

**ANALISIS KEKERABATAN KOLEKSI PLASMA NUTFAH
Saccharum complex MENGGUNAKAN PENANDA
MORFOLOGI DAN MOLEKULER**

Oleh
VEGA KARTIKA SARI



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

2011



**ANALISIS KEKERABATAN KOLEKSI PLASMA NUTFAH
Saccharum complex MENGGUNAKAN PENANDA
MORFOLOGI DAN MOLEKULER**



Oleh
VEGA KARTIKA SARI
0610470035-47

SKRIPSI

Disampaikan sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar
Sarjana Pertanian Strata Satu (S-1)

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERTANIAN
JURUSAN BUDIDAYA TANAMAN
MALANG
2011**

RINGKASAN

VEGA KARTIKA SARI. 0610470035-47. Analisis Kekerbatan Koleksi Plasma Nutfah *Saccharum complex* Menggunakan Penanda Morfologi dan Molekuler. Di bawah bimbingan Dr.Ir.Damanhuri,MS., Izmi Yulianah,SP.,MSi. dan Ir.Wiwit Budi Widyasari, MSi

Tebu merupakan tanaman tropis yang selama ini ditanam untuk bahan baku pembuatan gula dan salah satu sumber energi penghasil etanol. Berdasarkan Data Asosiasi Gula tahun 2009, produksi nasional belum mampu memenuhi kebutuhan konsumsi nasional yang mencapai 4,85 juta ton, sedangkan jumlah produksi hanya sebesar 2,36 juta ton (Anonymous^b, 2009; Direktorat Jenderal Perkebunan, 2009). Upaya yang dapat dilakukan untuk mengatasi masalah tersebut salah satunya dengan mengevaluasi dan memanfaatkan plasma nutfah yang ada secara optimal dalam upaya menghasilkan varietas tebu yang berkualitas unggul.

Saat ini, Pusat Penelitian Perkebunan gula Indonesia (P3GI) Pasuruan mengkoleksi sekitar 5190 klon plasma nutfah, terdiri dari beberapa spesies anggota *Saccharum complex* yang merupakan sumber gen penyusun genotipe tebu hibrida yang dibudidayakan sekarang ini (Widyasari dan Sugiyarta, 2008). Agar koleksi plasma nutfah tebu dapat dimanfaatkan secara optimal, perlu dilakukan evaluasi dan analisis kekerabatan. Kekerbatan antar koleksi plasma nutfah dapat dievaluasi dan dianalisis melalui penanda morfologi dan molekuler. Penanda morfologi merupakan penanda paling sederhana karena berdasarkan karakter fenotip yang mudah terlihat namun diperlukan informasi genetik mengenai hubungan kekerabatan antar varietas yang bisa digunakan untuk memilih tetua persilangan (Lamadji, 1998). Pada penelitian ini menggunakan penanda morfologi dan penanda molekuler yaitu mikrosatelit (SSR) untuk mengelompokkan dan mengetahui hubungan kekerabatan dari anggota *Saccharum complex* untuk melengkapi dan memperkuat sistem klasifikasi yang telah ada.

Tujuan penelitian ini ialah mengetahui hubungan kekerabatan dari 24 klon anggota *Saccharum complex* berdasarkan penanda morfologi dan penanda molekuler mikrosatelit dan untuk memverifikasi pengelompokan dari 24 klon anggota *Saccharum complex* berdasarkan penanda molekuler mikrosatelit.

Penelitian ini dilaksanakan di kebun koleksi dan di Laboratorium Bioteknologi, Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P3GI) Pasuruan, Jawa Timur mulai bulan Juni sampai September 2010. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian yaitu: kamera, mortar dan pestle, mesin centrifuge, mesin PCR, mikropipet, spektrofotometer, mesin elektroforesis, sarung tangan, UV transiluminator dan mesin pendingin. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah 24 klon tebu. Bahan kimia: buffer ekstraksi (NaCl, Tris HCl pH 7,5, EDTA, CTAB), Nitrogen cair, Etidium Bromide, agarose, larutan TE steril, dH₂O, buffer, MgCl₂, primer, Taq polymerase, etanol, dNTP mix, CIA, NFW, aquabides steril.

Metode yang dilakukan terdiri dari 5 tahap, yaitu karakterisasi morfologi, pengambilan sampel untuk analisa molekuler, isolasi DNA dengan metode CIMMYT Laboratorium (Modifikasi 2), analisis kualitatif dan kuantitatif DNA, aplikasi PCR menggunakan 3 pasang primer mikrosatelit, visualisasi produk PCR, dan analisis data dengan program NTSYSpc-2.02i.

Dendogram morfologi yang terbentuk menunjukkan pada nilai kemiripan 0.66, 24 klon *Saccharum complex* terbagi menjadi dua kelompok utama, yang terdiri dari subsubkelompok yang sebagian besar sesuai dengan jenisnya, namun ditemui beberapa klon yang tidak mengelompok sesuai jenisnya. Dendogram molekuler gabungan tiga primer mikrosatelit yang terbentuk menunjukkan pengelompokan dari 24 klon *Saccharum complex* terbagi menjadi 2

kelompok besar pada tingkat kemiripan 0,02. Pengelompokan berdasarkan molekuler juga menunjukkan bahwa masing-masing klon mengelompok berdasarkan jenisnya. Semakin besar kemiripan genetik dan kenampakan fenotip, maka semakin dekat hubungan kekerabatan.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa baik secara morfologi maupun molekuler umumnya klon-klon mengelompok sesuai dengan jenis dan asalnya. Hasil pengelompokan berdasarkan molekuler lebih teratur, masing-masing spesies membentuk satu kelompok dan terpisah dari kelompok spesies lainnya, sedangkan hasil pengelompokan berdasarkan morfologi agak tidak teratur, beberapa klon yang tidak membentuk satu kelompok sesuai jenisnya. Hasil pengelompokan berdasarkan molekuler menunjukkan bahwa pengelompokan klon tebu anggota *Saccharum complex* koleksi P3GI hingga saat ini masih sesuai dengan pengelompokan pada saat konservasi dahulu.



KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah, Rabb semesta alam, yang telah mencurahkan segala nikmat dan rahmat kepada seluruh makhluk-Nya. Shalawat serta salam semoga senantiasa dilimpahkan kepada pengemban risalah Islam dan teladan seluruh umat manusia, Rasulullah SAW.

Atas kasih sayang dan pertolongan-Nya sajalah, akhirnya penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi yang berjudul **Analisis Kekekabatan Koleksi Plasma Nutfah *Saccharum complex* Menggunakan Penanda Morfologi dan Molekuler**. Skripsi ini tidak akan terselesaikan dengan baik tanpa dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, perkenankan penulis mengungkapkan penghargaan dan ucapan terima kasih kepada:

1. Bapak Dr.Ir.Damanhuri,MS. selaku pembimbing I, atas segala bimbingannya selama penulisan skripsi ini.
2. Ibu Izmi Yulianah,SP.,MSi. selaku pembimbing II, atas segala bimbingan dan motivasinya selama penulisan skripsi ini.
3. Ibu Ir.Wiwit Budi Widyasari,MSi. selaku pembimbing III, atas bantuannya sehingga dapat melaksanakan penelitian di P3GI, dan bimbingannya selama penyusunan skripsi ini.
4. Staf dan teknisi Lab.Bioteknologi P3GI atas bantuannya selama pelaksanaan penelitian di P3GI.
5. Teman-teman Pemuliaan Tanaman yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah memberi motivasi selama penelitian hingga selesainya penyusunan skripsi ini.

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

Penulis menyadari masih ada kekurangan dalam penyusunan laporan skripsi ini. Penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi kemajuan ilmu dan sebagai referensi bacaan bagi siapapun yang membutuhkannya.

Malang, Februari 2011

Penulis

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan pada tanggal 10 Maret 1988 di Desa Sekarputih Kecamatan Tegalampel Kabupaten Bondowoso Jawa Timur. Penulis adalah anak ketiga dari tiga bersaudara dari Ibu Kartini dan Bapak Harianto.

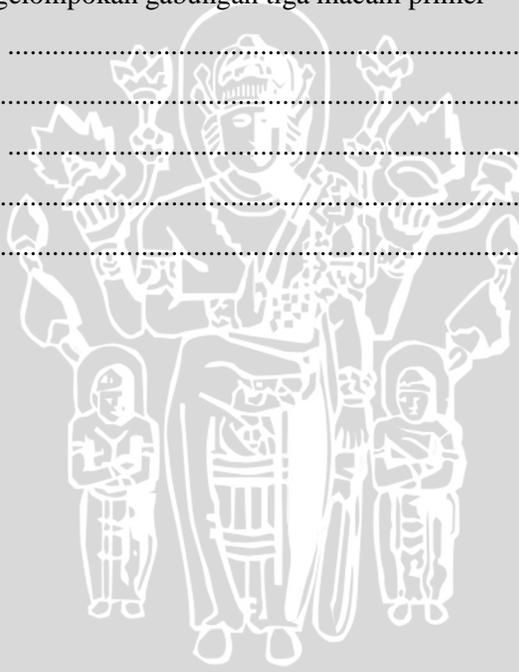
Penulis mengawali pendidikan di SD Negeri Dabasah 1 Bondowoso dan lulus pada tahun 2000, selanjutnya penulis melanjutkan pendidikan ke SLTP Negeri 1 Bondowoso dan lulus pada tahun 2003. Jenjang pendidikan berikutnya di tempuh di Kota Malang yaitu di SMA Negeri 4, lulus pada tahun 2006. Pada tahun yang sama penulis menempuh Sarjana strata 1 di Universitas Brawijaya Malang Fakultas Pertanian Jurusan Budidaya Pertanian pada Program Studi Pemuliaan Tanaman. Penulis diterima di kampus terkemuka tersebut melalui jalur Penerimaan Siswa Berprestasi (PSB). Pada awal perkuliahan, penulis menjadi staf magang Departemen Kewirausahaan di Himpunan Mahasiswa Budidaya Pertanian (HIMADATA). Setahun berikutnya, penulis aktif di Lembaga Dakwah Fakultas Forum Studi Insan Kamil (Forsika) Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya mulai tahun 2007-2010, sebagai staf Biro Finda tahun 2006/2007, staf Departemen Keputrian tahun 2007/2008, Ketua Keputrian tahun 2008/2009 dan Bendahara Umum tahun 2009/2010.

Disamping menjadi pengurus di keorganisasian, pada tahun 2007 penulis juga ikut serta dalam magang kerja di CV. Arjuna Flora Batu yang bergerak di bidang usaha tanaman hias. Pada tahun 2008, penulis turut serta dalam magang kerja di CV. Prima Investama Malang yang bergerak dalam usaha jamur tiram. Selain itu, penulis ikut serta dalam Program Mahasiswa Wirausaha (PMW) tahun 2009. Pada tahun yang sama, penulis juga ikut serta dalam Program Kegiatan Mahasiswa Wirausaha (PKMK) tahun 2009 yang diselenggarakan oleh Dikti. Tak hanya itu, penulis juga mengikuti berbagai kepanitian pada kegiatan skala Fakultas maupun Universitas. Sedangkan pada bidang akademis, penulis pernah menjadi asisten praktikum untuk mata kuliah Dasar Pemuliaan Tanaman pada tahun ajaran 2009/2010.

DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	v
RIWAYAT HIDUP	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar belakang	1
1.2 Tujuan	3
1.3 Manfaat penelitian	3
1.4 Hipotesis	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Botani tebu	4
2.2 Asal-usul tanaman tebu	5
2.3 Plasma nutfah tanaman tebu	10
2.4 Keragaman genetik dan hubungan kekerabatan tanaman tebu	11
2.5 Identifikasi keragaman genetik	13
2.5.1 Penanda morfologi	13
2.5.2 Penanda biokimia	14
2.5.3 Penanda molekuler	14
2.5.3.1 PCR (Polymerase Chain Reaction)	15
2.5.3.2 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)	17
2.5.3.3 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	18
2.5.3.4 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	18
2.5.3.5 Mikrosatelit atau SSR (Simple Sequence Repeat)	19
2.6 Analisis pengelompokan dan macam koefisien kemiripan genetik	20
3. BAHAN DAN METODE	
3.1 Tempat dan waktu	23
3.2 Alat dan bahan	23
3.3 Metode penelitian	24

3.4 Pelaksanaan.....	25
3.4.1 Karakterisasi morfologi.....	25
3.4.2 Karakterisasi molekuler	29
3.4.3 Intrepretasi data.....	34
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil	35
4.1.1 Penanda morfologi	35
4.1.2 Penanda molekuler	43
4.1.2.1 Isolasi DNA	43
4.1.2.2 Analisis kuantitatif DNA	43
4.1.2.3 Analisis kualitatif DNA	45
4.1.2.4 Aplikasi PCR	46
4.1.2.5 Analisis pengelompokan gabungan tiga macam primer mikrosatelit	49
4.2 Pembahasan	54
5. KESIMPULAN DAN SARAN	60
5.1 Kesimpulan	60
5.2 Saran	60
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	



DAFTAR TABEL

Nomor	Teks	Halaman
1.	Perbedaan antara Genus <i>Saccharum</i> dan <i>Erianthus</i>	8
2.	Jumlah aksesori yang dikoleksi P3GI MT 2007/2008	11
3.	Macam koefisien kemiripan	22
4.	Klon-klon tebu yang digunakan pada penelitian.....	23
5.	Tiga macam primer mikrosatelit yang digunakan pada penelitian.....	24
6.	Karakter morfologi untuk identifikasi varietas tebu	26
7.	Komponen reaksi PCR	31
8.	Program reaksi PCR pada tiga pasang primer	32
9.	Nilai kemiripan genetik antar 24 klon <i>Saccharum</i> complex berdasarkan penanda morfologi	41
10.	Nilai jarak genetik antar 24 klon <i>Saccharum</i> complex berdasarkan penanda morfologi	42
11.	Hasil pengukuran kuantitas DNA sampel.....	44
12.	Nilai kemiripan genetik antar 24 klon <i>Saccharum</i> complex berdasarkan penanda molekuler	52
13.	Nilai jarak genetik antar 24 klon <i>Saccharum</i> complex berdasarkan penanda molekuler	53

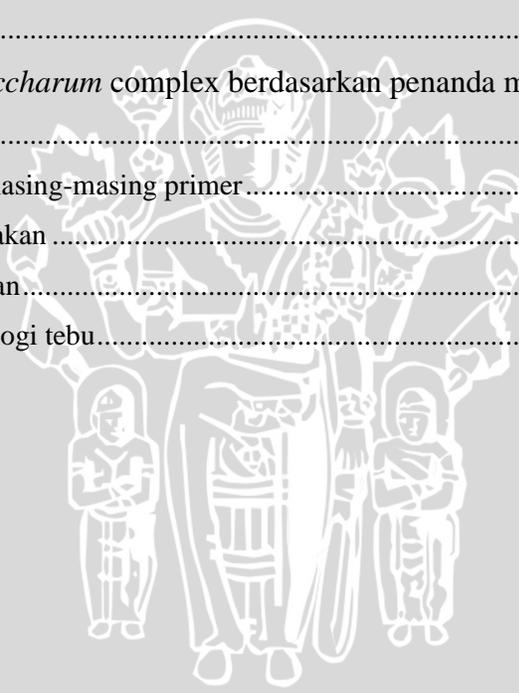
DAFTAR GAMBAR

Nomor	Teks	Halaman
1.	Skenario dari evolusi dan domestifikasi dari tanaman tebu yang analisis berdasarkan penanda molekuler	13
2.	Tahapan reaksi PCR	17
3.	Diagram alir dari tahapan penelitian	25
4.	Dendogram morfologi dari 24 klon <i>Saccharum</i> complex berdasarkan koefisien Simple Matching	39
5.	Visualisasi elektroforesis hasil isolasi DNA	45
6.	Elektroforegram hasil amplifikasi DNA (primer mSSCIR5)	46
7.	Elektroforegram hasil amplifikasi DNA (primer SMC1047HA)	47
8.	Elektroforegram hasil amplifikasi DNA (primer MSCA053C10)	48
9.	Dendogram molekuler gabungan tiga primer dari 24 klon berdasarkan koefisien Jaccard	50



DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Teks	Halaman
1.	Gambar morfologi tanaman tebu	68
2.	Kegiatan ekspedisi plasma nutfah tebu di Indonesia.....	69
3.	Data hasil pengamatan berdasarkan karakter morfologi	71
4.	Data biner berdasarkan penanda morfologi.....	72
5.	Deskripsi kode dari karakter morfologi.....	73
6.	Data biner 24 klon <i>Saccharum</i> complex berdasarkan penanda molekuler (Primer MCSA053C10).....	74
7.	Data biner 24 klon <i>Saccharum</i> complex berdasarkan penanda molekuler (Primer SMC1047HA).....	75
8.	Data biner 24 klon <i>Saccharum</i> complex berdasarkan penanda molekuler (Primer MSSCIR5)	76
9.	Dendogram molekuler masing-masing primer.....	77
10.	Daftar bahan yang digunakan	79
11.	Daftar alat yang digunakan.....	80
12.	Hasil pengamatan morfologi tebu.....	81



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tebu merupakan tanaman tropis yang selama ini ditanam untuk bahan baku pembuatan gula dan sebagai salah satu sumber energi terbarukan penghasil etanol. Tebu termasuk salah satu tanaman perkebunan yang patut dikembangkan untuk pemenuhan kebutuhan dalam maupun luar negeri.

Indonesia pernah menjadi eksportir gula nomor dua terbesar di dunia tahun 1930-an namun sekarang menjadi importir kedua terbesar di dunia (Susila, 2006; Yukamgo dan Widya, 2007). Indonesia melakukan impor gula antara lain disebabkan penurunan areal tebu dan kebutuhan konsumsi yang terus meningkat. Berdasarkan Data Asosiasi Gula tahun 2009, produksi nasional belum mampu memenuhi kebutuhan konsumsi nasional yang mencapai 4,85 juta ton, sedangkan jumlah produksi hanya sebesar 2,36 juta ton (Anonymous, 2009^a; Direktorat Jenderal Perkebunan, 2009). Upaya yang dapat dilakukan untuk mengatasi masalah tersebut ialah dengan meningkatkan produktivitas tebu nasional, salah satunya dengan mengevaluasi dan memanfaatkan plasma nutfah yang ada secara optimal dalam upaya menghasilkan varietas tebu yang berkualitas unggul.

Saat ini, Pusat Penelitian Perkebunan gula Indonesia (P3GI) Pasuruan telah mengkoleksi sekitar 5190 klon plasma nutfah, terdiri dari beberapa spesies yaitu *Saccharum officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense*, *S. edule*, *S. robustum*, *S. spontaneum*, serta kerabatnya yaitu genus *Erianthus*, *Mischantus* dan *Narenga* yang didapat dari hasil eksplorasi. Keseluruhan dari 6 spesies anggota genus *Saccharum* L. dan 4 kerabatnya termasuk genus *Schlerotachya* biasanya disebut dengan istilah *Saccharum* complex, merupakan sumber gen penyusun genotipe tebu hibrida yang dibudidayakan sekarang ini (Widyasari dan Sugiyarta, 2008). *Erianthus* merupakan sumber genetik yang memiliki kelebihan adaptasinya luas, tahan terhadap kekeringan, dan perakaran kuat namun, koleksi *Erianthus* di P3GI belum banyak dievaluasi dibandingkan spesies lainnya.

Agar koleksi plasma nutfah tebu dapat dimanfaatkan secara maksimal, perlu dilakukan evaluasi dan analisis kekerabatan. Kekerabatan antar koleksi plasma

nutfah dapat dievaluasi dan dianalisis melalui penanda morfologi dan molekuler sehingga dapat meningkatkan efisiensi pengelolaan dan pemanfaatan plasma nutfah tebu, menyederhanakan proses pemilihan tetua persilangan, serta mengoptimalkan prosedur seleksi sehingga berguna bagi generasi sekarang maupun yang akan datang (Khan *et al.*, 2009).

