

**STUDI KERAGAMAN GENETIK DAN HUBUNGAN
KEKERABATAN KOLEKSI TETUA PERSILANGAN TEBU
(*Saccharum Spp.*) BERDASARKAN PENANDA MOLEKULER
MIKROSATELIT**

Oleh
EKO NANANG NOVIANTO
0310470012-47



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

2009



**STUDI KERAGAMAN GENETIK DAN HUBUNGAN
KEKERABATAN KOLEKSI TETUA PERSILANGAN TEBU
(*Saccharum Spp.*) BERDASARKAN PENANDA MOLEKULER
MIKROSATELIT**

Oleh
EKO NANANG NOVIANTO
0310470012-47

SKRIPSI

**Disampaikan Sebagai Salah Satu Syarat
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Pertanian Strata (S-1)**

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

2009

RINGKASAN

Eko Nanang Novianto. 0310470012-47. Studi Keragaman Genetik dan Hubungan Kekerabatan Tetua Persilangan Tebu (*Saccharum* sp.) Berdasarkan Penanda Molekuler Mikrosatelit. Dibawah bimbingan Dr. Ir. Damanhuri, MS. dan Ir. Wiwit Budi Widyasari, MSi.

Evaluasi keragaman genetik plasma nutfah tebu, selama ini masih bersandar pada penanda morfologi yang beberapa diantaranya sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Pendekatan bioteknologi penanda DNA SSRs (*Simple Sequence Repeats*) atau biasa dikenal dengan mikrosatelit, dapat dijadikan sebagai solusi alternatif karena penanda ini tidak dipengaruhi oleh lingkungan dan umur tanaman, sehingga penanda ini mampu untuk meningkatkan efisiensi pada tahap awal seleksi sehingga dapat memperpendek waktu yang diperlukan untuk program pemuliaan tanaman tebu.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan kekerabatan dan keragaman genetik dari 22 tetua persilangan tebu berdasarkan penanda molekuler mikrosatelit. Hipotesis yang diajukan adalah diduga terdapat keragaman yang tinggi pada populasi tetua persilangan tebu yang diamati berdasarkan penanda mikrosatelit. Penelitian ini dilaksanakan di kebun koleksi dan laboratorium pemuliaan tanaman P3GI (Pusat Penelitian dan Perkebunan Gula Indonesia) Pasuruan, Jawa Timur selama bulan September sampai dengan Desember 2007. Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain mortar, pestle, pipet, gelas ukur, labu ukur, mikropipet, kain saring, tabung eppendorf, pengering vakum, mesin spektrofotometer, mesin PCR, branson, oven, tip, konikel, vortex, timbangan analitik, stirrer, pH meter, microwave, mesin elektrofotometer, waterbath, mesin centrifuge, autoclave. 22 klon dari P3GI (Pusat Penelitian dan Perkebunan Gula Indonesia) Pasuruan dengan mengambil daun yang masih menggulung. Selain itu juga digunakan bahan-bahan kimia diantaranya Buffer ekstraksi (NaCl, Tris HCl pH 8.0, EDTA), natrium bisulfit, meracptioethanol, Nitrogen cair, Cloroform, Isoamylalcohol, etanol dingin 95% dan 70%, etanol absolute, larutan TE steril, NaOAc, HCl, gel agarose, RNase, Ethidium Bromida, ddH₂O, PCR, MgCl₂, dNTP mix, Primer (forward dan reverse), Taq polymerase, nuclease free water, Asam asetat, Aquabides steril, TAE, Wash 1, Wash 2, 100 bp DNA ladder dan 1 kbp DNA ladder.

Tahapan yang akan dilakukan pada pengamatan molekuler adalah Ekstraksi DNA, Uji Kualitas DNA (Elektroforesis) dan Uji Kuantitas DNA (Spektrofotometri), Skrining Primer, Amplifikasi DNA dengan menggunakan PCR, Elektroforesis dan Visualisasi hasil PCR.

Hasil Analisis kesamaan genetik Jaccard berdasarkan penanda molekuler mikrosatelit didapatkan bahwa dua puluh dua klon tebu tetua persilangan koleksi P3GI mempunyai keragaman genetik yang tinggi. Hasil dendrogram yang diperoleh dari enam primer mikrosatelit gabungan menggunakan kesamaan genetik Jaccard menunjukkan bahwa dua puluh dua klon tetua persilangan koleksi P3GI dikelompokkan dalam dua kelompok besar pada tingkat kesamaan genetik 0,12(12%). Berdasarkan hubungan kekerabatan yang ditunjukkan oleh dendrogram, klon-klon tebu sebagian besar mengelompok berdasarkan daerah

asalnya. Kelompok pertama terdiri dari klon-klon tebu introduksi dari Amerika Serikat, Taiwan, Argentina, klon hasil ekspedisi dari Pulau Jawa dan Sulawesi dan beberapa klon tebu hasil persilangan yang telah dilakukan oleh P3GI, yakni klon PS57, BU772 hasil persilangan tahun 1980 dan BV320 hasil persilangan tahun 1981. Sedangkan kelompok kedua terdiri dari klon-klon introduksi asal Australia.

Dari tabel hubungan kekerabatan antar klon, diketahui bahwa sebagian besar klon yang diuji berkerabat jauh, dengan nilai kesamaan genetik kurang dari 40%. Namun ada pula klon-klon yang berkerabat dekat dengan nilai kesamaan genetik lebih dari 50%. Dan untuk persilangan selanjutnya, hendaknya dipilih tetua yang berkerabat jauh dengan tingkat kesamaan genetik dibawah 0,6 misalnya TRITON dengan NA56-30, VESTA dengan TUC72-24, TRITON dengan TUC72-24, dll. Karena untuk mendapatkan tanaman yang unggul, diperlukan keragaman yang tinggi pada populasi tetua untuk memperoleh efek heterosis.



KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah, Rabb semesta alam, yang telah mencurahkan segala nikmat dan rahmat kepada seluruh makhlukNya. Shalawat serta salam semoga senantiasa dilimpahkan kepada pengemban risalah Islam dan teladan seluruh ummat manusia, Rosulullah Muhammad SAW.

Atas kasih sayang dan pertolonganNya sajalah, akhirnya penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi yang berjudul STUDI KERAGAMAN GENETIK DAN HUBUNGAN KEKERABATAN TETUA PERSILANGAN TEBU (*Saccharum Spp.*) BERDASARKAN PENANDA MOLEKULER MIKROSATELIT. Skripsi ini tidak akan terselesaikan dengan baik tanpa bantuan dari berbagai pihak. Untuk itu, perkenankanlah pada lembaran ini penyusun mengungkapkan penghargaan dan terima kasih yang tulus untuk:

1. Dr. Ir. Damanhuri, MS selaku pembimbing I, atas segala bimbingannya selama penulisan skripsi ini.
2. Ir. Wiwit Budi Widyasari, M.Si selaku pembimbing II, atas segala bantuannya saat penulis melakukan penelitian di P3GI, dan bimbingan serta motivasinya dalam penyelesaian penulisan skripsi ini.
3. Orangtua tercinta serta adik yang selalu mendo'akan, menghadirkan kehangatan, kasih sayang dan dorongan semangat, atas segala pengorbanannya selama ini
4. Mbak Yuni DW., Mbak Sari, atas segala bantuan, masukan, dan motivasinya selama ini.
5. Staf dan teknisi Lab.Bioteknologi P3GI (Bu Tutik, Pak Pujiono, Pak Sulam, Pak Subur 1, Pak Subur 2, dan Pak Kusnadi) atas segala bantuan dan motivasinya dalam penyelesaian penelitian di P3GI.
6. Sahabat-sahabatku, Anggoro, Hendra, Yusron, Arif, Sendi, Dias, vicky, tangguh dan semua sahabatku 'Pemuliaan 03' yang telah memberikan motivasi, semangat dan masukan untuk menyelesaikan penelitian.
7. Mbak Endang sekeluarga, Mas Antonius Rokhim.E.P sekeluarga, Mas Eko yang telah memberikan semangat dan motivasi.
8. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Semoga Allah SWT membalas segala amal baik yang selama ini telah diberikan dengan pahala yang berlipat ganda.

Penulis sangat menyadari masih banyak kekurangan dalam penyusunan laporan skripsi ini. Namun, dengan segala keterbatasan yang ada, penulis berharap skripsi ini dapat memberi manfaat bagi kemajuan ilmu dan referensi bacaan bagi siapapun yang membutuhkannya di kemudian hari.

Malang, Agustus 2009

Penulis

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Gula merupakan salah satu kebutuhan pokok yang sangat penting bagi kehidupan manusia. Jumlah penduduk yang semakin bertambah setiap tahunnya dan tidak diimbangi oleh produktivitas tebu menyebabkan negara harus mengimpor gula. Untuk mencukupi kebutuhan gula di dalam negeri, perlu dilakukan upaya peningkatan produktivitas tebu. Oleh karena itu, peran pemulia menjadi sangat penting untuk merakit varietas tebu unggul berdaya hasil tinggi dan memiliki daya adaptasi terhadap kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan. Salah satu upaya untuk mendapatkan varietas unggul tersebut adalah dengan melakukan persilangan.

Dalam rangka mendukung proses persilangan, pemulia harus memiliki sumber plasma nutfah yang beragam sebagai sumber genetik untuk mendapatkan kombinasi persilangan yang diinginkan. Informasi tentang hubungan kekerabatan dan keragaman plasma nutfah yang akan dijadikan sebagai tetua persilangan sangat diperlukan agar persilangan menjadi lebih mudah dan lebih terarah, sehingga pemulia akan lebih mudah untuk memilih genotipa-genotipa tetua yang akan digunakan untuk membentuk populasi seleksi, atau untuk mengidentifikasi genotipa-genotipa tetua persilangan guna membentuk varietas hibrida dengan nilai heterosis yang tinggi.

Sejauh ini identifikasi plasma nutfah tebu, masih bersandar pada penanda morfologi yang beberapa diantaranya sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Namun, seiring dengan kemajuan ilmu dan teknologi, pendekatan bioteknologi khususnya penanda DNA sudah mulai berkembang. Penanda ini memiliki beberapa kelebihan diantaranya tidak dipengaruhi oleh lingkungan maupun umur tanaman dan salah satu penanda DNA yang sudah mulai digunakan untuk mempelajari keragaman genetik atau kekerabatan antar aksesori tanaman adalah SSR (Simple Sequence Repeat) atau sering disebut juga dengan mikrosatelit. Mikrosatelit merupakan pengulangan mono, di, atau trinucleotida yang biasanya terdiri atas 4 - 10 unit pengulangan, yang membentang pada utas DNA. Susunan

basa yang demikian merupakan karakteristik dari nuklear genom dan bervariasi antar spesies atau populasi (Wahyuni dkk, 2004).

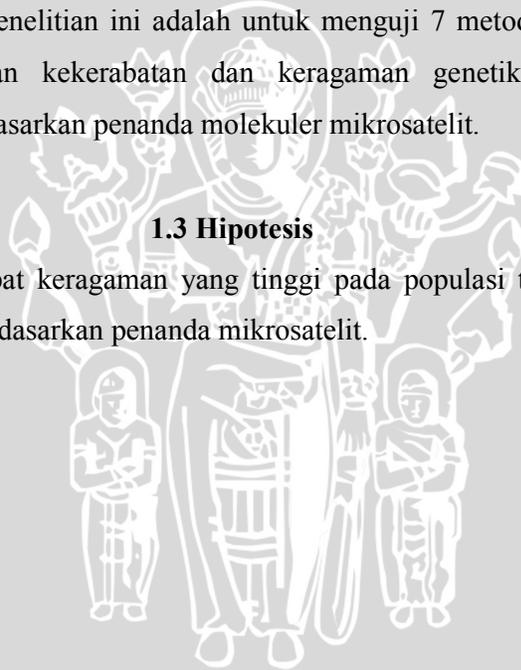
Teknik SSR mulai banyak digunakan untuk mempelajari keragaman genetik diantaranya pada tanaman kelapa genjah (Kumaunang *dkk.*, 2006), gandum (Plaschke *et al.*, 1995), palm (Witono and Kondo, 2006) dan tebu (Pan, 2006) karena memiliki polimorfisme dan resolusi yang tinggi. Oleh karena itu, metode SSR ini sangat baik dilakukan untuk identifikasi karena dapat dilakukan oleh peneliti berbeda dengan hasil yang relatif sama.

1.2 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji 7 metode isolasi DNA, mengetahui hubungan kekerabatan dan keragaman genetik dari 22 tetua persilangan tebu berdasarkan penanda molekuler mikrosatelit.

1.3 Hipotesis

Diduga terdapat keragaman yang tinggi pada populasi tetua persilangan tebu yang diamati berdasarkan penanda mikrosatelit.



III. METODOLOGI

3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilaksanakan di kebun koleksi dan laboratorium Bioteknologi P3GI (Pusat Penelitian dan Perkebunan Gula Indonesia) Pasuruan, Jawa Timur selama bulan September sampai dengan Desember 2007.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: mortar, pestle, pipet, gelas ukur, labu ukur, mikropipet, kain saring, tabung eppendorf, *glass hook*, mesin spektrofotometer, mesin PCR, branson, oven, tip, konikel, vortex, timbangan analitik, stirrer, pH meter, microwave, mesin elektroforesis, waterbath, mesin centrifuge, autoclave.

3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah 22 klon yang terdiri dari 18 klon yang rutin digunakan sebagai tetua persilangan tebu oleh P3GI (Pusat Penelitian dan Perkebunan Gula Indonesia) Pasuruan. Klon-klon ini digunakan sebagai tetua persilangan pada tahun 2004, yang terdiri dari klon-klon introduksi (CP= Introduksi asal Amerika Serikat; NA , TUC= Introduksi asal Argentina; TRITON , VESTA= Introduksi asal Australia; ROC= Introduksi asal Taiwan), IS76-198 dan IS76-200 (Tebu ekspedisi dari Sulawesi) dari jenis *Saccharum officinarum* , Tebu rakitan P3GI yaitu BU 772 yang merupakan klon hasil persilangan tahun 1980, BV 320 klon hasil persilangan tahun 1981 dan PS57 yang merupakan klon hasil persilangan tahun 1987. Sebagai *outgroup* digunakan klon-klon dari spesies *Saccharum spontaneum* yaitu BOT 19, BOT 57, BOT 56 dan BOT 55 (Tabel 3.1). Bagian yang digunakan sebagai bahan isolasi DNA adalah daun tebu yang masih menggulung (*leaf roll*).

Selain itu juga digunakan bahan-bahan kimia diantaranya adalah : Buffer ekstraksi (NaCl, Tris HCl pH 8.0, EDTA), Natrium bisulfit, Nitrogen cair, Cloroform, Isoamylalcohol, etanol dingin 95% dan 70%, etanol absolute, larutan TE steril, NaOAc, HCl, gel agarose, RNase, Ethidium Bromida, ddH₂O, PCR, MgCl₂, dNTP mix, Primer (forward dan reverse), Taq polymerase, nuclease free water, Asam asetat, Aquabides steril, TAE, Wash 1, Wash 2.

Tabel 3.1. Daftar 22 klon yang digunakan dalam penelitian

No	Klon	No	Klon	No	Klon	Keterangan:
1	CP 36-63	9	BU 772	17	JV 2	
2	CP 44-107	10	TUC 72-24	18	ROC 5	
3	CP 47-193	11	NA 56-30	19	BOT 19	<input checked="" type="checkbox"/> Klon Out Group
4	CP 68-1026	12	PS 57	20	BOT 57	
5	CP 70-1133	13	CP 75-1082	21	BOT 56	
6	CP 74-2005	14	TRITON	22	BOT 55	
7	IS 76-198	15	VESTA			
8	IS 76-200	16	BV 320			

3.3 Metode dan Pelaksanaan Penelitian

Tahapan-tahapan pelaksanaan Penelitian Analisis Keragaman dengan Menggunakan Penanda Molekuler Mikrosatelit antara lain:

1. Pengambilan sampel.
2. Isolasi DNA.
3. Estimasi Konsentrasi dan kemurnian DNA dengan menggunakan Spektrofotometer.
4. Pengujian kualitas DNA dengan elektroforesis gel Agarose 0,8% .
5. PCR dengan menggunakan primer mikrosatelit.
6. Visualisasi hasil PCR, dengan menggunakan elektroforesis gel agarose 1,6%.
7. Interpretasi jumlah dan letak pita DNA.
8. Rekonstruksi kekerabatan dengan dengan analisis NTSYS.
9. Dendogram.

3.3.1 Pengambilan sampel

Sampel yang digunakan didalam isolasi DNA, adalah daun tebu yang masih menggulung (*leaf roll*) yang diperoleh dari kebun koleksi P3GI, Pasuruan. Sampel daun tersebut diambil dari daun tebu dengan usia kurang dari tujuh bulan, kemudian daun tersebut ditimbang, 0,1 gram untuk mini scale dan 0,6 gram untuk large scale. Sampel yang telah ditimbang kemudian dibungkus dengan kertas yang telah diberi label nama klon, tanggal pengambilan sampel dan berat sampel. Selanjutnya dimasukkan kedalam Nitrogen cair sampai sampel tersebut siap digunakan untuk isolasi DNA.

3.3.2 Isolasi DNA

Setelah sampel daun dari seluruh klon berhasil didapatkan, tahapan selanjutnya adalah isolasi DNA. Didalam isolasi DNA ini, kemurnian DNA merupakan syarat yang harus dipenuhi untuk melakukan proses PCR. Dalam penelitian ini, dilakukan isolasi DNA menggunakan 7 metode untuk mendapatkan DNA dengan kemurnian yang tinggi.

Metode isolasi DNA yang digunakan pada penelitian ini nantinya hanya satu metode dari tujuh metode yang diuji (6 metode optimasi dan 1 metode KIT). Prosedur yang digunakan sesuai standart baku isolasi DNA sesuai Saghai-Marooof *et al.*, (1984) dan juga sesuai prosedur Lagercrantz (1993), dan isolasi DNA KIT, dimana metode, alat dan bahan yang digunakan untuk isolasi KIT sudah disediakan oleh produsennya. Isolasi DNA KIT yang dipakai adalah DNA KIT Nucleospin, Macherey-Nagel

Untuk mempermudah penamaan, metode yang langsung diaplikasikan sesuai dengan protokol standart CIMMYT maupun Philsurin, pada bagian belakang nama metode diberikan kata "standart", sedangkan yang telah mengalami modifikasi, diberikan kata "modifikasi". Langkah kerja dari masing-masing metode ekstraksi tersebut adalah sebagai berikut:

3.3.2.1 Metode CIMMYT standart.

Dalam isolasi DNA metode pertama, digunakan metode CTAB sesuai dengan protokol CIMMYT laboratorium tanpa modifikasi. Metode ini mengikuti prosedur Saghai-Marroof, *et al.*, (1984) sebagaimana yang ditulis oleh Hoisington, *et al.*, (1992). Adapun pelaksanaannya adalah sebagai berikut :

1. Sampel diambil dari daun tebu yang masih menggulung sebanyak 0,5 gram, dihaluskan pada mortar dengan bantuan nitrogen cair sampai menjadi serbuk
2. Ditambahkan 9 ml buffer CTAB (dH₂O; 1M Tris -7,5; 5M NaCl; 0,5M EDTA; CTAB; BME) 65⁰C
3. Buffer dan bubuk daun tebu kemudian dimasukkan dalam konikel steril, dan segera diinkubasi dalam oven 65⁰C selama 90 menit, setiap 15 menit sekali konikel digoyang-goyang agar larutan tercampur dan saling berikatan
4. Ditambahkan larutan CIA (*Chloroform Isoamil Alcohol* 1:24) sebanyak 4,5 ml, setelah terlebih dahulu konikel diambil dari oven dan didinginkan selama ± 4-5 menit
5. Larutan dihomogenkan selama 5-10 menit dengan cara divortex
6. Larutan disentrifuge selama 10 menit pada suhu ruang dengan kecepatan 3000 rpm
7. Supernatan diambil dan dipindahkan pada konikel steril baru
8. Larutan ditambahkan CIA sebanyak 4,5 ml
9. Larutan disentrifuge selama 10 menit pada suhu ruang dengan kecepatan 3000 rpm
10. Supernatan diambil dan dipindahkan pada konikel steril baru
11. Ditambahkan 6 ml isopropanol dingin, dan konikel digoyang pelan-pelan sampai muncul endapan DNA (berupa benang-benang bening yang berkoloni dan melayang dalam larutan)
12. Endapan DNA dipindah menggunakan *glass hook* ke dalam tabung mikro steril, selanjutnya DNA dibiarkan kering angin ± 20 menit

13. Sebanyak 400 μ l larutan TE ditambahkan ke dalam endapan DNA dan disimpan semalam/*over night* dalam suhu ruang
14. Setelah diinkubasi semalam (\pm 20 jam) endapan DNA + TE ditambahkan phenol sebanyak 400 μ l
15. DNA disentrifuge selama 10 menit pada suhu ruang dengan kecepatan 2500 rpm
16. Supernatan dipindah ke dalam tabung mikro steril dan tambahkan 50 μ l 5M NaCl + 1000 μ l 5M EtOh absolute
17. Secara perlahan tabung mikro dibolak-balik sampai muncul kembali endapan DNA
18. DNA dipindahkan menggunakan *glass hook* ke dalam tabung mikro steril yang berisi WASH 1 sebanyak 1400 μ l dan diamkan selama 20 menit
19. Setelah 20 menit, DNA dipindahkan ke dalam tabung mikro steril yang berisi WASH 2 1000 μ l dan diamkan selama 20 menit
20. Ditambahkan larutan TE sebanyak 400 μ l, agar DNA larut sejenak dan segera simpan pada suhu 4⁰C
21. Stok DNA yang tidak digunakan dalam waktu dekat segera disimpan dalam suhu -20⁰C.

