyai persentase perkecambahan 0,118% pada persilangan dengan teknik jawa dan 0,179% untuk teknik cangkokan.
3. Berdasarkan keberadaan spacer 5S rRNA dari kedua tetua, *genuine intergeneric hybrid* yang dihasilkan sebanyak 71,42% pada teknik persilangan jawa dan 100% pada teknik persilangan cangkokan.

5.2 SARAN

Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut terhadap *genuine intergeneric hybrid* yang diperoleh dengan parameter yang lain yaitu komponen produksi.



DAFTAR PUSTAKA

Ammal, J.1939. Intergeneric hybrid of saccharum. Journal of Genetics.41.Pp 217-25

Anonymous, 1985. Laporan Tahunan 1985. Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia.Pp28-30

—————, 1986. Laporan Tahunan 1986. Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia.Pp19-21

—————, 1987. Laporan Tahunan 1987. Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia.Pp21-23

—————, 2008. Pengembangan varietas tebu unggul.
<http://www.airmata.wordpress.com>

—————, 2010a. Fuzz.
http://www.lks.ac.th/student/kroo_aumara/bio02/5_111.jpg

—————, 2010b. Pertumbuhan dan perkembangan pada tanaman.
[http://umamy.blogspot.com/2009/08/.](http://umamy.blogspot.com/2009/08/)

—————, 2010c. Apakah tebu termasuk hypogeal.
<http://www.yahooanswer.com>

—————, 2010d. Macam perkecambahan biji.
<http://www.scribd.com/doc/23500545/PERKECAMBAHAN-BENIH>

—————, 2010e. Intergenic spacer.
[http://www.wikipedia.com/5SribosomalRNA/intergenicspacer.](http://www.wikipedia.com/5SribosomalRNA/intergenicspacer)

Ainsworth, C., Begnon, Buchanan. 1997. Techniques in Plant Molecular Biology. Workshop of Molecular Biology Malang. Brawijaya University. Malang

Alexander, A. G. 1973. Sugarcane Physiology. Elsevier Scientific Publishing Company Inc. New York.Pp. 523-570

Ashari, S. 2002. Pengantar Biologi Reproduksi Tanaman. PT. Rineka Cipta. Jakarta.Pp.4-85

Babu, C. N. 1979. Sugarcane. Allied publisher Pvt.Ltd. Shivaji Marg. New Delhi

Chen, H., C. K. Lim, Y. K. Lee dan Y. N. Chan. 2000. Comparative analysis of the genes encoding 23S-5S rRNA intergenic spacer regions of

Lactobacillus casei-related strains International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50.pp 471–478

CIMMYT. 2005. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Third Edition. Mexico. p 1-80.

Daniels, J., B.T Roach.1987. Taksonomi and Evolution. In “Sugarcane Improvement Through Breeding”. DJ. Heinz,ed Vol 11. Elsevier, Amsterdam, Netherland. Pp 7-84

Darjadi, L. dan Hardjono, 1972. Sendi-Sendi Silvikultur. Dirjen Kekutanana . Jakarta.

Darmodjo, S., Mirzawan PDN, S. Lamadji.1989. Pemuliaan Tebu dan Permasalahannya. BP3G. Pasuruan. Pp.9-11

Darmono, D.W . 2004. Menghasilkan Anggrek Silangan. Penebar Swadaya. Jakarta

D’Hont, A., D. Ison ., K, Alix., C, Roux., J. C, Glazmman., 1998. determination of basic chromosome number in the genus saccharum by physical mapping of ribosomal rna genes. Genome 41 : 221-225

Dillewijn, C. V. 1952. Botany of Sugarcane. The Cronoca Botanica Co. Book Departement. Waltham, Mass., USA. Pp.48-60

Ermawati, L.N. 2003. Perbandingan Kualitas Kuantitas DNA Daun Kenaf (*Hibiscusb cannabinus* L.) Hasil Isolasi Menggunakan Empat Metode. Skripsi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.

Glaszmann, J. C., J. L. Noyer, A. Fautret, C. Lanaud dan P. Feldmann. 1989. Molecular genetic markers in sugarcane. Proc.20th ISSCT Congress 2:872-881

Harvey, M., A. D’Hont , K. Alix, and B. Huckett. 1998. Use ofPCR-based markers for identification of Erianthus genetic mate-rial in putative intergeneric hybrids (Saccharum × Erianthus).Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass. 72: 318–320.

Hogarth, D. M. 1980. The impact of accidental selfing on the analysis od a diallel cross with sugarcane. Eiphytica 29: 737-746.