Penanda morfologi merupakan penanda paling sederhana karena berdasarkan karakter fenotip yang mudah terlihat. Saat ini keberadaan dan manfaat penanda morfologi masih terbatas pada pemberian informasi tentang kemiripan atau perbedaan antar varietas, padahal diperlukan informasi genetik mengenai hubungan kekerabatan antar varietas yang bisa digunakan untuk memilih tetua persilangan, sehingga diharapkan dapat timbul sifat heterosis dengan nilai yang tinggi (Lamadji, 1998). Pemilihan tanaman yang hanya didasarkan atas karakter morfologi memiliki kelemahan, terutama bila karakter tersebut dipengaruhi oleh faktor lingkungan (Widodo, 2003).

Pengamatan morfologi harus memperhatikan umur tanaman, karena perubahan umur mempengaruhi perubahan morfologi. Subyektivitas peneliti juga dimungkinkan terjadi dalam pengelompokan suatu varietas jika hanya berdasarkan penanda morfologi. Berbeda dengan penanda molekuler yang dapat memberikan informasi yang relatif lebih akurat karena sifat genetik cenderung stabil terhadap perubahan lingkungan dan tidak dipengaruhi oleh umur (Julisaniah *et al.*, 2008). Sebagian besar tebu yang dibudidayakan saat ini merupakan hasil eksplorasi yang dikelompokkan hanya berdasarkan morfologi, sehingga dimungkinkan terjadi kekeliruan karena antar spesies tebu memiliki kemiripan ciri morfologi. Oleh karena itu diperlukan pembuktian lebih jauh dengan menggunakan penanda molekuler.

Penanda molekuler berbasis PCR (*polymerase chain reaction*) mampu mendeteksi keragaman genetik pada tingkat resolusi yang lebih tinggi. Salah satu contoh penanda molekuler ialah mikrosatelit (SSR) yang telah digunakan pada beberapa penelitian untuk menganalisa keragaman genetik pada tanaman tebu (Pan *et al.*, 2003; Srivastava and Prashant, 2008), serta tanaman lainnya seperti jagung (Pabendon *et al.*, 2006), kakao (Susilo, 2007), dan barley (Guasmi *et al.*, 2008).

Pada penelitian ini digunakan penanda morfologi dan penanda molekuler yaitu mikrosatelit (SSR) untuk mengelompokkan dan mengetahui hubungan

kekerabatan dari anggota *Saccharum* complex untuk melengkapi dan memperkuat sistem klasifikasi yang telah ada.

1.2 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui hubungan kekerabatan dari 24 klon anggota *Saccharum* complex berdasarkan penanda morfologi dan penanda molekuler mikrosatelit.
2. Untuk memverifikasi pengelompokan dari 24 klon anggota *Saccharum* complex berdasarkan penanda molekuler mikrosatelit.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan ialah dengan adanya data mengenai hubungan kekerabatan diantara anggota *Saccharum* complex dapat mengoptimalkan prosedur seleksi dan dijadikan sebagai acuan dalam proses pemilihan tetua untuk merancang kombinasi persilangan.

1.4 Hipotesis

1. Ada perbedaan dalam pengelompokan secara morfologi dan secara analisis molekuler mikrosatelit.
2. Hasil analisis molekuler untuk klon-klon dari genus *Saccharum* membentuk kelompok yang terpisah dari klon-klon *Erianthus*.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Botani Tebu

Morfologi tanaman tebu meliputi batang, daun, bunga dan akar (Lampiran 1). Batang tanaman tebu tidak bercabang dan tumbuh tegak. Tinggi batangnya dapat mencapai 3 – 5m atau lebih dan diameter batang 25-50mm tergantung varietas dan kondisi pertumbuhan. Tanaman berbiji tunggal ini memiliki diameter dan warna batang yang berbeda tergantung jenisnya, umumnya berwarna hijau, kuning, ungu, merah tua atau kombinasinya. Batang tanaman tebu beruas-ruas yang dapat berbentuk tong, silindris, kelos, konis terbalik, cembung atau cekung dan diantaranya terdapat buku-buku yang memiliki mata ruas yang berbentuk bulat atau bulat panjang (Indriani dan Sumiarsih, 1992). Adisewojo (1983) menambahkan, mata ruas tersebut dapat tumbuh menjadi kuncup tanaman baru. Tanaman tebu juga memiliki mata akar tempat keluarnya akar untuk kehidupan kuncup tersebut. Indriani dan Sumiarsih (1992) mengungkapkan bahwa pada batang tebu terdapat lapisan lilin yang berwarna keabu-abuan. Lapisan lilin biasanya ada pada waktu batang masih muda.

Daun tebu merupakan daun tidak lengkap karena hanya memiliki pelepah dan ketiak daun tanpa tangkai daun. Daun berpangkal pada batang dengan kedudukan berseling (Adisewojo, 1983). Daun tebu terdiri dari dua bagian yaitu pelepah daun (leaf sheat) dan helaian (leaf blade). Pelepah daun membungkus ruas batang yang masih muda, umumnya terdapat bulu-bulu bidang punggung dan telinga daun (dewlap) (Sastrowijono, 1996). Helai daunnya berbentuk pita dengan panjang 1-2m dan lebar 2-7cm. Antara pelepah daun dan helaian daun bagian sisi luar terdapat sendi segitiga daun, sedangkan pada sisi dalamnya terdapat lidah daun. Tepi daunnya bergerigi dan banyak mengandung silikat (Setyamidjaja dan Azharni, 1992). Stomata terdapat pada kedua sisi daun, tetapi kerapatan stomata pada permukaan bawah daun hampir dua kali lipat dibanding permukaan atas daun (James, 2004).

Bunga tebu merupakan bunga majemuk yang berbentuk malai. Sumbu utama bercabang-cabang makin ke atas makin kecil sehingga membentuk piramid (Indriani dan Sumiarsih, 1992). Dalam satu malai terdapat bulir-bulir (spikelet) yang

terdiri dari 3 helai kelopak (calix), 3 benang sari (stamen) dan 1 bakal buah (ovarium) dan kepala putik (stigma) yang berbulu-bulu. Heinz (1987) menambahkan, pada tiap spikelet juga memiliki rumbai-rumbai rambut (rambut kalus) yang memanjang dari dasarnya dan umumnya halus seperti sutera. Bunga tebu dilindungi oleh “glume” yang berupa sekam umumnya mekar pada pagi hari dan jangka waktu pembungaannya pada satu malai beragam antara 5-12 hari. Pembungaan tebu berlangsung setelah pertumbuhan vegetatif selesai yaitu sekitar umur 12 bulan (Setyamidjaja dan Azharni, 1992). Penyerbukan terjadi dengan bantuan angin sehingga pembuahan terjadi karena penyerbukan sendiri atau silang (Adisewojo, 1983).

Akar tanaman tebu berupa akar serabut yang keluar dari pangkal batang, berbentuk silindris dan berfungsi menguatkan tegakan batang dan menyerap air serta unsur hara (Moenandir, 1993). Sewaktu tanaman masih muda atau berupa bibit ada dua macam akar yaitu akar stek dan akar tunas. Akar stek berasal dari stek batangnya yang tidak berumur panjang dan hanya berfungsi sewaktu tanaman masih muda. Akar tunas berasal dari tunas yang tetap ada selama tanaman tumbuh (Indriani dan Sumiarsih, 1992). Pada tanah yang subur dan gembur, panjang akar mencapai 1-2m namun, pada tanah yang kurus atau keras maka akar relatif pendek (Notojoewono, 1983).

2.2 Asal-Usul Tanaman Tebu

Menurut Amalraj and Balasundaram (2006), taksonomi tebu sebagai berikut: Kingdom Plantae, Divisi Magnoliophyta, Kelas Liliopsida, Ordo Poales, Famili Poaceae, Sub-famili Panicoideae, Tribe Andropogoneae, Sub-tribe Saccharinae, Group Saccharastrae dan Genus *Saccharum* L. yang terdiri dari beberapa spesies yaitu *Saccharum officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense*, *S. edule*, *S. robustum*, *S. spontaneum*, serta kerabatnya yaitu genus *Erianthus*, *Mischantus*, *Narenga* dan *Schlerotachya*. Widyasari dan Sugiyarta (2008) menambahkan, keseluruhan dari spesies dan kerabat tebu tersebut biasanya disebut dengan istilah *Saccharum* complex, yang merupakan sumber gen penyusun genotipe tebu hibrida yang dibudidayakan sekarang ini. Sukarso dan Hermono (1992) mengungkapkan, istilah *Saccharum* complex diperkenalkan Mukherjee pada tahun 1957 dalam

kajiannya mengenai asal dan penyebaran genus *Saccharum*. Ditunjukkan pula bahwa genus *Saccharum*, *Erianthus*, *Narenga* dan *Schlerotachya* saling berhubungan erat, interbreeding dalam asal-usul tebu. Daniels *et al.* (1975), dalam Alwala *et al.* (2006) memasukkan *Miscanthus* ke dalam golongan tersebut, namun hubungan kekerabatannya belum jelas.

Menurut Amalraj and Balasundaram (2006), anggota *Saccharum* complex sama-sama termasuk subtribe 'Saccharinae' karena dicirikan dengan:

1. Memiliki sepasang spikelet; biasanya terdiri dari satu sessile dan lainnya pedicellate.
2. Tersebar di daerah tropis dan sub-tropis, terutama India dan Indonesia pada tingkat genus.

Saccharum officinarum berasal dari Indonesia tepatnya sebelah timur garis Wallace yang meliputi Sulawesi, Maluku dan Papua yang kemudian menyebar ke Fiji, India dan China pada masa pra sejarah (Widyasari dan Sugiyarta, 2008). *S. officinarum* berasal dari *S. robustum*. Spesies ini ($2n=80$) ialah spesies tebu dengan kandungan sukrosa tinggi (Arro *et al.*, 2006). Ramdoyal dan Badaloo (2002) menambahkan, klon *S. officinarum* memiliki batang yang besar, kandungan nira yang tinggi, serat rendah, vigor rendah, adaptasi terhadap cekaman lingkungan rendah, dan rentan terhadap penyakit. Secara morfologi, spesies tebu ini berbatang tegak, lurus, padat, tingginya 2.5-6m, berbuku-buku dengan panjang buku 5-25cm dan diameter batang 1.5-6cm. Warna batang tergantung pada kultivar dan iklimnya. Panjang helai daun 70-120cm dan berbentuk pita. Bunganya merupakan bunga majemuk berbentuk seperti mata panah dan besarnya bervariasi tergantung pada kultivarnya (Sudarnadi, 1996).

Saccharum spontaneum berasal dari utara dan timur Afrika, Anatolia, Turkmenistan, Kalimantan, Burma, Cina, Jawa, New Guinea, Filipina, Sulawesi dan Taiwan. Klon *S. spontaneum* banyak dan beragam, namun mudah dibedakan dengan *S. officinarum*. Berdasarkan karakter vegetatif ada dua subspecies yaitu *indicum*, yang berumbai (kecuali yang berasal dari Jawa dikenal dengan 'Glagah') dan subspecies kedua yaitu *aegyptiacum* yang bercirikan tegak. *S. Spontaneum* ini dapat dipakai sebagai sumber gen ketahanan terhadap lingkungan rawan seperti kekeringan, pH tanah rendah dan lain-lain (James, 2004). Sepadan yang dinyatakan Arro *et al.*,

(2006) bahwa *S.spontaneum* ($2n= 40-128$) resisten terhadap berbagai faktor biotik dan abiotik namun kandungan sukrosanya lebih rendah dibanding *S.officinarum*. Lamadji (1994) menambahkan, spesies ini mampu memberikan pertumbuhan yang baik, perkecambahan dan anakan yang banyak, sifat kekerasan kulit dan ketahanan terhadap hama dan penyakit. Lebih jauh tentang morfologi, Sudarnadi (1996) menyatakan bahwa spesies tebu ini mempunyai rimpang yang menjalar ke berbagai arah sehingga membentuk rumpun yang padat. Berbatang tegak setinggi 1-4m atau lebih, berbuku-buku dengan diameter batang kecil. Spesies tebu yang kandungan seratnya tinggi ini memiliki panjang pelepah daun 20cm atau lebih, berwarna keungu-unguan, lidah daun berbentuk segitiga yang berambut pendek dan helai daun berbentuk pita, dari pangkal spikelet tumbuh rambut-rambut panjang yang berwarna putih.

Saccharum barberi ($2n = 81-124$). Spesies ini dibedakan menjadi lima jenis utama berdasarkan karakteristik daun, batang dan akar yaitu Mungo, Nargori, Saretia, Sunnabile dan Pansahi. Jenis Pansahi tidak hanya ditemukan di India, tetapi juga di selatan Cina, Indocina dan Taiwan (James, 2004). *S. barberi* dan *S.sinensis* merupakan hasil dari persilangan secara alami antara *S.spontaneum* dan *S.offiscinarum* (Zhang *et al.*, 2004). *S.barberi* dan *S.sinense* memiliki ciri yang serupa yaitu batang berukuran kecil hingga sedang, kandungan sukrosa rendah, berserat tinggi dan toleran terhadap kondisi cekaman (Ramdoyal dan Badaloo, 2002). Amalraj and Balasundaram (2006) menambahkan, ciri lainnya dari genus ini batang silinder, berwarna hijau keabu-abuan atau putih dan daun sempit. Umumnya mampu beradaptasi pada daerah subtropikal.

Saccharum sinense ($2n = 111-120$). Spesies ini tahan terhadap penyakit virus mozaik dan memiliki kualitas penggilingan yang lebih baik (James, 2004). Genus ini memiliki batang berbentuk seperti kumparan, batang berwarna hijau perunggu dan daun lebar (Amalraj dan Balasundaram, 2006). Seperti halnya *S.barberi*, *S. sinense* diperoleh dari introgression *S.spontaneum* dan *S. officinarum* (Zhang *et al.*, 2004).

Saccharum robustum berasal dari alam liar seperti *S. Spontaneum*, ditemukan di New Guinea dan pulau-pulau tetangga. *S.robustum* pada habitat alaminya, tingginya dapat mencapai 10 m namun spesies ini rentan terhadap virus

mozaik (James, 2004). Ramdoyal dan Badaloo (2002) menambahkan, batang dari spesies ini keras, berkayu, kecil dan sedikit kandungan niranya. *S.robustum* biasanya digunakan sebagai tanaman obat di Kalimantan. Spesies ini memiliki keragaman secara morfologi yang sangat tinggi di Papua Nugini.

Saccharum edule Hassk ($2n = 60, 70, \text{ dan } 80$) berasal dari New Guinea dan pulau-pulau tetangganya. Spesies ini berkerabat dekat dengan *S.robustum*, bahkan banyak yang menganggap tidak berbeda dengan *S.robustum*. *Saccharum edule* digunakan sebagai bahan makanan di Melanesia (James, 2004). Menurut Alix *et al.*, (1998), *S.edule* merupakan tebu yang berkualitas rendah dibanding spesies tebu lainnya, bahkan menurut Grivet *et al.*, (2006) tidak mengandung sukrosa meskipun memiliki batang yang besar. Amalraj dan Balasundaram (2006) menambahkan, ciri lainnya dari genus ini pembungaan steril dan aborsi. *S. edule* diperoleh dari saling-silang *S. officinarum* atau *S. robustum* dan *Miscanthus* (Zhang *et al.*, 2004).

Tabel 1. Perbedaan antara Genus *Saccharum* dan *Erianthus* (Amalraj dan Balasundaram, 2006)

No.	Karakter	Saccharum	Erianthus
1.	Mata akar	2 baris atau lebih	Hanya 1 baris jika ada
2.	Mata tunas (bud)	Berkembang baik dan reproduktif	Bersisik, kecuali 2 spesies
3.	Telinga daun	Ada	Tidak ada
4.	Sepasang spikelet	Sessile dan pedicellate	Sessile dan pedicellate
5.	Rambut kalus	Lebih dari 2-3 kali panjang spikelet	Lebih pendek, sama atau sedikit lebih panjang dari spikelet
6.	Tannin pada ujung akar	Tidak ada	Ada
7.	Ratio stomata pada sisi daun bagian atas dan bawah	2:1	3:1

Genus *Erianthus* Michx Sect. *Ripidium* Henrard ($2n=20-60$) ialah salah satu kerabat dari *Saccharum*, yang dapat dijadikan sebagai sumber genetik karena adaptasinya luas, tahan terhadap kekeringan, dan perakaran kuat (Zhang *et al.*, 2004). *Erianthus* tersebar di India, Asia tenggara sampai Jepang, Indonesia dan Papua Nugini. Klon dari *Erianthus* memiliki vigor yang tinggi, batang panjang dengan diameter yang baik dan tahan terhadap penyakit (Ramdoyal dan Badaloo, 2002).

Salah satu spesies dari genus ini yaitu *E.arundinaceus* yang berasal dari Indonesia, memiliki ciri morfologi pertumbuhan cincin dan mata akar menonjol (Amalraj and Balasundaram, 2006). Berdasarkan penelitian Piperidis *et al.* (2000), terjadi inkompatibilitas antara *Erianthus arundinaceus* dan anggota *Saccharum*, diketahui dari sangat sedikitnya persilangan yang terjadi antara 2 spesies tersebut. Dari analisis molekuler yang dilakukan Alix *et al.* (1998,1999) dan Nair *et al.* (1999) dalam Piperidis *et al.* (2000) menunjukkan bahwa *E.arundinaceus* secara genetik sangat jauh dengan genus *Saccharum*. Perbedaan morfologi yang signifikan pada tingkat genus antara *Saccharum* dan *Erianthus* disajikan pada Tabel 1.

Genus *Miscanthus* ($2n=38-114$), dikembangkan oleh Andersson pada tahun 1856 (Amalraj *et al.* 2006). Genus ini tersebar dari Tahiti sampai wilayah Indonesia Timur, Indo-Cina, Cina Utara, Siberia dan Jepang (Ramdoyal dan Badaloo, 2002). Yang membedakan genus ini dengan *Saccharum* dan *Erianthus* ialah secara alami lebih tahan terhadap penyakit dan adanya sepasang pedicellate spikelet, sedangkan yang membedakan dengan *Sclerostachya* ialah pada glume keempat berbulu dan memiliki rambut-rambut kalus yang lebih panjang (Amalraj dan Balasundaram, 2006).

Sclerostachya ($2n=30$) dikembangkan oleh A.Camus pada tahun 1922. *Sclerostachya* dari kata 'Skleros' yang berarti keras dan 'Stachys' yang berarti bulir atau spikelet. Genus ini tersebar di India, Burma, China dan Malaysia. Karakter dari genus ini, batang cekung, tidak mempunyai mata akar, sedikit mata tunas dan malai berwarna abu-abu kecoklatan. Genus ini terdiri dari dua spesies yaitu *S. fusca* dan *S. ridleyi* (Amalraj dan Balasundaram, 2006).

Sedangkan, genus *Narenga* ($2n= 30$) dikembangkan oleh N.L.Bor pada tahun 1940, tersebar di India dan Asia Tenggara. Genus ini serupa dan berkerabat dekat dengan *Sclerostachya* tapi dibedakan dengan adanya sepasang sessile spikelet yang berdekatan, buku-buku (nodes) yang berakar, dan adanya pelepah daun pada tebu dewasa. Genus ini terdiri dari dua spesies yaitu *N. fallax* (spikelet 4-5 mm) dan *N. porphyrocoma* (spikelet 2.5- 3mm) (Amalraj dan Balasundaram, 2006).