3.3.2.2 Metode CIMMYT Laboratorium (Modifikasi 1)

Metode ini mengikuti prosedur Saghai-Maroo, *et al.*, (1984) sebagaimana yang ditulis oleh Hoisington, *et al.*, (1992) dengan modifikasi. Modifikasi yang digunakan dalam metode ini adalah dengan mengurangi satu komponen buffer ekstraksi yaitu dengan tidak menggunakan BME (β Mercapto Etanol), menggantinya dengan Na Bisulfite dan mengurangi masa inkubasi dari 90 menit menjadi 60 menit. Dan pelaksanaannya sebagai berikut:

1. Sampel diambil dari daun tebu yang masih menggulung sebanyak 3 gram, dihaluskan pada mortar dengan bantuan nitrogen cair sampai menjadi serbuk

2. Ditambahkan 9 ml buffer CTAB ((dH₂O; 1M Tris -7,5; 5M NaCl; 0,5M EDTA; CTAB) 65⁰C
3. Buffer dan bubuk daun tebu kemudian dimasukkan dalam konikel steril, dan segera diinkubasi dalam *waterbath* 60⁰C selama 60 menit dan setiap 15 menit sekali konikel digoyang-goyang agar larutan berikatan
4. Konikel diangkat dan dibiarkan dingin selama ± 5-10 menit
5. Diambahkan larutan CIA sebanyak ½ volume supernatan kemudian di vortek agar larutan homogen
6. Larutan disentrifuge selama 10 menit pada suhu ruang dengan kecepatan 5000 rpm
7. Supernatan dipindah ke dalam konikel steril baru dan ditambahkan isopropanol dingin sebanyak 1x volume larutan
8. Konikel digoyang pelan-pelan sampai muncul endapan DNA
9. DNA dipindah menggunakan *glass hook* ke dalam tabung mikro baru
10. Diambahkan larutan TE sebanyak 500µl dan didiamkan semalam dalam suhu ruang
11. Setelah diinkubasi semalam, ditambahkan phenol sebanyak 500µl
12. Selanjutnya dilakukan sentrifuge selama 10 menit pada suhu ruang dengan kecepatan 1500 rpm
13. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikro baru
14. CIA sebanyak ½ volume supernatan ditambahkan ke dalam tabung mikro baru
15. Selanjutnya disentrifuge kembali selama 10 menit pada suhu ruang dengan kecepatan 1500 rpm
16. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikro baru
17. Ditambahkan 50µl 5M NaCl dan EtOh absolute 2,5 volume larutan, konikel digoyang pelan sampai muncul lagi endapan DNA
18. DNA dipindahkan menggunakan *glass hook* ke dalam tabung mikro yang berisi 1000µl WASH 1 selama 20 menit
19. DNA dipindahkan menggunakan *glass hook* ke dalam tabung mikro yang berisi 1000µl WASH 2 selama 20 menit

20. Ditambahkan larutan TE sebanyak 400 μl dan stok DNA disimpan dalam -20°C

3.3.2.3 Metode CIMMYT Laboratorium (Modifikasi 2)

Metode ini mengikuti prosedur Saghai-Marooof, *et al.*, (1984) sebagaimana yang ditulis oleh Hoisington, *et al.*, (1992) dengan menggunakan modifikasi di dalamnya. Modifikasi yang dilakukan adalah dengan mengurangi satu siklus untuk presipitasi, yaitu DNA dipresipitasi tanpa didiamkan semalam pada suhu ruang tapi cukup didiamkan selama 60 menit dalam suhu -20°C . Sedangkan buffer ekstraksi yang digunakan sama dengan buffer ekstraksi pada metode kedua (CIMMYT Modifikasi 1). Dan pelaksanaannya adalah sebagai berikut :

1. Sampel diambil dari daun tebu yang masih menggulung (pucuk) sebanyak 0,3 gram dihaluskan pada mortar dengan bantuan nitrogen cair sampai menjadi bubuk
2. Selanjutnya dimasukkan dalam tabung tabung mikro steril 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 Isoamylalcohol 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 bolak-balik hingga DNA terpresipitasi (mengendap)
7. DNA disimpan dalam freezer (-20°C) selama 60 menit
8. Kemudian DNA disentrifuge pada 5000 rpm dengan suhu 4°C selama 8 menit
9. Supernatan dibuang hingga hanya DNA yang tertinggal di tabung mikro

10. Selanjutnya DNA dicuci dengan larutan Wash 1 dan Wash 2 masing-masing 60 menit sebanyak $500 \mu\text{l}$
11. Sampel dikeringanginkan selama 20 menit dan ditambahkan buffer TE sebanyak $100 \mu\text{l}$
12. Stok DNA disimpan pada -20°C .

3.3.2.4 Metode Philsurin Laboratorium Standart

Metode ini sesuai dengan prosedur Logercrantz (1993) tanpa modifikasi. Pelaksanaannya adalah sebagai berikut:

1. Sampel diambil dari daun tebu yang masih menggulung (pucuk) sebanyak 1,2 gram dihaluskan pada mortar dengan bantuan nitrogen cair sampai menjadi bubuk
2. Ditambahkan 8 ml buffer CTAB (dH_2O ; 1M Tris-7,5; 5M NaCl; 0,5M EDTA; CTAB, Na-Bisulfite) 65°C
3. Larutan diinkubasi dalam *waterbath* selama 90 menit pada suhu 65°C dan konikel digoyang setiap 15 menit sekali
4. Konikel diangkat dan didinginkan selama 4-5 menit
5. Ekstak daun yang sudah diperoleh dan supernatan dipisahkan dengan dilakukan penyaringan dan supernatan yang diperoleh ditampung hingga volume 6ml.
6. Ditambahkan CIA 1x volume (sampai 12 ml) dan konikel dibolak-balik sesaat
7. Larutan disentrifuge dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit pada suhu 25°C
8. Supernatan dipindahkan pada konikel steril yang baru
9. Ditambahkan 0,8-1x volume isopropanol dingin ($\approx 5 \text{ ml}$)
10. Konikel dibolak-balik sampai DNA mengendap
11. DNA disentrifuge dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit pada suhu ruang
12. Supernatan dibuang dan ditinggalkan endapan DNA saja
13. Ditambahkan 5 ml WASH 1 selama 20 menit

14. DNA dipindahkan dengan *glass hook* pada tabung mikro baru
15. Ditambahkan 1 ml WASH 2 selama 20 menit
16. DNA pellet dikeringanginkan selama 30 menit dengan membalik konikel pada tissue
17. DNA dilarutkan dalam 400 μ l TE
18. DNA disentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang
19. Supernatan yang diperoleh merupakan DNA terlarut (dengan TE) kemudian dipindahkan pada tabung mikro baru dan stok DNA disimpan pada -20°C .

3.3.2.5 Metode Philsurin Laboratorium (Modifikasi 1)

Metode ini sesuai dengan prosedur Logercrantz (1993) dengan modifikasi. Modifikasi yang digunakan adalah dengan mengurangi suhu inkubasi dari 90 menit menjadi 60 menit; tidak dilakukan penyaringan antara ekstrak jaringan daun dengan supernatan: pada fase presipitasi dilakukan penyimpanan DNA pada suhu -20°C selama 1 hari (overnight), setelah dilarutkan ke dalam TE, tidak dilakukan sentrifugasi. Adapun pelaksanaannya adalah sebagai berikut :

1. Sampel diambil dari daun tebu yang masih menggulung (pucuk) sebanyak 1,2 gram dihaluskan pada mortar dengan bantuan nitrogen cair sampai menjadi bubuk
2. Ditambahkan 8 ml buffer CTAB (dH_2O ; 1M Tris-7,5; 5M NaCl; 0,5M EDTA; CTAB, Na-Bisulfite)
3. Larutan diinkubasi dalam *waterbath* selama 60 menit pada suhu 65°C dan konikel digoyang setiap 15 menit sekali
4. Konikel diangkat dan didinginkan selama 4-5 menit
5. Ditambahkan CIA sebanyak 1x volume larutan
6. Larutan disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 4 menit pada suhu ruang.
7. Supernatan dipindahkan pada konikel steril baru
8. Ditambahkan isopropanol dingin sebanyak 1x volume

9. Konikel dibolak-balik sampai DNA mengendap
10. DNA disimpan pada suhu -20°C selama 1 hari (overnight)
11. DNA disentrifuge dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu ruang selama 10 menit
12. Supernatan dibuang dan ditinggalkan endapan DNA saja
13. Ditambahkan 5 ml WASH 1 pada tabung mikro berisi DNA dan didiamkan selama 20 menit
14. WASH 1 dibuang dan selanjutnya ditambahkan WASH 2 sebanyak 5 ml, diamkan selama 20 menit
15. Pellet DNA dikeringanginkan selama 30 menit
16. DNA dilarutkan dalam TE $400\ \mu\text{l}$ kemudian DNA disimpan dalam -20°C sampai DNA digunakan.

3.3.2.6 Metode Philsurin Laboratorium (Modifikasi 2)

Metode ini sesuai dengan prosedur Logercrantz (1993) dengan modifikasi. Perbedaan modifikasi antara metode Philsirin Modifikasi 1 dengan metode ini adalah pada kecepatan sentrifuge dan suhu yang digunakan. Sedangkan selebihnya prosedur yang digunakan sama dengan modifikasi yang pertama. Adapun prosedur pelaksanaannya adalah sebagai berikut:

1. Sampel diambil dari daun tebu yang masih menggulung (pucuk) sebanyak 0,6 gram dihaluskan pada mortar dengan bantuan nitrogen cair sampai menjadi bubuk
2. Ditambahkan 4 ml buffer ekstraksi (dH_2O ; 1M Tris-7,5; 5M NaCl; 0,5M EDTA; CTAB; 0,25% Na-Bisulfite)
3. Larutan diinkubasi dalam *waterbath* selama 60 menit pada suhu 65°C dan konikel digoyang setiap 15 menit sekali
4. Konikel didinginkan selama 5-10 menit
5. Ditambahkan CIA sebanyak $500\ \mu\text{l}$
6. Larutan disentrifuge dengan kecepatan 8000 rpm selama 5 menit pada suhu ruang.
7. Supernatan dipindahkan pada tabung mikro steril baru

8. Ditambahkan CIA sebanyak 350 μ l
9. Larutan disentrifuge dengan kecepatan 8000 rpm pada suhu ruang selama 5 menit
10. Supernatan dipindahkan pada tabung mikro steril baru
11. Ditambahkan isopropanol dingin sebanyak 3ml
12. Konikel dibolak-balik perlahan sampai DNA mengendap
13. DNA disimpan pada suhu -20°C selama 15 menit
14. Supernatan dibuang dan ditinggalkan endapan DNA saja
15. Ditambahkan 1 ml WASH 1 dan didiamkan selama 20 menit
16. WASH 1 dibuang dan ditambahkan WASH 2 sebanyak 1 ml, selanjutnya didiamkan selama 10 menit
17. Pellet DNA dikeringanginkan selama 30 menit
18. DNA dilarutkan dalam TE 150 μ l kemudian disimpan dalam -20°C sampai DNA digunakan.

3.3.2.7 Metode Isolasi DNA dengan menggunakan KIT Nucleospin, Macherey-Nagel

Metode ini merupakan metode standart yang telah disediakan pada saat pembelian produk KIT. Selain metode yang digunakan, alat dan bahan yang akan dipakai juga telah disertakan di dalamnya. Adapun prosedur pelaksanaannya adalah sebagai berikut:

1. Sampel diambil dari daun tebu yang masih menggulung (pucuk) sebanyak 0,1 gram dihaluskan pada mortar dengan bantuan nitrogen cair sampai menjadi bubuk dan dimasukkan kedalam eppendorf 2ml
2. Ditambahkan 400 μ l PL1 dan dilanjutkan dengan penambahan RNase 10 μ l, kemudian diinkubasi dalam *waterbath* selama 60 menit pada suhu 65°C .
3. Larutan kemudian dimasukkan kedalam *violet ring* disentrifuge dengan kecepatan 11.000 rpm selama 5 menit pada suhu 20°C .

4. Supernatan yang terbentuk kemudian ditambahkan 450 μ l PC dan dipipeting sebanyak lima kali untuk menghomogenkan larutan.
5. Setelah homogen, kemudian larutan dimasukkan kedalam *green ring* dan disentrifuge dengan kecepatan 11.000 rpm selama 1 menit pada suhu 20⁰C.
6. Buang supernatan yang terbentuk, tambahkan 400 μ l PW1 sentrifuge dengan kecepatan 11.000 rpm selama 1 menit pada suhu 20⁰C.
7. Buang supernatan yang terbentuk, tambahkan 700 μ l PW2 sentrifuge dengan kecepatan 11.000 rpm selama 1 menit pada suhu 20⁰C. Ulangi lagi dengan penambahan PW2 sebanyak 200 μ l, sentrifuge dengan kecepatan 11.000 rpm selama 2 menit pada suhu 20⁰C.
8. Buang supernatan, keringanginkan *green ring* selama 20 menit, kemudian tambahkan 50 μ l PE hangat dan diinkubasi dalam *waterbath* selama 5 menit pada suhu 70⁰C. Sentrifuge dengan kecepatan 11.000 rpm selama 2 menit pada suhu 20⁰C.
9. Ulangi langkah 9 yaitu dengan menambahkan 50 μ l PE hangat dan diinkubasi dalam *waterbath* selama 5 menit pada suhu 70⁰C. Sentrifuge dengan kecepatan 11.000 rpm selama 2 menit pada suhu 20⁰C.
10. Supernatan yang terbentuk kemudian disimpan dalam -20⁰C sampai DNA digunakan.

3.3.2 Karakterisasi Kualitatif dan Kuantitatif DNA

3.3.2.1 Karakterisasi Kualitatif

Setelah diperoleh sampel DNA, selanjutnya untuk mengetahui kualitas DNA dilakukan pemotongan DNA menggunakan enzim *EcoRI* (larutan 'cut'). Pengujian dilakukan dengan membandingkannya dengan kontrol, yakni DNA yang tidak dipotong oleh enzim *EcoRI* (larutan 'uncut').

Sebanyak 5 μ L DNA hasil isolasi masing-masing klon, dicampurkan dengan 5 μ l larutan mix pemotongan DNA dengan enzim *EcoRI*, sebagaimana yang dapat dilihat pada tabel 3.2 (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989).

Sedangkan untuk kontrol, 5 μ L DNA hasil isolasi dalam kondisi murni tidak dicampur dengan bahan lain.

Tabel 3.2. Komposisi Pemotongan DNA Untuk Satu Kali Reaksi

Komponen Stock	Konsentrasi Akhir	Jumlah (μ l)
Buffer H 10x	1x	1
BSA (10mg/ml)	0.1 mg/ml	1
Enzim <i>Eco</i> RI (12U/ μ l)	6U/ μ l	0.5
Air Nanopure Steril	-	2.5
DNA	-	5
Total	-	10

Selanjutnya semua komponen larutan diinkubasi pada suhu 37^oC selama 16 jam (*over night*). Hasil pemotongan dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1% dalam TAE 1x (40 mM Tris-asetat; 1mM EDTA). Sebanyak 5 μ l DNA yang telah diinkubasi tersebut dicampurkan dengan 2 μ l “loading dye”. Lalu campuran tersebut dimasukkan ke dalam sumur-sumur gel, dan kemudian elektroforesis dilakukan dengan beda potensial 110 volt selama 60 menit. DNA hasil elektroforesis kemudian diamati pada UV transluminator, lalu didokumentasikan dengan menggunakan film polaroid merk Fuji Film FP 3000.

3.3.2.2 Karakterisasi Kuantitatif

Selesai pengujian kualitatif, selanjutnya dilakukan uji kuantitatif DNA dengan menggunakan mesin spektrofotometer, untuk mengetahui seberapa besar konsentrasi DNA yang diisolasi serta tingkat kemurniannya (Tabel 4.1). Komposisi pengujian adalah 10 μ l sampel DNA dan 1490 μ l dH₂O steril. Sampel diukur pada absorbansi 260 nm dan 280 nm. Konsentrasi DNA dihitung dengan rumus :

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g/ml}) = \text{Nilai ABS}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{faktor pengenceran}$$

50 μ g/ml merupakan faktor konversi dari nilai absorbansi 260 = 1 sehingga konsentrasi DNA berarti 50 μ g/ml. Untuk kemurnian DNA dihitung berdasarkan hasil bagi nilai ABS₂₆₀ dengan ABS₂₈₀ (OD₂₆₀/OD₂₈₀). Hasil pembagian ditunjukkan dengan nilai rasio, dimana nilai rasio 1,8 menunjukkan tingkat kemurnian DNA yang sangat baik. Apabila terkontaminasi dengan protein,

nilai rasio yang diberikan lebih kecil dari nilai rasio konsentrasi DNA murni dan apabila terkontaminasi oleh RNA, nilai rasio yang diberikan lebih besar dari 2 (Sambrook, 1989).

3.3.4 Amplifikasi DNA dengan Menggunakan PCR

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan mesin “thermocycler” dengan program *Gene Amp PCR system 2400* yang dikeluarkan *PCR PERKIN ELMER*, yang memiliki kemampuan untuk mengubah-ubah suhu sesuai dengan yang telah diprogram sebelumnya.

Setiap tabung PCR (*PCR tube*) berisi 25 μ l total volume yang terdiri dari sejumlah larutan komposisi reaksi PCR (Tabel 3.3). Pembuatan komponen reaksi PCR tersebut dilakukan secara hati-hati dan cepat di dalam wadah berisi es untuk menjaga keefektifan kerja beberapa zat yang digunakan seperti dNTPs dan enzim *Taq* DNA Polymerase yang mudah rusak. Berikutnya, tabung berisi komponen reaksi PCR tersebut disimpan pada alat “thermocycler” yang 15 menit sebelum digunakan telah dinyalakan untuk memanaskan mesin (Kusumadewi, 2005).

Tabel 3.3 Komponen Reaksi PCR

No	Komponen PCR	Konsentrasi Awal	Konsentrasi Akhir	Volume 1x (μ l)
1	Primer F	25 μ M	1 μ M	1
2	Primer R	25 μ M	1 μ M	1
3	Template DNA	5 μ g/25 μ l	0.5 μ g/25 μ l	2.5
4	MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.5
5	dNTP mix	10mM	0.8 mM	2
6	Buffer 5x	5x	1x	5
7	Taq	5 u/ μ l	0.75 u/ μ l	0.15
8	NFW	-	sampai 25 μ l	11.85
Total Volume Reaksi (μl)				25

Komponen PCR yang dipakai, Sebagian besar adalah produk dari PROMEGA (MgCl₂, dNTPmix, Buffer 5x dan Taq), sedangkan Primer yang dipakai adalah tujuh pasang Primer mikrosatelit dari *AlphaDNA*, yang merupakan primer yang telah diteliti pada tanaman tebu oleh Cordeiro, *et al.*, (2003), dan telah terbukti memiliki pita yang polimorfik. Diskripsi dari tujuh pasang primer tersebut, tertera pada Tabel 3.4

Tabel 3.4 Diskripsi 7 Pasang Primer Mikrosatelit

No	Marker Code		SSR Sequence	% G+C	Tm
1	SMC222CG	Forward	(CA) ₂₄	50	60
		Reverse		43.5	66
2	SMC226CG	Forward	(CA) ₁₀	57.9	60
		Reverse		47.6	62
3	SMC248CG	Forward	(TTA) ₆	45.5	64
		Reverse		32	66
4	SMC319CG	Forward	(CA) ₁₇	52.4	64
		Reverse		52.4	64
5	SMC477CG	Forward	(CA) ₃₁	42.9	60
		Reverse		54.6	68
6	SMC863CG	Forward	(TC) ₉	55	62
		Reverse		45.5	64
7	SMC1096CG	Forward	(TG) ₁₇	52.17	70
		Reverse		57.14	66

Keterangan:

*1 Berdasarkan jurnal Cordeiro, *et al.*, (2003).

*2 Berdasarkan keterangan yang disertakan bersama primer *AlphaDNA*.

Program PCR untuk 5 pasang primer (SMC222CG, SMC246CG, SMC248CG, SMC319CG dan SMC863CG), akan diaplikasikan program yang telah dioptimasi oleh peneliti sebelumnya (Tabel 3.5)

Tabel 3.5 Program Reaksi PCR Hasil Optimasi Enam Pasang Primer Mikrosatelit.