James, G. 2004. An introduction to sugarcane. Dalam Sugarcane Second Edition. Blackwell Publishing. Australia. Pp 8-15

- Kamil, J. 1979. Teknologi Benih 1. Angkasa Raya. Padang.
- Kuswanto, H. 1996. Dasar-dasar Teknologi Produksi dan Sertifikasi Benih. Penerbit Andi Yogyakarta.
- Lambers, H., F.S. Chapin III., L.P. Thijs. 1998. Plant Physiological – Ecology. Springer. New York.
- Mukherjee, S.K. 1957. Origin and distribution of *Saccharum*. Bot. Gaz. 119: 55–61
- Mulyana, W.1983. Bercocok Tanam Tebu dengan Segala Masalahnya. Aneka Ilmu : Semarang.
- Murray, R.G.E. and E. Stackebrandt. 1995. Taxonomic notes: implementation of the provisional status *candidatus* for incompletely describes prokaryotes. International Jurnal of Systematic Bacteriology 45: 186-187.
- Pan, Y.B., D.M, Burner., G.M, Corderio., B.L, Legendre., R.J, Henry. 2004. New *Saccharum* hybrids in *s. spontaneum* cytoplasm developed through a combination of conventional and molecular breeding approaches. Plant Genetic Resources 2(2): 131-139
- Pan, Y. B. 2006. Highly polymorphic microsatellite dna markers for sugarcane germplasm evaluation and variety identity testing. Sugar Tech 8(4): 246-256
- Pangastuti, A. 2006. Definisi spesies prokaryota berdasarkan urutan basa gen penyandi 16s rna dan gen penyandi protein. Biodiversitas 7(3):292-296
- Piperidis, G., M.J, Christoper., B.J, Carol., N, Berding., A, D’Hont. 2000. Molecular contribution to selection of intergeneric hybrids between sugarcane and the wild species *erianthus arundinaceus*. Genome 43 : 1033-1037
- Poehlman, J. and B, Dhirendranath.1969. Breeding Asian Field Crops. Holth Rinehart and Winston, Ltd. London
- Poespodarsono, S. 1998. Dasar- dasar Ilmu Pemuliaan Tanaman. IPB. Bogor
- Purwantoro, A., E, Ambarwati dan F, Setyaningsih. 1999. kekerabatan antar anggrek spesies berdasarkan sifat morfologi tanaman dan bunga. FP UGM. Yogyakarta
- Saghai-Marooof, M.A., K. Soliman, R.A. Jorgensen and R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian

inheritance, chromosomal location, and population dynamics. PNAS 81:8014-8018.

Sambrook J, E.F. Fritsch and T. Maniatis . 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Santoso, T. J. D. W, E. M Utami dan Septiningsih. 2006. Analisis sidik jari dna plasma nutfah kedelai menggunakan markah ssr. jurnal agrobiogen 2(1): 1-7

Sardjoko. 1991. Bioteknologi Latar Belakang dan beberapa Pemanfaatannya. PT.Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.p 26-52

Sastrowijono, S. 1998. Morfologi Tanaman Tebu: bagian 1. Gula Indonesia XXIII (2):28-30

Soeprijanto dan G. Sukarso. 1989. Emasculation of sugarcane (*Saccharum officinarum*) tassels using alcohol immersion. Proc.20th ISSCT Congress 2: 860-864

Sreenivasan, T. V., dan D. Jagathesan. 1975. Meiotic abnormalities in *Saccharum spontaneum*. Euphytica 24: 543-549

Sreenivasan, T.V., B.S, Ahloowalia., D.J, Heinz., 1987. Cytogenetics. In. "Sugarcane Improvement Through Breeding". DJ. Heinz,ed Vol 11. Elsevier, Amsterdam, Netherland. Pp 211-253

Stackebrandt, E. and B.M.Goebel. 1995. A place for dna-dna reassociation and 16s rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. International Journal of Systematic Bacteriology 44: 846-849.

Suryo. 2005. Genetika I. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.p55-87

Sutopo, L., 1993. Teknologi benih. Rajawali Jakarta.

Tai, P. Y. P. 1989. Progress and problems of intergeneric hybridisation in sugar cane breeding. Proc. Inter- Am Sugar Cane Sem., Vol I: 391-395

Taiz, L and E. Zeiger. 1998. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc, Publishers Sunderland, Massachusetts.

Tjitrosoepomo, G.1986. Morfologi Tumbuhan.UGM Press.Yogyakarta.p126-202

Tim Penulis PS, 1992. Pembudidayaan Tebu di lahan sawah dan tegalan. PT. Penebar Swadaya. Jakarta. pp. 19-27

Zhang, H. Y., L.L. He., H.Q. Zhong., F.S. Li., S.C. He., Q.H. Yang. 2009. Identification of Intergeneric hybrids between *Saccharum* spp. And *Erianthus fulvus* with ITSs. *American Journal of Biotechnology* 8(9) pp. 1841-1845