2.3 Plasma Nutfah Tanaman Tebu

Plasma nutfah tebu sangat diperlukan sebagai sumber gen yang mempunyai keanekaragaman genetik yang luas yang dapat digunakan dalam perbaikan genetik pada spesies tanaman yang memiliki nilai ekonomi. Keanekaragaman genetik plasma nutfah ini dikenal sebagai *gene pools* atau *genetic resources* (Lamadji, 1994).

Daerah antara daratan Asia Tenggara dan Papua Nugini diduga sebagai pusat penyebaran spesies tebu. Kegiatan mengkoleksi plasma nutfah tebu dilakukan Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P3GI) sejak tahun 1916 hingga tahun 1995 (Lampiran 2). Kegiatan ekspedisi pada mulanya dilakukan di Papua Nugini dan Indonesia yang merupakan pusat diversitas terbesar dari tanaman tebu. Selain itu, kegiatan pengumpulan berkembang ke India, Fiji, Taiwan, Thailand dan Philipina. Dalam kurun waktu 80 tahun ekspedisi pengumpulan plasma nutfah tebu dan kerabatnya di Papua Nugini telah dilakukan sebanyak 14 kali, di Indonesia dan India sebanyak 8 kali (Widyasari dan Sugiyarta, 2008).

Komposisi koleksi plasma nutfah tebu yang dimiliki P3GI MT 2007/2008 disajikan pada Tabel 2. P3GI memiliki koleksi keragaman genetik tebu dan kerabat-kerabatnya sebanyak 5.308 aksesi yang dipelihara di lapang pada masa tanam (MT) 2006/2007 namun, pada masa tanam 2007/2008 jumlah koleksi berkurang menjadi 5.190 disebabkan beberapa klon dari *S. barberi*, *S. sinense* dan *S. officinarum* mati karena pengaruh lingkungan dan teknik budidaya, sedangkan 139 klon dari tebu hibrida sengaja dibuang karena tidak menunjukkan sifat unggul secara agronomis. Koleksi plasma nutfah tebu tersebut ditanam pada lahan seluas 3,5 hektar (Widyasari dan Sugiyarta, 2008).

Tabel 2. Jumlah aksesori yang dikoleksi P3GI MT 2007/2008

Spesies	Musim Tanam (MT) 2007/2008
	Jumlah klon
<i>S. officinarum</i>	229
<i>S. spontaneum</i>	118
<i>S. robustum</i>	55
<i>S. barberi</i>	25
<i>S. sinense</i>	24
<i>S. edule</i>	7
<i>Erianthus spp.</i>	160
<i>Miscanthus spp.</i>	2
Belum digolongkan	11
Hibrida :	
-Rakitan sendiri:	
Seri POJ	436
Seri PS	1069
- Introduksi	2744
- Nobelisasi <i>S. officinarum</i> dengan :	76
<i>S. spontaneum</i>	9
<i>S. robustum</i>	6
<i>S. barberi</i>	17
<i>S. sinense</i>	12
<i>Erianthus spp.</i>	4
<i>Miscanthus spp.</i>	42
<i>Sorghum spp.</i>	11
<i>Narenga spp.</i>	20
Lain-lain	
- Hasil iradiasi sinar <i>Gamma</i>	116
JUMLAH	5190

2.4 Keragaman Genetik dan Hubungan Kekerbatan Tanaman Tebu

Keragaman terdiri dari keragaman lingkungan dan genetik. Keragaman yang terdapat dalam populasi bisa disebabkan oleh pengaruh lingkungan, karena kondisi yang tidak seragam dan tidak selalu konstan, sehingga seringkali mengaburkan sifat genetik suatu individu tanaman. Keragaman genetik ialah keragaman yang semata-mata disebabkan perbedaan genetik akibat adanya segregasi dan interaksi dengan gen lain. Keragaman yang terjadi akibat dari faktor lingkungan dan faktor genetik yang berinteraksi disebut keragaman fenotip (Welsh, 1981).

Dalam program pemuliaan tanaman, pendugaan hubungan kekerabatan sangat berguna untuk mengelola plasma nutfah, identifikasi kultivar, membantu

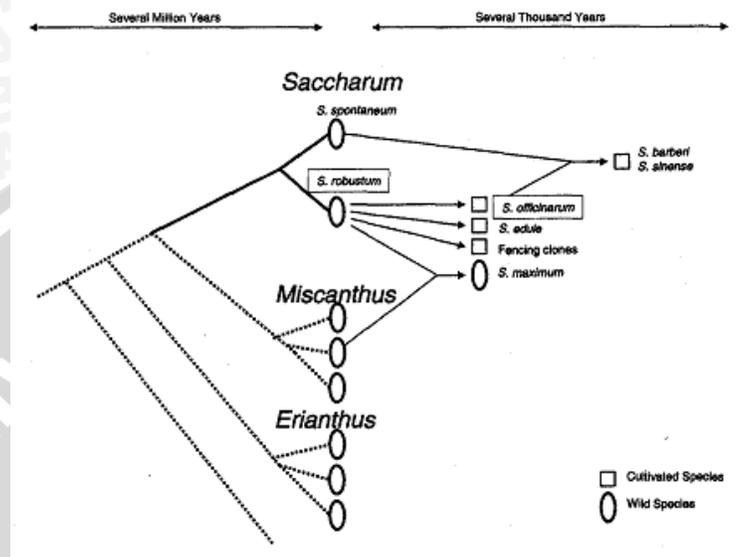
seleksi tetua untuk persilangan, serta mengurangi jumlah individu yang dibutuhkan untuk pengambilan sampel dengan kisaran keragaman genetik yang luas (Julisaniah *et al.*, 2008). Hubungan kekerabatan dapat ditunjukkan dengan kenampakan fenotip dan susunan genetik antar tanaman. Semakin tinggi kemiripan kenampakan fenotip dan susunan genetik, maka berarti semakin dekat hubungan kekerabatannya (Suharyanto, 2002).

Informasi mengenai keragaman genetik dan hubungan kekerabatan penting artinya agar tidak terjadi kekeliruan dalam kegiatan konservasi. Kesalahan informasi akan mengakibatkan spesies yang terancam diabaikan dari proteksi dan sebaliknya spesies yang keberadaannya tidak terancam justru mendapatkan proteksi (Frankham *et al.*, 2004 dalam Hartati, 2007).

Upaya untuk mengidentifikasi dan membedakan antara anggota dari *Saccharum complex* telah dilakukan sejak lama dengan metode tradisional yang mengkombinasikan sifat-sifat agronomi dan karakter morfologi (Artschwager dan Brandes, 1958; Skinner, 1972; Skinner *et al.*, 1987 dalam Alwala, 2006). Padahal penanda yang hanya berdasarkan karakter morfologi memiliki beberapa kelemahan sedangkan program pemuliaan jangka panjang yang memanfaatkan plasma nutfah untuk memperbaiki sifat-sifat agronomi dari kultivar-kultivar terpilih harus didasarkan pada perkiraan determinasi genetik yang lebih akurat, agar penentuan individu tanaman sebagai bahan dalam perbaikan genetik bisa dilakukan dengan tepat (Karsinah *et al.*, 2002). Penanda molekuler, penanda yang dapat memberikan informasi yang relatif lebih akurat karena sifat genetik cenderung stabil (Julisaniah *et al.*, 2008).

Grivet *et al.*(2006) mengungkapkan bahwa dari hasil penelitian-penelitian molekuler sebelumnya dengan analisis RFLP seperti yang dilakukan Lu *et al.*(1994) menempatkan *S.officinarum* berkerabat sangat dekat dengan *S.robustum*, *S.edule* berkerabat dekat dengan *S.robustum* (Tidak dipublikasikan) dan diduga *S.edule* merupakan klon dari *S.robustum* yang bermutasi. Penelitian yang dilakukan Sobral *et al.*(1994) dengan analisis kloroplas dan Alix *et al.*(1998,1999) dengan analisis nuclear repeated sequences menunjukkan bahwa *Saccharum* lebih berkerabat dekat dengan *Miscanthus* dari pada *Erianthus*. Brandes (1956) dalam Grivet *et al.*(2006) menyimpulkan dari penelitiannya yang juga menggunakan penanda molekuler bahwa

S.officinarum merupakan hasil domestifikasi dari *S.robustum*, seperti yang terdapat di Papua Nugini, sedangkan *S.barberi* dan *S.sinensis* dihasilkan dari persilangan interspesifik antara *S.officinarum* dan *S.spontanuem*, sedangkan *S.edule* merupakan hasil mutasi dari *S.robustum*.



Gambar 1. Skenario dari evolusi dan domestikasi dari tanaman tebu yang berdasarkan analisis penanda molekuler menurut Brandes (1956) dalam Grivet *et al.* (2006).

2.5 Identifikasi Keragaman Genetik

Keragaman genetik dapat diidentifikasi menggunakan beberapa macam teknik antara lain melalui penanda morfologi, penanda biokimia dan penanda molekuler.

2.5.1 Penanda Morfologi

Penanda morfologi mudah diamati dengan mata telanjang dan telah banyak digunakan sejak masa awal genetika, karena penanda ini sangat sederhana, murah dan mudah dalam pelaksanaannya. Penanda ini memiliki kelemahan yaitu dipengaruhi oleh kondisi lingkungan sehingga mengurangi keakuratan (Kumaunang *et al.*, 2006). Data morfologi telah banyak digunakan oleh lembaga-lembaga penelitian tebu di bidang pemuliaan tanaman untuk identifikasi varietas. Saat ini keberadaan dan manfaat penanda morfologi masih terbatas pada pemberian informasi tentang kemiripan atau perbedaan antar varietas, padahal informasi genetik yang lebih mendasar disamping identifikasi tersebut juga diperlukan. Informasi tentang

hubungan kekerabatan genetik antar varietas yang bisa digunakan sebagai acuan dalam memilih calon tetua persilangan (Lamadji, 1998). Penelitian yang dilakukan Tjatjo *et al.* (2008) untuk mendapatkan tanaman kakao yang toleran hama penggerek buah ialah melakukan upaya awal melalui analisis keragaman morfologi buah kakao dengan mengidentifikasi morfologi, sifat serta hasil buah kakao, sehingga dapat memberi acuan gambaran ketahanan tanaman terhadap hama penggerek buah.

2.5.2 Penanda Biokimia

Penanda biokimia, seperti isozim menambah macam marka kualitatif. Selain kurang dipengaruhi oleh kondisi pertumbuhan tanaman seperti karakter kuantitatif, marka ini relatif murah dalam pelaksanaannya dan cepat. Meskipun penanda ini telah banyak digunakan dalam analisis genetik tanaman, namun dalam perkembangannya penanda isozim masih sangat terbatas jumlahnya. Selain itu, beberapa sistem enzim tertentu dipengaruhi oleh regulasi perkembangan jaringan, yaitu hanya mengekspresikan suatu sifat pada jaringan tertentu. Kedua faktor tersebut merupakan kendala utama penggunaan penanda isozim dalam mengeksplorasi potensi genetik tanaman (Azrai, 2005). Pabendon (2004) menambahkan, penanda biokimia kadang-kadang tidak menunjukkan perbedaan yang nyata diantara genotip-genotip yang diuji.

2.5.3 Penanda Molekuler

Pada awal tahun 1980-an ditemukan teknologi molekuler yang berbasis pada DNA. Penanda molekuler tersebut dapat menutupi kekurangan dari penanda isozim, karena jumlah yang tidak terbatas dan dapat melingkupi seluruh genom tanaman, tidak dipengaruhi oleh regulasi perkembangan jaringan, sehingga dapat dideteksi pada seluruh jaringan (Azrai, 2005). Srivastava dan Prashant (2008) menambahkan, penanda molekuler berbasis DNA mampu mendeteksi keragaman genetik pada tingkat resolusi yang lebih tinggi dari pada metode lain. Selain itu, dengan penanda ini informasi dapat diperoleh dari sampel tanaman dalam jumlah yang sedikit pada tiap tahap perkembangan dan tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Kelebihan lainnya ialah memungkinkan untuk dapat menyimpulkan secara langsung mengenai keragaman genetik dan hubungan kekerabatan pada level DNA. Ukuran keragaman genetik yang biasanya digunakan pada penanda molekuler yaitu: (1) polimorfisme, menggambarkan proporsi variasi alel dari semua lokus gen;

dan (2) heterosigositas rata-rata (h), menggambarkan proporsi dari semua lokus gen yang heterosigot dalam populasi yang dijadikan sampel (Lowe *et al.*, 2004).

Kekurangan dari penggunaan penanda molekuler ialah membutuhkan biaya yang cukup mahal dan laboran yang terlatih (Brown *et al.*, 2007). Varshney *et al.*, (2007) menyatakan, macam penanda molekuler berbasis DNA yaitu (1) *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (RAPD); (2) *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP); (3) *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), (4) *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), dan (5) *Simple Sequence Repeat* (SSR) atau dikenal juga dengan mikrosatelit.

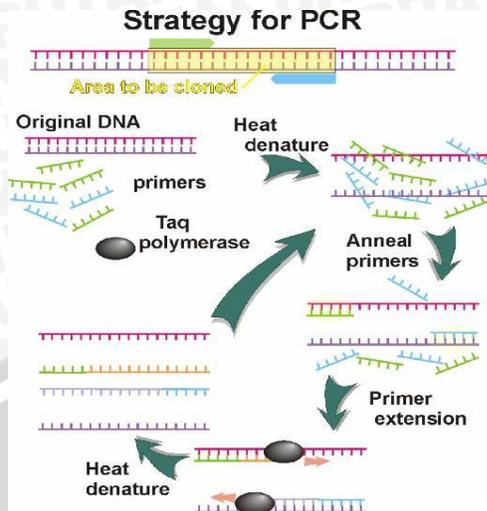
2.5.3.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Reaksi berantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ialah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan sekuens nukleotida tertentu secara *in vitro*. Setiap urutan basa nukleotida yang diamplifikasi secara eksponensial akan menjadi dua kali jumlahnya (2^n , n adalah jumlah siklus). Metode ini pertama kali dikembangkan oleh Kary B. Mullis pada tahun 1985. Kelebihan metode PCR dapat melipatgandakan fragmen DNA secara cepat dan komponen yang dibutuhkan jumlahnya sangat sedikit (Yuwono, 2006).

Empat komponen utama pada proses PCR adalah (1) DNA *template*, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan; (2) primer, yaitu suatu sekuens oligonukleotida pendek (15-25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA; (3) deoksiribonukleotida (dNTP), terdiri atas dATP, dCTP, dGTP dan dTTP; (4) *Taq* DNA polimerase, yaitu enzim yang tahan terhadap suhu tinggi dan mampu menggabungkan nukleotida mencapai 150 nukleotida per detik per molekul enzim. Komponen lain yang juga penting adalah senyawa buffer (ion magnesium ($MgCl_2$) yang mempengaruhi aktivitas *Taq* DNA polimerase) (Yuwono, 2006).

PCR terdiri dari tiga tahapan yang berurutan, yaitu reaksi denaturasi, penempelan (*annealing*) dan pemanjangan (*elongation*) (Gambar 2). (1) Tahap denaturasi. Reaksi pelipatgandaan suatu fragmen DNA diawali dengan melakukan denaturasi dengan DNA *template*, sehingga rantai DNA yang berantai ganda (*double stranded*) akan terpisah menjadi rantai tunggal (*single stranded*). Denaturasi DNA

dilakukan dengan menggunakan panas 94°C selama 1-2 menit (Yuwono, 2006). Menurut Watson *et.al.*, (1988), DNA untai ganda dapat terbuka menjadi untai-untai komplementernya jika dikenai suhu yang mendekati titik didih. (2) Tahap penempelan (*Annealing*). Pada tahap ini terjadi pencarian urutan basa komplementer oleh primer pada DNA template sampai primer menemukan urutan basa komplementer yang sesuai dengan basa-basa yang terdapat pada primer. Pada annealing terjadi penurunan suhu agar primer mampu melakukan penempelan pada DNA template yang spesifik sampai membentuk gabungan yang stabil dengan pita tunggal DNA dan mengandung primer untuk mensintesis DNA baru dengan bantuan taq polymerase (Promega, 1996). Kusumawaty (1999) menambahkan, biasanya suhu diturunkan menjadi 37°C - 60°C (tergantung primer yang digunakan) menyebabkan penempelan suatu primer pada *template* yang telah terpisah menjadi rantai tunggal. Yuwono (2006) menambahkan, primer akan membentuk jembatan hidrogen dengan *template* pada daerah sekuen yang komplementer dengan sekuen primer. Amplifikasi akan lebih efisien bila suhu penempelan dilakukan pada suhu rendah (37°C), tetapi biasanya terjadi *mispriming* yaitu penempelan primer pada tempat yang salah. Sedangkan, pada suhu sekitar 55°C akan dihasilkan amplifikasi produk yang mempunyai spesifisitas yang tinggi namun efisiensinya menurun. (3) Tahap pemanjangan (*Elongation*). Menurut Arnheim dan Levenson (1990), pada tahap ekstensi terjadi pemanjangan primer dengan ditambahkan dNTP dengan bantuan enzim DNA taq polymerase sampai terbentuk rantai DNA baru yang komplementer dengan rantai DNA yang lama. Menurut Hoffman (2002), temperatur DNA Taq polymerase menjadi aktif antara 70°C - 75°C .



Gambar 2. Tahapan reaksi PCR
(Anonymous, 2006)

2.5.3.2 Penanda RAPD

Prinsip kerja penanda RAPD adalah berdasarkan perbedaan amplifikasi PCR pada sampel DNA dari sekuen oligonukleotida pendek yang secara genetik merupakan kelompok penanda dominan. Primer RAPD bersifat random dengan ukuran panjang biasanya 10 nukleotida. Jumlah produk amplifikasi PCR berhubungan langsung dengan jumlah dan orientasi sekuen yang komplementer terhadap primer di dalam genom tanaman (Azrai, 2005).

Penanda RAPD merupakan teknik yang lebih cepat, lebih mudah dan lebih murah dibandingkan dengan RFLP dan AFLP, sehingga RAPD layak digunakan dalam suatu analisis yang menggunakan jumlah sampel cukup besar dan dimanfaatkan dalam upaya pemuliaan tanaman. Kelemahan dari penanda ini, individu yang homositot dan heterositot tidak dapat dibedakan (Julisaniah *et al.*, 2008). Kelemahan lainnya, jumlah pola pita yang dihasilkan dengan penanda ini lebih sedikit bila dibanding dengan RFLP atau AFLP. Biasanya sebanyak 50 - 100 pola pita teramplifikasi pada AFLP yang hasilnya divisualisasikan pada denaturing polyacrylamide gel, sedangkan pada RAPD jumlah pita yang teramplifikasi hanya sedikit (kurang dari 20 pola pita), dan visualisasi dapat dilakukan pada agarose gel. Jadi, tiap penanda tidak hanya berbeda dalam metode amplifikasinya tetapi juga berbeda dalam jumlah pola pita yang dihasilkan (teramplifikasi) (Wahyuni *et al.*, 2004).

2.5.3.3 Penanda AFLP

Penanda AFLP merupakan jenis penanda yang berdasarkan pada amplifikasi selektif dari potongan DNA hasil restriksi genomik total dengan enzim restriksi endonuklease. Hasil amplifikasi tersebut dipisahkan dengan elektroforesis, kemudian divisualisasi dengan menggunakan pewarnaan perak (silver staining). Sebenarnya penanda ini mirip penanda RAPD, tetapi primernya spesifik dan jumlah pitanya lebih banyak.