No	Primer	SSR Sequence	Program PCR			
1	SMC 222 CG (F, R)	CA ₂₄	Pre Denaturasi	: 94°C	2'	
			Denaturasi	: 94°C	1'	
			Annealing *	: 59°C	1'	
			* Penurunan 1°C tiap siklusnya			} 7 siklus
			Elongation	: 72°C	1'	
			Denaturasi	: 94°C	1'	
			Annealing	: 52°C	1'	
			Elongation	: 72°C	1'	
			Post Elongation	: 72°C	5'	
-----			} 35 siklus			
2	SMC 226 CG (F,R)	CA ₁₀		Pre Denaturasi	: 94°C	2'
				Denaturasi	: 94°C	30"
				Annealing	: 66°C	1'
			Elongation	: 72°C	1'	
			Post Elongation	: 72°C	5'	
-----			} 7 siklus			
3	SMC 248 CG (F,R)	TTA ₆		Pre Denaturasi	: 94°C	2'
				Denaturasi	: 94°C	1'
				Annealing *	: 59°C	1'
				* Penurunan 1°C tiap siklusnya		
				Elongation	: 72°C	1'
				Denaturasi	: 94°C	1'
			Annealing	: 52°C	1'	
			Elongation	: 72°C	1'	
Post Elongation	: 72°C	5'				
-----			} 30 siklus			
4	SMC 319 CG (F,R)	CA ₁₇		Pre Denaturasi	: 94°C	5'
				Denaturasi	: 94°C	1'
				Annealing	: 61°C	1'
				Elongation	: 72°C	2'
			Post Elongation	: 72°C	3'	
-----			} 30 siklus			
5	SMC 863 CG (F,R)	TC ₉		Pre Denaturasi	: 94°C	5'
				Denaturasi	: 94°C	1'
				Annealing	: 61°C	1'
				Elongation	: 72°C	2'
			Post Elongation	: 72°C	3'	

Sedangkan untuk dua pasang primer yang lain (SMC477CG dan SMC1096CG) dilakukan optimasi lebih lanjut. Program yang dipakai untuk mengoptimasi primer SMC477CG dan SMC1096CG, tertera pada tabel 3.6

Tabel 3.6 Optimasi Beberapa Program Reaksi PCR Pada Primer primer SMC477CG dan SMC1096CG

No	Program PCR			No	Program PCR			
1	Pre Denaturasi	: 95 ^o C	2'	6	Pre Denaturasi	: 95 ^o C	3'	
	Denaturasi	: 95 ^o C	30"		Denaturasi	: 95 ^o C	45"	
	Annealing	: 60 ^o C	1'		Annealing	: 60 ^o C	30"	
	Elongation	: 72 ^o C	2'		Elongation	: 72 ^o C	30"	
	Post Elongation	: 72 ^o C	5'		Post Elongation	: 72 ^o C	5'	
} 35 siklus				} 35 siklus				
2	Pre Denaturasi	: 94 ^o C	2'	7	Pre Denaturasi	: 94 ^o C	4'	
	Denaturasi	: 94 ^o C	30"		Denaturasi	: 94 ^o C	3'	
	Annealing	: 66 ^o C	1'		Annealing	: 66 ^o C	1'	
	Elongation	: 72 ^o C	1'		Elongation	: 73 ^o C	1'	
	Post Elongation	: 72 ^o C	5'		Post Elongation	: 73 ^o C	5'	
} 35 siklus				} 30 siklus				
3	Pre Denaturasi	: 94 ^o C	2'	8	Pre Denaturasi	: 94 ^o C	2'	
	Denaturasi	: 94 ^o C	1'		Denaturasi	: 94 ^o C	1'	
	Annealing *	: 67 ^o C	1'		Annealing *	: 60 ^o C	1'	
	* Penurunan 1 ^o C tiap siklusnya				* Penurunan 1 ^o C tiap siklusnya			
	Elongation	: 72 ^o C	1'		Elongation	: 72 ^o C	1'	
	Denaturasi	: 94 ^o C	1'		Denaturasi	: 94 ^o C	1"	
	Annealing	: 60 ^o C	1'		Annealing	: 52 ^o C	1'	
Elongation	: 72 ^o C	1'	Elongation	: 72 ^o C	1"			
Post Elongation	: 72 ^o C	5'	Post Elongation	: 72 ^o C	5'			
} 7 siklus				} 7 siklus				
} 30 siklus				} 35 siklus				
4	Pre Denaturasi	: 95 ^o C	2'	9	Pre Denaturasi	: 95 ^o C	5'	
	Denaturasi	: 95 ^o C	1'		Denaturasi	: 95 ^o C	1'	
	Annealing	: 63 ^o C	1'		Annealing	: 60 ^o C	1'	
	Elongation	: 72 ^o C	2'		Elongation	: 72 ^o C	1'	
	Post Elongation	: 72 ^o C	5'		Post Elongation	: 72 ^o C	5'	
} 35 siklus				} 35 siklus				
5	Pre Denaturasi	: 94 ^o C	2'	10	Pre Denaturasi	: 95 ^o C	5'	
	Denaturasi	: 94 ^o C	45"		Denaturasi	: 95 ^o C	1'	
	Annealing *	: 67 ^o C	1'		Annealing	: 60 ^o C	1'	
	* Penurunan 1 ^o C tiap siklusnya				Elongation	: 72 ^o C	1'	
	Elongation	: 72 ^o C	90"		Post Elongation	: 72 ^o C	5'	
	Denaturasi	: 94 ^o C	45"					
	Annealing	: 60 ^o C	1'					
Elongation	: 72 ^o C	90"						
Post Elongation	: 72 ^o C	8'						
} 5 siklus				} 35 siklus				

3.3.5 Elektroforesis dan Visualisasi hasil PCR

Elektroforesis dilakukan dengan tujuan untuk memvisualisasi hasil amplifikasi. Langkah kerjanya adalah dengan menuangkan TAE 1X kedalam Gel agarose (1.6 %). Masukkan 5 μ l sampel DNA dan 2 μ l loading dye ke dalam chamber. Gel yang berisi sampel dielektroforesis pada tegangan 50 volt selama 1 jam. Kemudian gel direndam dalam editium bromide selama 10 menit di ruang gelap, selanjutnya direndam dalam H₂O steril selama 10 menit. Untuk mengetahui hasil amplifikasi, sampel diamati di atas UV transluminator dan difoto dengan menggunakan film polaroid merk Fuji Film FP 3000.

3.4 Interpretasi Data

Setelah dilakukan elektroforesis, pita DNA hasil amplifikasi akan terseparasi berdasarkan ukurannya (berupa pasangan basa=bp/*base pair*). Dari hasil separasi tersebut, kemudian dibandingkan dengan marker DNA dan diubah menjadi data biner dengan cara melihat kehadiran atau ketidakhadiran pita-pita DNA, hasil amplifikasi tersebut. Adanya larik amplifikasi dilambangkan dengan angka 1, sedangkan untuk ketidakhadiran larik dilambangkan dengan angka 0.

Analisa Kekerbatan antar varietas dilakukan dengan pengelompokan (*clustering*) dan digambarkan dalam bentuk dendogram yang dibuat untuk tiap primer yang digunakan dan juga dilengkapi dengan dendogram konsensus atau biasa disebut dengan dendogram gabungan. Perhitungan jarak genetik dihitung menggunakan kesamaan jaccard. Pengelompokan dan penyusunan dendogram dilakukan dengan program NTSys berdasar metode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*).

Keseluruhan pelaksanaan penelitian studi keragaman genetik tetua persilangan tebu berdasarkan penanda mikrosatelit, dapat diilustrasikan dalam diagram berikut:



Gambar 3.1. Diagram alur Pelaksanaan kegiatan penelitian

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

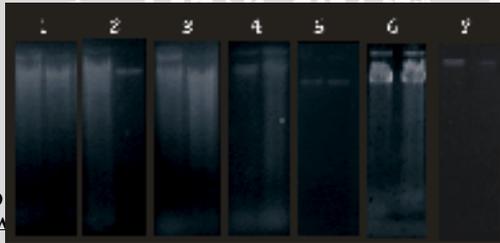
4.1 Hasil

4.1.1 Isolasi DNA

4.1.1.1 Optimasi Metode Isolasi DNA

Pada penelitian ini telah dilakukan pengujian terhadap tujuh metode ekstraksi DNA (6 metode optimasi dan 1 metode KIT). Dari ketujuh metode tersebut, kemudian dipilih satu metode yang paling bagus, untuk digunakan sebagai metode dasar dalam pelaksanaan isolasi DNA selanjutnya. Prosedur yang digunakan sesuai standart baku isolasi DNA berdasarkan Saghai-Marooof, *et al.*, (1984) dan juga sesuai prosedur Logercrantz (1993).

Hasil kualitatif optimasi 7 (tujuh) metode isolasi DNA yang sudah dilakukan, ditampilkan pada Gambar berikut :



Gambar 4.1. Foto hasil uji kualitatif optimasi 7 Metode Isolasi DNA

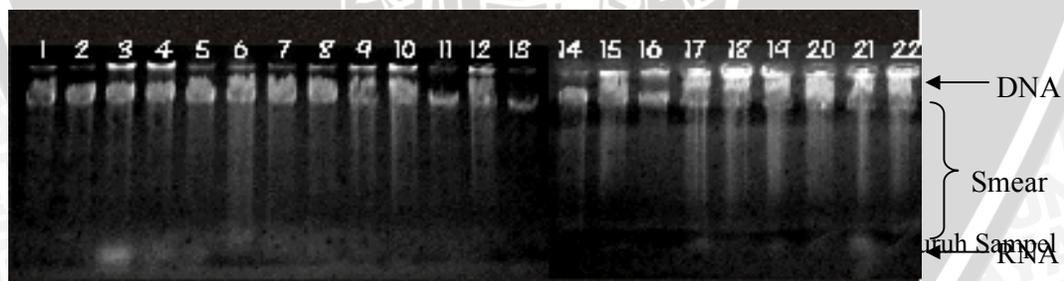
Keterangan : 1=Metode 1 (CIMMYT Standart), 2= Metode 2 (CIMMYT Modifikasi 1), 3= Metode 3 (CIMMYT Modifikasi 2), 4= Metode 4 (Philsurin Standart), 5= Metode 5 (Philsurin modifikasi 1), 6= Metode 6 (Philsurin Modifikasi 2), 7= Metode 7 (KIT)

Tabel 4.1 Hasil Pengujian Kemurnian DNA Dari Optimasi Metode DNA

No	Nama metode	WL 1	WL2	Diff	Nilai Kemurnian DNA (Rasio)
1	Metode CIMMYT Laboraturium (standart)	0,070	0,042	0,028	1,667
		0,056	0,039	0,017	1,436
2	Metode CIMMYT Laboraturium (modifikasi 1)	0,170	0,112	0,058	1,518
		0,097	0,060	0,037	1,617
3	Metode CIMMYT Laboraturium (modifikasi 2)	0,14	0,084	0,056	1,667
		0,238	0,13	0,108	1,831
4	Metode Philzurine Laboraturium (standart)	0,204	0,102	0,102	2,00
		0,108	0,063	0,045	1,714
5	Metode Philzurine Laboraturium (modifikasi 1)	0,032	0,018	0,018	1,778
		0,023	0,014	0,009	1,648
6	Metode Philzurine Laboraturium (modifikasi 2)	0,171	0,092	0,079	1,859
		0,178	0,093	0,085	1,914
7	Metode KIT	0,097	0,060	0,037	1,617
		0,032	0,018	0,018	1,778

Setelah dilakukan beberapa metode isolasi DNA, 6 metode optimasi DNA yang dipilih untuk dibandingkan dengan metode isolasi DNA KIT adalah metode Philsurin modifikasi 2. Pemilihan metode ini dilakukan dengan beberapa pertimbangan diantaranya: (1) Kuantitas DNA yang didapatkan dengan metode isolasi ini sangat tinggi, lebih tinggi dari keempat metode isolasi DNA yang lain, (2) Ratio kemurnian DNA menunjukkan nilai yang bagus (rata-rata memiliki ratio 1,8) mendekati ratio DNA murni, (3) Hasil elektroforesis menunjukkan pita DNA yang sangat tebal, hal ini juga membuktikan bahwa konsentrasi DNA yang terkandung juga sangat tinggi. (4) Dari hasil elektroforesis juga diketahui bahwa smear DNA juga sangat tipis, Walaupun dalam sampel masih terdapat kontaminan RNA, tetapi hal ini dapat diatasi dengan penambahan RNase.

DNA yang telah diisolasi dengan menggunakan metode Phisurin, kemudian dielektroforesis dengan gel agarose untuk mengetahui apakah DNA tersebut terkontaminasi oleh RNA atau senyawa lain. Pada pelaksanaannya, sebelum DNA dielektroforesis terlebih dahulu ditambahkan RNase untuk menghindari kontaminasi RNA. Masing-masing sampel ditambahkan 2,5 μl RNase yang sudah diencerkan kemudian diinkubasi dalam suhu 37°C selama 30 menit agar RNase bereaksi dan kemudian DNA disimpan dalam -20°C sampai siap digunakan.

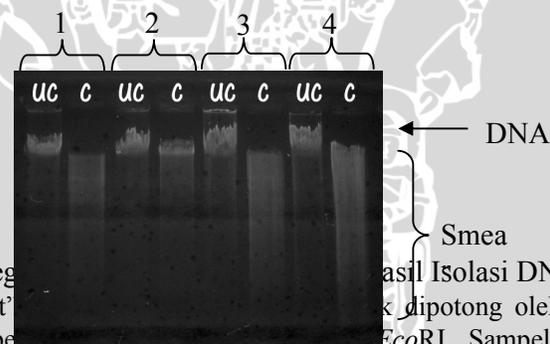


- | | | |
|---------------|----------------|------------|
| 1. CP 36-63 | 10. TUC 72-24 | 19. BOT 19 |
| 2. CP 44-107 | 11. NA 56-30 | 20. BOT 57 |
| 3. CP 47-193 | 12. PS 57 | 21. BOT 56 |
| 4. CP 68-1026 | 13. CP 75-1082 | 22. BOT 55 |
| 5. CP 70-1133 | 14. TRITON | |
| 6. CP 74-2005 | 15. VESTA | |
| 7. IS 76-198 | 16. BV 320 | |
| 8. IS 76-200 | 17. JV 2 | |
| 9. BU 772 | 18. ROC 5 | |

Dari hasil elektroforegram duapuluh dua klon, masing-masing klon menunjukkan kuantitas DNA yang sangat tinggi, hal ini ditunjukkan dengan adanya pita tebal pada masing-masing sumur. Namun, selain pita yang tebal juga terdapat *smear* pada sampel yang menunjukkan kualitas DNA masih kurang bagus. Selain itu, masih ada beberapa sampel yang terlihat masih terdapat kontaminan RNA, sampel tersebut diantaranya adalah CP 47-193, JV 2, BOT 19 dan BOT 56. Kontaminan RNA dapat dihilangkan dengan menambahkan lagi RNase kedalam sampel tersebut.

4.1.2 Karakterisasi Kualitatif dan Kuantitatif DNA

DNA hasil isolasi dikarakterisasi secara kualitatif dan kuantitatif. Tujuan dilakukan karakterisasi adalah untuk melihat kondisi DNA sampel yang akan dianalisis menggunakan penanda mikrosatelit-PCR. Karakterisasi secara kualitatif dilakukan dengan membandingkan antara DNA yang dipotong oleh enzim *EcoRI* (“cut”) dengan DNA tidak dipotong enzim *EcoRI* (“uncut”), yang di elektroforesis pada gel agarosa 1% dalam buffer TAE 1x dengan beda potensial 310 volt selama 2 jam (Gambar 4.3).



Gambar 4.3 Elektroforegram hasil Isolasi DNA

Keterangan: uc= “uncut”, c= “cut”, sampel DNA yang dipotong oleh *EcoRI*. Sampel DNA 1 : TRITON, 2 : CP 74-2005, 3: is 76-198, 4 : CP 68-1026. Masing-masing memiliki DNA dengan larik yang tebal dan sedikit smear.

Dari Gambar diatas, terlihat bahwa semua sampel DNA yang dipotong oleh enzim *EcoRI* menunjukkan adanya “smear”. Hal ini berarti bahwa semua DNA genom terpotong sempurna sehingga memenuhi kualitas untuk digunakan dalam analisis PCR menggunakan penanda mikrosatelit.

Setelah DNA dikarakterisasi secara kualitatif, dilakukan karakterisasi secara kuantitatif dengan mengukur konsentrasi dan tingkat kemurnian DNA menggunakan alat UV Spektrofotometer (Tabel 4.2).

Tabel 4.2. Konsentrasi dan Kemurnian (Rasio A_{260} / A_{280}) DNA 22 Klon Tebu

No.	Sampel	Ratio	[DNA] ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	No.	Sampel	Ratio	[DNA] ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
1	CP 36-63	1.75	0.67	12	PS 57	1.84	0.92
2	CP 44-107	1.92	2.35	13	CP 75-1082	1.86	1.28
3	CP 47-193	1.81	0.87	14	TRITON	1.82	0.85
4	CP 68-1026	1.8	0.73	15	VESTA	1.77	0.59
5	CP 70-1133	1.72	0.85	16	BV 320	1.9	0.84
6	CP 74-2005	1.93	1.25	17	JV 2	1.66	0.83
7	IS 76-198	1.96	0.78	18	ROC 5	1.83	0.95
8	IS 76-200	1.91	1.34	19	BOT 19	1.95	0.94
9	BU 772	1.84	1.7	20	BOT 57	1.86	1.96
10	TUC 72-24	1.83	0.89	21	BOT 56	1.89	1.32
11	NA 56-30	1.79	0.83	22	BOT 55	1.86	0.71

tinggi yang memiliki rata-rata sebesar $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, lebih tinggi dari kebutuhan DNA untuk proses PCR. Konsentrasi DNA paling besar pada klon CP 44-107 yang memiliki konsentrasi $2,35 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, sedangkan konsentrasi paling rendah pada klon CP 36-63 dengan konsentrasi sebesar $0,67 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Dari hasil pengujian didapatkan kemurnian DNA (rasio A_{260} / A_{280}) duapuluh dua klon tebu yang diuji berkisar antara 1,72 hingga 1,96. Sampel yang memiliki tingkat kemurnian DNA yang paling baik berdasar Sambrook (1989) adalah sampel ke-3 (CP 47-193), sampel ke-4 (CP 68-1026), sampel ke-9 (BU 772), sampel ke-10 (TUC 72-24), sampel ke-12 (PS 57), sampel ke-13 (CP 75-1082), sampel ke-14 (TRITON), ke-18 (ROC 5), ke-20 (BOT 57), ke-21 (BOT 56), ke-22 (BOT 55), dengan nilai rasio A_{260}/A_{280} berturut-turut adalah 1.81; 1.8; 1.84; 1.83; 1.84; 1.86; 1.82; 1.83; 1.86; 1.89 dan 1.86. Sampel yang memiliki kemurnian terendah yaitu JV2 dengan tingkat kemurnian sebesar 1,66.

4.1.3 Isolasi DNA menggunakan KIT

Setelah dilakukan isolasi DNA menggunakan metode terpilih, kemudian sampel tersebut dibandingkan dengan isolasi DNA menggunakan KIT. Bahan, peralatan dan metode yang digunakan di dalam proses isolasi DNA sudah baku. Semua bahan yang digunakan di dalam proses isolasi DNA ini sudah memiliki takaran sendiri yang dibuat oleh produsen, baik itu pH, takaran pengambilan bahan sampai dengan proses penyimpanan bahan-bahan tersebut agar bahan-bahan tersebut tidak mudah rusak. Tidak seperti metode CIMMYT maupun Phisurin, buffer yang digunakan dalam KIT sudah bisa langsung digunakan.

Dari hasil elektroforegram duapuluh dua klon tebu yang telah diisolasi dengan menggunakan KIT (Gambar 4.4), terlihat masing-masing klon memiliki kualitas DNA yang bagus yang terlihat dari minimnya *smear* dan tidak terlihatnya sisa RNA pada sampel. Namun untuk pengujian secara kuantitatif menggunakan Spektrofotometer, menunjukkan hal sebaliknya (Tabel 4.2).

Tabel 4.3. Konsentrasi dan Kemurnian (Rasio A_{260} / A_{280}) DNA 22 Klon Tebu berdasarkan isolasi DNA dengan menggunakan KIT.

No.	Sampel	Ratio	[DNA] ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	No.	Sampel	Ratio	[DNA] ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
1	CP 36-63	1.212	0.3	12	PS 57	*)	*)
2	CP 44-107	1.067	0.5	13	CP 75-1082	*)	*)
3	CP 47-193	1.267	0.3	14	TRITON	1.168	0.9
4	CP 68-1026	*)	*)	15	VESTA	1.172	0.6
5	CP 70-1133	1.381	0.2	16	BV 320	*)	*)
6	CP 74-2005	1.151	0.85	17	JV 2	*)	*)
7	IS 76-198	1.167	1	18	ROC 5	*)	*)
8	IS 76-200	1.148	1	19	BOT 19	*)	*)
9	BU 772	1.154	1	20	BOT 57	1.433	0.32
10	TUC 72-24	1.144	1	21	BOT 56	0.923	-0.36
11	NA 56-30	1.2	0.4	22	BOT 55	*)	*)

terdokumentasikan.

Dari duapuluh dua klon yang diuji, 13 klon berhasil diambil data tingkat kemurnian DNA (rasio A_{260} / A_{280}) dengan nilai ratio yang rendah (dibawah 1,8), beberapa klon yang lain menunjukkan adanya nilai negatif (-) sehingga proses pengujian tidak dilanjutkan. Untuk pengujian bagus tidaknya DNA yang telah berhasil diisolasi dengan menggunakan KIT dilakukan dengan melihat kualitas berdasarkan hasil visualisasi Elektroforesis gel Agarose dan dengan cara membandingkan aplikasi PCR antara isolasi DNA metode terpilih (Metode Phisurin modifikasi) dengan Isolasi DNA dengan menggunakan KIT. Hasil yang paling bagus, akan digunakan untuk aplikasi PCR selanjutnya. Untuk mengetahui berapa kuantitas DNA sampel, digunakan DNA kontrol untuk melihat apakah kuantitas DNA memadai digunakan untuk proses PCR atau tidak. Hasil isolasi DNA menggunakan KIT, ditampilkan pada Gambar 4.4



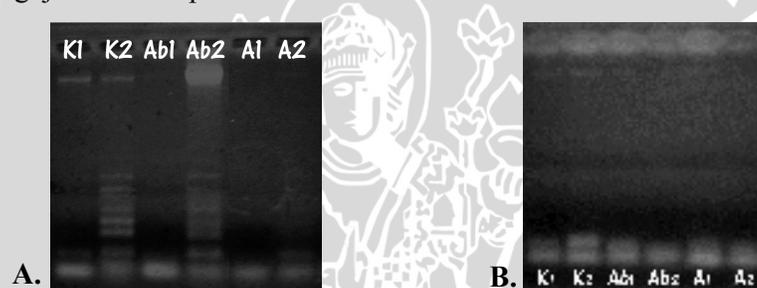
Gambar 4.4 Foto Hasil Elektroforesis (Elektroforegram) DNA Total Genom Seluruh Sampel menggunakan KIT

Keterangan :

- | | | |
|---------------|----------------|---------------|
| 1. CP 36-63 | 10. TUC 72-24 | 19. BOT 19 |
| 2. CP 44-107 | 11. NA 56-30 | 20. BOT 57 |
| 3. CP 47-193 | 12. PS 57 | 21. BOT 56 |
| 4. CP 68-1026 | 13. CP 75-1082 | 22. BOT 55 |
| 5. CP 70-1133 | 14. TRITON | |
| 6. CP 74-2005 | 15. VESTA | C=Kontrol DNA |
| 7. IS 76-198 | 16. BV 320 | |
| 8. IS 76-200 | 17. JV 2 | |
| 9. BU 772 | 18. ROC 5 | |

Dari hasil elektroforegram Gambar 4.2, terlihat bahwa 22 klon yang telah berhasil diisolasi, menghasilkan kualitas DNA yang memadai yang terlihat dengan minimnya smear yang terbentuk. Pada Gambar tersebut juga terlihat bahwa semua sampel memiliki konsentrasi yang lebih rendah daripada Kontrol DNA. Sehingga dapat disimpulkan bahwa 22 klon tersebut memiliki kuantitas DNA dibawah DNA Kontrol, yakni kurang dari 0,4 gram/ μ l.

Untuk mengetahui DNA mana yang digunakan untuk aplikasi PCR, langkah selanjutnya yang perlu dilakukan adalah menguji kualitas DNA isolasi KIT dengan cara membandingkan hasil amplifikasi metode Phisurin modifikasi (metode isolasi DNA terpilih) dengan metode isolasi DNA dengan menggunakan KIT. Hasil pengujian terlihat pada Gambar 4.5



Gambar 4.5 Foto Hasil Elektroforesis (Elektroforegram) hasil Amplifikasi PCR. A=Hasil Amplifikasi Primer 2, B=Hasil Amplifikasi Primer 5.