Lampiran 1

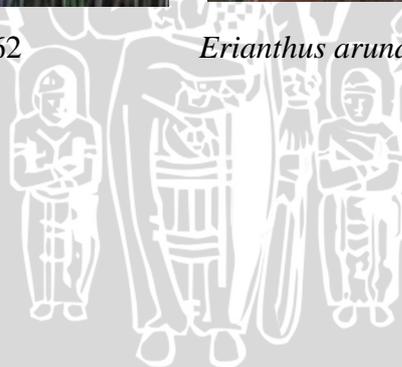
Tetua persilangan



Tebu Varietas PS 862



Erianthus arundinaceus Klon IJ76-375



Lampiran 2

Persilangan teknik jawa dan teknik cangkakan

Persilangan teknik jawa



Malai tetua betina siap disilangkan



Malai tetua jantan siap



Batang malai tetua jantan pada larutan Hawaii (kebun)



Persilangan teknik Jawa

Persilangan teknik Cangkokan



Batang tanaman yang akan disilangkan di cangkok

Proses emaskulasi



Proses persilangan teknik cangkakan (bangsal)



Lampiran 3.

Protokol pembuatan laruta

1. Buffer Stock

a) 1 M Trisma pH 7,5 (10 ml)

Ditimbang trisma base sebanyak 1,21 gram, kemudian dimasukkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan akuabides sebanyak 5 ml, di-*stirrer* sampai larut, ukur pH sampai menunjukkan angka 7,5. Untuk meningkatkan pH tambahkan NaOH sedangkan untuk menurunkan pH tambahkan HCl. Selanjutnya ditambahkan akuabides sampai volume 10 ml. Disimpan dalam botol kemudian disterilisasi dengan autoklaf, disimpan pada suhu 4 °C.

b) 5 M NaCl (10 ml)

Ditimbang 2,9222 NaCl, ditambah akuabides sebanyak 10 ml. Dimasukkan ke gelas ukur, di-*stirrer* untuk melarutkan. Disimpan dalam botol kemudian disterilisasi dengan autoklaf, disimpan pada suhu 4 °C.

c) 0,5 M EDTA pH 8 (30 ml)

Ditimbang 5,583 gr EDTA, ditambah akuabides sebanyak 21 ml, dilarutkan dengan *stirrer*. Ditimbang 4 gr NaOH dan ditambah 10 ml akuabides, dilarutkan. Ditambahkan larutan NaOH sebanyak 9 ml ke dalam larutan EDTA yang sebelumnya telah dibuat. Disterilisasi dengan autoklav dan disimpan pada suhu ruang.

2. Buffer Ekstraksi (1 ml)

Diambil 0,1 M Tris pH 7,5 sebanyak 0,1 ml; 0,7 M NaCl sebanyak 0,14 ml; 0,5 M EDTA sebanyak 0,1 ml, dimasukkan ke dalam konikel steril dan ditambahkan akuabides, selanjutnya diinkubasi dalam *waterbath*. Dimasukkan 1% CTAB sebanyak 0,1 gr, dihomogenkan dan ditambahkan 140 mM NaHSO₃ sebanyak 0,015 gr, dihomogenkan dan diinkubasi lagi dalam *waterbath* sampai digunakan lagi untuk ekstraksi DNA.

3. Buffer TE (2 ml)

Diambil 20 µl 1 M Tris pH 7,5; 4 µl 0,5 M EDTA pH 8 dan 1976 µl akuabides, dimasukkan ke dalam eppendorf steril. Disimpan larutan pada suhu -20 °C sampai digunakan.

4. Cloroform : Isoamil alkohol (CIA) (50 ml)

Diambil 48 ml kloroform dan 2 ml isoamil alkohol dalam ruang asam, dimasukkan ke dalam botol dan ditutup rapat. Disimpan pada suhu ruang.

5. Larutan Wash I (50 ml)

Diambil 38 ml EtOH absolut, 4 ml NaOAC 2,5 M dan 8 ml akuabides, dimasukkan ke dalam botol dan disimpan pada suhu -20 °C sampai digunakan.

6. Larutan Wash II

Diambil 38 ml EtOH absolut, 0,5 ml NH₄OAC 1 M dan 11,5 ml akuabides, dimasukkan ke dalam botol dan disimpan pada suhu -20 °C sampai digunakan.

7. Larutan TAE 10 X (250 ml)

Ditimbang 12,1 gr tris base, ditambah 5 ml 0,5 M EDTA pH 8, ditambah 2,85 ml glisial asam asetat dan akuabides sampai volume 250 ml, dihomogenkan dengan *stirrer* sampai larut. Disimpan larutan pada suhu ruang.

8. TAE 1X (100 ml)

TAE 10 X sebanyak 10 ml diencerkan dengan 90 ml akuabides, dihomogenkan dengan *stirrer* sampai larut. Disimpan larutan pada suhu ruang.

9. Loading Buffer

Sukrosa sebanyak 6,5 gram dilarutkan dengan 1 M Tris sebanyak 0,1 ml. Selanjutnya larutan tersebut ditambah dengan 0,5 EDTA sebanyak 0,2 ml dan bromofenol blue sebanyak 0,03 gr. Larutan dihomogenkan dengan *stirrer* sampai larut. Disimpan larutan pada suhu ruang.