Keunggulan penanda AFLP, antara lain (1) tidak memerlukan informasi sekuen dari genom dan perangkat oligonukleotida yang sama ketika dilakukan analisis dan dapat diaplikasikan pada semua spesies tanaman; (2) hasil amplifikasinya stabil, tingkat pengulangan dan variabilitasnya sangat tinggi; (3) memiliki efisiensi yang sangat tinggi dalam pemetaan lokus, karena sekali amplifikasi dapat meliputi beberapa lokus; (4) dapat digunakan untuk menganalisis sidik jari semua DNA dengan mengabaikan kompleksitas dan asal usulnya. Kelemahan dari penanda AFLP adalah cara aplikasinya relatif lebih rumit, sehingga memerlukan waktu lebih lama, keterampilan khusus, serta pengadaan alat dan bahan sangat mahal. Selain itu, sulitnya membedakan intensitas pita antara dominan homozigot dan heterozigot (Azrai, 2005).

2.5.3.4 Penanda RFLP

Penanda RFLP didefinisikan sebagai suatu kombinasi dari probe enzim spesifik (Azrai, 2005). Penanda RFLP dapat menghasilkan polimorfisme yang tinggi, namun teknologi ini sangat mahal, memerlukan waktu lama, memerlukan *probe* (DNA pelacak), bahan radioaktif dan keahlian pelaksananya (Karsinah *et al.*, 2002). Selain itu, penanda ini memiliki keterbatasan jika digunakan sebagai alat bantu seleksi. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor, di antaranya (1) pada beberapa spesies tingkat polimorfisme DNA-nya sangat rendah, (2) menyita banyak tenaga dan waktu, (3) kuantitas dan kualitas DNA yang diperlukan sangat tinggi, (4) prosedur rumit, dan (5) memerlukan pustaka probe untuk spesies-spesies tanaman yang belum pernah dieksplorasi sebelumnya (Azrai, 2005).

2.5.3.5 Penanda Molekuler Mikrosatelit (SSR)

Mikrosatelit merupakan penanda yang berkembang lebih akhir dibanding RAPD dan RFLP dan dapat pula digunakan untuk mempelajari keragaman genetik pada tanaman. Mikrosatelit sering disebut dengan *simple sequence repeat* (SSR) yaitu berupa pengulangan mono, di, atau trinucleotida yang biasanya terdiri atas 4 - 10 unit pengulangan, membentang pada utas DNA. Susunan basa yang demikian merupakan karakteristik dari nuklear genom dan bervariasi antar spesies atau populasi. Penanda mikrosatelit dalam mendeteksi genetik polymorphisme tanpa perlu lebih dahulu mengetahui susunan basa (*sequence*) dari genomik tanaman diantara susunan basa yang berulang, asal susunan basa berulang tersebut mewakili secara luas dan menyebar di seluruh genom (Wahyuni *et al.*, 2004). Setiap spesies biasanya memiliki ciri khas dalam pengulangan sekuen sederhana ini. Secara umum sekuen AT paling banyak terdapat pada tanaman sedangkan AC/TG pada hewan (Morgante dan Olivieri, 1993 dalam Prasetyono dan Tasilah, 2003). Motif lain yang juga banyak didapatkan di dalam genom tanaman adalah (GA)_n; (AAG)_n dan (AAT)_n. Sedangkan, motif (CA)_n banyak didapatkan pada mamalia, namun motif ini sangat sedikit ditemukan dalam genom tanaman. Beberapa peneliti melaporkan bahwa sekuen mikrosatelit banyak ditemukan pada (1) ORF (*Open Reading Frame*) atau tempat membukanya rantai DNA, (2) bagian utas 3' dan 5' yang tidak ditranslasikan, (3) intron-intron, dan (4) bagian antar gen (Prasetyono dan Tasilah, 2004).

Perbedaan jumlah sekuen mikrosatelit menjadi dasar analisis polimorfisme dalam suatu genom organism. Polimorfisme digunakan untuk mendeteksi perbedaan antar individu. Primer yang dibuat terdiri dari primer kiri dan kanan yang dipakai tiuntuk mengamplifikasi sekuen mikrosatelit yang terdapat diantara kedua primer tersebut. Primer yang didesain untuk mendeteksi sekuen mikrosatelit merupakan primer spesifik yang hanya akan mendeteksi sekuen tersebut. Untuk menghindari kesalahan dalam amplifikasi sekuen mikrosatelit dalam DNA, suhu penempelan primer (annealing) dalam proses PCR biasanya menggunakan suhu yang tinggi berkisar antara 50-60°C tergantung pola nukleotida yang dibuat (Prasetyono dan Tasilah, 2004).

Beberapa pertimbangan untuk penggunaan penanda mikrosatelit dalam studi genetik di antaranya (1) penanda terdistribusi secara melimpah dan merata dalam

genom, variabilitasnya sangat tinggi (banyak alel dalam lokus), sifatnya kodominan dan lokasi genom dapat diketahui; (2) merupakan alat uji yang memiliki reproduksibilitas dan ketepatan yang sangat tinggi; (3) merupakan alat bantu yang sangat akurat untuk membedakan genotipe, evaluasi kemurnian benih, pemetaan, dan seleksi genotip untuk karakter yang diinginkan; (4) studi genetika populasi dan analisis diversitas genetik (Azrai, 2005). Susilo (2007) menambahkan, aplikasi teknik mikrosatelit lebih cepat prosesnya dengan jumlah sampel yang lebih banyak, serta materi yang dibutuhkan untuk analisa lebih sedikit.

Mikrosatelit merupakan salah satu dari penanda berbasis PCR, sehingga juga memerlukan primer. Disamping beberapa kelebihan yang ada, penanda ini juga memiliki kelemahan antara lain pembuatan primernya memerlukan investasi yang besar dan primer mikrosatelit bersifat spesifik spesies (sukar dipertukarkan antar spesies) (Anonymous, 2009^b). Selain itu Widyasari (2004) menambahkan, kelemahan dari penanda ini yaitu (1) perancangan primer yang spesifik untuk mencari lokus mikrosatelit memakan waktu yang lama, pekerjaannya cukup rumit dan biaya yang besar, (2) terkadang membutuhkan radioisotop untuk mendeteksi hasil amplifikasi lokus mikrosatelit. Namun, hal tersebut dapat diatasi dengan cara memanfaatkan primer yang telah ditemukan oleh peneliti lain pada penelitian sebelumnya. Penanda ini telah banyak digunakan dalam penelitian keragaman genetik tanaman seperti pada tanaman tebu (Pan *et al.*, 2003; Srivastava *et al.*, 2008; Parida *et al.*, 2009), serta tanaman lainnya seperti jagung (Ruswadi *et al.*, 2005), kakao (Susilo, 2007), dan barley (Guasmi *et al.*, 2008).

2.6 Analisis Pengelompokan dan Macam Koefisien Kemiripan Genetik

Analisis pengelompokan merupakan suatu metode untuk mengelompokkan suatu populasi individu ke dalam beberapa kelompok sehingga individu-individu dalam kelompok yang satu lebih homogen dibandingkan individu-individu dalam kelompok yang lain. Kriteria pengelompokan didasarkan pada ukuran keserupaan yang berupa kemiripan genetik (*genetic similarity*). Pengelompokan yang ditampilkan dalam bentuk diagram pohon dapat dibuat dengan dua pendekatan, yaitu *phenetic* dan *cladistic*. Pendekatan *phenetic* berdasarkan kemiripan individu tanpa memperhatikan hubungan evolusinya sedangkan *cladistic* membangun diagram pohon

dengan memperhatikan jalur evolusi atau silsilahnya (Nei,1987 dalam Roslim *et al.*,2003).

Unweighted Pair Group Method with Arithmetic (UPGMA) merupakan salah satu metode pengelompokan suatu populasi menjadi diagram pohon yang paling sederhana dengan tampilan paling baik dan mendekati kebenaran. Prosedur meratakan jarak genetik dalam UPGMA menurunkan efek kesalahan dalam memperkirakan panjang percabangan, sehingga besarnya kemiripan genetik antar individu dapat diketahui langsung pada diagram pohon yang dihasilkan (Roslim *et al.*, 2003).

Memilih metode kemiripan genetik sangat penting untuk memperkirakan tingkat keterkaitan antara kultivar. Kemiripan genetik antara kultivar diperkirakan antara lain dengan *Dice*, *Jaccard*, dan *Simple Matching* (SM). Beberapa penelitian yang menggunakan metode *Dice* antara lain penelitian analisis kekerabatan antar genus angrek berdasarkan data fenotip dan pola pita DNA (Kartianingrum *et al.*, 2002); kekerabatan antar jahe merah, jahe emprit dan jahe besar dengan ISSR (Wahyuni *et al.*, 2004). Penelitian yang menggunakan metode *Jaccard* dilakukan oleh Widyasari *et al.*(2008) untuk identifikasi keragaman genetik koleksi tebu asli (*Saccharum officinarum* L.) menggunakan mikrosatelit; Cordeiro *et al.*(2003) untuk mengetahui keragaman genetik diantara anggota *Saccharum*. Sedangkan, penelitian yang menggunakan *Simple Matching* dilakukan oleh Lamadji (1998) tentang pemberdayaan sifat morfologi untuk analisis kekerabatan plasma nutfah tebu.

Koefisien kemiripan seperti koefisien *Jaccard* dan *Dice* didasarkan pada perbandingan antara munculnya *band* atau karakter yang sama pada 2 individu (ditandai dengan angka 1-1 dalam suatu data matriks), *band* atau karakter yang berbeda pada 2 individu (ditandai dengan angka 1- 0 atau 0-1), sedangkan koefisien lain seperti koefisien *Simple Matching* juga mempertimbangkan terjadinya nol (ditandai dengan angka 0-0 dalam suatu data matriks) dimana 0 menandakan karakter yang sama – sama tidak dimiliki atau tidak tampak pada kedua individu yang dibandingkan. Tabel 3 dibawah ini menunjukkan macam koefisien yang umum digunakan.

Tabel 3. Macam koefisien kemiripan (Dalirsefat *et al.*, 2009)

Coefficients	Similarity expression	Source
Simple matching (SM)	$\frac{a+d}{a+b+c+d}$	Sokal and Michener, 1958
Jaccard (J)	$\frac{a}{a+b+c}$	Jaccard, 1901
Sorensen-Dice (SD)	$\frac{2a}{2a+b+c}$	Sorensen,1948; Dice, 1945

Keterangan: a= 1-1 ; b=1-0 ; c= 0-1 dan d= 0-0

Balestre *et.al.* (2008) menambahkan, ada perbedaan kualitatif yang signifikan antara koefisien kemiripan *Simple matching* dengan *Jaccard* dan *Dice*, yaitu pada koefisien *Simple matching* menyertakan nilai 0-0 (karakter yang tidak tampak pada dua individu) dan nilai 1-1 (karakter yang sama tampak pada dua individu) sebagai faktor yang berkontribusi untuk kemiripan antara dua individu. Berbeda dengan koefisien *Jaccard* yang hanya mempertimbangkan nilai 1-1 sebagai faktor yang berkontribusi terhadap kemiripan individu dan mengabaikan nilai 0-0. Koefisien kemiripan *Dice* juga mengabaikan nilai 0-0 dan disamping itu berbeda secara kuantitatif dengan *Jaccard*. Pada koefisien kemiripan *Dice*, nilai 1-1 (a) merupakan faktor yang dianggap sangat mempengaruhi nilai kemiripan antar dua individu dibandingkan dengan nilai 1-0 (b) atau 0-1 (c), sehingga nilai (a) pada *Jaccard* menjadi (2a) pada koefisien *Dice*.



3. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di kebun koleksi (pengambilan sampel) dan di Laboratorium Bioteknologi, Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P3GI) Pasuruan, Jawa Timur mulai bulan Juni sampai September 2010.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian yaitu: alat tulis, penggaris, lup kamera, microwave, mortar dan pestle, timbangan analitik, mesin centrifuge, mesin PCR, stirer, autoclave, pipet, vortex, mikropipet, spektrofotometer, gunting, gelas ukur, UV transiluminator, mikrotube steril, labu ukur, mesin elektroforesis, timer, sarung tangan, dan mesin pendingin.

Tabel 4. Klon-klon tebu yang digunakan pada penelitian

No.	Nama Klon	Spesies	Asal	Tahun Ekspedisi
1.	IS 76-202	<i>Erianthus</i>	Sulawesi	1976
2.	IS 76-205	<i>Erianthus</i>	Sulawesi	1976
3.	IK 76-149	<i>Erianthus</i>	Kalimantan	1976
4.	IK 76-150	<i>Erianthus</i>	Kalimantan	1976
5.	IK 76-153	<i>Erianthus</i>	Kalimantan	1976
6.	IJ 76-374	<i>Erianthus</i>	Irian Jaya	1976
7.	IJ 76-375	<i>Erianthus</i>	Irian Jaya	1976
8.	IJ 76-370	<i>Erianthus</i>	Irian Jaya	1976
9.	IJ 76-348	<i>Erianthus</i>	Irian Jaya	1976
10.	IJ 76-396	<i>Erianthus</i>	Irian Jaya	1976
11.	M 442-51	<i>Saccharum</i> spp. Hybrids	B37172 X M213-40	*)
12.	PS-862	<i>Saccharum</i> spp. Hybrids	POJ 2722 (polycross)	*)
13.	TD 50	<i>S.officinarum</i>	Jawa	*)
14.	TD 53	<i>S.officinarum</i>	Jawa	*)
15.	15 OC 18	<i>S.sinense</i>	*)	1915
16.	15 OC 19	<i>S.sinense</i>	*)	1915
17.	IK76-36	<i>S.spontaneum</i>	Kalimantan	1976
18.	IK76-41	<i>S.spontaneum</i>	Kalimantan	1976
19.	IS 76-175	<i>Miscanthus</i>	Sulawesi	1976
20.	IS 76-181	<i>Miscanthus</i>	Sulawesi	1976
21.	IJ 76-412	<i>S.robustum</i>	Irian Jaya	1976
22.	IJ 76-415	<i>S.robustum</i>	Irian Jaya	1976
23.	X OC 55	<i>S.barberi</i>	*)	1921
24.	X OC 56	<i>S.barberi</i>	*)	1925

Keterangan : *) Tidak terdokumentasi

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah 24 klon tebu seperti yang disajikan pada Tabel 4 dan bahan kimia yang digunakan antara lain buffer ekstraksi (NaCl, Tris HCl pH 7,5, EDTA), CTAB, Natrium Bisulfate, Nitrogen cair, Etidium Bromide, agarose, NaOAc, larutan TE steril, dH₂O, buffer 10x, MgCl₂, primer, Taq polymerase, etanol, dNTP mix, chloroform, template DNA, nuclease free water, aquabides steril, TAE, larutan pencuci (wash 1) dan larutan pencuci 2 (wash 2).

Primer mikrosatelit yang digunakan pada penelitian ini sebanyak tiga macam primer yang diperoleh dari Konsorsium Mikrosatelit Tebu Internasional. Alasan penggunaan primer tersebut karena pada penelitian sebelumnya telah dilakukan pengujian terhadap primer-primer tersebut dan dipilih yang mempunyai tingkat polimorfisme yang tinggi untuk digunakan pada penelitian ini. Macam primer tersebut disajikan pada Tabel 5.

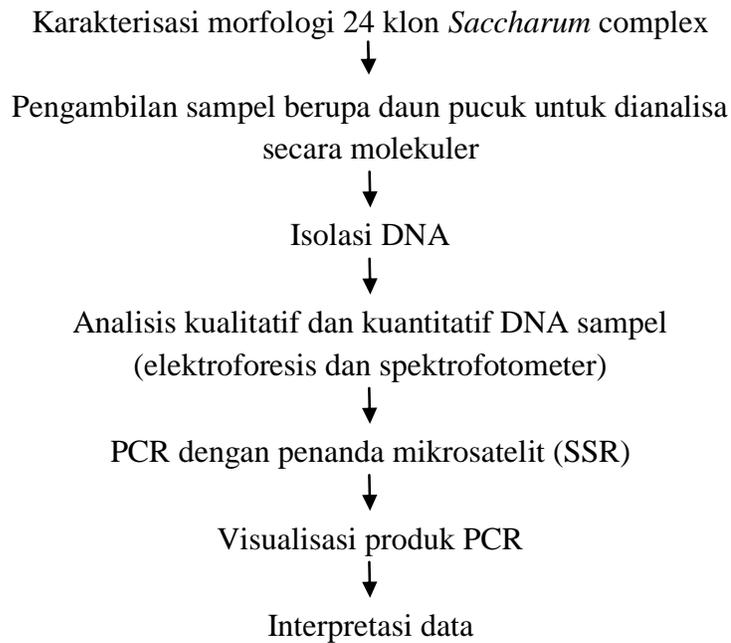
Tabel 5. Tiga macam primer mikrosatelit yang digunakan pada penelitian

No.	Primer	SSR Sequence
1.	MCSA053C10	(CAG) ₅
2.	SMC1047HA	(GA) ₂₆
3.	mSSCIR5	(GGC) ₉

Sumber: Corderio *et al.*(2003); Pan (2006)

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini termasuk jenis penelitian observasional dan eksperimental karena melakukan rangkaian kegiatan meliputi pengamatan 37 karakter morfologi pada 24 klon tebu di kebun koleksi P3GI, pengumpulan data untuk diskoring, serta analisis molekuler mulai dari isolasi DNA, analisis kualitatif dan kuantitatif DNA dengan elektroforesis dan spektrofotometer, sampai tahap aplikasi PCR. Berikut ini disajikan diagram alir dari tahapan pelaksanaan yang dilakukan selama penelitian (Gambar 3).



Gambar 3. Diagram alir dari tahapan penelitian

3.4 Pelaksanaan

3.4.1 Karakterisasi Morfologi

Karakterisasi sifat morfologi pada 24 klon koleksi *Saccharum complex* dilakukan secara langsung di kebun koleksi P3GI pada waktu tanaman berumur ± 7 bulan. Di kebun koleksi, tiap klon ditanam pada 2 juring, tiap juring terdiri dari 10 tanaman. Sampel diambil secara acak sebanyak 10 batang tiap klon dari 2 juring. Sifat morfologi yang diamati meliputi tiga organ utama yaitu daun, batang dan mata tunas. Pedoman yang digunakan untuk identifikasi varietas tebu berdasarkan Sastrowijono (1996). Karakter morfologi yang diamati sebagai berikut (Tabel 6).