Keterangan : K= Hasil Amplifikasi PCR isolasi DNA dengan menggunakan KIT, Ab= Hasil Amplifikasi PCR isolasi DNA dengan menggunakan metode Phisurin modifikasi dengan pelarut menggunakan Aquabides, A= Hasil Amplifikasi PCR isolasi DNA dengan menggunakan metode Phisurin modifikasi dengan pelarut menggunakan dH_2O . Sedangkan 1 dan 2 menunjukkan sampel yang dipakai untuk pembandingan, 1= Klon PS-57 dan 2= Klon CP68-1026.

Dari hasil elektroforegram diatas, terlihat bahwa hasil amplifikasi PCR dengan menggunakan isolasi KIT memiliki kualitas yang lebih bagus dibandingkan dengan menggunakan metode Phisurin modifikasi. Hasil amplifikasi PCR dengan menggunakan isolasi KIT menghasilkan pita DNA yang lebih tajam dan separasi yang lebih jelas. Berdasarkan beberapa pertimbangan diatas, metode isolasi DNA dengan menggunakan KIT digunakan sebagai metode dasar dalam pelaksanaan isolasi DNA selanjutnya.

4.1.4 Optimasi Program PCR

Pada dasarnya, setiap produsen komponen PCR, seperti PROMEGA, FERMENTAS, INVITROGEN, sudah menyediakan protokol yang dapat digunakan untuk aplikasi PCR termasuk program PCR yang digunakan. Namun tidak semua primer dapat teramplifikasi dengan bagus apabila diaplikasikan dengan program PCR yang disertakan oleh masing-masing produsen tersebut. Program PCR tersebut perlu dioptimasi kembali, terutama suhu *annealing*, yang disesuaikan dengan masing-masing kondisi primer yang digunakan (Biasanya berdasarkan T_m) untuk mendapatkan hasil amplifikasi yang bagus, pita jelas dan memiliki batas separasi yang tegas.

Seperti yang telah diketahui sebelumnya, Primer yang dipakai dalam penelitian ini telah dipakai juga oleh peneliti sebelumnya dan telah ditemukan program optimasi dari primer 1 (SMC222CG), primer 2 (SMC246CG), primer 3 (SMC248CG), primer 4 (SMC319CG) dan primer 6 (SMC863CG). Pada penelitian ini, primer 5 (SMC 477 CG) dan primer 7 (SMC 1039 CG) perlu dilakukan optimasi untuk mendapatkan program PCR yang tepat.

DNA template yang digunakan untuk optimasi Primer 5 (SMC 477 CG) dan Primer 7 (SMC 1039 CG) adalah CP 68-1026 (sebagai kontrol). Untuk melihat polimorfisme dari primer 7, digunakan pula sampel acak, diantaranya BOT 56, NA 56-30, BOT 19, TUC 72-24 dan JV2.

Hasil yang didapat dari 10 model optimasi program reaksi PCR didapatkan hasil yang relatif sama (Tabel 4.3). Untuk primer 5 (SMC 477 CG) menghasilkan 2 pita, sedangkan pada primer 7 (SMC 1039 CG) menghasilkan 1 pita DNA dan tidak terlihat adanya polimorfisme pada primer 7 tersebut.

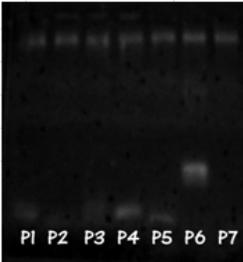
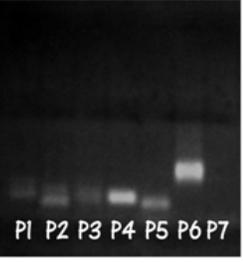
Tabel 4.4 Hasil Optimasi Program PCR pada Primer 5 (SMC 477 CG) dan primer 7 (SMC 1039 CG)

No	Keterangan																																	
1	<p>Program Optimasi ini berdasarkan protokol PCR dari PROMEGA, yang menyatakan bahwa: Idealnya, kedua primer (F&R) untuk reaksi PCR memiliki melting temperature (Tm) yang hampir sama, sehingga suhu annealing dapat diaplikasikan pada suhu yang sama pula. Namun pada kasus lain, apabila Tm pada kedua primer tersebut tidak sama, temperatur annealing yang diaplikasikan, tergantung pada primer yang memiliki Tm terendah. Optimasi pertama ditujukan untuk mengoptimasi Primer 5 (SMC 477 CG). Primer 5, memiliki Tm dengan perbedaan suhu (antara Primer F dan R) yang sangat signifikan yaitu sebesar 8°C. Tm (F)=60°C, sedangkan Tm (R)=68°C. Dengan pertimbangan protokol diatas, maka diambil keputusan untuk menggunakan suhu annealing sesuai dengan Tm Primer terendah, yakni Tm (F)=60 °C.</p>																																	
	Program PCR Optimasi 1	Hasil																																
	<table border="1"> <tr> <td>Pre Denaturasi</td> <td>: 95°C 2'</td> <td rowspan="5">} 35 siklus</td> </tr> <tr> <td>Denaturasi</td> <td>: 95°C 30"</td> </tr> <tr> <td>Annealing</td> <td>: 60°C 1'</td> </tr> <tr> <td>Elongation</td> <td>: 72°C 2'</td> </tr> <tr> <td>Post Elongation</td> <td>: 72°C 5'</td> </tr> </table>	Pre Denaturasi	: 95°C 2'	} 35 siklus	Denaturasi	: 95°C 30"	Annealing	: 60°C 1'	Elongation	: 72°C 2'	Post Elongation	: 72°C 5'	<p>Keterangan: M=DNA marker 100 bp, P5=primer SMC 477 CG, P7=primer SMC 1039 CG, Klon yang dipakai= CP 68-1026,</p> <p>Masing-masing primer dapat teramplifikasi dengan jelas. Primer 5 (SMC 477 CG) teramplifikasi 2 pita pada posisi 70bp dan 100bp, Primer 7 (SMC 1039 CG) teramplifikasi 1 pita pada posisi 70bp.</p>																					
Pre Denaturasi	: 95°C 2'	} 35 siklus																																
Denaturasi	: 95°C 30"																																	
Annealing	: 60°C 1'																																	
Elongation	: 72°C 2'																																	
Post Elongation	: 72°C 5'																																	
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>No</th> <th colspan="2">Keterangan</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2</td> <td colspan="2"> <p>Optimasi ke2, masih berdasarkan protokol PCR dari PROMEGA, Namun Penentuan suhu annealing diambil berdasarkan Tm terendah pada Primer 7. Primer 7, memiliki Tm dengan perbedaan suhu (antara Primer F dan R) sebesar 4°C dan kedua primer tersebut memiliki Tm rata-rata diatas 65°C. Tm (F)=70°C, sedangkan Tm (R)=66°C. Dengan pertimbangan protokol PROMEGA, maka diambil keputusan untuk menggunakan suhu annealing sesuai dengan Tm Primer terendah, yakni Tm (R)=66 °C.</p> </td> </tr> <tr> <td></td> <td>Program PCR Optimasi 2</td> <td>Hasil</td> </tr> <tr> <td></td> <td> <table border="1"> <tr> <td>Pre Denaturasi</td> <td>: 94°C 2'</td> <td rowspan="5">} 35 siklus</td> </tr> <tr> <td>Denaturasi</td> <td>: 94°C 30"</td> </tr> <tr> <td>Annealing</td> <td>: 66°C 1'</td> </tr> <tr> <td>Elongation</td> <td>: 72°C 1'</td> </tr> <tr> <td>Post Elongation</td> <td>: 72°C 5'</td> </tr> </table> </td> <td> <p>Keterangan: M=DNA marker 100 bp, P5=primer SMC 477 CG, P7=primer SMC 1039 CG, Klon yang dipakai= CP 68-1026,</p> <p>Masing-masing primer tidak dapat teramplifikasi dengan jelas. Primer 5 (SMC 477 CG) maupun Primer 7 tidak menunjukkan adanya pita DNA.</p> </td> </tr> <tr> <td></td> <td colspan="2"> <table border="1"> <thead> <tr> <th>No</th> <th colspan="2">Keterangan</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3</td> <td colspan="2"> <p>Program optimasi 3, adalah program touchdown yang juga telah banyak diaplikasikan pada primer mikrosatelit. Menurut Mburu. D and Hanotte. O, (2005), program touchdown digunakan untuk mencegah terjadinya non spesifik produk amplifikasi. Dengan aplikasi annealing pada suhu tinggi, primer dan template DNA akan lebih spesifik berpasangan, dan sebaliknya, apabila diaplikasikan pada suhu rendah, ada kemungkinan primer tidak berpasangan secara spesifik dengan template pasangannya, sehingga terbentuk produk PCR yang tidak diinginkan. Oleh karena itu, pada siklus awal Touchdown, digunakan suhu annealing yang tinggi, kemudian suhu annealing diturunkan pada siklus berikutnya. Primer 5, memiliki Tm dengan perbedaan suhu (antara Primer F dan R) sebesar 8°C. Tm (F)=60°C, sedangkan Tm (R)=68°C. Untuk program touchdown, pada siklus pertama, digunakan suhu annealing sebesar 67°C, kemudian diturunkan 1°C tiap siklusnya, selama 7 siklus.</p> </td> </tr> </tbody> </table> </td> </tr> </tbody> </table>		No	Keterangan		2	<p>Optimasi ke2, masih berdasarkan protokol PCR dari PROMEGA, Namun Penentuan suhu annealing diambil berdasarkan Tm terendah pada Primer 7. Primer 7, memiliki Tm dengan perbedaan suhu (antara Primer F dan R) sebesar 4°C dan kedua primer tersebut memiliki Tm rata-rata diatas 65°C. Tm (F)=70°C, sedangkan Tm (R)=66°C. Dengan pertimbangan protokol PROMEGA, maka diambil keputusan untuk menggunakan suhu annealing sesuai dengan Tm Primer terendah, yakni Tm (R)=66 °C.</p>			Program PCR Optimasi 2	Hasil		<table border="1"> <tr> <td>Pre Denaturasi</td> <td>: 94°C 2'</td> <td rowspan="5">} 35 siklus</td> </tr> <tr> <td>Denaturasi</td> <td>: 94°C 30"</td> </tr> <tr> <td>Annealing</td> <td>: 66°C 1'</td> </tr> <tr> <td>Elongation</td> <td>: 72°C 1'</td> </tr> <tr> <td>Post Elongation</td> <td>: 72°C 5'</td> </tr> </table>	Pre Denaturasi	: 94°C 2'	} 35 siklus	Denaturasi	: 94°C 30"	Annealing	: 66°C 1'	Elongation	: 72°C 1'	Post Elongation	: 72°C 5'	<p>Keterangan: M=DNA marker 100 bp, P5=primer SMC 477 CG, P7=primer SMC 1039 CG, Klon yang dipakai= CP 68-1026,</p> <p>Masing-masing primer tidak dapat teramplifikasi dengan jelas. Primer 5 (SMC 477 CG) maupun Primer 7 tidak menunjukkan adanya pita DNA.</p>		<table border="1"> <thead> <tr> <th>No</th> <th colspan="2">Keterangan</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3</td> <td colspan="2"> <p>Program optimasi 3, adalah program touchdown yang juga telah banyak diaplikasikan pada primer mikrosatelit. Menurut Mburu. D and Hanotte. O, (2005), program touchdown digunakan untuk mencegah terjadinya non spesifik produk amplifikasi. Dengan aplikasi annealing pada suhu tinggi, primer dan template DNA akan lebih spesifik berpasangan, dan sebaliknya, apabila diaplikasikan pada suhu rendah, ada kemungkinan primer tidak berpasangan secara spesifik dengan template pasangannya, sehingga terbentuk produk PCR yang tidak diinginkan. Oleh karena itu, pada siklus awal Touchdown, digunakan suhu annealing yang tinggi, kemudian suhu annealing diturunkan pada siklus berikutnya. Primer 5, memiliki Tm dengan perbedaan suhu (antara Primer F dan R) sebesar 8°C. Tm (F)=60°C, sedangkan Tm (R)=68°C. Untuk program touchdown, pada siklus pertama, digunakan suhu annealing sebesar 67°C, kemudian diturunkan 1°C tiap siklusnya, selama 7 siklus.</p> </td> </tr> </tbody> </table>		No	Keterangan		3	<p>Program optimasi 3, adalah program touchdown yang juga telah banyak diaplikasikan pada primer mikrosatelit. Menurut Mburu. D and Hanotte. O, (2005), program touchdown digunakan untuk mencegah terjadinya non spesifik produk amplifikasi. Dengan aplikasi annealing pada suhu tinggi, primer dan template DNA akan lebih spesifik berpasangan, dan sebaliknya, apabila diaplikasikan pada suhu rendah, ada kemungkinan primer tidak berpasangan secara spesifik dengan template pasangannya, sehingga terbentuk produk PCR yang tidak diinginkan. Oleh karena itu, pada siklus awal Touchdown, digunakan suhu annealing yang tinggi, kemudian suhu annealing diturunkan pada siklus berikutnya. Primer 5, memiliki Tm dengan perbedaan suhu (antara Primer F dan R) sebesar 8°C. Tm (F)=60°C, sedangkan Tm (R)=68°C. Untuk program touchdown, pada siklus pertama, digunakan suhu annealing sebesar 67°C, kemudian diturunkan 1°C tiap siklusnya, selama 7 siklus.</p>	
No	Keterangan																																	
2	<p>Optimasi ke2, masih berdasarkan protokol PCR dari PROMEGA, Namun Penentuan suhu annealing diambil berdasarkan Tm terendah pada Primer 7. Primer 7, memiliki Tm dengan perbedaan suhu (antara Primer F dan R) sebesar 4°C dan kedua primer tersebut memiliki Tm rata-rata diatas 65°C. Tm (F)=70°C, sedangkan Tm (R)=66°C. Dengan pertimbangan protokol PROMEGA, maka diambil keputusan untuk menggunakan suhu annealing sesuai dengan Tm Primer terendah, yakni Tm (R)=66 °C.</p>																																	
	Program PCR Optimasi 2	Hasil																																
	<table border="1"> <tr> <td>Pre Denaturasi</td> <td>: 94°C 2'</td> <td rowspan="5">} 35 siklus</td> </tr> <tr> <td>Denaturasi</td> <td>: 94°C 30"</td> </tr> <tr> <td>Annealing</td> <td>: 66°C 1'</td> </tr> <tr> <td>Elongation</td> <td>: 72°C 1'</td> </tr> <tr> <td>Post Elongation</td> <td>: 72°C 5'</td> </tr> </table>	Pre Denaturasi	: 94°C 2'	} 35 siklus	Denaturasi	: 94°C 30"	Annealing	: 66°C 1'	Elongation	: 72°C 1'	Post Elongation	: 72°C 5'	<p>Keterangan: M=DNA marker 100 bp, P5=primer SMC 477 CG, P7=primer SMC 1039 CG, Klon yang dipakai= CP 68-1026,</p> <p>Masing-masing primer tidak dapat teramplifikasi dengan jelas. Primer 5 (SMC 477 CG) maupun Primer 7 tidak menunjukkan adanya pita DNA.</p>																					
Pre Denaturasi	: 94°C 2'	} 35 siklus																																
Denaturasi	: 94°C 30"																																	
Annealing	: 66°C 1'																																	
Elongation	: 72°C 1'																																	
Post Elongation	: 72°C 5'																																	
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>No</th> <th colspan="2">Keterangan</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3</td> <td colspan="2"> <p>Program optimasi 3, adalah program touchdown yang juga telah banyak diaplikasikan pada primer mikrosatelit. Menurut Mburu. D and Hanotte. O, (2005), program touchdown digunakan untuk mencegah terjadinya non spesifik produk amplifikasi. Dengan aplikasi annealing pada suhu tinggi, primer dan template DNA akan lebih spesifik berpasangan, dan sebaliknya, apabila diaplikasikan pada suhu rendah, ada kemungkinan primer tidak berpasangan secara spesifik dengan template pasangannya, sehingga terbentuk produk PCR yang tidak diinginkan. Oleh karena itu, pada siklus awal Touchdown, digunakan suhu annealing yang tinggi, kemudian suhu annealing diturunkan pada siklus berikutnya. Primer 5, memiliki Tm dengan perbedaan suhu (antara Primer F dan R) sebesar 8°C. Tm (F)=60°C, sedangkan Tm (R)=68°C. Untuk program touchdown, pada siklus pertama, digunakan suhu annealing sebesar 67°C, kemudian diturunkan 1°C tiap siklusnya, selama 7 siklus.</p> </td> </tr> </tbody> </table>		No	Keterangan		3	<p>Program optimasi 3, adalah program touchdown yang juga telah banyak diaplikasikan pada primer mikrosatelit. Menurut Mburu. D and Hanotte. O, (2005), program touchdown digunakan untuk mencegah terjadinya non spesifik produk amplifikasi. Dengan aplikasi annealing pada suhu tinggi, primer dan template DNA akan lebih spesifik berpasangan, dan sebaliknya, apabila diaplikasikan pada suhu rendah, ada kemungkinan primer tidak berpasangan secara spesifik dengan template pasangannya, sehingga terbentuk produk PCR yang tidak diinginkan. Oleh karena itu, pada siklus awal Touchdown, digunakan suhu annealing yang tinggi, kemudian suhu annealing diturunkan pada siklus berikutnya. Primer 5, memiliki Tm dengan perbedaan suhu (antara Primer F dan R) sebesar 8°C. Tm (F)=60°C, sedangkan Tm (R)=68°C. Untuk program touchdown, pada siklus pertama, digunakan suhu annealing sebesar 67°C, kemudian diturunkan 1°C tiap siklusnya, selama 7 siklus.</p>																											
No	Keterangan																																	
3	<p>Program optimasi 3, adalah program touchdown yang juga telah banyak diaplikasikan pada primer mikrosatelit. Menurut Mburu. D and Hanotte. O, (2005), program touchdown digunakan untuk mencegah terjadinya non spesifik produk amplifikasi. Dengan aplikasi annealing pada suhu tinggi, primer dan template DNA akan lebih spesifik berpasangan, dan sebaliknya, apabila diaplikasikan pada suhu rendah, ada kemungkinan primer tidak berpasangan secara spesifik dengan template pasangannya, sehingga terbentuk produk PCR yang tidak diinginkan. Oleh karena itu, pada siklus awal Touchdown, digunakan suhu annealing yang tinggi, kemudian suhu annealing diturunkan pada siklus berikutnya. Primer 5, memiliki Tm dengan perbedaan suhu (antara Primer F dan R) sebesar 8°C. Tm (F)=60°C, sedangkan Tm (R)=68°C. Untuk program touchdown, pada siklus pertama, digunakan suhu annealing sebesar 67°C, kemudian diturunkan 1°C tiap siklusnya, selama 7 siklus.</p>																																	

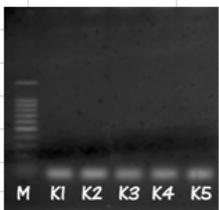
Tabel 4.4 Hasil Optimasi Program PCR pada Primer 5 (SMC 477 CG) dan primer 7 (SMC 1039 CG)

Program PCR Optimasi 3			Hasil		
Pre Denaturasi	: 94°C 2'	} 7 siklus		<p>Keterangan: M=DNA marker 100 bp, P5=primer SMC 477 CG, P7=primer SMC 1039 CG, K1= CP 68-1026, Klon 2= BOT 56,</p> <p>Masing-masing primer dapat teramplifikasi dengan jelas. Primer 7 (SMC 1039 CG) teramplifikasi 1 pita pada posisi 70bp. Primer 5 (SMC 477 CG) teramplifikasi 2 pita pada posisi 70bp dan 150bp, sedangkan untuk primer 5 klon 2 teramplifikasi 1 pita pada posisi 70 bp.</p>	
Denaturasi	: 94°C 1'				
Annealing *	: 67°C 1'				
* Penurunan 1°C tiap siklusnya					
Elongation	: 72°C 1'				
Denaturasi	: 94°C 1'				} 30 siklus
Annealing	: 60°C 1'				
Elongation	: 72°C 1'				
Post Elongation	: 72°C 5'				
No			Keterangan		
4	<p>Program Optimasi 4 berdasarkan protokol FERMENTAS yang menyatakan bahwa suhu optimal annealing, biasanya 5°C dibawah Tm Primer.</p> <p>Primer 7, memiliki Tm dengan perbedaan suhu (antara Primer F dan R) sebesar 4°C dan kedua primer tersebut memiliki Tm rata-rata 68°C. Tm (F)=70°C, sedangkan Tm (R)=66°C. Dengan pertimbangan protokol FERMENTAS, maka diambil keputusan untuk menggunakan suhu annealing, 5°C dibawah Tm rata-rata kedua primer yakni 63 °C</p>				
Program PCR Optimasi 4			Hasil		
Pre Denaturasi	: 95°C 2'	} 35 siklus		<p>Keterangan: M=DNA marker 100 bp, P5=primer SMC 477 CG, P7=primer SMC 1039 CG, Klon 1= CP 68-1026, klon 2= BOT 56, Klon 3= NA 56-30</p> <p>Masing-masing primer dapat teramplifikasi dengan jelas. Primer 5 (SMC 477 CG) teramplifikasi 2 pita pada posisi 70bp dan 150bp, sedangkan untuk Primer 7 (SMC 1039 CG) untuk klon 1, 2, dan 3, masing-masing teramplifikasi 1 pita pada posisi 70bp.</p>	
Denaturasi	: 95°C 1'				
Annealing	: 63°C 1'				
Elongation	: 72°C 2'				
Post Elongation	: 72°C 5'				
No			Keterangan		
5	<p>Program optimasi 5, dilakukan untuk melihat polimorfisme pada primer 5, sehingga pada aplikasi optimasi ini, tidak digunakan marker DNA. Program optimasi 5 hampir sama dengan program optimasi 3, yaitu dengan memakai program touchdown. Pada siklus pertama, digunakan suhu annealing sebesar 60°C, kemudian diturunkan 1°C tiap siklusnya, selama 5 siklus.</p>				
Program PCR Optimasi 5			Hasil		
Pre Denaturasi	: 94°C 2'	} 5 siklus		<p>Keterangan: P5=primer SMC 477 CG, P7=primer SMC 1039 CG, K1= CP 68-1026, Klon 2= BOT 56,</p> <p>Masing-masing primer dapat teramplifikasi dengan jelas. Primer 7 (SMC 1039 CG) teramplifikasi 1 pita. Primer 5 (SMC 477 CG) teramplifikasi 2 pita, sedangkan untuk primer 5 klon 2 teramplifikasi 2 pita dengan pita paling atas sedikit memudar.</p>	
Denaturasi	: 94°C 45"				
Annealing *	: 60°C 1'				
* Penurunan 1°C tiap siklusnya					
Elongation	: 72°C 90"				
Denaturasi	: 94°C 45"				} 30 siklus
Annealing	: 55°C 1'				
Elongation	: 72°C 90"				
Post Elongation	: 72°C 8'				
No			Keterangan		
6	<p>Program Optimasi 6 berdasarkan jurnal Cordeiro., <i>et al</i> (2000) yang mengaplikasikan primer 5 dan primer 7 pada suhu annealing 55 °C. Pada program optimasi ini, turut diaplikasikan pula primer 1, primer 2, primer 3 dan primer 6.</p>				

Tabel 4.4 Hasil Optimasi Program PCR pada Primer 5 (SMC 477 CG) dan primer 7 (SMC 1039 CG)

Program PCR Optimasi 6			Hasil	
Pre Denaturasi	: 95°C 3'	} 25 siklus		
Denaturasi	: 95°C 45"			
Annealing	: 55°C 30"			
Elongation	: 73°C 30"			
Post Elongation	: 73°C 5'			
			<p>Keterangan: P1=primer SMC 222 CG, P2=primer SMC 226 CG, P3=primer SMC 248 CG, P4=primer SMC 319 CG, P5=primer SMC 477 CG, P6=primer SMC 863 CG, P7=primer SMC 1039 CG, Klon yang dipakai= CP 68-1026.</p> <p>Masing-masing primer kurang dapat teramplifikasi dengan jelas. Pita yang dihasilkan pudar, sehingga separasi kurang bagus.</p>	
No	Keterangan			
7	<p>Program Optimasi 7 berdasarkan pada Optimasi 6. ditambahkan juga pada protokol FERMENTAS bahwa terlepasnya rantai ganda DNA template pada awal proses PCR (initial denaturasi) merupakan hal yang sangat penting. Tidak sempurnanya proses denaturasi pada tahap awal proses PCR dapat menyebabkan sedikitnya hasil amplifikasi. Suhu initial denaturasi, biasanya berkisar antara 95°C dan berlangsung selama 1-3 menit jika kandungan GC 50% atau dibawahnya. Waktu seharusnya ditambah hingga 10 menit jika kandungan GC lebih tinggi.</p>			
Program PCR Optimasi 7			Hasil	
Pre Denaturasi	: 94°C 4'	} 30 siklus		
Denaturasi	: 94°C 3'			
Annealing	: 55°C 1'			
Elongation	: 73°C 1'			
Post Elongation	: 73°C 5'			
			<p>Keterangan: P1=primer SMC 222 CG, P2=primer SMC 226 CG, P3=primer SMC 248 CG, P4=primer SMC 319 CG, P5=primer SMC 477 CG, P6=primer SMC 863 CG, P7=primer SMC 1039 CG, Klon yang dipakai= CP 68-1026.</p> <p>Masing-masing primer menghasilkan produk amplifikasi, kecuali primer 7. Pada primer 3 separasi kurang jelas. primer 1 dan primer 2 masing-masing menghasilkan 2 pita DNA, Namun separasinya kurang bagus. Aplikasi bagus untuk primer 4 dan primer 6.</p>	
No	Keterangan			
8	<p>Program optimasi 8, dilakukan untuk melihat polimorfisme pada primer 7, sehingga pada aplikasi optimasi ini, tidak digunakan marker DNA. Program optimasi 8 hampir sama dengan program optimasi 3, yaitu dengan memakai program touchdown. Pada siklus pertama, digunakan suhu annealing sebesar 59°C, kemudian diturunkan 1°C tiap siklusnya, selama 7 siklus.</p>			
Program PCR Optimasi 8			Hasil	
Pre Denaturasi	: 94°C 2'	} 7 siklus		
Denaturasi	: 94°C 1'			
Annealing *	: 60°C 1'			
* Penurunan 1°C tiap siklusnya				
Elongation	: 72°C 1'			
Denaturasi	: 94°C 1"			} 35 siklus
Annealing	: 52°C 1'			
Elongation	: 72°C 1"			
Post Elongation	: 72°C 5'		<p>Keterangan: P5=primer SMC 477 CG, P7=primer SMC 1039 CG, K1= CP 68-1026, K2= BOT 56, K3= BOT 19</p> <p>Masing-masing primer dapat teramplifikasi dengan jelas. Primer 7 (SMC 1039 CG) masing-masing teramplifikasi 1 pita, sedangkan Primer 5 (SMC 477 CG) teramplifikasi 2 pita.</p>	

Tabel 4.4 Hasil Optimasi Program PCR pada Primer 5 (SMC 477 CG) dan primer 7 (SMC 1039 CG)

No	Keterangan	
9	Program optimasi 9 ditujukan untuk melihat polimorfisme pada primer 7, sampel yang dipakai untuk program ini sebanyak 4 klon dengan pengaplikasian suhu annealing sebesar 60°C	
Program PCR Optimasi 9		
Pre Denaturasi	: 95°C 5'	
Denaturasi	: 95°C 1'	
Annealing	: 60°C 1'	
Elongation	: 72°C 1'	
Post Elongation	: 72°C 5'	
		Keterangan: K1= CP 68-1026, K2= BOT 56, K3= TUC 72-24, K4= JV2 Masing-masing klon pada Primer 7 (SMC 1039 CG) teramplifikasi dengan jelas satu pita DNA.
Program PCR Optimasi 10		
Pre Denaturasi	: 95°C 5'	
Denaturasi	: 95°C 1'	
Annealing	: 63°C 1'	
Elongation	: 72°C 1'	
Post Elongation	: 72°C 5'	
		Keterangan: M=Marker K1= CP 68-1026, K2= BOT 56, K3= TUC 72-24, K4= JV2 Masing-masing klon pada Primer 7 (SMC 1039 CG) menghasilkan 1 produk amplifikasi pada posisi yang sama, yaitu 80bp.

Setelah dilakukan optimasi pada Tabel 4.4 diatas, dipilih program optimasi 1 sebagai program reaksi PCR untuk primer 5. Karena memiliki visualisasi pita yang jelas dan separasi yang tegas bila dibandingkan dengan kedelapan program optimasi yang telah diujikan. Hal ini didukung oleh pendapat Wulandari (2007), yang menyatakan bahwa penentuan program reaksi PCR didasarkan pada produk PCR (pita DNA) dengan visualisasi yang jelas sehingga mudah dibaca (reliable) dan penggunaan program reaksi PCR tersebut tidak berubah jika digunakan lagi dalam kesempatan yang berbeda (stabil). Selain itu, program optimasi 1 juga membutuhkan waktu yang singkat untuk proses amplifikasi, sehingga dapat mengefisienkan waktu yang dipakai. Untuk primer 7, masih belum dapat ditemukan program optimasi yang tepat. Hal ini dikarenakan produk amplifikasi dari optimasi diatas, menghasilkan pita DNA yang relatif seragam (tidak terjadi polimorfisme).

4.1.5 Aplikasi Program PCR

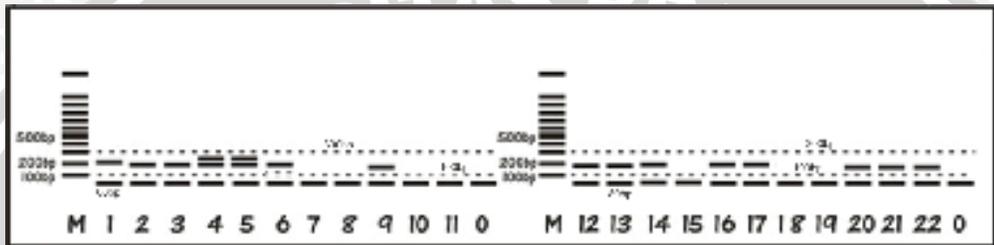
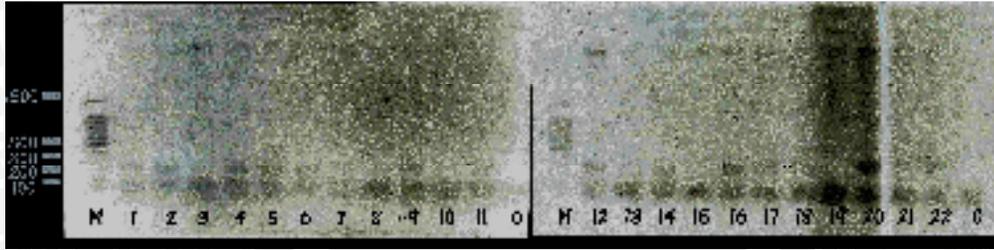
Aplikasi program PCR dengan menggunakan enam pasang mikrosatelit menunjukkan bahwa penanda mikrosatelit tersebut mendeteksi polimorfisme pada DNA antar klon/individu berdasarkan munculnya pita amplifikasi pada suatu lokus. Setiap pita DNA hasil amplifikasi pada laju elektroforesis tertentu dianggap sebagai satu lokus yang homolog, sedangkan pita yang berbeda ukurannya dari satu primer mikrosatelit diasumsikan berasal dari lokus yang berbeda.

Tabel 4.5 Persentase Jumlah Pita Polimorfik DNA

No	Primer	SSR sequence	Jumlah lokus polimorfik	Jumlah lokus monomorfik	Total
1	SMC222C	(CA) ₂₄	5	1	6
2	SMC226C	(CA) ₁₀	10	0	10
3	SMC248C	(TTA) ₆	6	0	6
4	SMC319C	(CA) ₁₇	6	0	6
5	SMC477C	(CA) ₃₁	6	0	6
6	SMC863C	(TC) ₉	11	0	11
Total			44	1	45
Persentase			0.98%	0.02%	100%

menunjukkan kontrol (komponen reaksi PCR tanpa DNA Template).



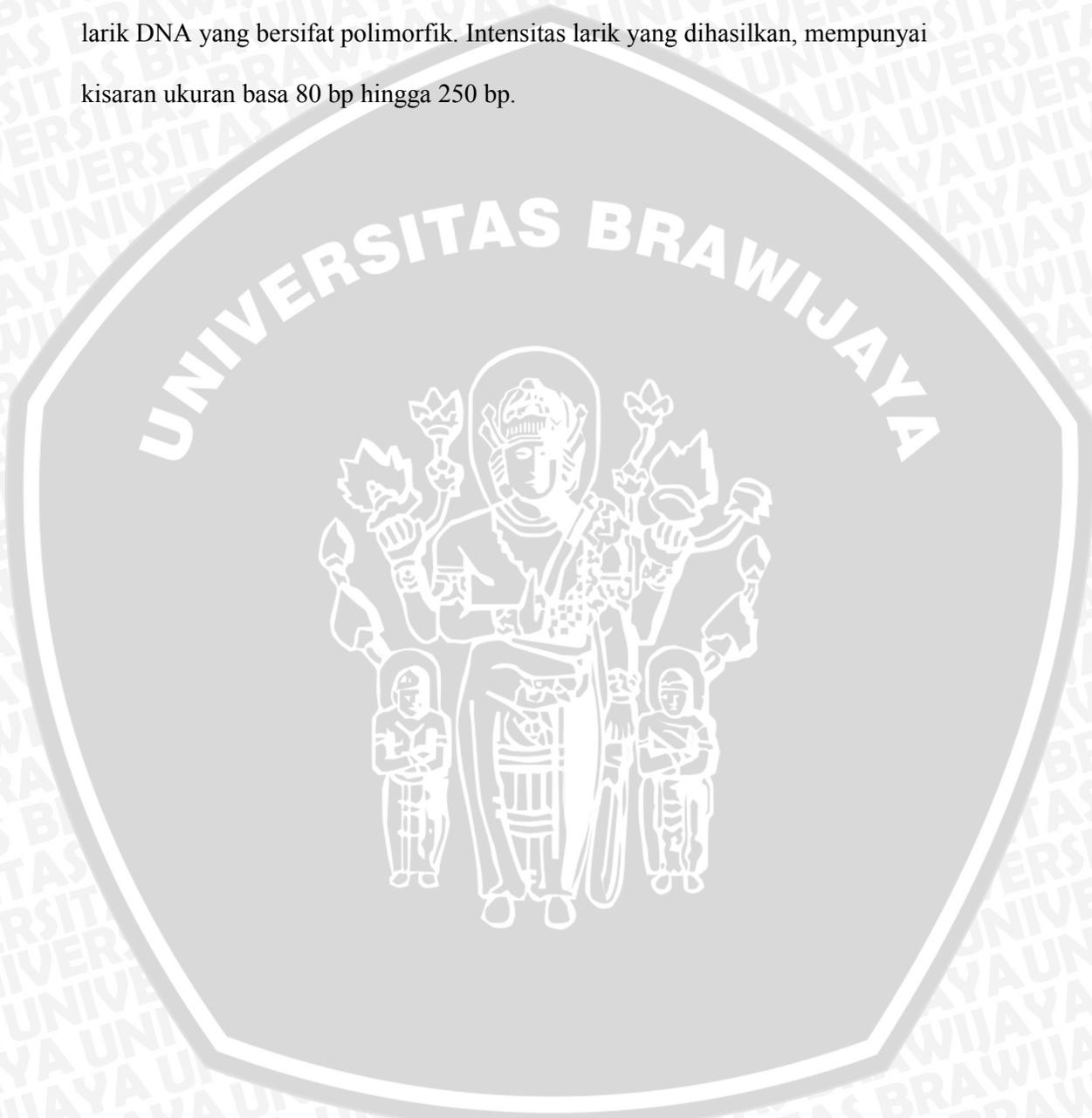


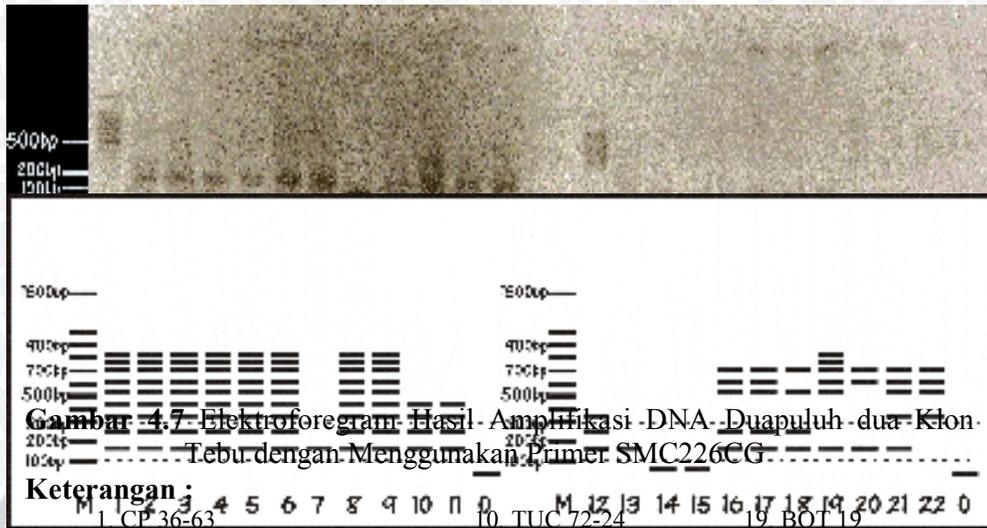
Gambar 4.6 Elektroforegram Hasil Amplifikasi DNA Duapuluh dua Klon Tebu dengan Menggunakan Primer SMC222CG

Keterangan :

- | | | |
|---------------|----------------|------------|
| 1. CP 36-63 | 10. TUC 72-24 | 19. BOT 19 |
| 2. CP 44-107 | 11. NA 56-30 | 20. BOT 57 |
| 3. CP 47-193 | 12. PS 57 | 21. BOT 56 |
| 4. CP 68-1026 | 13. CP 75-1082 | 22. BOT 55 |
| 5. CP 70-1133 | 14. TRITON | |
| 6. CP 74-2005 | 15. VESTA | |
| 7. IS 76-198 | 16. BV 320 | |
| 8. IS 76-200 | 17. JV 2 | |
| 9. BU 772 | 18. ROC 5 | |

Gambar 4.6 di atas menunjukkan bahwa primer ke-1 (SMC222CG) mampu mengamplifikasi DNA 22 klon yang diuji dan mampu menghasilkan 39 larik DNA yang bersifat polimorfik. Intensitas larik yang dihasilkan, mempunyai kisaran ukuran basa 80 bp hingga 250 bp.



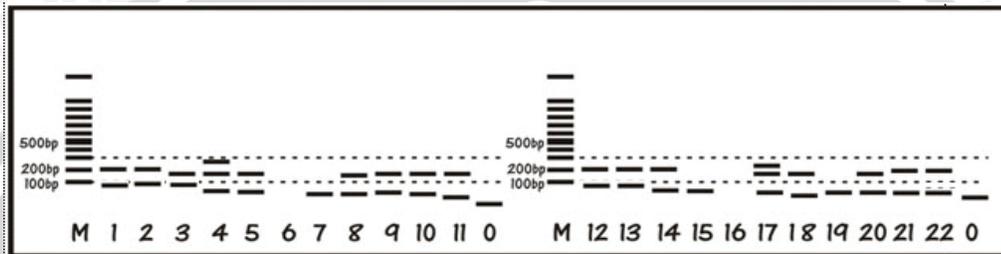
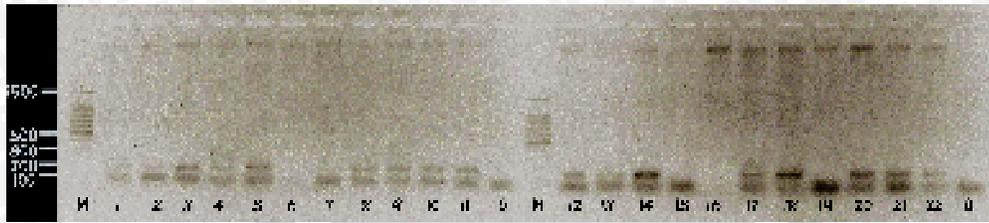


Gambar 4.7 Elektroferegram Hasil Amplifikasi DNA Duapuluh dua Klon Tebu dengan Menggunakan Primer SMC226CG

Keterangan;

- | | | |
|---------------|----------------|------------|
| 1. CP 36-63 | 10. TUC 72-24 | 19. BOT 19 |
| 2. CP 44-107 | 11. NA 56-30 | 20. BOT 57 |
| 3. CP 47-193 | 12. PS 57 | 21. BOT 56 |
| 4. CP 68-1026 | 13. CP 75-1082 | 22. BOT 55 |
| 5. CP 70-1133 | 14. TRITON | |
| 6. CP 74-2005 | 15. VESTA | |
| 7. IS 76-198 | 16. BV 320 | |
| 8. IS 76-200 | 17. JV 2 | |
| 9. BU 77-4 | 18. ROC 5 | |

Dari Gambar 4.7 di atas, diketahui bahwa primer ke-2 (SMC226CG) dapat mengamplifikasi DNA 22 klon klon yang diuji dan mampu menghasilkan 119 larik DNA yang bersifat polimorfik. Intensitas larik yang dihasilkan, mempunyai kisaran ukuran basa 50 bp hingga 850 bp.

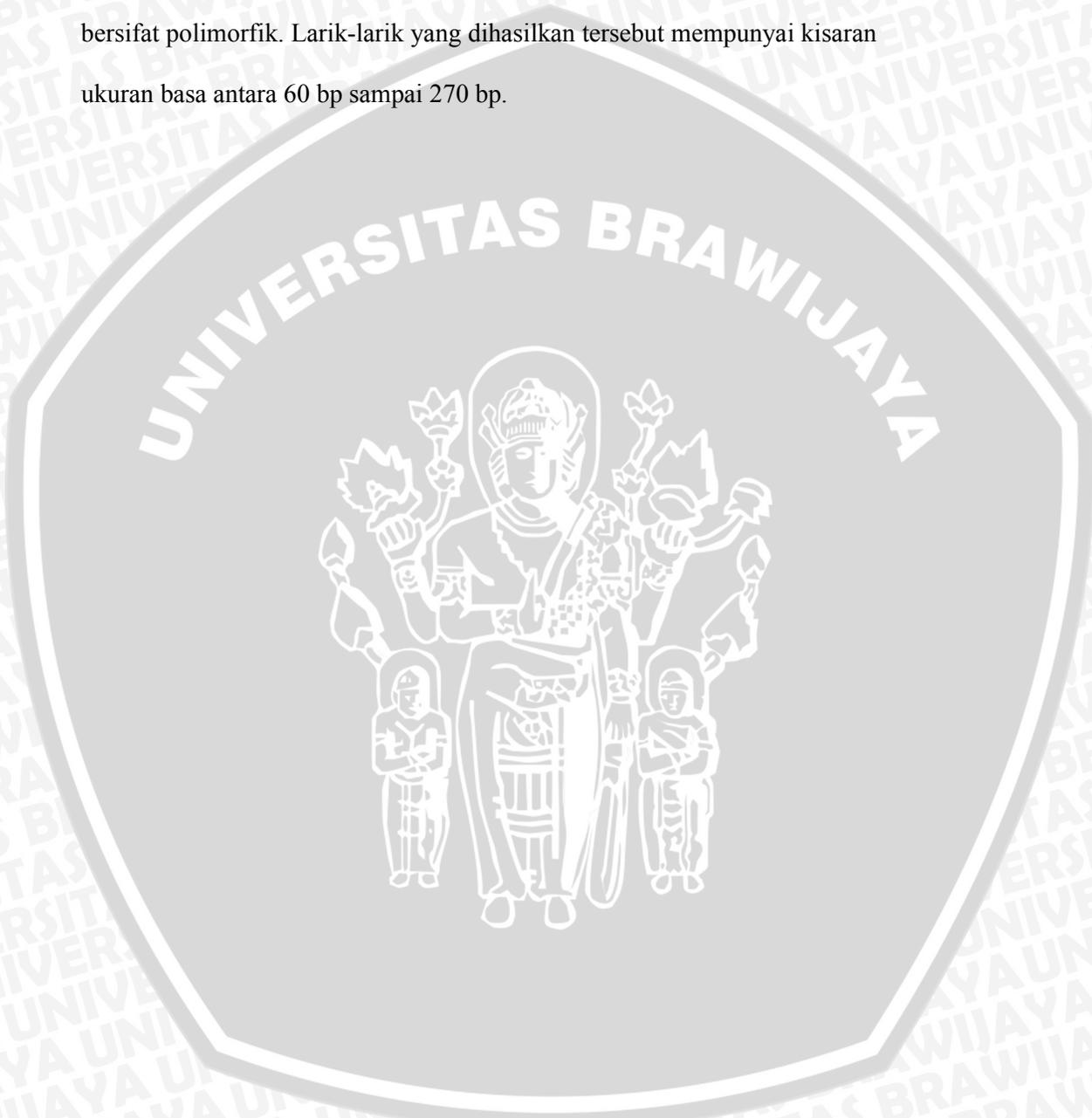


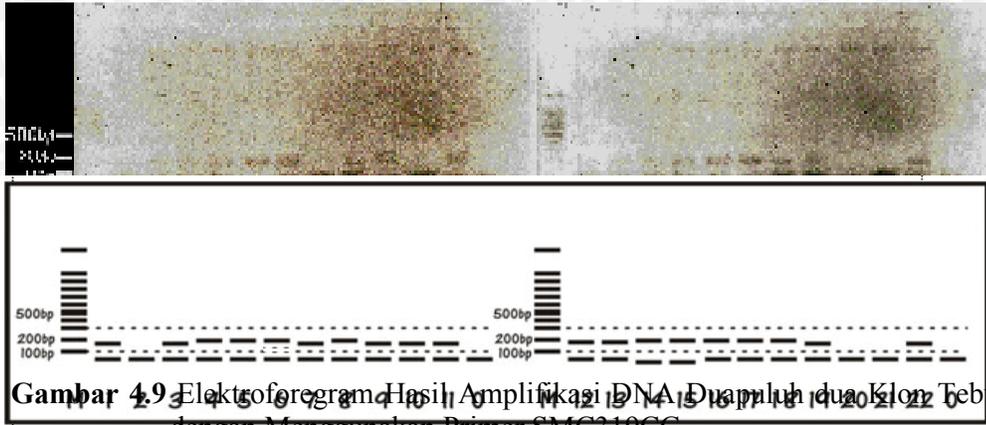
Gambar 4.8 Elektrofogram Hasil Amplifikasi DNA Duapuluh dua Klon Tebu dengan Menggunakan Primer SMC248CG

Keterangan :

- | | | |
|---------------|----------------|------------|
| 1. CP 36-63 | 10. TUC 72-24 | 19. BOT 19 |
| 2. CP 44-107 | 11. NA 56-30 | 20. BOT 57 |
| 3. CP 47-193 | 12. PS 57 | 21. BOT 56 |
| 4. CP 68-1026 | 13. CP 75-1082 | 22. BOT 55 |
| 5. CP 70-1133 | 14. TRITON | |
| 6. CP 74-2005 | 15. VESTA | |
| 7. IS 76-198 | 16. BV 320 | |
| 8. IS 76-200 | 17. JV 2 | |
| 9. BU 772 | 18. ROC 5 | |

Amplifikasi primer ke-3 (SMC248CG) terhadap DNA 22 klon yang diuji berdasarkan Gambar 4.8, menghasilkan larik DNA sebanyak 38 yang kesemuanya bersifat polimorfik. Larik-larik yang dihasilkan tersebut mempunyai kisaran ukuran basa antara 60 bp sampai 270 bp.