Tabel 6. Karakter morfologi untuk identifikasi varietas tebu (Sastrowijono,1996)

Kode	Karakter Morfologi	Deskripsi
D1	Lengkung helai daun	A. Tegak B. Melengkung $<1/2$ C. Melengkung $\geq 1/2$
D2	Warna daun	A. Hijau B. Hijau tua C. Hijau kekuningan
D3	Ukuran lebar daun	A. Sempit ($<4\text{cm}$) B. Sedang ($4-6\text{cm}$) C. Lebar ($>6\text{cm}$)
D4	Kedudukan telinga daun	A. Tegak B. Serong C. Tidak bertelinga
D5	Tinggi telinga daun	A. Tinggi 1 cm B. $>1- <3\text{cm}$ C. $\geq 3\text{cm}$ D. Tidak bertelinga
D6	Warna sendi segitiga	A. Hijau kekuningan B. Hijau kecoklatan C. Hijau kuning kecoklatan D. Hijau E. Lainnya:....
P1	Bidang punggung	A. Tidak ada B. Jarang C. Lebat
P2	Panjang bidang punggung	A. Tidak mencapai puncak pelepah B. Hampir mencapai ($\leq 1\text{cm}$) puncak pelepah C. Mencapai puncak pelepah D. Tidak ada
P3	Lebar bidang punggung	A. Sempit ($<1/4$ lebar pelepah) B. Lebar ($\geq 1/4$ lebar pelepah) C. Tidak ada
P4	Kedudukan bidang punggung	A. Rebah B. Condong C. Tegak D. Tidak ada
P5	Lapisan lilin pelepah	A. Sedikit B. Sedang C. Banyak
P6	Sifat lepas pelepah	A. Sukar B. Agak mudah C. Mudah
P7	Warna pelepah	A. Hijau tua B. Hijau kekuningan C. Hijau kuning keunguan D. Hijau kuning kemerahan E. Lainnya
R1	Warna ruas	A. Hijau kekuningan B. Hijau

		<ul style="list-style-type: none"> C. Hijau kuning kecoklatan D. Hijau kuning keunguan E. Hijau kuning kemerahan F. Lainnya:...
R2	Lapisan lilin ruas	<ul style="list-style-type: none"> A. Tidak ada B. Tipis C. Sedang D. Tebal
R3	Susunan ruas	<ul style="list-style-type: none"> A. Lurus B. Berbiku
R4	Bentuk ruas	<ul style="list-style-type: none"> A. Silindris B. Tong C. Kumparan D. Konis E. Konis terbalik F. Cembung-cekung
R5	Noda gabus	<ul style="list-style-type: none"> A. Tidak ada B. Sedikit C. Banyak
R6	Retakan gabus	<ul style="list-style-type: none"> A. Tidak ada B. Sedikit C. Banyak
R7	Retakan tumbuh	<ul style="list-style-type: none"> A. Tidak ada B. Jarang C. Hampir di seluruh ruas
R8	Penampang melintang ruas	<ul style="list-style-type: none"> A. Bulat B. Pipih
R9	Alur mata	<ul style="list-style-type: none"> A. Tidak ada B. Dangkal C. Dalam
R10	Lebar alur mata	<ul style="list-style-type: none"> A. Tidak ada B. Sempit C. Lebar
R11	Panjang alur mata	<ul style="list-style-type: none"> A. Tidak ada B. Tidak mencapai tengah ruas C. Mencapai tengah ruas
B1	Letak cincin tumbuh	<ul style="list-style-type: none"> A. Di atas puncak mata B. Menyinggung puncak mata C. Di belakang puncak mata D. Dibawah puncak mata
B2	Bentuk cincin tumbuh	<ul style="list-style-type: none"> A. Melingkar datar B. Melengkung
B3	Jumlah mata akar	<ul style="list-style-type: none"> A. 1 baris B. 2-3 baris C. 3-4 baris D. >4baris
B4	Bentuk buku ruas	<ul style="list-style-type: none"> A. Silindris B. Konis C. Konis terbalik D. Tong

		E. Kumparan
M1	Kedudukan mata	A. Pada bekas pangkal pelepah daun B. Di atas bekas pangkal pelepah daun
M2	Bentuk mata	A. Bulat B. Bulat panjang C. Bulat telur D. Bulat telur terbalik E. Segitiga
M3	Bagian terlebar mata	A. Di bawah tengah-tengah mata B. Pada tengah-tengah mata C. Di atas tengah-tengah mata
M4	Ukuran sayap mata	A. Sama lebar B. Basis sempit C. Basis lebar
M5	Pusat tumbuh	A. Di bawah tengah mata B. Pada tengah mata C. Di atas tengah mata D. Di puncak mata
M6	Rambut tepi basal	A. Tidak ada B. Ada
M7	Rambut jambul	A. Tidak ada B. Ada
M8	Ukuran mata	A. Kecil B. Sedang C. Besar
M9	Tepi sayap mata	A. Rata B. Bergerigi C. Puncak berlekuk

3.4.2 Karakterisasi Molekuler

Karakterisasi secara molekuler diawali dengan cara mengambil sampel berupa helai daun pucuk dari klon yang diuji di kebun koleksi. Pemilihan tersebut didasarkan pada pernyataan Prana dan Hartati (2003) bahwa daun pucuk yang masih muda kandungan polisakaridanya lebih rendah sehingga dapat meminimalisir kontaminasi saat ekstraksi DNA serta dengan menggunakan daun yang masih muda dapat memudahkan dalam proses destruksi atau penghancuran sel. Sampel daun tersebut dibungkus dalam kantong kertas kemudian segera dikirim ke laboratorium untuk dilakukan pengamatan secara molekuler. Prosedur yang dilakukan sebagai berikut:

1. Isolasi DNA

Isolasi DNA adalah serangkaian proses untuk memisahkan DNA dari komponen sel lainnya. Metode yang digunakan ialah metode CIMMYT Laboratorium (Modifikasi 2). Metode ini mengikuti prosedur Sanghai-Marroof *et al.* (1984) dengan menggunakan modifikasi didalamnya. Modifikasi dilakukan dengan cara mengurangi satu siklus untuk presipitasi. DNA dipresipitasi tanpa didiamkan semalam pada suhu ruang tetapi cukup didiamkan selama 60 menit dalam suhu -20°C. Metode ini telah digunakan dalam penelitian molekuler tanaman tebu oleh Alix *et al.* (1998) dan Handayani (2008), dengan urutan sebagai berikut:

1. Sampel berupa daun tebu sebanyak 0,3 gram dihaluskan pada mortar dengan ditambahkan nitrogen cair sampai menjadi powder.
2. Sampel dimasukkan ke dalam mikrotube steril dan ditambahkan buffer ekstraksi CTAB sebanyak 3x berat sampel yang bertujuan untuk mendegradasi membran sel sehingga organel didalamnya dapat keluar dari sel dan mengikat DNA.
3. Larutan diinkubasi dalam waterbath pada suhu 65°C selama 60 menit dengan dibolak-balik setiap 15 menit, kemudian didinginkan 5 menit.
4. Ditambahkan larutan CIA (Chloroform isoamylalcohol) sebanyak 250µl dan dihomogenkan dengan vortex selama 1 menit yang berfungsi untuk memisahkan protein dari DNA.
5. Larutan disentrifuge selama 10 menit pada suhu 15°C dengan kecepatan 7500 rpm untuk memisahkan fase cair (supernatan) dan fase organik.

6. Supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam mikrotube steril yang baru, kemudian ditambahkan isopropanol dingin sebanyak volume supernatan (1:1) dan dibolak-balik secara perlahan hingga DNA terpresipitasi (mengendap).
7. DNA diinkubasi dalam freezer (-20°C) selama 60 menit.
8. DNA selanjutnya disentrifuge pada 7500 rpm dengan suhu 4°C selama 8 menit.
9. Supernatan dibuang dan hanya menyisakan DNA.
10. Tambahkan H₂O 300 µl untuk melarutkan dan kemudian tambahkan juga etanol dingin (2,5 x volume H₂O). Menurut Hays (2007), pemberian etanol menyebabkan DNA akan terurai dan terpresipitasi sehingga mudah dibedakan dari komponen sel lain yang tidak terlarut dalam etanol.
11. Setelah tampak gumpalan seperti lendir, buang etanol tersebut dan sisakan DNA nya saja.
12. DNA selanjutnya dicuci dengan larutan Wash 1 dan Wash 2, masing-masing sebanyak 500µl selama 30 menit.
13. DNA pellet tersebut dikeringanginkan selama 20 menit, lalu ditambahkan buffer TE sebanyak 100 µl.
14. DNA pellet yang diperoleh disimpan dalam lemari pendingin -20 °C sampai pada saat digunakan untuk meminimalkan terjadinya degradasi DNA.

2. Analisis DNA

Analisis DNA secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan mesin spektrofotometer untuk mengetahui seberapa besar konsentrasi DNA yang diisolasi serta tingkat kemurniannya. Kemurnian DNA dapat diketahui berdasarkan hasil bagi nilai absorbansi λ260 nm dengan absorbansi λ280 nm. DNA dikatakan murni jika memiliki nilai perbandingan sebesar 1,8. Berikut ialah alur pelaksanaan untuk menganalisis DNA secara kuantitatif (Sambrook, 1989):

1. Kuvert quart diisi dengan H₂O sebanyak 3000 µl sebagai larutan blanko.
2. Larutan blanko (H₂O) yang digunakan sebagai kontrol harus menunjukkan nilai konsentrasi DNA sama dengan nol pada λ260 nm.
3. Larutan blanko kemudian diganti dengan larutan DNA sampel, dengan cara larutan DNA sebanyak 10µl dimasukkan dalam kuvert yang telah berisi 2990µl larutan blanko (H₂O), yang kemudian dihomogenkan. Dengan alat spektrofotometer, dapat diketahui nilai absorbansi pada λ260nm dan λ280nm. Konsentrasi DNA dihitung dengan rumus:

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

50 µg/ml merupakan faktor konversi dari nilai absorbansi 260=1 sehingga konsentrasi DNA berarti 50 µg/m. Faktor pengenceran merupakan nilai perbandingan antara volume akhir larutan dengan volume DNA yang digunakan.

3. Aplikasi PCR

Aplikasi PCR dilakukan dengan menggunakan mesin “thermocycler” dengan program *Gene Amp PCR system 2400* yang dikeluarkan PCR PERKIN ELMER. Komponen reaksi PCR yang dibutuhkan yaitu: buffer PCR, MgCl₂, dNTP mix, Taq DNA polymerase, template DNA, primer, dan nuclease free water. Setiap tabung PCR berisi 25µl total volume. Komponen reaksi PCR ditunjukkan pada Tabel 7 berikut ini:

Tabel 7. Komponen reaksi PCR

No.	Komponen	Konsentrasi awal	Konsentrasi akhir	Volume untuk 1xR
1.	Buffer PCR	5x	1x	5
2.	MgCl ₂	25mM	1,5mM	1,5
3.	dNTPmix	10mM	0,2mM/25µl	0,5
4.	Taq DNA Polymerase	5u	1,25u/25µl	0,25
5.	Template DNA	0,2µg/µl	0,7µg/25µl	3,5
6.	Primer forward	25µM	1 µM	1
7.	Primer reverse	25µM	1 µM	1
8.	Nuclease Free Water	-	-	12,25
Volume total (µl)				25

Prosedur yang dilakukan sebagai berikut:

1. $MgCl_2$, buffer PCR, template DNA, dNTP mix dan primer diletakkan ke dalam parutan es batu.
2. DNA template dimasukkan ke dalam tube PCR, lalu diflash.
3. Membuat PCR mix, yang terdiri dari $MgCl_2$, dNTP mix, buffer PCR, primer, dan Taq DNA polymerase, masing-masing dimasukkan ke dalam tube PCR, lalu divorteks.
4. Tube PCR dimasukkan ke dalam mesin PCR dan diatur programnya yang meliputi suhu dan waktu dari tahap denaturasi, annealing dan elongation. Program reaksi PCR dari tiga pasang primer disajikan pada Tabel 8.

Tabel 8. Program reaksi PCR pada tiga pasang primer

No.	Primer	Program reaksi
1.	mSSCIR5	Pre Denaturasi : 95°C : 5' Denaturasi : 94°C : 30'' Annealing : 68°C : 30'' Elongation : 72°C : 30'' Post elongation : 72°C : 2' } 35 siklus
2.	MCSA053C10	Pre Denaturasi : 95°C : 5' Denaturasi : 94°C : 30'' Annealing : 57°C : 30'' Elongation : 72°C : 30'' Post elongation : 72°C : 2' } 35 siklus
3.	SMC1047HA	Pre Denaturasi : 94°C : 2' Denaturasi : 94°C : 45'' Annealing* : 48°C : 1' (* 1°C per siklus) Elongation : 72°C : 1' Denaturasi : 94°C : 1'30'' Annealing : 55°C : 1' Elongation : 72°C : 1' Post elongation : 72°C : 1' } 5 siklus } 35 siklus

4. Visualisasi DNA hasil isolasi dan PCR

Elektroforesis dilakukan untuk mengetahui kualitas hasil isolasi DNA dan hasil amplifikasi DNA dengan PCR. Peralatan elektroforesis menggunakan produk Biorad. Prosedur yang dilakukan ialah sebagai berikut (Sambrook, 1989):

1. Membuat gel agarose (0,8% agarose untuk analisis kualitas DNA sedangkan 1,5% untuk mengetahui amplifikasi PCR) dan dicampurkan dengan TAE 1x.
2. Dihomogenkan dalam microwave sampai mencair penuh. Setelah didinginkan ± 1 menit, gel tersebut dituang dalam plate yang telah dipasang sisir dan dibiarkan sampai mengeras (± 60 menit).
3. Gel yang telah mengeras diletakkan pada perangkat elektroforesis dan direndam dengan TAE 1x.
4. Larutan DNA dan loading dye (Glyserol 90%, EDTA 0,5 M, Bromophenol Blue) dicampur dan dimasukkan kedalam sumur yang sebelumnya telah terendam larutan buffer TAE 1x. Untuk mengetahui kualitas isolasi DNA, 5 μ l larutan DNA dicampur dengan 2 μ l loading dye; sedangkan untuk mengetahui hasil PCR, masing-masing sumur diisi 10 μ l produk PCR.
5. Perangkat elektroforesis dihubungkan dengan sumber tegangan 50 volt (running) selama ± 1 jam untuk analisis kualitas DNA maupun untuk mengetahui produk PCR.
6. Hasil elektroforesis (gel) direndam dalam EtBr (Ethidium Bromide) selama ± 15 menit untuk hasil isolasi DNA dan ± 45 menit untuk produk PCR, kemudian dibilas dengan H₂O beberapa kali.
7. Gel tersebut divisualisasi dengan UV transluminator dan didokumentasikan dengan Gel doc XR merk Biorad.
8. Dokumentasi produk PCR tersebut digunakan untuk mengidentifikasi produk amplifikasi berdasarkan ukuran pita dalam pasangan basa (pb) untuk setiap primer yang digunakan. Berat molekul pita DNA hasil amplifikasi diduga dengan menggunakan DNA standart 100 bp DNA ladder (Fermentas) dan 1 kb DNA ladder (Promega).

3.5 Intrepretasi Data

Data dari analisis molekuler yang berupa pita DNA hasil amplifikasi diintrepretasikan sebagai data kualitatif yang kemudian disajikan dalam bentuk data biner yang dilihat dari kehadiran pita DNA. Adanya pita DNA ditandai dengan angka 1 sedangkan tidak adanya pita ditandai dengan angka 0 pada satu posisi larik yang sama. Seperti pada penelitian Pan (2006), pita-pita yang dihasilkan melalui penanda mikrosatelit ditandai dengan angka 1 dan 0 dan disajikan dalam bentuk data biner.

Data hasil pengamatan morfologi juga ditransfer ke dalam bentuk data biner, angka 1 untuk sifat yang tampak dan angka 0 untuk sifat yang tidak tampak. Penelitian Lamadji (1998) mengenai analisis kekerabatan plasmanutfah tebu berdasarkan sifat morfologi dan Tjatjo *et al.* (2008) mengenai analisis keragaman morfologi buah kakao juga membuat data biner dari hasil pengamatan karakter morfologi.

Data biner digunakan untuk mengetahui nilai kemiripan genetik dan menyusun dendogram. Koefisien kemiripan genetik yang digunakan untuk penanda morfologi ialah koefisien kemiripan Simple Matching sedangkan untuk penanda molekuler menggunakan koefisien kemiripan Jaccard.

Penyusunan dendrogram menggunakan metode kluster *Unweighted Pair Group Method with Mean Arithmetic* (UPGMA) dengan program *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* (NTSYS-PC-2.02i) seperti pada penelitian Schenk *et al.*(2004); Alwala *et al.*(2006); dan Parida *et al.*(2009). Rancangan dendogram dibuat berdasarkan pengamatan morfologi dan molekuler. Rancangan dendogram dari hasil pengamatan molekuler dibuat untuk masing-masing primer dan juga dibuat dendrogram gabungan.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Penanda Morfologi

Pengamatan karakter morfologi dilakukan secara langsung pada tanaman tebu di kebun koleksi P3GI. Tanaman yang diamati berumur ± 7 bulan, dipilih yang sehat bebas dari serangan hama dan penyakit. Pengamatan dilakukan pada pagi hari sekitar pukul 07.00-10.00 WIB. Hasil pengamatan morfologi pada 37 karakter kualitatif dari 24 klon tebu *Saccharum complex* disajikan pada Lampiran 3.

Data hasil pengamatan tersebut menunjukkan bahwa antar 24 klon *Saccharum complex* memiliki persamaan maupun perbedaan karakter morfologi. Karakter morfologi yang sebagian besar menjadi kemiripan pada 24 klon yang diamati meliputi lengkung helai daun (D1), warna daun (D2), kedudukan telinga daun (D4), tinggi telinga daun (D5), warna sendi segitiga (D6), warna sendi segitiga (P2), panjang bidang punggung (P2), lebar bidang punggung (P3), kedudukan bidang punggung (P4), lapisan lilin pelepah (P5), sifat lepas pelepah (P6), warna ruas (R1), bentuk ruas (R4), noda gabus (R5), retakan gabus (R6), retakan tumbuh (R7), penampang melintang batang (R8), alur mata (R9), lebar alur mata (R10), panjang alur mata (R11), letak cincin tumbuh (B1), bentuk cincin tumbuh (B2), kedudukan mata (M1), bentuk mata (M2), bagian terlebar mata (M3), pusat tumbuh (M5), rambut tepi basal (M6), rambut jambul (M7), ukuran mata (M8) dan tepi sayap mata (M9).

Karakter yang menjadi kemiripan antar klon dalam genus *Erianthus* meliputi:

1. Bagian daun: lengkung helai daun (D1) melengkung $\geq 1/2$; warna daun (D2) hijau; telinga daun (D4, D5) tidak bertelinga; bidang punggung (P1, P2, P3, P4) tidak ada; lapisan lilin pelepah (P5) banyak; sifat lepas pelepah (P6) sukar.
2. Bagian ruas: warna ruas (R1) hijau kekuningan; susunan ruas (R3) lurus; bentuk ruas (R4) silindris, noda gabus (R5) tidak ada; retakan gabus (R6) tidak ada; retakan tumbuh (R7) tidak ada; penampang melintang batang (R8) pipih; alur mata (R9, R10, R11) tidak ada; letak cincin tumbuh (B1) di belakang puncak mata; bentuk cincin tumbuh (B2) melingkar datar; jumlah mata akar (B3) satu baris.

3. Bagian mata tunas: kedudukan mata (M1) pada bekas pangkal mata; bentuk mata (M2) bulat panjang; bagian terlebar mata (M3) dibawah tengah mata; pusat tumbuh (M5) diatas tengah mata; rambut tepi basal (M6) ada; rambut jambul (M7) tidak ada; ukuran mata (M8) besar dan tepi sayap mata (M9) rata.

Klon-klon dalam spesies anggota genus *Saccharum* memiliki beberapa kemiripan karakter morfologi. Dua klon *Saccharum officinarum* (TD50 dan TD53) memiliki kemiripan sebanyak 27 karakter, dua klon *Saccharum sinense* (15OC18 dan 15OC19) memiliki kemiripan sebanyak 31 karakter, dua klon *Saccharum spontaneum* (IK76-36 dan IK76-41) memiliki kemiripan sebanyak 33 karakter, dua klon *Saccharum barberi* (XOC55 dan XOC56) dan dua klon *Saccharum robustum* (IJ76-412 dan IJ76-415) masing-masing memiliki kemiripan sebanyak 17 karakter. Karakter yang menjadi kemiripan disajikan sebagai berikut:

1. *Saccharum officinarum* (TD50 dan TD53)

Bagian daun meliputi warna daun (D2) hijau tua; telinga daun (D4, D5) tidak bertelinga; bidang punggung (P1, P2, P3, P4) tidak ada; lapisan lilin pelepah (P5) banyak; warna pelepah (P7) hijau kuning kemerahan.

Bagian ruas meliputi warna ruas (R1) hijau kekuningan; lapisan lilin ruas (R2) tebal; susunan ruas (R3) berbiku; bentuk ruas (R4) silindris; retakan tumbuh (R7) hampir di seluruh ruas; penampang melintang ruas (R8) bulat; alur mata (R9, R10, R11) tidak ada; letak cincin tumbuh (B1) menyinggung puncak mata; bentuk cincin tumbuh (B2) melingkar datar; jumlah mata akar (B3) 2-3 baris.

Bagian mata tunas meliputi kedudukan mata (M1) pada bekas pangkal mata; bagian terlebar mata (M3) pada tengah mata; pusat tumbuh (M5) diatas tengah mata; rambut tepi basal (M6) tidak ada; rambut jambul (M7) tidak ada; dan tepi sayap mata (M9) rata.

2. *Saccharum sinense* (15OC18 dan 15OC19)

Bagian daun meliputi warna daun (D2) hijau tua; telinga daun (D4;D5) tidak bertelinga; warna sendi segitiga (D6) hijau kekuningan; bidang punggung (P1) jarang; panjang bidang punggung (P2) tidak mencapai puncak pelepah; lebar bidang punggung (P3) sempit ($< \frac{1}{4}$ lebar pelepah); kedudukan bidang punggung

(P4) rebah; lapisan lilin pelepah (P5) banyak; sifat lepas pelepah (P6) agak mudah.

Bagian ruas meliputi warna ruas (R1) hijau kekuningan; lapisan lilin ruas (R2) sedang; susunan ruas (R3) berbiku; bentuk ruas (R4) konis; noda gabus (R5) tidak ada; retakan gabus (R6) tidak ada; retakan tumbuh (R7) tidak ada; penampang melintang ruas (R8) bulat; alur mata (R9;R10;R11) tidak ada; bentuk cincin tumbuh (B2) melingkar datar; jumlah mata akar (B3) 2-3 baris.

Bagian mata tunas meliputi kedudukan mata (M1) pada bekas pangkal mata; bentuk mata (M2) bulat telur; bagian terlebar mata (M3) pada tengaxh mata; ukuran sayap mata (M4) sama lebar; pusat tumbuh (M5) diatas tengah mata; rambut tepi basal (M6) ada; ukuran mata (M8) besar; tepi sayap mata (M9) rata.

3. *Saccharum spontaneum* (IK76-36 dan IK76-41)

Bagian daun meliputi warna daun (D2) hijau; ukuran lebar daun (D3) sempit (<4cm); telinga daun (D4, D5) tidak ada; warna sendi segitiga (D6) hijau kekuningan; bidang punggung (P1,P2,P3,P4) tidak ada; lapisan lilin pelepah (P5) sedikit; sifat lepas pelepah (P6) mudah; warna pelepah (P7) hijau kuning kemerahan.

Bagian ruas meliputi warna ruas (R1) hijau kekuningan; susunan ruas (R3) berbiku; noda gabus (R5) tidak ada; retakan gabus (R6) tidak ada; retakan tumbuh (R7) tidak ada; penampang melintang ruas (R8) bulat; alur mata (R9;R10;R11) tidak ada; letak cincin tumbuh (B1) dibelakang puncak mata; bentuk cincin tumbuh (B2) melingkar data; jumlah mata akar (B3) satu baris; bentuk buku ruas (B4) konis terbalik.

Bagian mata tunas meliputi kedudukan mata (M1) pada bekas pangkal mata; bentuk mata (M2) bulat telur; bagian terlebar mata (M3) pada tengah mata; ukuran sayap mata (M4) sama lebar; pusat tumbuh (M5) diatas tengah mata; rambut tepi basal (M6) ada; ukuran mata (M8) besar; tepi sayap mata (M9) rata.

4. *Saccharum barberi* (XOC55 dan XOC56)

Bagian daun meliputi lengkung helai daun (D1) melengkung $\leq 1/2$; warna daun (D2) hijau; warna sendi segitiga (D6) hijau kekuningan, lapisan lilin pelepah (P5) sedikit.

Bagian ruas meliputi lapisan lilin ruas (R2) banyak; susunan ruas (R3) berbiku; noda gabus (R5) tidak ada; retakan tumbuh (R7) tidak ada; bentuk cincin tumbuh (B2) melingkar datar; jumlah mata akar (B3) 2-3 baris.

Bagian mata ruas meliputi kedudukan mata (M1) pada bekas pelepah daun; bagian terlebar mata (M3) pada mata; pusat tumbuh (M5) di atas tengah mata; rambut tepi basal (M6) ada; rambut jambul (M7) tidak ada; ukuran mata (M8) kecil; tepi sayap mata (M9) rata.

5. *Saccharum robustum* (IJ76-412 dan IJ76-415)

Bagian daun meliputi lengkung helai daun (D1) melengkung $\leq 1/2$; warna daun (D2) hijau; telinga daun (D5) tinggi 1; sifat lepas pelepah (P6) sukar.

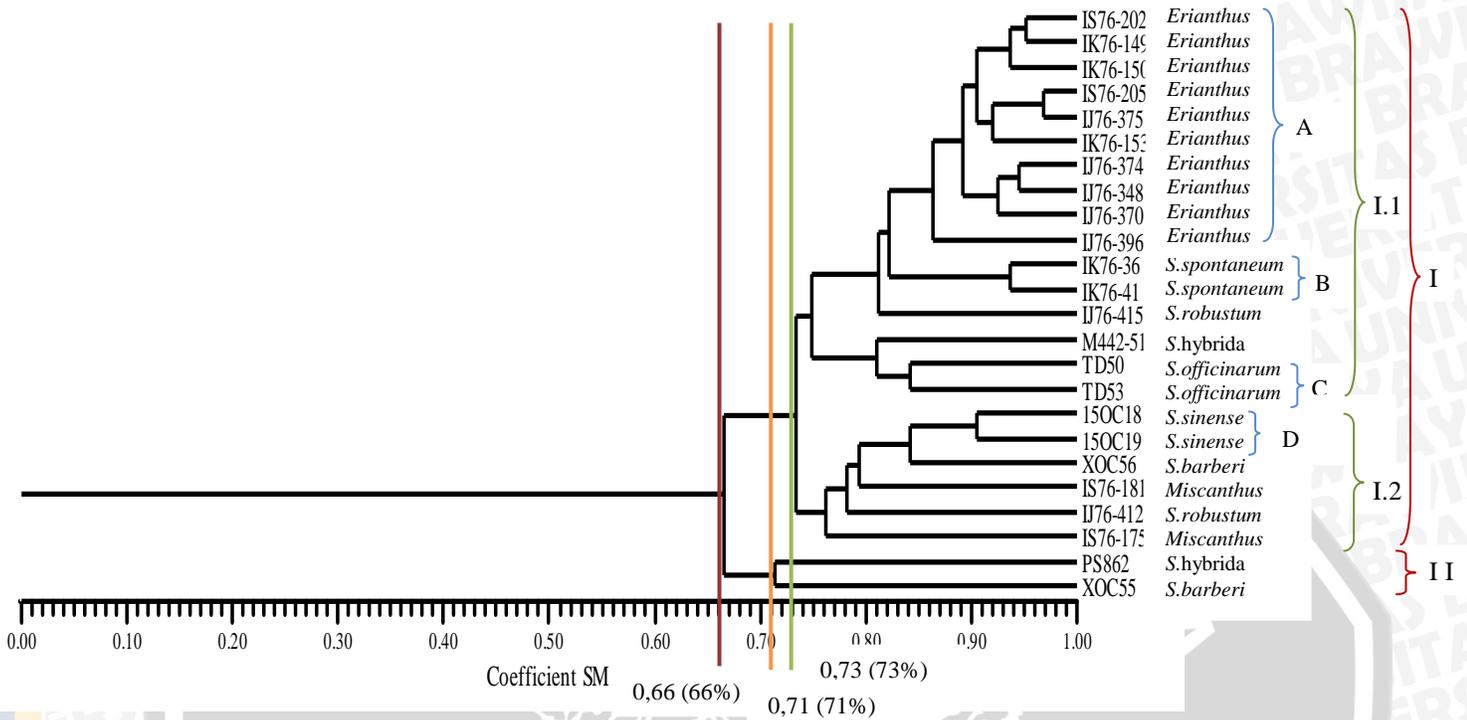
Bagian ruas meliputi warna ruas (R1) hijau kekuningan; susunan ruas (R3) lurus; noda gabus (R5) tidak ada; retakan gabus (R6) tidak ada; retakan tumbuh (R7) tidak ada; alur mata (R9;R10;R11) tidak ada; bentuk cincin tumbuh (B2) melingkar data; jumlah mata akar (B3) 2-3 baris.

Bagian mata ruas meliputi kedudukan mata (M1) pada bekas pelepah daun; bagian terlebar mata (M3) pada mata; pusat tumbuh (M5) di atas tengah mata; tepi sayap mata (M9) rata.

Karakter yang menjadi pembeda antara *Erianthus* dan *Saccharum* meliputi susunan ruas (R3) (*Erianthus* lurus, *Saccharum* berbiku); penampang melintang ruas (R8) (*Erianthus* pipih, *Saccharum* bulat); jumlah mata akar (B3) (*Erianthus* 1 baris, *Saccharum* 2-3 baris); dan bagian terlebar mata (M3) (*Erianthus* pada bawah tengah mata, *Saccharum* pada tengah mata).

Hasil karakterisasi morfologi ditransformasikan kedalam bentuk data biner (Lampiran 4) yang selanjutnya digunakan untuk membuat dendogram. Dendogram yang dihasilkan (Gambar 4) berdasarkan koefisien Simple Matching menunjukkan hubungan kekerabatan diantara 24 klon *Saccharum* complex terbagi menjadi 2 kelompok besar pada nilai kemiripan 0.66 (66%), yaitu kelompok pertama terdiri dari 22 klon dan kelompok kedua terdiri dari 2 klon saja yaitu PS862 (*S.hybrida*) dan XOC55 (anggota *Miscanthus*). Kelompok pertama terbagi menjadi dua subkelompok pada nilai kemiripan 0.73 (73%).

DENDOGRAM MORFOLOGI



Gambar 4. Dendrogram Morfologi dari 24 klon *Saccharum* complex berdasarkan koefisien Simple Matching

Pada nilai kesamaan 0.73 kelompok pertama terbagi menjadi dua subkelompok (1.1 dan 1.2). Masing-masing subkelompok terdiri dari klon-klon, dimana klon yang berasal dari jenis yang sama berada pada kelompok yang sama ditandai dengan huruf A,B,C dan seterusnya. Pada kesamaan 0.75 subkelompok 1.1 terdiri dari 16 klon yaitu: 10 klon *Erianthus* (IS76-202, IK76-149, IK76-150, IS76-205, IJ76-375, IK76-153, IJ76-374, IJ76-348, IJ76-370, IJ 76-396) {A}; 2 klon *Saccharum spontaneum* (IK76-36 dan IK76-41) {B}; 1 klon *Saccharum robustum* (IJ76-415); 1 klon *Saccharum hybrida* (M442-51); 2 klon *Saccharum officinarum* (TD50 dan TD 53) {C}. Pada kesamaan 0.76 subkelompok 1.2 terdiri dari 6 klon yaitu: 2 klon *Saccharum sinense* (15OC18 dan 15OC19) {D}; 1 klon *Saccharum barberi* (XOC56); 1 klon *Miscanthus* (IS76-181); terdiri dari 1 klon *Saccharum robustum* (IJ76-412); dan 1 klon *Miscanthus* (IS76-175). Pada nilai kesamaan 0.71 (71%) kelompok kedua terdiri dari dua klon yaitu: 1 klon *Saccharum* hybrid (PS862) dan 1 klon *Saccharum barberi* (XOC55).

Dendrogram berdasarkan penanda morfologi tersebut secara garis besar pengelompokannya cenderung menurut jenisnya. Berdasarkan nilai kemiripan genetik 73% 24 klon *Saccharum* complex terbagi menjadi kelompok-kelompok sesuai dengan jenisnya yaitu klon-klon jenis *Erianthus*, *S. spontaneum*, *S. officinarum* dan *S. sinense*. Sepuluh klon dari jenis *Erianthus* mengelompok dengan nilai kemiripan genetik 86% dan 2 klon dari jenis *S. spontaneum* mengelompok dengan nilai kemiripan genetik 94%, 2 klon dari jenis *S. officinarum* mengelompok pada tingkat kemiripan genetik 84%, 2 klon *S. sinense* mengelompok pada tingkat kemiripan genetik 90%. Ada beberapa klon yang awalnya diduga dari jenis yang sama, tetapi dari hasil penelitian ini antar klon tersebut memiliki nilai kemiripan genetik yang lebih rendah dibanding klon-klon lain yang mengelompok berdasarkan jenisnya. Klon-klon tersebut ialah XOC56 dan XOC55 dari jenis *S. barberi* yang nilai kemiripan genetiknya 68% dan IJ76-412 dan IJ76-415 dari *S. robustum* yang tingkat kemiripan genetiknya 69%.

Dari nilai kemiripan genetik dapat diketahui jarak genetik dan hubungan kekerabatan diantara klon-klon yang dibandingkan. Nilai kemiripan genetik berbanding terbalik dengan jarak genetik, semakin besar nilai kemiripan genetik antar klon, maka semakin kecil jarak genetiknya (Hartati, 2007). Jarak genetik dihitung dari selisih nilai persentase kemiripan genetik terhadap 100%. Korelasi nilai kemiripan genetik dengan hubungan kekerabatan diungkapkan Suharyanto (2002 dalam Hartati, 2007) bahwa semakin besar kemiripan genetik dan kenampakan fenotip, maka semakin dekat hubungan kekerabatan.

Berdasarkan Tabel 9 dan 10 dapat diketahui bahwa yang memiliki nilai kemiripan genetik terbesar ialah antara IK76-375 dan IK76-205 sebesar 0,9683 (97%) sedangkan jarak genetik antar dua klon tersebut sebesar 0,0317 yang berarti hubungan kekerabatan antar dua klon tersebut dekat. Hasil tersebut bisa terjadi karena IK76-375 dan IK76-205 termasuk dalam genus yang sama yaitu *Erianthus* dan berasal dari lokasi yang sama yaitu Kalimantan. Nilai kemiripan genetik yang terendah antara PS862 dan IJ76-396 yaitu 0.5714 (57%) dan jarak genetiknya sebesar 0,4286. PS862 termasuk *Saccharum* hybrida sedangkan IJ76-396 termasuk genus *Erianthus* sehingga hubungan kekerabatan diantara keduanya lebih jauh dibandingkan dengan klon lainnya.

Tabel 9. Nilai kemiripan genetik antar 24 klon *Saccharum complex* berdasarkan penanda morfologi

	IS76-202	IS76-205	IK76-149	IK76-150	IK76-153	IJ76-374	IJ76-375	IJ76-370	IJ76-348	IJ76-396	M442-51	PS862	TD50	TD53	150C18	150C19	IK76-36	IK76-41	IS76-175	IS76-181	IJ76-412	IJ76-415	XOC55	XOC56	
IS76-202	1.0000																								
IS76-205	0.9524	1.0000																							
IK76-149	0.9524	0.9206	1.0000																						
IK76-150	0.9206	0.9048	0.9524	1.0000																					
IK76-153	0.8889	0.9365	0.8571	0.9048	1.0000																				
IJ76-374	0.8889	0.8730	0.8730	0.8889	0.8730	1.0000																			
IJ76-375	0.9206	0.9683	0.9048	0.8889	0.9048	0.9048	1.0000																		
IJ76-370	0.9206	0.9048	0.9048	0.8889	0.8730	0.9365	0.9365	1.0000																	
IJ76-348	0.8810	0.8810	0.8651	0.8810	0.8968	0.9444	0.9127	0.9127	1.0000																
IJ76-396	0.8571	0.8254	0.8730	0.8730	0.8254	0.8730	0.8571	0.8889	0.8968	1.0000															
M442-51	0.7460	0.7778	0.7302	0.7302	0.7778	0.7460	0.7937	0.7302	0.7698	0.7302	1.0000														
PS862	0.6032	0.6032	0.5873	0.6032	0.5873	0.5873	0.6032	0.6032	0.6111	0.5714	0.6508	1.0000													
TD50	0.6825	0.6984	0.6667	0.6825	0.7302	0.7302	0.7143	0.7302	0.7381	0.6825	0.7937	0.6667	1.0000												
TD53	0.7778	0.7937	0.7619	0.7937	0.8095	0.7778	0.7778	0.7778	0.7857	0.6984	0.8254	0.6667	0.8413	1.0000											
150C18	0.7302	0.7778	0.7143	0.7302	0.7460	0.6984	0.7778	0.7460	0.7063	0.6667	0.7302	0.7143	0.6984	0.7778	1.0000										
150C19	0.7143	0.7302	0.7143	0.7302	0.7143	0.7143	0.7460	0.7619	0.7222	0.6825	0.7460	0.6825	0.7302	0.7937	0.9048	1.0000									
IK76-36	0.7937	0.8095	0.7778	0.8095	0.8571	0.7937	0.8095	0.8413	0.8175	0.7619	0.7619	0.6825	0.7619	0.8413	0.7460	0.7619	1.0000								
IK76-41	0.8254	0.8730	0.8095	0.8254	0.8730	0.8095	0.8730	0.8730	0.8333	0.7778	0.7778	0.6984	0.7778	0.8095	0.7778	0.7619	0.9365	1.0000							
IS76-175	0.7302	0.7302	0.7302	0.7460	0.7778	0.7460	0.7302	0.7143	0.7540	0.6825	0.6667	0.6032	0.5873	0.6984	0.7778	0.7778	0.7143	0.6667	1.0000						
IS76-181	0.7460	0.7460	0.7302	0.7778	0.7619	0.7460	0.7619	0.7460	0.7540	0.7143	0.6984	0.6825	0.6667	0.6984	0.7778	0.7937	0.7937	0.7619	0.7778	1.0000					
IJ76-412	0.6984	0.7143	0.6825	0.7143	0.7302	0.7302	0.7460	0.7143	0.7540	0.6825	0.7619	0.7778	0.6984	0.7778	0.7460	0.7778	0.7460	0.7143	0.7143	0.7778	1.0000				
IJ76-415	0.8571	0.8254	0.8571	0.8571	0.8095	0.7937	0.8095	0.8254	0.8016	0.7778	0.7302	0.6349	0.6667	0.7302	0.7460	0.7460	0.7619	0.7619	0.7460	0.6984	0.6984	1.0000			
XOC55	0.6667	0.6667	0.6508	0.6825	0.6825	0.6825	0.6825	0.7302	0.6905	0.6825	0.6825	0.7143	0.6984	0.7143	0.6349	0.6984	0.7619	0.7302	0.6190	0.6984	0.6984	0.7143	1.0000		
XOC56	0.7778	0.7619	0.7619	0.7937	0.7460	0.7460	0.7619	0.7937	0.7381	0.7302	0.6825	0.7302	0.7143	0.7619	0.8571	0.8254	0.7778	0.7778	0.7619	0.8095	0.8254	0.7302	0.6825	1.0000	

Tabel 10. Nilai jarak genetik antar 24 klon *Saccharum complex* berdasarkan penanda morfologi