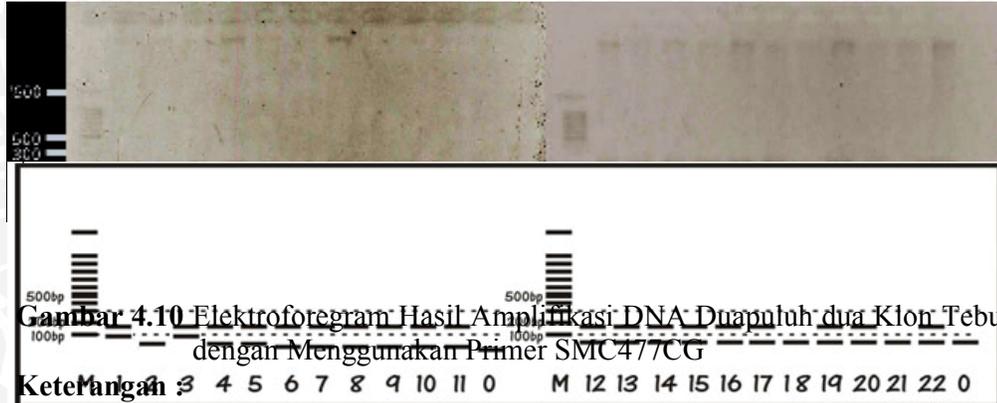


Gambar 4.9 Elektroforegram Hasil Amplifikasi DNA Duapuluh dua Klon Tebu dengan Menggunakan Primer SMC319CG

Keterangan :

- | | | |
|---------------|----------------|------------|
| 1. CP 36-63 | 10. TUC 72-24 | 19. BOT 19 |
| 2. CP 44-107 | 11. NA 56-30 | 20. BOT 57 |
| 3. CP 47-193 | 12. PS 57 | 21. BOT 56 |
| 4. CP 68-1026 | 13. CP 75-1082 | 22. BOT 55 |
| 5. CP 70-1133 | 14. TRITON | |
| 6. CP 74-2005 | 15. VESTA | |
| 7. IS 76-198 | 16. BV 320 | |
| 8. PS 76-200 | 17. IV 2 | |
| 9. BU 772 | 18. ROC 5 | |

Produk PCR yang dihasilkan dari amplifikasi primer ke-4 (SMC319CG) terhadap DNA 22 klon yang diuji (Gambar 4.9) berjumlah 39 larik, dan semuanya bersifat polimorfik. Larik-larik yang dihasilkan tersebut mempunyai ukuran antara 50 bp sampai 200 bp.



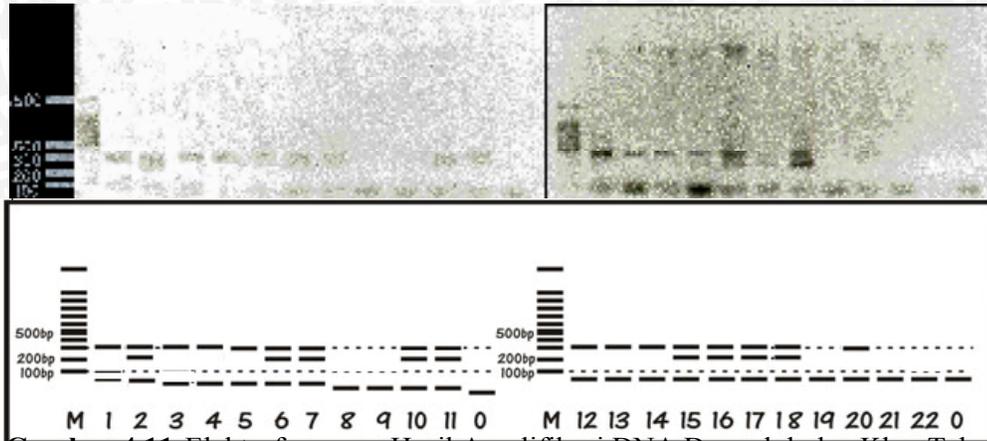
Gambar 4.10 Elektroforegram Hasil Amplifikasi DNA Duplikat Klon Tebu dengan Menggunakan Primer SMC477CG

Keterangan 3 4 5 6 7 8 9 10 11 0 M 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 0

- | | | |
|---------------|----------------|------------|
| 1. CP 36-63 | 10. TUC 72-24 | 19. BOT 19 |
| 2. CP 44-107 | 11. NA 56-30 | 20. BOT 57 |
| 3. CP 47-193 | 12. PS 57 | 21. BOT 56 |
| 4. CP 68-1026 | 13. CP 75-1082 | 22. BOT 55 |
| 5. CP 70-1133 | 14. TRITON | |
| 6. CP 74-2005 | 15. VESTA | |
| 7. IS 76-198 | 16. BY 320 | |
| 8. IS 76-200 | 17. JV 2 | |
| 9. DA 72 | 18. KOF | |

Amplifikasi primer ke-5 (SMC477CG) terhadap DNA 22 klon yang diuji, mampu menghasilkan 37 pita DNA yang bersifat polimorfik. Dan tarik-larik yang telah dihasilkan tersebut mempunyai kisaran ukuran basa antara 60 bp hingga 200bp.





Gambar 4.11 Elektroforegram Hasil Amplifikasi DNA Duapuluh dua Klon Tebu dengan Menggunakan Primer SMC863CG

Keterangan :

- | | | |
|---------------|----------------|------------|
| 1. CP 36-63 | 10. TUC 72-24 | 19. BOT 19 |
| 2. CP 44-107 | 11. NA 56-30 | 20. BOT 57 |
| 3. CP 47-193 | 12. PS 57 | 21. BOT 56 |
| 4. CP 68-1026 | 13. CP 75-1082 | 22. BOT 55 |
| 5. CP 70-1133 | 14. TRITON | |
| 6. CP 74-2005 | 15. VESTA | |
| 7. IS 76-198 | 16. BV 320 | |
| 8. IS 76-200 | 17. JV 2 | |
| 9. BU 772 | 18. ROC 5 | |

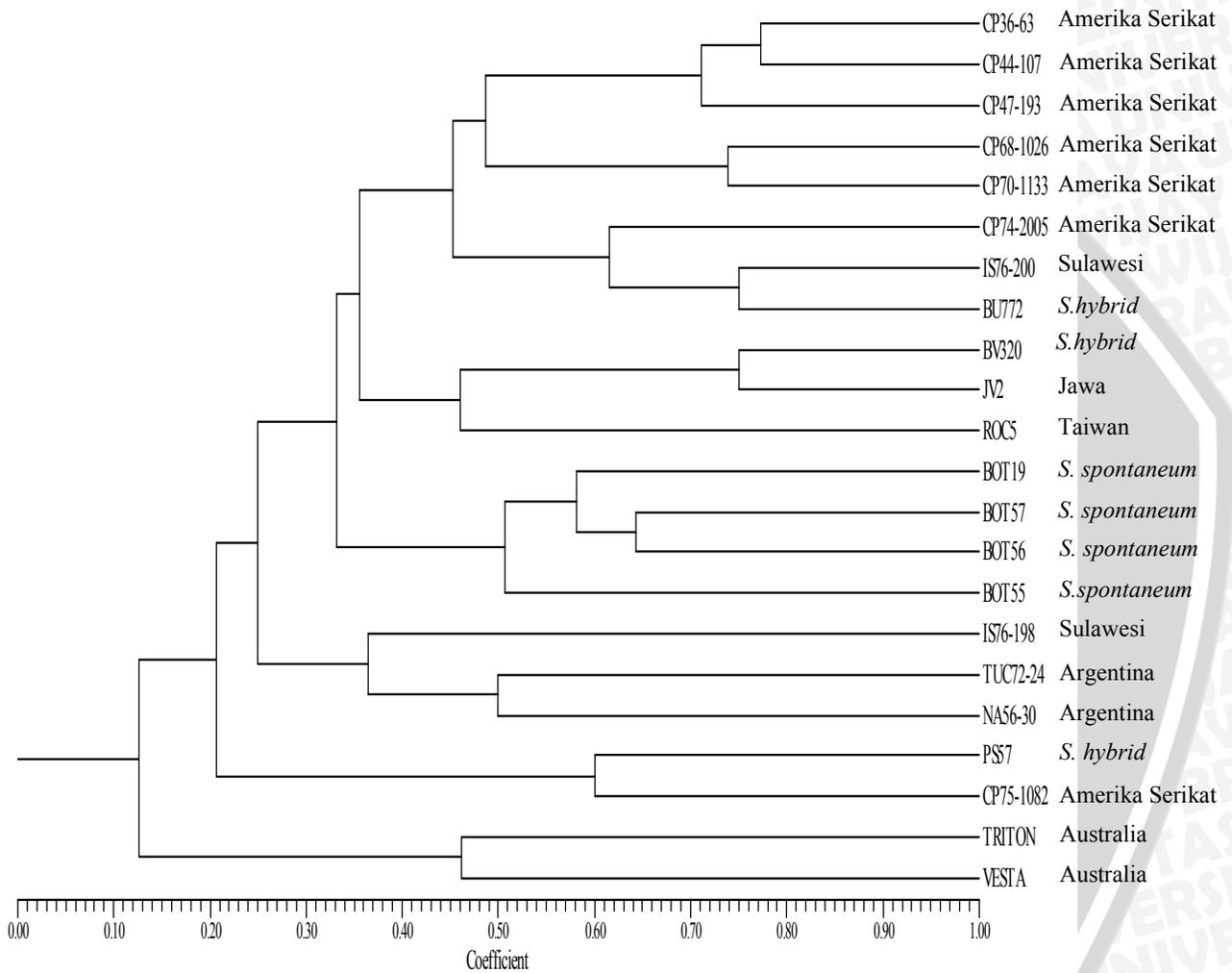
Hasil amplifikasi primer ke-6 (SMC863CG) terhadap DNA 22 klon yang diuji berdasarkan Gambar 4.11 menunjukkan bahwa larik-larik DNA hasil amplifikasi bersifat polimorfik dengan total larik DNA sebanyak 28. Ukuran basa yang larik DNA tersebut berkisar antara 60 bp sampai 430 bp.

4.1.6 Analisis Keragaman Genetik dari 22 Klon

Analisis keragaman genetik pada penelitian ini didasarkan pada hasil perhitungan koefisien kesamaan genetik Jaccard menurut Sneath dan Sokal (1997 dalam Cordeiro *et. al.*, 2003), bisa dilihat pada Tabel 4.6.

Dendogram pada gambar 4.12 dikonstruksi berdasarkan koefisien kesamaan genetik Jaccard, yang sebelumnya dilakukan pengelompokan dengan metode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Aritmatic mean*). Kriteria pengelompokan didasarkan pada ukuran kemiripan yang berupa kesamaan genetik (*genetic similarity*). Analisis kelompok merupakan salah satu metode untuk mengelompokkan individu-individu atau suatu populasi ke dalam beberapa

kelompok sehingga individu-individu dalam kelompok yang satu lebih homogen dibandingkan dengan individu-individu dalam kelompok lain (Hartati, 2007).



Gambar 4.12. Dendrogram Hubungan Genetik Duapuluh Dua Klon yang diuji dengan Menggunakan Primer Gabungan (SMC222CG, SMC226CG, SMC248CG, SMC319CG, SMC477CG, dan SMC863CG)

Hasil dendrogram (Gambar 4.12) menunjukkan bahwa 22 klon yang diujikan (18 klon tetua persilangan koleksi P3GI dan 4 outgroup dari tebu jenis *Saccharum spontaneum*) terbagi dalam dua kelompok besar pada nilai kesamaan genetik (*genetic similarity*) sebesar 0,12. Kelompok pertama terdiri dari klon-klon

tebu introduksi dari Amerika Serikat, Taiwan, Argentina, klon hasil ekspedisi asal Jawa dan Sulawesi dan beberapa klon tebu jenis *S. hybrid*, yang merupakan klon hasil persilangan P3GI (BU772, BV320, dan PS57).

Kelompok pertama terbagi menjadi 4 kelompok kecil (sub kelompok). Sub kelompok pertama terdiri dari populasi klon introduksi asal Amerika Serikat, klon introduksi asal Taiwan, klon hasil ekspedisi asal Sulawesi, klon hasil ekspedisi asal Jawa dan klon hasil persilangan P3GI (BU772 hasil persilangan tahun 1980 dan BV320 yang merupakan hasil persilangan tahun 1981). Sub kelompok kedua terdiri dari klon yang termasuk kedalam *outgroup* penelitian, yaitu klon-klon dari spesies *S.spontaneum*. Sub kelompok ketiga terdiri dari klon-klon introduksi asal Argentina dan klon hasil ekspedisi asal Sulawesi IS76-198 yang tergolong kedalam spesies *S.officinarum*. Sub kelompok terakhir terdiri dari populasi klon CP75-1082 yang merupakan klon introduksi asal Amerika Serikat dan klon PS57 yang tergolong kedalam spesies *S.hybrid*. Kelompok pertama ini mempunyai tingkat keragaman genetik yang tinggi dengan nilai kesamaan genetik sebesar 0,21.

Kelompok kedua terdiri dari klon-klon tebu introduksi yang berasal dari Australia dan memiliki kesamaan genetik sebesar 0,46.

4.1.7 Analisis Hubungan Kekerabatan Antar Klon

Hubungan kekerabatan antar klon yang diuji menunjukkan seberapa dekat hubungan kekerabatan masing-masing klon yang diujikan dalam kisaran kesamaan genetik 0 sampai dengan 1, seperti yang tertera pada tabel 4.6 dibawah ini.

Tabel 4.6. Hubungan kekerabatan Duapuluh Dua Klon yang diuji

KLON	CP36-63	CP44-107	CP47-193	CP68-1026	CP70-1133	CP74-2005	IS76-198	IS76-200	BU772	TUC72-24	NA56-30	PS 57	CP 75-1082	TRITON	VESTA	BV 320	JV 2	ROC 5	BOT 19	BOT 57	BOT 56	BOT 55	
CP36-63	1																						
CP44-107	0.773	1																					
CP47-193	0.727	0.696	1																				
CP68-1026	0.538	0.519	0.600	1																			
CP70-1133	0.407	0.393	0.462	0.739	1																		
CP74-2005	0.480	0.462	0.480	0.500	0.542	1																	
IS76-198	0.120	0.160	0.167	0.154	0.157	0.421	1																
IS76-200	0.440	0.423	0.440	0.407	0.440	0.667	0.300	1															
BU772	0.423	0.407	0.423	0.444	0.480	0.565	0.227	0.750	1														
TUC72-24	0.280	0.269	0.280	0.259	0.185	0.348	0.375	0.500	0.409	1													
NA56-30	0.222	0.214	0.222	0.207	0.269	0.391	0.353	0.409	0.455	0.500	1												
PS 57	0.391	0.375	0.280	0.360	0.280	0.240	0.158	0.200	0.192	0.238	0.227	1											
CP 75-1082	0.304	0.240	0.250	0.185	0.111	0.115	0.176	0.120	0.115	0.143	0.136	0.600	1										
TRITON	0.115	0.154	0.115	0.107	0.074	0.077	0.056	0.080	0.077	0.045	0.043	0.211	0.235	1									
VESTA	0.120	0.115	0.077	0.111	0.120	0.080	0.059	0.083	0.080	0.048	0.095	0.158	0.176	0.462	1								
BV320	0.409	0.333	0.292	0.320	0.409	0.500	0.235	0.450	0.364	0.190	0.300	0.250	0.150	0.100	0.235	1							
JV 2	0.400	0.333	0.250	0.370	0.400	0.417	0.190	0.375	0.360	0.160	0.250	0.261	0.174	0.182	0.250	0.750	1						
ROC 5	0.391	0.435	0.280	0.308	0.231	0.292	0.222	0.364	0.240	0.300	0.174	0.300	0.200	0.211	0.158	0.471	0.450	1					
BOT 19	0.391	0.375	0.333	0.360	0.333	0.409	0.222	0.429	0.550	0.238	0.227	0.130	0.143	0.095	0.158	0.389	0.381	0.300	1				
BOT 57	0.250	0.240	0.200	0.280	0.250	0.261	0.250	0.273	0.318	0.263	0.190	0.200	0.222	0.105	0.250	0.353	0.350	0.263	0.600	1			
BOT 56	0.348	0.333	0.292	0.375	0.348	0.364	0.235	0.381	0.429	0.250	0.238	0.190	0.150	0.100	0.167	0.412	0.400	0.316	0.563	0.643	1		
BOT 55	0.250	0.240	0.250	0.333	0.304	0.318	0.111	0.333	0.318	0.200	0.136	0.143	0.100	0.167	0.176	0.353	0.350	0.263	0.412	0.412	0.643	1	

KETERANGAN

Klon berkerabat dekat, dengan kesamaan genetik > 50%

Klon yang berkerabat jauh, dengan kesamaan genetik < 40%

Berdasarkan data pada Tabel 4.6 diatas, didapatkan hubungan kekerabatan antar klon yang bervariasi dengan kisaran dari yang terendah dengan nilai kesamaan genetik sebesar 0.043 (Triton dengan NA56-30) dan yang tertinggi dengan nilai kesamaan genetik sebesar 0.773 (CP36-63 dengan CP44-107).

Sebagian besar klon diatas berkerabat jauh, dengan nilai kesamaan genetik kurang dari 40% (dapat dilihat pada Tabel 4.6). Namun ada pula klon-klon yang berkerabat dekat dengan nilai kesamaan genetik lebih dari 50 % yaitu klon CP36-63 dengan CP44-107, CP36-63 dengan CP47-193, CP 44-107 dengan CP47-193, CP 47-193 dengan CP 68-1026, CP 68-1026 dengan CP70-1133, CP74-2005 dengan IS76-200, CP74-2005 dengan BU772, IS76-200 dengan BU772, PS 57 dengan CP 75-1082, BV 320 dengan JV2, BOT 19 dengan BOT 57, BOT 19 dengan BOT 56, BOT 57 dengan BOT 56, BOT 55 dengan BOT 56 .



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Metode DNA KIT Nucleospin, Macherey-Nagel dipilih sebagai metode baku isolasi DNA pada penelitian ini karena metode ini memiliki hasil yang bagus bila dibandingkan dengan keenam metode isolasi DNA yang diujikan..
2. Analisis kesamaan genetik Jaccard berdasarkan penanda molekuler mikrosatelit didapatkan bahwa dua puluh dua klon tebu tetua persilangan koleksi P3GI mempunyai keragaman genetik yang tinggi sehingga bagus untuk dijadikan sebagai tetua persilangan.
3. Hasil dendogram yang diperoleh dari enam primer mikrosatelit gabungan menggunakan kesamaan genetik Jaccard menunjukkan bahwa dua puluh dua klon tetua persilangan koleksi P3GI dikelompokkan dalam dua kelompok besar pada tingkat kesamaan genetik 0,12(12%).
4. Berdasarkan hubungan kekerabatan yang ditunjukkan oleh dendogram, klon-klon tebu sebagian besar mengelompok berdasarkan daerah asalnya. Kelompok pertama terdiri dari klon-klon tebu introduksi dari Amerika Serikat, Taiwan, Argentina, klon hasil ekspedisi dari Pulau Jawa dan Sulawesi dan beberapa klon tebu hasil persilangan yang telah dilakukan oleh P3GI, yakni klon PS57, BU772 hasil persilangan tahun 1980 dan BV320 hasil persilangan tahun 1981. Sedangkan kelompok kedua terdiri dari klon-klon introduksi asal Australia.
5. Untuk kegiatan pemuliaan selanjutnya, hendaknya dipilih tetua yang berkerabat jauh dengan tingkat kesamaan genetik dibawah 0,6 misalnya TRITON dengan NA56-30, VESTA dengan TUC72-24, TRITON dengan TUC72-24, dan menghindari persilangan antar klon yang berkerabat dekat, yakni klon CP36-63 dengan CP44-107, CP36-63 dengan CP47-193, CP68-1026 dengan CP70-1133, BV320 dengan JV2

5.2 Saran

Penambahan jumlah primer pada penelitian selanjutnya akan lebih menambah keakuratan data guna melengkapi *database* koleksi plasma nutfah tebu sehingga bermanfaat untuk proses pemuliaan selanjutnya.



DAFTAR PUSTAKA

Adisewojo, R. Sodo. 1983. Bercocok Tanam Tebu (*Saccharum officinarum*), Sumur Bandung, Bandung.

Acquaah, G. 1992. *Practical protein electrophoresis for genetic research*. Dioscorides Press. Portland, Oregon.

Anonimous. 2007 . Genomic DNA Isolation in Laboratory Protocol : CIMMYT Applied Molecular Genetic Laboratory. Third Edition Mexico. <http://www.cimmyt.org/ambionet>. (Diakses Tanggal 25 Januari 2007)

_____. 2007a. Polymerase Chain Reaction. http://en.wikipedia.org/wiki/Polymorphic_chainreaction. (Diakses Tanggal 1 Februari 2007)

_____. 2007b. Amplifikasi Acak Polimorfisme DNA. http://id.wikipedia.org/wiki/Amplifikasi_Acak_Polimorfisme_DNA. (Diakses Tanggal 25 Januari 2007)

_____. 2007c. Penanda Genetik. http://id.wikipedia.org/wiki/Penanda_genetik. (Diakses Tanggal 25 Januari 2007)

_____. 2007d . *POLYMERASE CHAIN REACTION*. http://id.wikipedia.org/wiki/Polymerase_Chain_Reaction. (Diakses Tanggal 25 Januari 2007)

_____. 2007e . Polimorfisme panjang fragmen restriksi. http://id.wikipedia.org/wiki/Polimorfisme_panjang_fragmen_restriksi. (Diakses Tanggal 1 Februari 2007)

_____. 2007f. Reaksi Berantai Polimerase. http://id.wikipedia.org/wiki/Reaksi_berantai_polimerase. (Diakses Tanggal 25 Januari 2007).

_____. 2009. Hubungan_sedarah. http://id.wikipedia.org/wiki/Hubungan_sedarah. (Diakses Tanggal 23 Februari 2009)

Asano. T, T. Tsudzuki, S. Takahashi, H. Shimada, and K. Kadowaki. 2004. Complete Nucleotide Sequence of the Sugarcane (*Saccharum Officinarum*) Chloroplast Genome: A Comparative Analysis of Four Monocot Chloroplast Genomes. National Institute of Agrobiological Sciences. Japan.

Asisn, M.J., R. Herrero, and L. Navarro. 1995. Faktor affecting *Citrus* tree isozyme-gene expression. *Theor. Appl. Genet.* 90: 892-898.

- Azrai, M. 2005. Pemanfaatan Markah Molekuler dalam Proses Seleksi Pemuliaan Tanaman. *Jurnal AgroBiogen*. 1(1):26-37
- Cordeiro, M. Giovanni, Yong-Bao Pan, and Robert J. Henry, 2003. Sugarcane Microsatellites for the Assessment of Genetic Diversity in Sugarcane Germplasm. *Plant science* 165: 181-189
- Darmodjo, S. 1970. Himpunan Diktat Kursus Tanaman. BP3G. Pasuruan.
- Demeke, T. and R.P. Adams. 1994. The use of PCR-RAPD analysis in plant taxonomy and evolution. P. 179-191. *In* H.G. Griffin and A.M. Griffin (Ed.) *PCR Technology Current Innovations*. CRC Press, Inc. London.
- Garcia, A. A. F and L. B. Luciana. 2004. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR marker for Diversity Studies in Tropical Maize Inbred Lines. *Genet. Mol. Biol.* 27(4).
- Heinz, D. J. 1987. *Sugarcane Improvement Through Breeding*. Elsevier Science Publishing Company Inc. New York.
- Indriani¹, F. C. , L. Soetopo , Sudjindro , dan A. N. Sugiharto. 2002. Keragaman Genetik Plasma Nutfah Kenaf (*hibiscus cannabinus* L.) dan Beberapa Species Yang Sekerabat Berdasarkan Analisis Isozim. *Biosain*, II(1), April.
- Kusumawaty. D., 1999. Studi Keanekaragaman Genetik Kultivar Tomat (*Lycopersicon lycopersicum* L.) dengan menggunakan metode “ Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD). Jurusan Biologi. ITB. Bandung
- Kumaunang, J., I. Maskromo dan E. Manaroinsong. 2006. Evaluasi Keragaman Genetik Plasma Nutfah Kelapa Genjah di Kebun Percobaan MAPANGET berdasarkan penanda DNA SSRs (Simple Sequence Repeats). *Jurnal Littri* 12(3):116-120.
- Lagercrantz, U., Ellergren, H. and L. Anderson. 1993. The Abundance of Various Polimorphic Microsatellite Motif Differ Between Plants and Vertebrate. *Nucleic Acids Res.* 21(5): 1111-1115
- Lamadji, S. 1998. Pemberdayaan Sifat Morfologi untuk Analisis Kekerabatan Plasma Nutfah Tebu. *Bulletin P3GI* 148:17-31
- Lamadji, S., M. Bustamam, K.A. Wahyudi, dan N.K Rustini. 1999. Rekayasa Penanda Molekuler Plasma Nutfah Tebu *Saccharum officinarum* dan *Saccharum spontaneum* L. P3GI. Pasuruan.

- Liu, B. H. 1998. *Statistic Genomic, Linkage, Mapping, and QTL Analisis*. CRC Press. LLC. USA.
- Mburu, D. and O. Hanotte. 2005. *A Practical Approach to Microsatellite Genotyping With Special Reference to Livestock Population Genetics*. ILRI. Nairobi, Kenya.
- Nasir, M. 2002. *Biologi Molekuler Teknik Rekayasa Genetik Tanaman*. PT Cita Adidaya Bakti. Bandung.p: 113 & 115
- Pabendon, M.B. 2004. Deteksi Tingkat Heterosigositas dan Variasi Alil 73 Genotip Jagung Melalui Marka SSRs (*Simple Sequence Repeats*). *Zuriat* 15(1):1-13
- Panaud, O., X. Chen, and S.R. McCouch. 1996. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet.* 252:597-607.
- Pierce, L. C. and J. L. Brewbaker. (1973) Application of isozyme analysis in horticultural science. *HortSci.* 8(1): 17- 22.
- Plaschke, J., M. W. Ganal, M. S. Roder. 1995. Detection of Genetic Diversity in Closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 91:1001-1007.
- Prasetyono .J dan Tasliah, 2004. Marka Mikrosatelit: Marka Molekuler yang Menjanjikan. www.indobiogen.or.id/terbitan/agrobio/abstrak/agrobio_vol6_no2_2004_41-47.html (Diakses Tanggal 25 Januari 2007)
- Prana, T. K. dan N. S. Hartati 2003. Identifikasi Sidik Jari DNA Talas (*Colocusia esculenta* Schoot) Indonesia dengan teknik RAPD (Random Aplified Polymorphic DNA): Skrining Primer dan Optimalisasi Kondisi PCR. *Natur Indonesia* 5(2):107-112
- Powell, W., G.C. Macharay, and J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1:215-222
- Sambrook, J: E. F. Fritisch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sanghai-Marooof. M. A., K. Soliman, R.A. Jorgensen and R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA Spacelenght Polymorfism in Barley: Mendelian Inheritance, chromosomal location and polation dynamics. *PNAS* 81:8014-8018

- Sastrowijono, S. 1998a. Morfologi Tanaman Tebu. *Gula Indonesia* XXIII(2), April-Juni.
- _____, S. 1998b. Daun Tebu (*Saccharum officinarum*). *Gula Indonesia* XXIII(4), Oktober-Desember.
- _____, S. 1993. Penamaan Varietas Tebu di Indonesia. *Gula Indonesia* XVIII(3), September
- Schuler M.A. and R.E. Zielinski, 1989. *Methods in Plant Molecular Biology*. Academic Press.Inc. USA. Pp1-38.
- Setiawan, A., G. Koch., S.R. Barnes, and C. Jung. 2000. Mapping quantitative trait loci (QTLs) for resistance to *Cercospora* leaf spot disease (*Cercospora beticola* sacc.) in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100:1176-1182.
- Singh, R.K., P. Singh, S.P. Singh, T. Mohapatra and S.B. Singh. 2006. *Molecular Diversity Among Saccharum Species and Elite Sugarcane Varieties based on RAPD and AFLP Marker*. Indian Agriculture Institute. New Delhi. India.
- Smith, O.S., Smith, J.S.C., Bowen, S.L., Tenborg, R.A., Wall, S.J. 1990. Similarity among group of elite maize inbred as measured by pedigree, F1 grain Yield, heterosis, and RFLP. *Theor. Appl. Genet.* 80: 833-840.
- Tjitrosoepomo, G. 1998. *Taksonomi Umum (Dasar-dasar Taksonomi Tumbuhan)*. UGM Press. Yogyakarta.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Vd. Lee, M. Horne, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23:4407-4414.
- Weeden, N.F. and J.F. Wendel. 1989. Genetic and Plant Isozymes In *Isozymes in plant Biology* (Eds D. E. Soltis and P.S. Soltis), pp. 46 – 72. Diocorides Press. Portland, Oregon
- Widyasari, W. B. 2004. Mengenal Lebih Dekat Mikrosatelit. XXVIII(1), Maret.
- Witono, J. R., and K. Kondo. 2006. Genetic Analysis of Some Species of *Pinanga* (PALMAE) by Using ISSR Markers. *Berita Biologi* VIII(1), April.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Protokol Pembuatan Larutan

1. Buffer Stock
 - a) 1 M Trisma pH 7,5 (10 ml) : Timbang Trisma base sebanyak 1,21 gr, kemudian masukkan ke dalam gelas ukur dan tambahkan H₂O sebanyak 5 ml. stirrer sampai larut, ukur pH sampai menunjukkan angka 7,5. Untuk meningkatkan pH tambahkan NaOH dan untuk menurunkan tambahkan HCl. Selanjutnya tambahkan H₂O sampai volume 10 ml. simpan dalam botol kemudian sterilisasi dengan autoclave dan simpan pada suhu 4°C.
 - b) 0,5 M EDTA (30 ml) pH 8 : Timbang 5,583 gr EDTA, tambahkan H₂O sebanyak 21 ml, larutkan dengan stirrer. Timbang 4 gr NaOH dan tambahkan 10 ml H₂O, larutkan. Tambahkan larutan NaOH sebanyak 9 ml ke dalam larutan EDTA yang sebelumnya telah dibuat. Sterilisasi dengan autoclave dan simpan pada suhu ruang.
 - c) 5 M NaCl (10 ml) : Timbang 2,922 gram NaCl, tambahkan H₂O sebanyak 10 ml. Masukkan tabung ukur dan kemudian stirrer untuk melarutkan, kemudian simpan dalam botol dan sterilisasi dengan autoclave, larutan disimpan pada suhu 4°C .
2. Chlorofom : Isoamylalcohol (50 ml)
Ambil 48 ml Chloroform dan 2 ml Isoamylalcohol dalam ruang asam, masukkan dalam botol dan tutup rapat. Simpan dalam suhu ruang.
3. Larutan Wash 1 (100 ml)
Ambil 76 ml EtOH absolute, 8 ml NaOAC 2,5 M dan 16 ml H₂O, masukkan dalam botol dan simpan dalam suhu -20°C sampai digunakan.
4. Larutan Wash 2 (100ml)
Ambil 76 ml EtOH absolute, 1 ml NH₄OAC 1 M dan 23 ml H₂O, masukkan dalam botol dan simpan dalam suhu -20°C sampai digunakan.
5. Buffer TE (2 ml)
Ambil 20 µl 1 M Tris pH 7,5; 4 µl 0,5 M EDTA pH 8 dan 1976 µl H₂O steril, masukkan dalam eppendorf steril. Simpan larutan dalam suhu -20°C sampai digunakan.
6. Larutan TAE 10 X (250 ml)
Timbang 12,1 gr Tris base, tambahkan 5 ml 0,5 M EDTA pH 8, tambahkan 2,85 ml Glacial Acetic Acid dan H₂O sampai volume 250 ml. homogenkan dengan stirrer sampai larut. Simpan larutan pada suhu ruang.

Lampiran 2. Daftar Alat Yang digunakan dalam penelitian

No.	Nama Alat	Fungsi
1.	Ultrasonic Cleaner (BRANSON 1200)	Untuk sterilisasi alat-alat yang kecil (sebelum autoclave)
2.	Autoclave	Untuk sterilisasi alat
3.	Mesin PCR (PERKIN ELMER Gene Amp PCR System 2400)	Untuk amplifikasi DNA
4.	Tabung Nitrogen	Untuk menyimpan Nitrogen cair
5.	Vortex	Untuk menghomogenkan larutan
6.	Mikropipet dan Tip	Untuk mengambil sampel/bahan-bahan cair (larutan) dalam jumlah kecil dan tertentu
7.	Tube (Eppendorf)	Tempat menyimpan sampel DNA dan bahan-bahan lain
8.	Waterbath	Sterilisasi bahan
9.	Mesin Centrifuge (HERMLE z233 MK-2)	Memisahkan komponen-komponen yang terdapat dalam larutan pada proses ekstraksi DNA
10.	Timbangan Analitik	Menimbang bahan-bahan yang diperlukan
11.	Mesin Spektrofotometer	Mengukur kuantitas DNA yang diuji
12.	Electrophoresis chanber	Untuk visualisasi DNA hasil ekstraksi dan amplifikasi PCR
13.	Microwave	Memanaskan larutan agarose
14.	Flash (Denver Instrument)	Menghomogenkan larutan dan mengendapkan kotoran-kotoran yang tercampur dalam DNA
15.	Lemari Es	Menyimpan sampel DNA dan bahan-bahan yang digunakan
16.	Distiled water	Sterilisasi H ₂ O
17.	UV Transluminator	Melihat visualisasi kualitas DNA
18.	Foto Polaroid	Mendokumentasikan (menyimpan data berupa gambar) kualitas DNA dan pita-pita DNA hasil amplifikasi dengan PCR

Lampiran3. Data matrik Duapuluh Dua Klon Tetua Persilangan Koleksi P3GI

Tabel 1. Data matrik Duapuluh Dua Klon Tetua Persilangan Koleksi P3GI dengan Menggunakan Primer SMC222CG

No.	Klon	Ukuran Pita					
		80	200	210	220	240	250
1	CP 36-63	1	0	1	0	0	0
2	CP 44-107	1	1	0	0	0	0
3	CP 47-193	1	1	0	0	0	0
4	CP 68-1026	1	0	1	0	0	1
5	CP 70-1133	1	0	1	0	0	1
6	CP 74-2005	1	0	1	0	0	0
7	IS 76-198	1	0	0	0	0	0
8	IS 76-200	1	0	0	0	0	0
9	BU 772	1	0	0	0	1	0
10	TUC 72-24	1	0	0	0	0	0
11	NA 56-30	1	0	0	0	0	0
12	PS 57	1	0	1	0	0	0
13	CP 75-1082	1	0	0	1	0	0
14	TRITON	1	1	0	0	0	0
15	VESTA	1	0	0	0	0	0
16	BV 320	1	0	1	0	0	0
17	JV 2	1	0	1	0	0	0
18	ROC 5	1	0	0	0	0	0
19	BOT 19	1	0	0	0	0	0
20	BOT 57	1	0	0	0	0	1
21	BOT 56	1	0	0	0	0	1
22	BOT 55	1	0	0	0	0	1

Tabel 2. Data matrik Duapuluh Dua Klon Tetua Persilangan Koleksi P3GI dengan Menggunakan Primer SMC226CG

No.	Klon	Ukuran Pita									
		50	150	250	350	450	550	600	700	750	850
1	CP 36-63	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	CP 44-107	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	CP 47-193	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	CP 68-1026	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	CP 70-1133	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	CP 74-2005	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	IS 76-198	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
8	IS 76-200	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	BU 772	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	TUC 72-24	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
11	NA 56-30	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
12	PS 57	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
13	CP 75-1082	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
14	TRITON	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	VESTA	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	BV 320	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0
17	JV 2	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0
18	ROC 5	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0
19	BOT 19	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
20	BOT 57	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
21	BOT 56	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0
22	BOT 55	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0

Tabel 3. Data matrik Duapuluh Dua Klon Tetua Persilangan Koleksi P3GI dengan Menggunakan Primer SMC248CG

No.	Klon	Ukuran Pita									
		60	70	80	100	160	170	180	200	210	270
1	CP 36-63	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
2	CP 44-107	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
3	CP 47-193	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
4	CP 68-1026	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
5	CP 70-1133	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
6	CP 74-2005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	IS 76-198	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
8	IS 76-200	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
9	BU 772	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
10	TUC 72-24	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
11	NA 56-30	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
12	PS 57	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
13	CP 75-1082	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
14	TRITON	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
15	VESTA	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
16	BV 320	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	JV 2	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1
18	ROC 5	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
19	BOT 19	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
20	BOT 57	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
21	BOT 56	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
22	BOT 55	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0

Tabel 4. Data matrik Duapuluh Dua Klon Tetua Persilangan Koleksi P3GI dengan Menggunakan Primer, SMC319CG

No.	Klon	Ukuran Pita					
		50	60	170	180	190	200
1	CP 36-63	0	1	1	0	0	0
2	CP 44-107	0	1	1	0	0	0
3	CP 47-193	0	1	1	0	0	0
4	CP 68-1026	0	1	0	1	0	0
5	CP 70-1133	0	0	0	1	0	0
6	CP 74-2005	0	1	0	0	1	0
7	IS 76-198	0	1	0	0	0	0
8	IS 76-200	0	1	0	0	1	0
9	BU 772	0	1	0	0	0	1
10	TUC 72-24	0	1	0	0	0	0
11	NA 56-30	0	1	0	0	0	1
12	PS 57	0	1	0	1	0	0
13	CP 75-1082	0	1	0	1	0	0
14	TRITON	1	0	0	0	1	0
15	VESTA	1	0	0	0	1	0
16	BV 320	0	1	0	0	1	0
17	JV 2	0	1	0	0	1	0
18	ROC 5	0	1	0	0	1	0
19	BOT 19	0	1	0	0	0	1
20	BOT 57	0	1	0	0	0	0
21	BOT 56	0	1	0	0	0	0
22	BOT 55	0	1	0	0	1	0

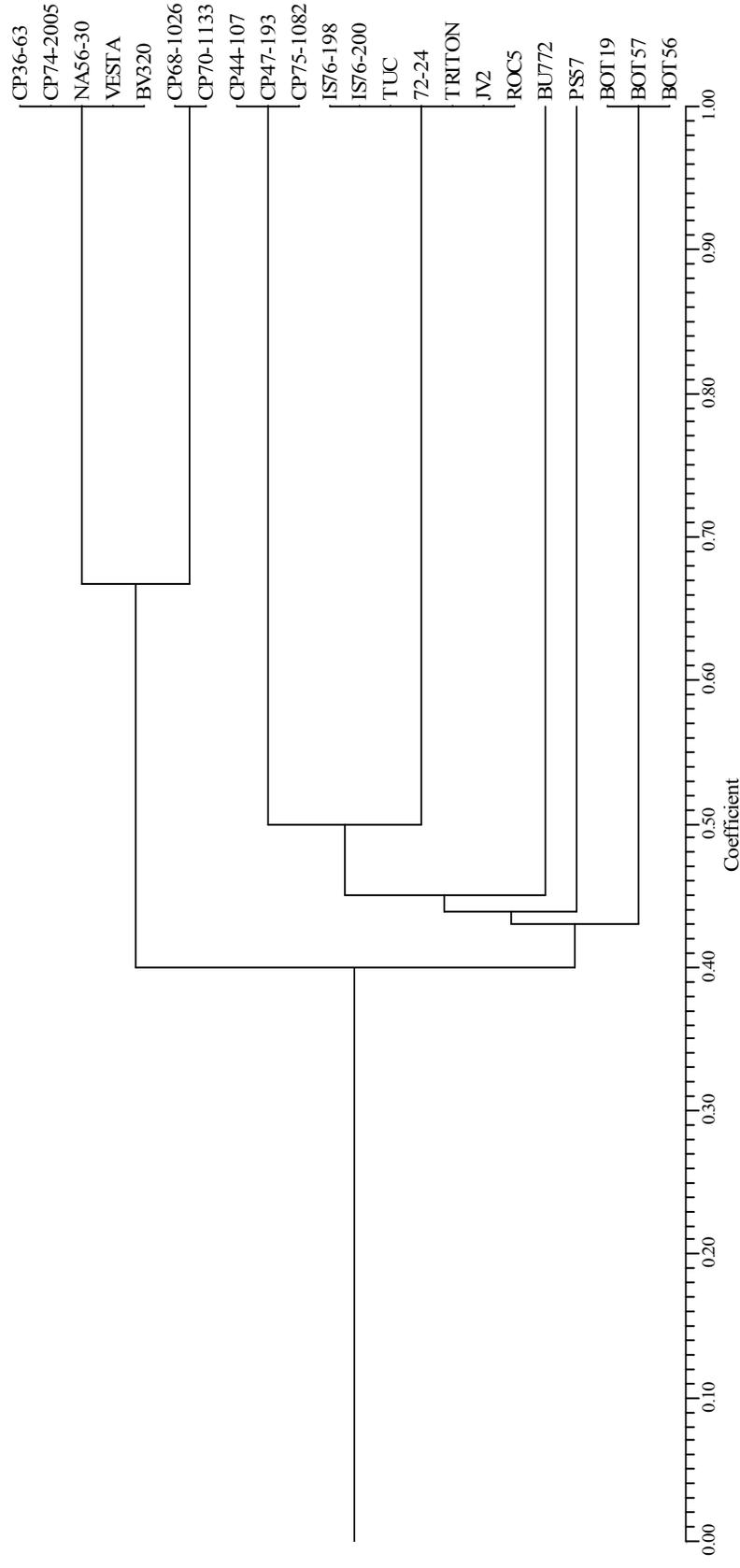
Tabel 5. Data matrik Duapuluh Dua Klon Tetua Persilangan Koleksi P3GI dengan Menggunakan Primer SMC477CG