	IS76-202	IS76-205	IK76-149	IK76-150	IK76-153	IJ76-374	IJ76-375	IJ76-370	IJ76-348	IJ76-396	M442-51	PS862	TD50	TD53	150C18	150C19	IK76-36	IK76-41	IS76-175	IS76-181	IJ76-412	IJ76-415	XOC55	XOC56
IS76-202	0,0000																							
IS76-205	0,0476	0,0000																						
IK76-149	0,0476	0,0794	0,0000																					
IK76-150	0,0794	0,0952	0,0476	0,0000																				
IK76-153	0,1111	0,0635	0,1429	0,0952	0,0000																			
IJ76-374	0,1111	0,1270	0,1270	0,1111	0,1270	0,0000																		
IJ76-375	0,0794	0,0317	0,0952	0,1111	0,0952	0,0952	0,0000																	
IJ76-370	0,0794	0,0952	0,0952	0,1111	0,1270	0,0635	0,0635	0,0000																
IJ76-348	0,1190	0,1190	0,1349	0,1190	0,1032	0,0556	0,0873	0,0873	0,0000															
IJ76-396	0,1429	0,1746	0,1270	0,1270	0,1746	0,1270	0,1429	0,1111	0,1032	0,0000														
M442-51	0,2540	0,2222	0,2698	0,2698	0,2222	0,2540	0,2063	0,2698	0,2302	0,2698	0,0000													
PS862	0,3968	0,3968	0,4127	0,3968	0,4127	0,4127	0,3968	0,3968	0,3889	0,4286	0,3492	0,0000												
TD50	0,3175	0,3016	0,3333	0,3175	0,2698	0,2698	0,2857	0,2698	0,2619	0,3175	0,2063	0,3333	0,0000											
TD53	0,2222	0,2063	0,2381	0,2063	0,1905	0,2222	0,2222	0,2222	0,2143	0,3016	0,1746	0,3333	0,1587	0,0000										
150C18	0,2698	0,2222	0,2857	0,2698	0,2540	0,3016	0,2222	0,2540	0,2937	0,3333	0,2698	0,2857	0,3016	0,2222	0,0000									
150C19	0,2857	0,2698	0,2857	0,2698	0,2857	0,2857	0,2540	0,2381	0,2778	0,3175	0,2540	0,3175	0,2698	0,2063	0,0952	0,0000								
IK76-36	0,2063	0,1905	0,2222	0,1905	0,1429	0,2063	0,1905	0,1587	0,1825	0,2381	0,2381	0,3175	0,2381	0,1587	0,2540	0,2381	0,0000							
IK76-41	0,1746	0,1270	0,1905	0,1746	0,1270	0,1905	0,1270	0,1270	0,1667	0,2222	0,2222	0,3016	0,2222	0,1905	0,2222	0,2381	0,0635	0,0000						
IS76-175	0,2698	0,2698	0,2698	0,2540	0,2222	0,2540	0,2698	0,2857	0,2460	0,3175	0,3333	0,3968	0,4127	0,3016	0,2222	0,2222	0,2857	0,3333	0,0000					
IS76-181	0,2540	0,2540	0,2698	0,2222	0,2381	0,2540	0,2381	0,2540	0,2460	0,2857	0,3016	0,3175	0,3333	0,3016	0,2222	0,2063	0,2063	0,2381	0,2222	0,0000				
IJ76-412	0,3016	0,2857	0,3175	0,2857	0,2698	0,2698	0,2540	0,2857	0,2460	0,3175	0,2381	0,2222	0,3016	0,2222	0,2540	0,2222	0,2540	0,2857	0,2857	0,2222	0,0000			
IJ76-415	0,1429	0,1746	0,1429	0,1429	0,1905	0,2063	0,1905	0,1746	0,1984	0,2222	0,2698	0,3651	0,3333	0,2698	0,2540	0,2540	0,2381	0,2381	0,2540	0,3016	0,3016	0,0000		
XOC55	0,3333	0,3333	0,3492	0,3175	0,3175	0,3175	0,3175	0,2698	0,3095	0,3175	0,3175	0,2857	0,3016	0,2857	0,3651	0,3016	0,2381	0,2698	0,3810	0,3016	0,3016	0,2857	0,0000	
XOC56	0,2222	0,2381	0,2381	0,2063	0,2540	0,2540	0,2381	0,2063	0,2619	0,2698	0,3175	0,2698	0,2857	0,2381	0,1429	0,1746	0,2222	0,2222	0,2381	0,1905	0,1746	0,2698	0,3175	0,0000

4.1.2 Penanda Molekuler

4.1.2.1 Isolasi DNA

Isolasi DNA yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan metode CIMMYT Laboratorium (Modifikasi 2). Metode ini mengikuti prosedur Saghai-Marooof *et al.*(1984) dengan modifikasi mengurangi satu siklus untuk presipitasi. Hasil isolasi DNA dari 24 klon dianalisis kuantitatif dan kualitatifnya. DNA yang terkontaminasi protein memiliki rasio $<1,8$ dan DNA yang terkontaminasi RNA rasionya $>2,0$, DNA dikatakan murni jika rasionya antara 1,8-2,0 (CIMMYT,2005).

Hasil analisis kuantitatif dengan spektrofotometer menunjukkan rasio DNA dari 24 klon berkisar antara 1,423 - 2,000. Ada 13 sampel DNA yang diduga terkontaminasi protein sedangkan 11 sampel DNA lainnya murni dan tidak ada DNA yang terkontaminasi RNA. Beberapa hal yang mungkin menjadi penyebab kontaminasi adalah proses isolasi yang kurang sempurna, seperti kesalahan dalam teknik pengambilan fase cair (supernatan) sehingga masih terkontaminasi oleh fase organik (tumpukan sisa dinding sel dan organela lainnya) (Muladno,2002). Kemungkinan lainnya, kontaminasi protein bisa disebabkan kloroform yang kurang maksimal. Pada penelitian ini pemberian CIA sebanyak 250 μ l sedangkan pada penelitian Herison *et al.*(2003) menggunakan CIA sebanyak 500 μ l dan dapat menghasilkan kemurnian DNA sampel yang sempurna.

DNA sampel dianalisis lebih lanjut secara visual dengan elektroforesis dan hasilnya menunjukkan bahwa DNA sampel yang memiliki sedikit fragmen *smear* yaitu IS76-181, IJ76-415 dan 15OC18, sedangkan pada sampel M442-51 dan PS862 ada indikasi kontaminasi RNA. Hasil elektroforesis tersebut menunjukkan sebagian besar kualitas DNA yang dihasilkan masih layak untuk digunakan pada analisis selanjutnya, karena meskipun DNA terkontaminasi proses reaksi PCR tidak akan memperbanyak kontaminannya, baik protein maupun RNA (Kusumawaty, 1996 *dalam* Widayarsi dan Sugiyarta, 2008).

4.1.2.2 Analisis Kuantitatif DNA

Analisis kuantitatif pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian dari DNA sampel hasil isolasi. Hasil pengukuran disajikan pada Tabel 11.

Berdasarkan hasil analisis kuantitatif dengan spektrofotometer diketahui bahwa dari 24 klon yang diisolasi DNANYa, diperoleh 11 DNA sampel yang tergolong murni yaitu berada pada kisaran rasio 1,8-2,0. Sampel yang memiliki tingkat rasio tertinggi yaitu IK76-36 sebesar 2,000 dan yang terendah yaitu IJ76-396 sebesar 1,423. Sampel dengan rasio terendah juga digunakan untuk analisis, seperti Widyasari (2008) tetap melakukan analisis PCR dengan nilai kemurnian DNA-nya sebesar 1,031 dan hasilnya menunjukkan DNA sampel tersebut tetap teramplifikasi dengan baik.

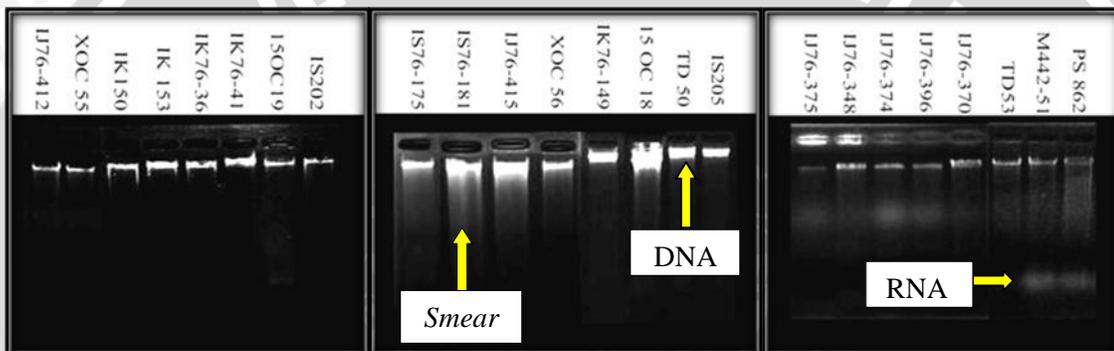
Spektrofotometer dapat menunjukkan konsentrasi DNA sampel hasil isolasi. Nilai konsentrasi dari 24 klon berkisar antara 0,240 µg/µl sampai 2,670 µg/µl. Klon yang memiliki nilai konsentrasi tertinggi yaitu IJ76-374 sedangkan yang memiliki konsentrasi terendah yaitu IK76-153.

Tabel 11. Hasil pengukuran kuantitas DNA sampel

No	Klon	Jenis	Nilai absorbansi		Rasio W11/W12	[DNA] (µg/µl)
			W11 (λ ₂₆₀)	W12 (λ ₂₈₀)		
1.	IK76-36	<i>S.spontaneum</i>	0,034	0,017	2,000	0,510
2.	IK76-41	<i>S.spontaneum</i>	0,031	0,016	1,937	0,465
3.	IK 76-149	<i>Erianthus</i>	0,019	0,010	1,900	0,285
4.	IK 76-150	<i>Erianthus</i>	0,019	0,011	1,727	0,285
5.	IK 76-153	<i>Erianthus</i>	0,016	0,009	1,778	0,240
6.	IS 76-202	<i>Erianthus</i>	0,018	0,011	1,636	0,270
7.	IS 76-205	<i>Erianthus</i>	0,043	0,024	1,792	0,645
8.	15 OC 18	<i>S.sinense</i>	0,035	0,020	1,750	0,525
9.	15 OC 19	<i>S.sinense</i>	0,030	0,016	1,875	0,450
10.	IJ 76-412	<i>S.robustum</i>	0,018	0,011	1,636	0,270
11.	IJ 76-415	<i>S.robustum</i>	0,036	0,020	1,800	0,540
12.	TD 50	<i>S.officinarum</i>	0,050	0,026	1,923	0,750
13.	TD 53	<i>S.officinarum</i>	0,025	0,014	1,786	0,375
14.	IJ 76-375	<i>Erianthus</i>	0,098	0,068	1,441	1,470
15.	IJ 76-374	<i>Erianthus</i>	0,178	0,098	1,816	2,670
16.	IJ 76-370	<i>Erianthus</i>	0,049	0,030	1,633	0,735
17.	IJ 76-396	<i>Erianthus</i>	0,121	0,085	1,423	1,815
18.	IJ 76-348	<i>Erianthus</i>	0,116	0,077	1,506	1,740
19.	X OC 55	<i>S.barberi</i>	0,026	0,017	1,529	0,390
20.	X OC 56	<i>S.barberi</i>	0,032	0,017	1,882	0,480
21.	IS 76-175	<i>Miscanthus</i>	0,038	0,020	1,900	0,570
22.	IS 76-181	<i>Miscanthus</i>	0,021	0,014	1,500	0,315
23.	M 442-51	<i>Saccharum</i> spp. Hybrids	0,039	0,021	1,857	0,585
24.	PS-862	<i>Saccharum</i> spp. Hybrids	0,026	0,014	1,857	0,390

4.1.2.3 Analisis Kualitatif DNA

Analisis kualitatif dilakukan dengan menggunakan elektroforesis. Prinsip elektroforesis ialah DNA yang bermuatan negatif akan bergerak ke elektroda positif saat arus mengalir, DNA akan melewati pori-pori gel agarose. Weaver (2002) menambahkan, DNA bermuatan negatif karena kandungan fosfatnya, yang akan bermigrasi ke arah elektroda positif. Pada penelitian ini DNA sampel hasil isolasi dielektroforesis dengan agarose 0,8% dalam buffer TAE 1x dengan tegangan 50V selama ± 1 jam. Menurut Fegan (1995), elektroforesis dengan gel agarose merupakan metode standar yang digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan mengetahui kemurnian DNA. Visualisasi hasil elektroforesis disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Visualisasi elektroforesis hasil isolasi DNA

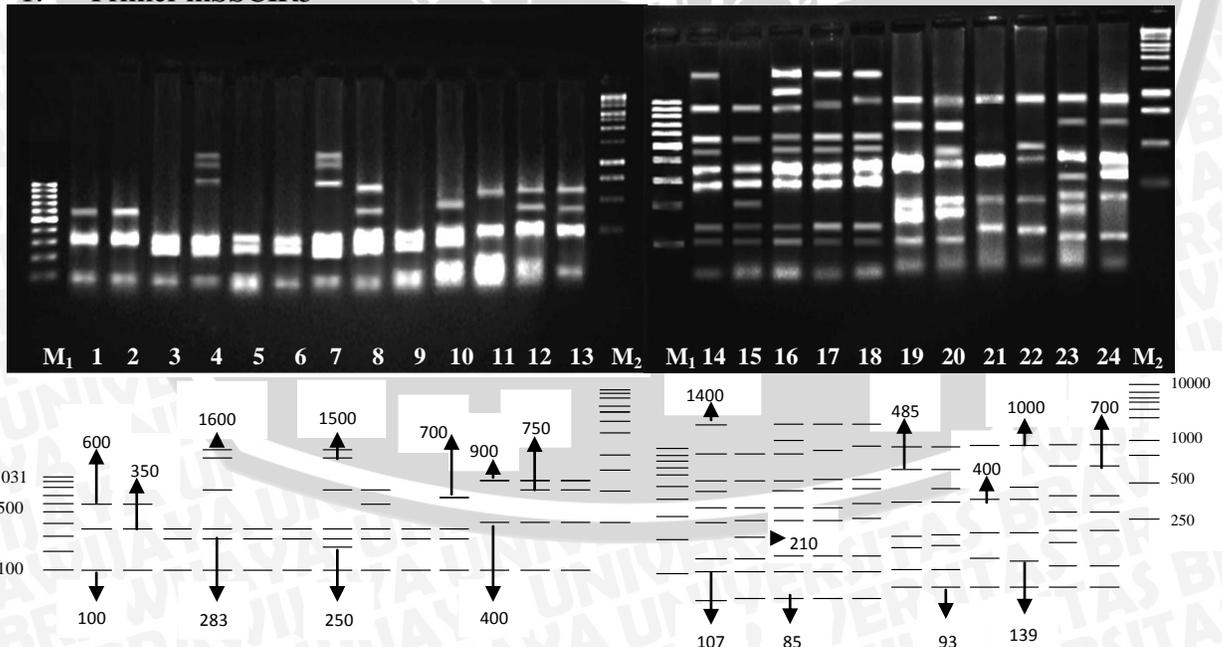
Gambar 5 diatas menunjukkan bahwa pada semua DNA sampel hasil isolasi memiliki tingkat konsentrasi yang bervariasi, yang ditunjukkan dengan variasi ketebalan pita DNA. Seperti yang diungkapkan Talbot *et al.*(2003) bahwa semakin tebal band DNA yang terbentuk pada gel maka akan semakin tinggi konsentrasi DNA. Sebagian besar kualitas DNA yang diperoleh cukup baik yang ditandai dengan sedikitnya fragmen *smear* yang hadir di bawah fragmen utama dan ada sedikit kontaminasi RNA. Fragmen-fragmen *smear* tersebut merupakan kumpulan potongan DNA pendek yang terbentuk pada saat proses isolasi (DNA yang terdegradasi). Smith dan Wood (1991) menyatakan bahwa smear terjadi karena isolasi DNA yang kurang sempurna atau dengan kata lain DNA masih terkontaminasi pencucian DNA dengan ethanol yang kurang maksimal. Meskipun adanya indikasi *smear* pada beberapa sampel yaitu IS76-181, U76-415 dan 15 OC18 tetapi proporsi DNA dari fragmen utama masih lebih besar, sehingga DNA tersebut tergolong masih baik untuk digunakan pada analisis selanjutnya. Widyasari (2008) tetap

menggunakan sampel yang smear dan hasilnya tetap menunjukkan kualitas yang bagus untuk analisis PCRnya. Indikasi adanya kontaminasi RNA seperti pada sampel M442-51 dan PS862 disebabkan pada penelitian ini tidak menggunakan RNase. Adanya kenyataan bahwa secara kuantitas DNA pada dua sampel tersebut mempunyai rasio yang tergolong murni sedangkan visualisasinya menunjukkan ada kontaminan RNA, diduga DNA kedua sampel sejak awalnya telah terkontaminasi akibat isolasi yang kurang sempurna, namun tidak terdeteksi saat dianalisa dengan spektrofotometer, karena diduga DNA yang terambil saat pipeting tidak mengandung RNA. Gambar 5 menunjukkan kontaminan RNA dengan pola pita yang tipis, menandakan kontaminan yang tidak terlalu banyak dan masih bisa digunakan untuk analisis selanjutnya. Menurut Kusumawaty (1996) dalam Widyasari *et al.* (2008) menyatakan bahwa meskipun DNA terkontaminasi, proses reaksi PCR tidak akan memperbanyak kontaminannya, baik protein maupun RNA.

4.1.2.4 Aplikasi PCR

Penelitian ini menggunakan tiga macam primer, berikut ialah gambar hasil visualisasi dengan elektroforesis pada agarose 1,5% setelah melalui proses amplifikasi dengan mesin PCR.

1. Primer mSSCIR5



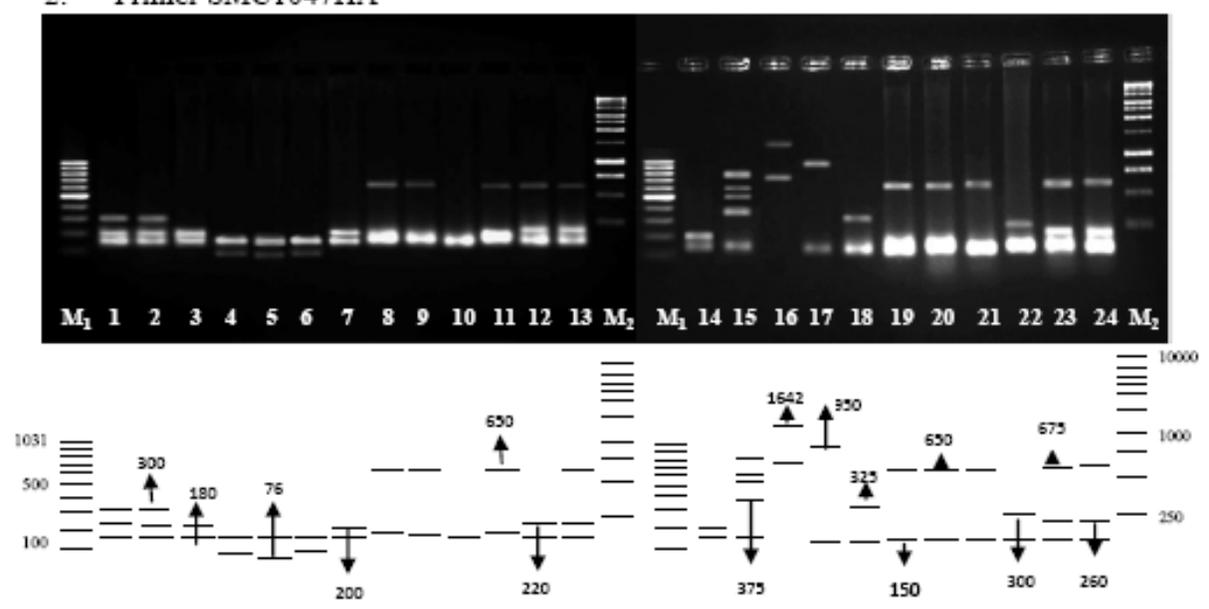
Gambar 6. Elektroforegram hasil amplifikasi DNA dengan menggunakan primer mSSCIR5

Keterangan:

- | | | | |
|-------------|--------------|--------------|--------------------|
| 1. IK76-36 | 9. 15OC19 | 18. IJ76-348 | M1 = Marker 100 bp |
| 2. IK76-41 | 10. IJ76-412 | 19. XOC55 | M2 = Marker 1kb |
| 3. IK76-149 | 11. IJ76-415 | 20. XOC 56 | |
| 4. IK76-150 | 12. TD50 | 21. IS76-175 | |
| 5. IK76-153 | 13. TD53 | 22. IS76-181 | |
| 6. IS76-202 | 14. IJ76-375 | 23. M442-51 | |
| 7. IS76-205 | 15. IJ76-374 | 24. PS862 | |
| 8. 15OC18 | 16. IJ76-370 | | |

Gambar 6 diatas menunjukkan bahwa primer mSSCIR5 dapat mengamplifikasi DNA dari 24 klon *Saccharum complex* sebanyak 44 larik DNA yang bersifat polimorfik dengan kisaran ukuran basa antara 83 bp sampai 1600 bp.