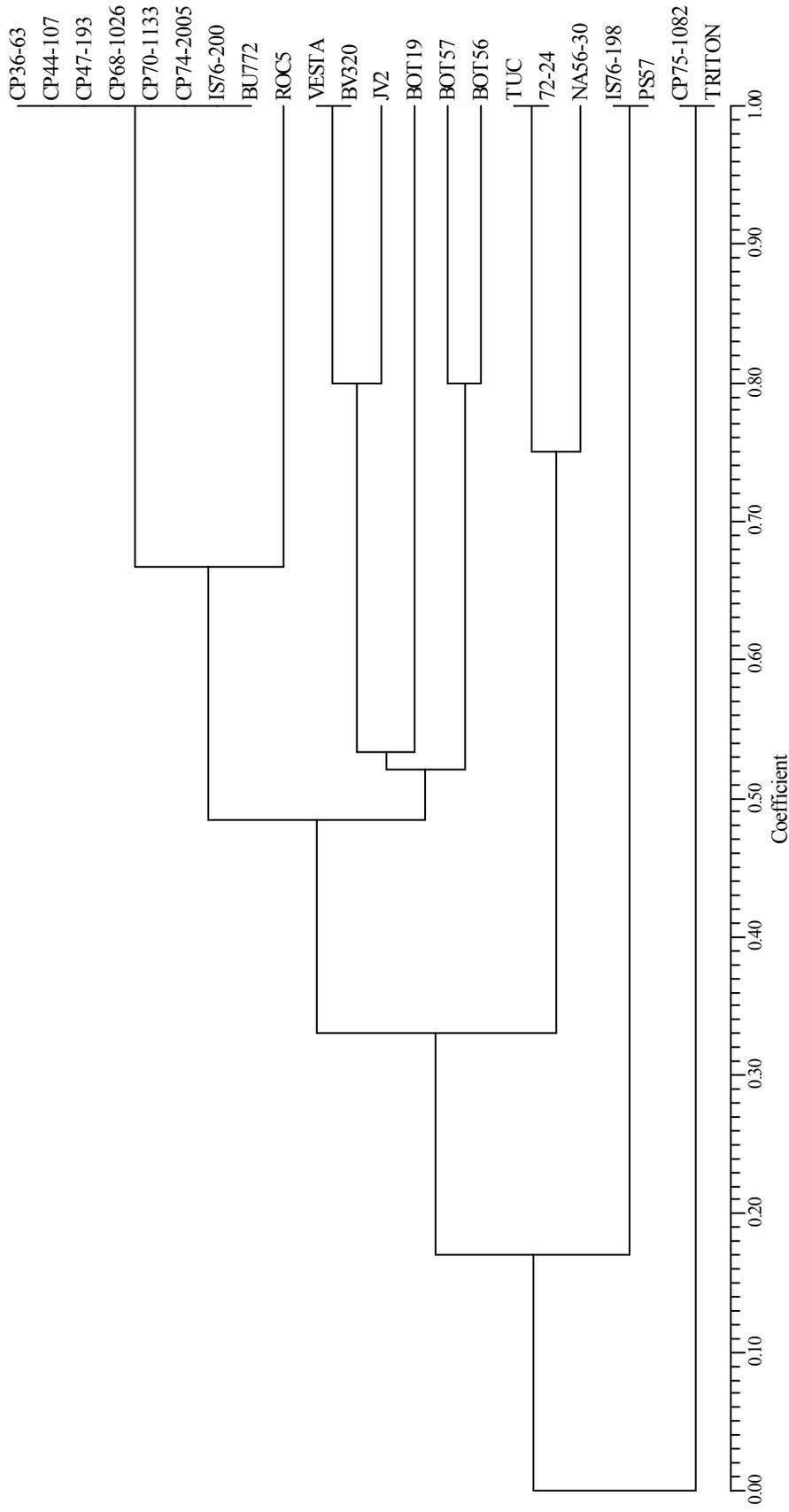
No .	Klon	Ukuran Pita					
		60	70	100	170	180	200
1	CP 36-63	0	0	1	0	0	1
2	CP 44-107	0	1	0	0	0	1
3	CP 47-193	0	0	1	0	0	1
4	CP 68-1026	0	1	0	0	0	1
5	CP 70-1133	0	1	0	0	1	0
6	CP 74-2005	1	0	0	0	1	0
7	IS 76-198	1	0	0	0	1	0
8	IS 76-200	1	0	0	0	1	0
9	BU 772	1	0	0	0	1	0
10	TUC 72-24	1	0	0	1	0	0
11	NA 56-30	1	0	0	0	1	0
12	PS 57	0	1	0	0	0	1
13	CP 75-1082	0	0	1	0	0	1
14	TRITON	0	0	0	0	0	1
15	VESTA	0	0	0	0	0	1
16	BV 320	0	0	0	0	1	0
17	JV 2	0	0	0	0	1	0
18	ROC 5	0	1	0	0	0	0
19	BOT 19	1	0	0	1	0	0
20	BOT 57	1	0	0	1	0	0
21	BOT 56	1	0	0	0	0	0
22	BOT 55	0	0	0	1	0	0

Tabel 6. Data matrik Duapuluh Dua Klon Tetua Persilangan Koleksi P3GI dengan Menggunakan Primer SMC863CG

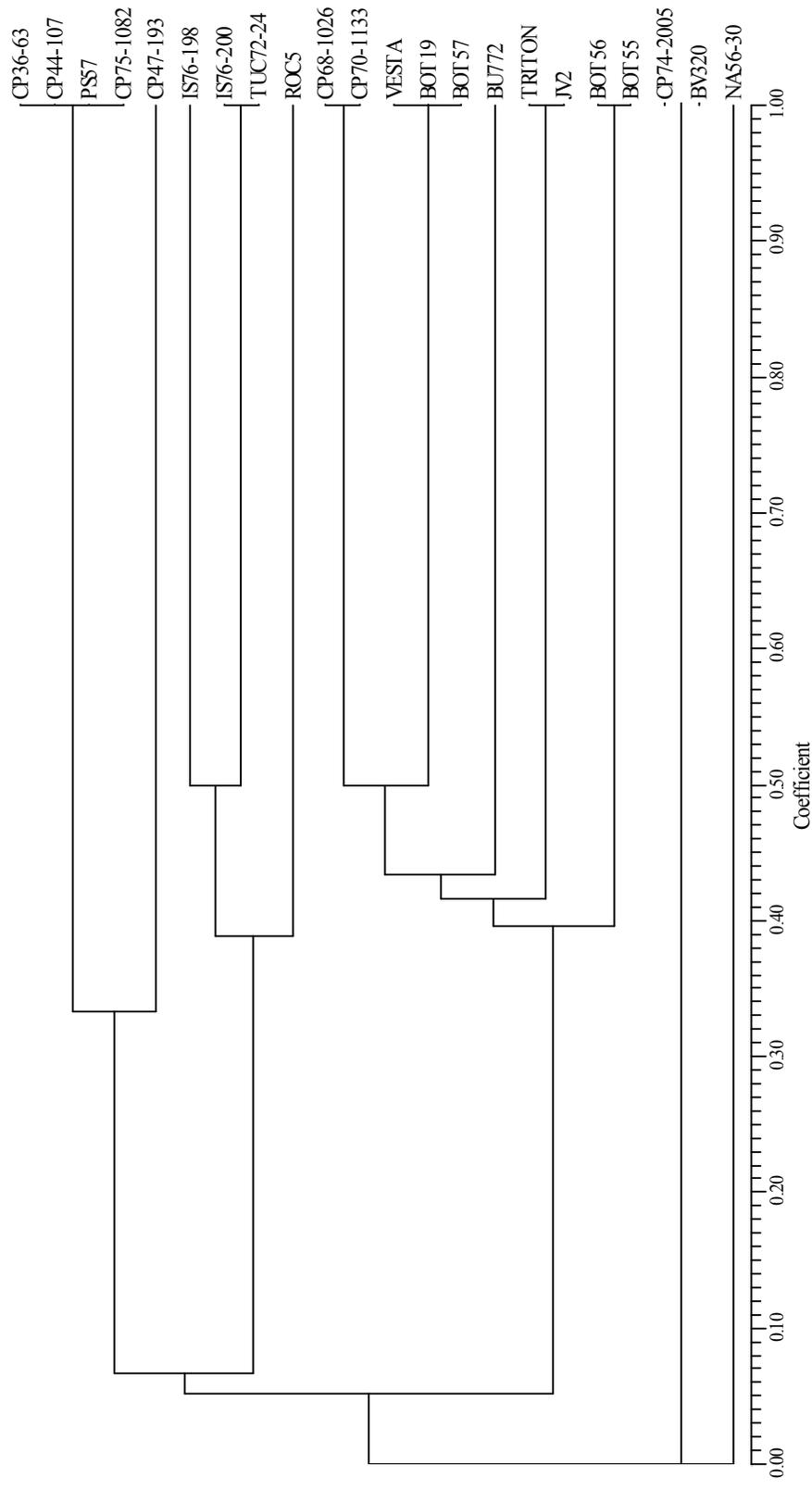
No .	Klon	Ukuran Pita										
		60	70	80	100	240	250	300	320	400	420	430
1	CP 36-63	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
2	CP 44-107	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
3	CP 47-193	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
4	CP 68-1026	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
5	CP 70-1133	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
6	CP 74-2005	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
7	IS 76-198	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
8	IS 76-200	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	BU 772	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	TUC 72-24	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
11	NA 56-30	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
12	PS 57	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
13	CP 75-1082	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
14	TRITON	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
15	VESTA	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0
16	BV 320	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
17	JV 2	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
18	ROC 5	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
19	BOT 19	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
20	BOT 57	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
21	BOT 56	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
22	BOT 55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Lampiran 4. Dendrogram Hubungan Genetik Duapuluh Dua Klon Tetua Persilangan Koleksi P3GI

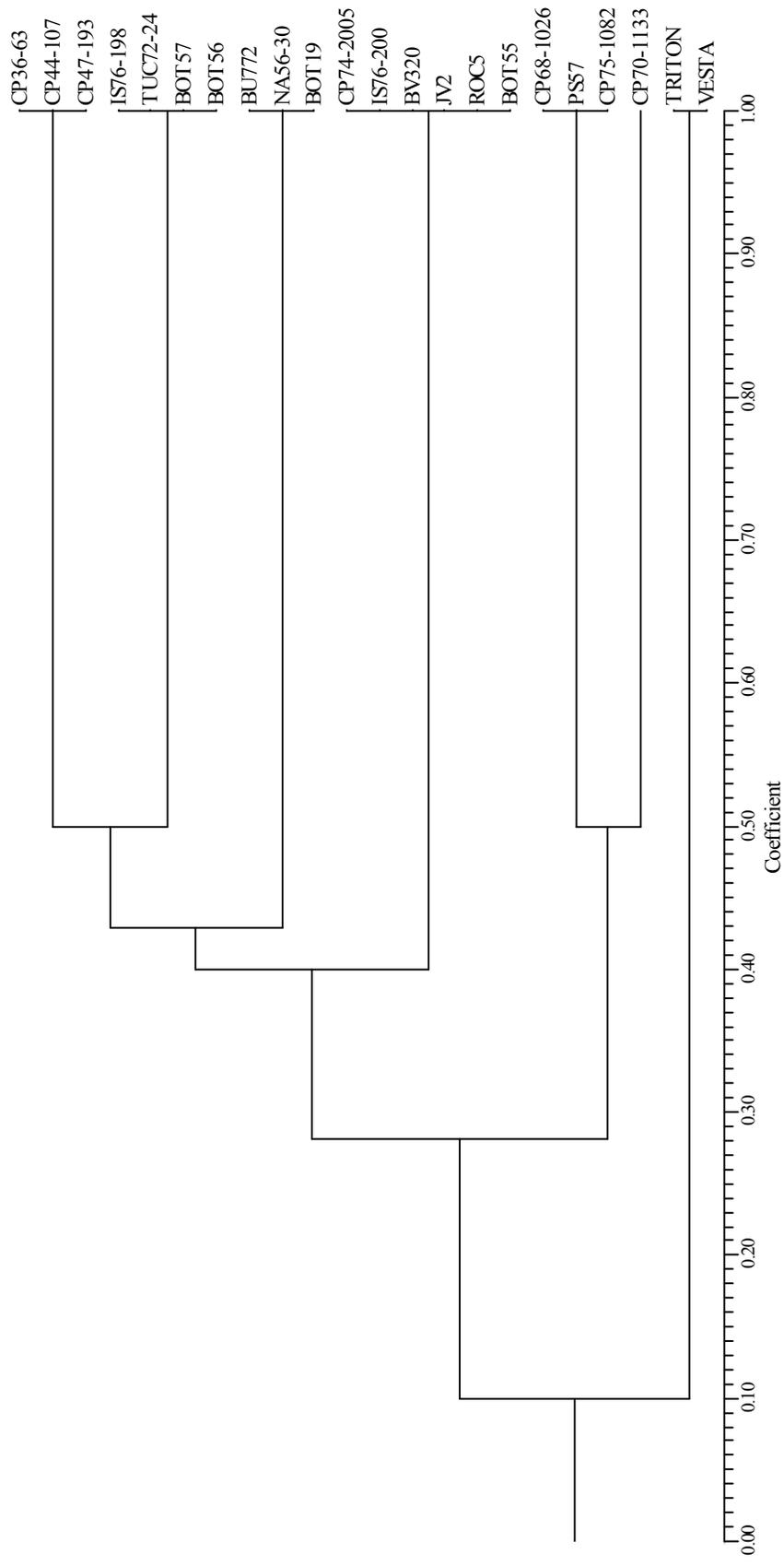
**Gambar 1.** Dendrogram Hubungan Genetik Duapuluh Dua Klon Tetua Persilangan Koleksi P3GI dengan Menggunakan Primer SMC22CG



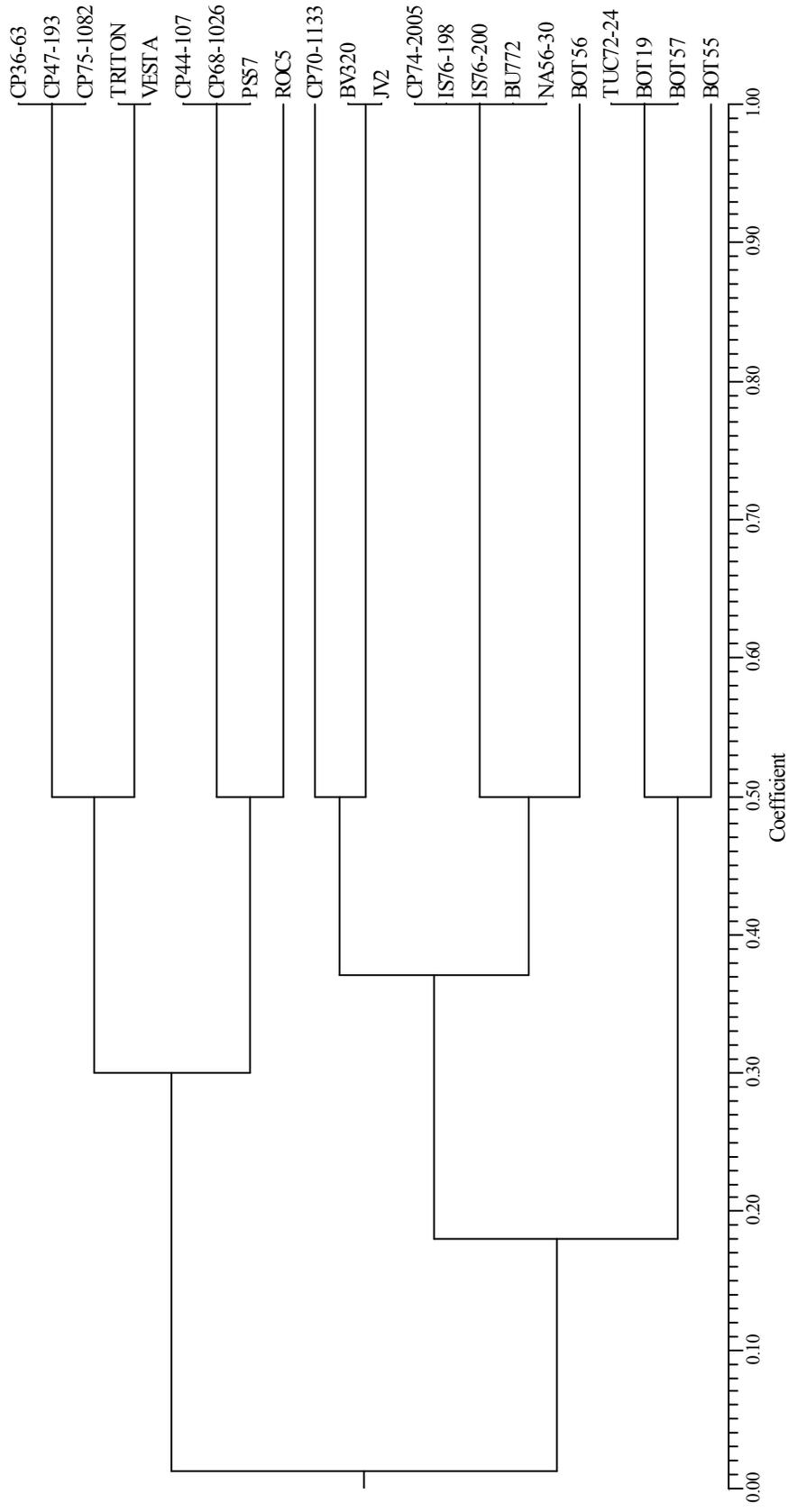
Gambar 2. Dendrogram Hubungan Genetik Duapuluh Dua Klon Tetua Persilangan Koleksi P3GI dengan Menggunakan Primer SMC226CG,



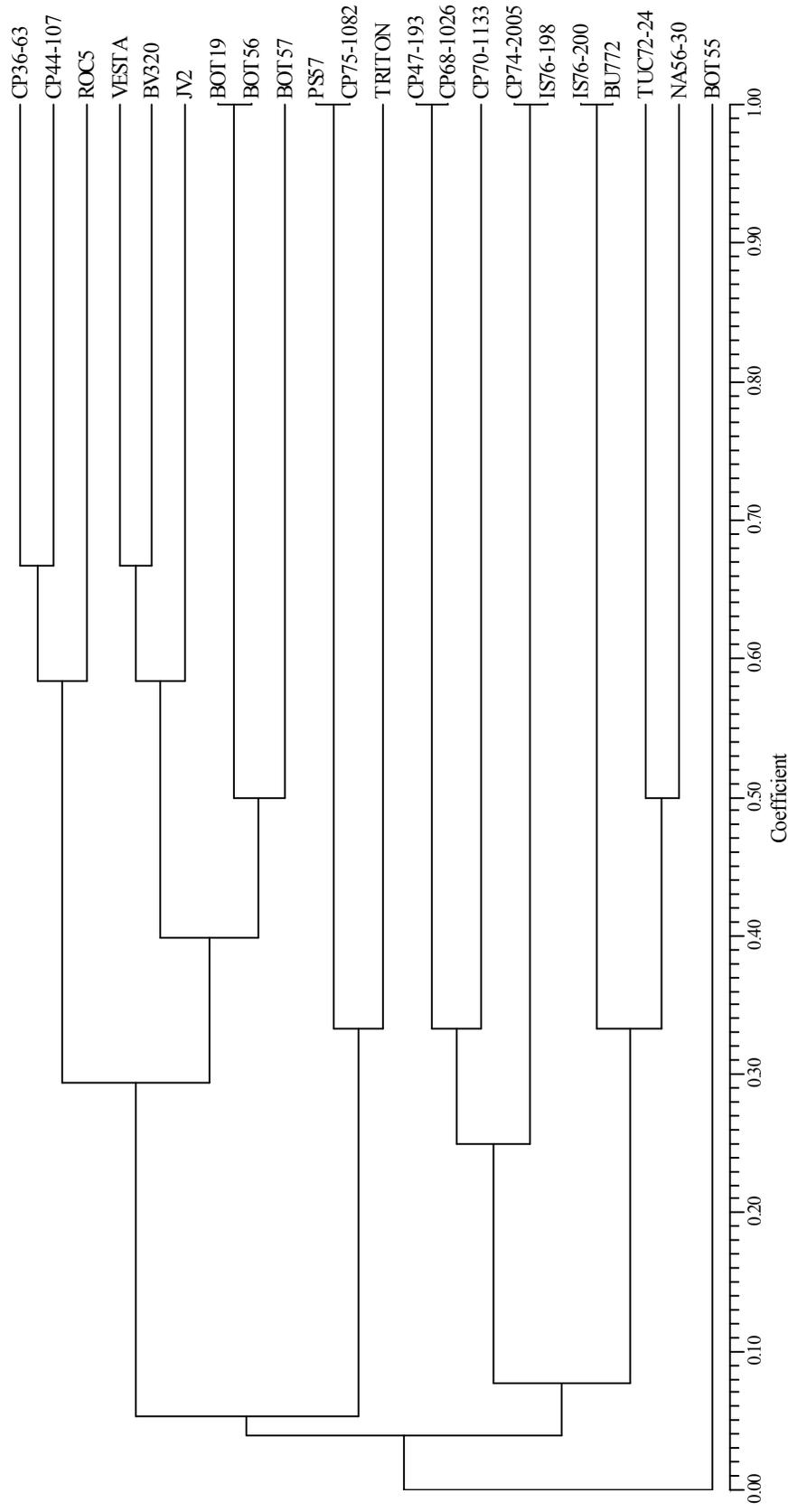
Gambar 3. Dendrogram Hubungan Genetik Duapuluh Dua Klon Tetua Persilangan Koleksi P3GI dengan Menggunakan Primer SMC248CG



Gambar 4. Dendrogram Hubungan Genetik Duapuluh Dua Klon Tetua Persilangan Koleksi P3GI dengan Menggunakan Primer SMC319CG



Gambar 5. Dendrogram Hubungan Genetik Duapuluh Dua Klon Tetua Persilangan Koleksi P3G1 dengan Menggunakan Primer SMC477CG.



Gambar 6. Dendrogram Hubungan Genetik Duapuluh Dua Klon Tetua Persilangan Koleksi P3GI dengan Menggunakan Primer SMC863CG