2. Primer SMC1047HA



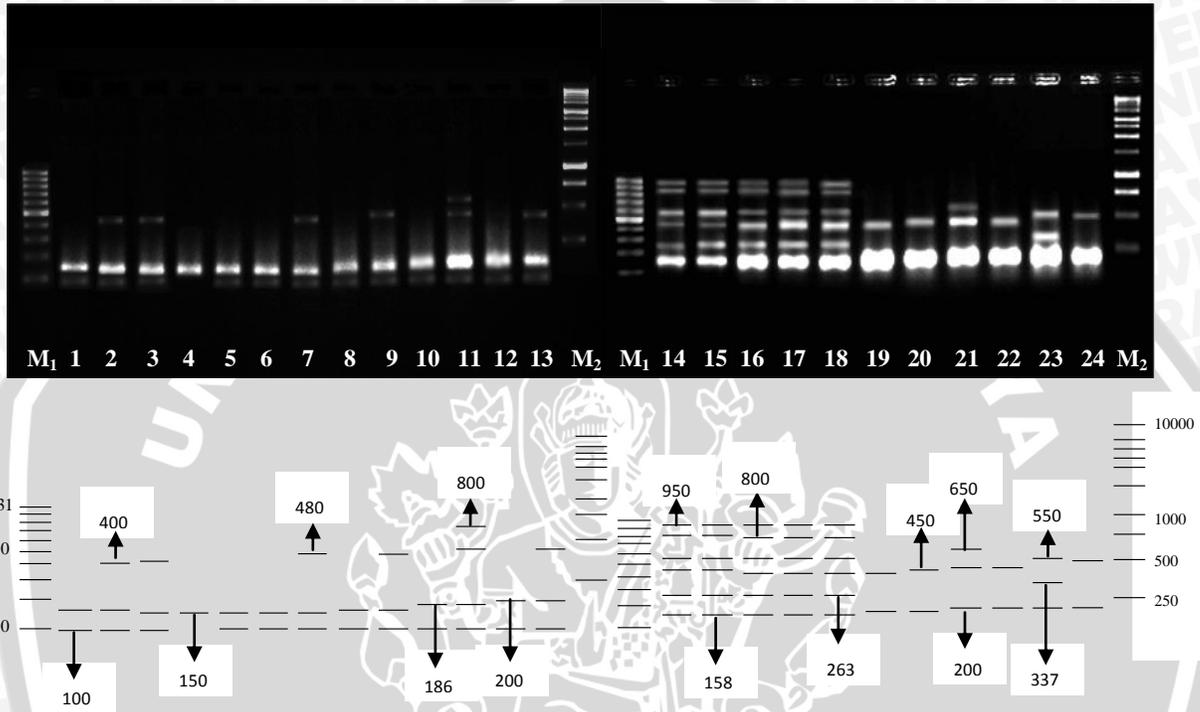
Gambar 7. Elektroforegram hasil amplifikasi DNA dengan menggunakan primer SMC1047HA

Keterangan:

- | | | | |
|-------------|--------------|--------------|--------------------|
| 1. IK76-36 | 9. 15OC19 | 17. IJ76-396 | |
| 2. IK76-41 | 10. IJ76-412 | 18. IJ76-348 | |
| 3. IK76-149 | 11. IJ76-415 | 19. XOC55 | |
| 4. IK76-150 | 12. TD50 | 20. XOC 56 | M1 = Marker 100 bp |
| 5. IK76-153 | 13. TD53 | 21. IS76-175 | M2 = Marker 1kb |
| 6. IS76-202 | 14. IJ76-375 | 22. IS76-181 | |
| 7. IS76-205 | 15. IJ76-374 | 23. M442-51 | |
| 8. 15OC18 | 16. IJ76-370 | 24. PS862 | |

Gambar 7 diatas menunjukkan bahwa hasil visualisasi yang diperoleh pada 1,5% gel agarose primer SMC1047HA mampu mengamplifikasi DNA dari 24 klon *Saccharum* complex sebanyak 22 larik DNA. Ukuran basa dari DNA tersebut berkisar antara 76 bp sampai 1642 bp.

3.Primer MSCA053C10



Gambar 8. Elektroforegram hasil amplifikasi DNA dengan menggunakan primer MSCA053C10

Keterangan:

- | | | |
|-------------|--------------|--------------|
| 1. IK76-36 | 9. 15OC19 | 17. IJ76-396 |
| 2. IK76-41 | 10. IJ76-412 | 18. IJ76-348 |
| 3. IK76-149 | 11. IJ76-415 | 19. XOC55 |
| 4. IK76-150 | 12. TD50 | 20. XOC 56 |
| 5. IK76-153 | 13. TD53 | 21. IS76-175 |
| 6. IS76-202 | 14. IJ76-375 | 22. IS76-181 |
| 7. IS76-205 | 15. IJ76-374 | 23. M442-51 |
| 8. 15OC18 | 16. IJ76-370 | 24. PS862 |

M1 = Marker 100 bp
M2 = Marker 1kb

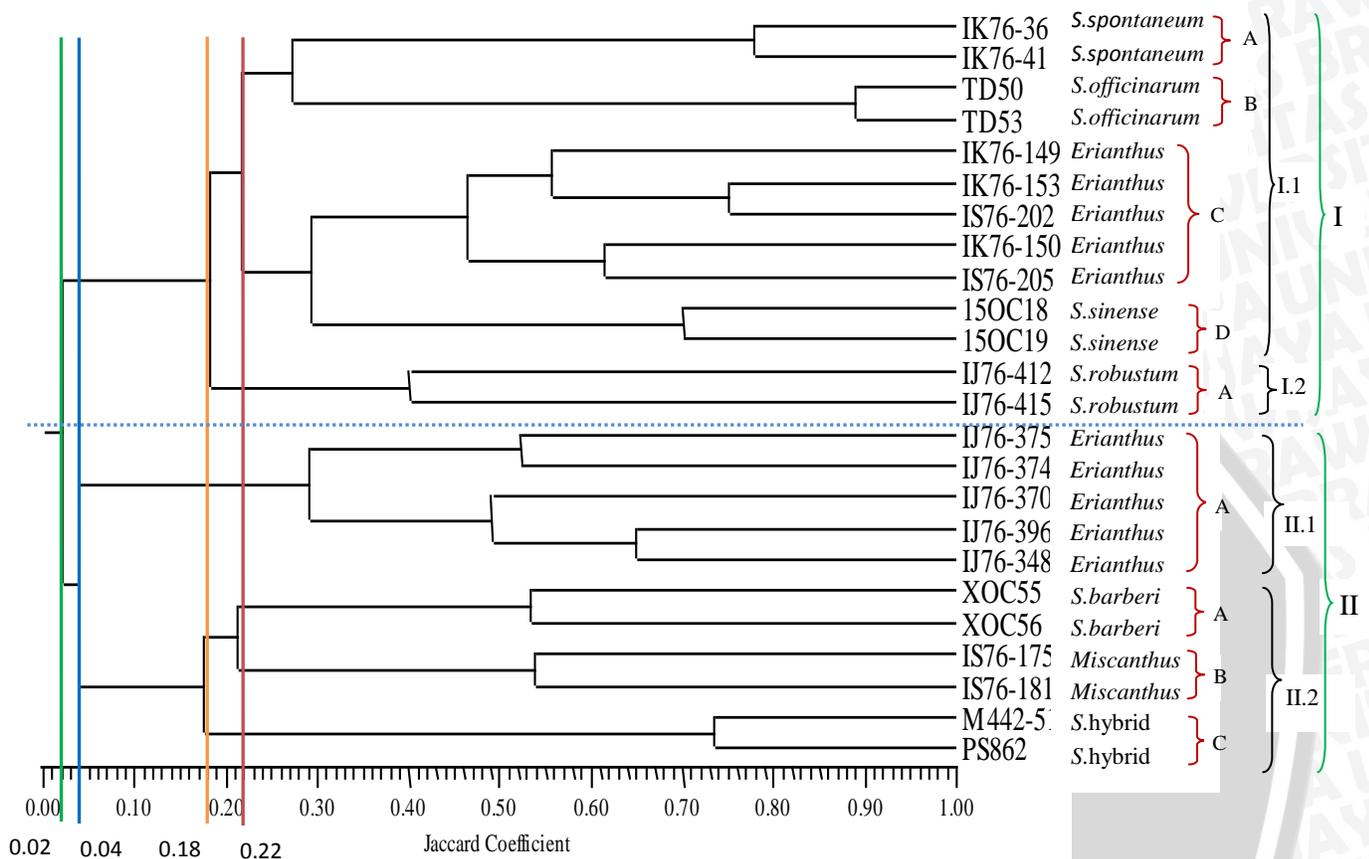
Berdasarkan hasil visualisasi seperti yang disajikan pada Gambar 8 diketahui bahwa primer MSCA053C10 mampu mengamplifikasi DNA dari 24 klon *Saccharum complex* sebanyak 24 larik DNA. Kisaran ukuran basa DNA tersebut antara 98 bp sampai 950 bp.

Tiga pasang primer mikrosatelit yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA 24 klon tebu anggota *Saccharum complex* mampu menghasilkan 90 larik DNA yang bervariasi ukuran pasang basanya. Larik DNA yang dianalisa pada penelitian ini ialah larik DNA yang dapat dilihat dengan jelas, tanpa memperhatikan perbedaan intensitas (tebal-tipisnya larik DNA). Pada elektroforegram masing-masing primer mikrosatelit diatas terlihat bahwa amplifikasi DNA menghasilkan visualisasi pita-pita DNA yang cukup jelas.

4.1.2.5 Analisis Pengelompokan Gabungan Tiga Macam Primer Mikrosatelit

Pita DNA hasil amplifikasi diinterpretasikan sebagai data kualitatif yang selanjutnya ditrasformasikan ke bentuk data biner yang dilihat dari ada tidaknya pita DNA. Angka 1 untuk kehadiran pita sedangkan angka 0 untuk ketidakhadiran pita pada satu posisi larik yang sama. Data biner dari tiap primer disajikan pada Lampiran 6, 7 dan 8. Data biner tersebut selanjutnya digunakan untuk mengetahui nilai kemiripan genetik dan menyusun dendrogram. Berikut ialah dendrogram yang dibentuk menggunakan program NTSYSpc-2.02i berdasarkan koefisien kemiripan genetik Jaccard. Koefisien kemiripan menggunakan skala nilai 0,00 - 1,00. Nilai 1,00 menunjukkan nilai kemiripan 100% yang berarti juga nilai jarak genetiknya 0,00 (Julisaniah, 2008). Dendrogram masing-masing primer disajikan pada Lampiran 9. Berikut ini ialah dendrogram yang dihasilkan dari penggabungan ketiga primer (Gambar 9).

DENDOGRAM MOLEKULER
GABUNGAN 3 PRIMER



Gambar 9. Dendrogram molekuler gabungan tiga primer dari 24 klon dengan koefisien Jaccard

Hasil dendrogram penanda molekuler (Gambar 9) menunjukkan pengelompokan dari 24 klon *Saccharum* complex berdasarkan koefisien kemiripan Jaccard terbagi menjadi 2 kelompok besar pada tingkat kemiripan 0,02 yaitu kelompok I dan II. Masing-masing kelompok tersebut terbagi lagi menjadi sub-subkelompok. Kelompok I terbagi lagi menjadi subkelompok I.1 dan I.2, sedangkan kelompok II terbagi lagi menjadi subkelompok II.1 dan II.2.

Kelompok I membentuk 2 subkelompok yang ditandai dengan 1.1 dan 1.2 pada nilai kemiripan 0.18. Sub kelompok tersebut terbagi lagi menjadi subsubkelompok pada nilai kemiripan 0.22 yang ditandai dengan huruf. Sub kelompok 1.1 terbagi menjadi 4 subsubkelompok yaitu: (A) Terdiri dari 2 klon *Saccharum spontaneum* (IK 76-36 dan IK76-41); (B) Terdiri dari 2 klon *Saccharum*

officinarum (TD50 dan TD53); (C) Terdiri dari 5 klon *Erianthus* (IK76-149, IK76-150, IK76-153, IS76-202, IS76-205); (D) Terdiri dari 2 klon *Saccharum sinense* (15OC18 dan 15OC19). Subkelompok 1.2 terdiri dari (A) 2 klon *Saccharum robustum* (IJ76-412 dan IJ76-415).

Kelompok II terbagi menjadi 2 subkelompok yaitu II.1 dan II.2 pada nilai kemiripan 0.04. Pada subkelompok II.1 terdiri dari klon-klon *Erianthus* (A) yaitu IJ76-375, IJ76-374; IJ76-370; IJ76-396, IJ76-348. Pada subkelompok II.2 terdiri dari 3 sub-subkelompok yaitu (A) klon-klon dari *Saccharum barberi* (XOC55, XOC56) ; (B) klon-klon dari *Miscanthus* (IS76-175, IS76-181); dan (C) klon-klon dari *Saccharum hybrid* (M442-51, PS862).

Dendogram diatas menunjukkan bahwa pengelompokan berdasarkan penanda molekuler dari 24 klon tebu yang diuji mengelompok sesuai dengan jenisnya. Tingkat kemiripan genetik antar 24 klon dapat dilihat pada tabel 12 sedangkan nilai jarak genetiknya pada Tabel 13. Berdasarkan kedua tabel tersebut diketahui bahwa yang memiliki nilai kemiripan genetik terbesar ialah dari jenis *Saccharum officinarum* (TD50 dan TD53) sebesar 0,8889 (89%) dan jarak genetik antar kedua klon tersebut sebesar 0.1111, sedangkan nilai kemiripan genetik terendah sebesar 0,0000 (0%) antar beberapa klon.

Tabel 12. Nilai kemiripan genetik antar 24 klon *Saccharum complex* berdasarkan gabungan tiga primer mikrosatelit

	IK76-36	IK76-41	IK76-149	IK76-150	IK76-153	IS76-202	IS76-205	ISOC18	ISOC19	IJ76-412	IJ76-415	TD50	TD53	IJ76-375	IJ76-374	IJ76-370	IJ76-396	IJ76-348	XOC55	XOC56	IS76-175	IS76-181	M442-51	PS862
IK76-36	1,0000																							
IK76-41	0.7778	1,0000																						
IK76-149	0.3636	0.3636	1,0000																					
IK76-150	0.2143	0.2143	0.4545	1,0000																				
IK76-153	0.2500	0.2500	0.5556	0.4545	1,0000																			
IS76-202	0.2500	0.2500	0.5556	0.6000	0.7500	1,0000																		
IS76-205	0.1765	0.1765	0.3571	0.6154	0.4615	0.4615	1,0000																	
ISOC18	0.3077	0.3077	0.2308	0.2857	0.3333	0.3333	0.3125	1,0000																
ISOC19	0.2308	0.2308	0.2500	0.2143	0.3636	0.3636	0.2500	0.7000	1,0000															
IJ76-412	0.2500	0.2500	0.4000	0.2308	0.2727	0.2727	0.1875	0.2308	0.2500	1,0000														
IJ76-415	0.1538	0.1538	0.1667	0.0667	0.0769	0.0769	0.0556	0.0667	0.0714	0.4000	1,0000													
TD50	0.3333	0.2308	0.2500	0.2143	0.1538	0.1538	0.1765	0.2143	0.1429	0.1538	0.2500	1,0000												
TD53	0.3077	0.2143	0.2308	0.2000	0.1429	0.1429	0.1667	0.2000	0.1333	0.1429	0.2308	0.8889	1,0000											
IJ76-375	0.0435	0.0435	0.0455	0.0417	0.0455	0.0455	0.0769	0.0417	0.0435	0.0455	0.0000	0.0000	0.0000	1,0000										
IJ76-374	0.0385	0.0385	0.0400	0.0370	0.0400	0.0400	0.0333	0.0370	0.0385	0.0400	0.0000	0.0000	0.0000	0.5217	1,0000									
IJ76-370	0.0417	0.0417	0.0435	0.0400	0.0435	0.0435	0.0357	0.0400	0.0417	0.0435	0.0435	0.0000	0.0000	0.3750	0.3846	1,0000								
IJ76-396	0.0417	0.0417	0.0435	0.0400	0.0435	0.0435	0.0357	0.0400	0.0417	0.0435	0.0435	0.0000	0.0000	0.2692	0.2857	0.5455	1,0000							
IJ76-348	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0455	0.0000	0.0000	0.2308	0.2069	0.4348	0.6500	1,0000						
XOC55	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0526	0.0556	0.0000	0.0000	0.0556	0.0526	0.0385	0.0714	0.0370	0.0370	0.0385	1,0000					
XOC56	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0500	0.0526	0.0000	0.0000	0.0556	0.0500	0.0769	0.0690	0.0000	0.0357	0.0370	0.5333	1,0000				
IS76-175	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0556	0.0588	0.0000	0.0000	0.1250	0.1176	0.0400	0.0357	0.0000	0.0000	0.0000	0.2353	0.2222	1,0000			
IS76-181	0.0588	0.0588	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0588	0.0556	0.0400	0.0357	0.0000	0.0385	0.0400	0.1667	0.2222	0.5385	1,0000		
M442-51	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0500	0.0000	0.0476	0.0455	0.0714	0.0645	0.0333	0.0333	0.0345	0.1364	0.1304	0.2000	0.2000	1,0000	
PS862	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0556	0.0000	0.0526	0.0500	0.0769	0.0690	0.0357	0.0357	0.0370	0.1500	0.1429	0.2222	0.2222	0.7333	1,0000

Tabel 13. Nilai jarak genetik antar 24 klon *Saccharum complex* berdasarkan gabungan tiga primer mikrosatelit

	IK76-36	IK76-41	IK76-149	IK76-150	IK76-153	IS76-202	IS76-205	I5OC18	I5OC19	IJ76-412	IJ76-415	TD50	TD53	IJ76-375	IJ76-374	IJ76-370	IJ76-396	IJ76-348	XOC55	XOC56	IS76-175	IS76-181	M442-51	PS862
IK76-36	0,0000																							
IK76-41	0,2222	0,0000																						
IK76-149	0,6364	0,6364	0,0000																					
IK76-150	0,7857	0,7857	0,5455	0,0000																				
IK76-153	0,7273	0,7273	0,3750	0,5000	0,0000																			
IS76-202	0,7273	0,7273	0,3750	0,3333	0,2857	0,0000																		
IS76-205	0,8125	0,8125	0,6154	0,3333	0,5833	0,5833	0,0000																	
I5OC18	0,6667	0,6667	0,7500	0,6923	0,7273	0,7273	0,7333	0,0000																
I5OC19	0,7500	0,7500	0,7273	0,7692	0,7000	0,7000	0,8000	0,3333	0,0000															
IJ76-412	0,7500	0,7500	0,6000	0,7692	0,7000	0,7000	0,8000	0,7500	0,7273	0,0000														
IJ76-415	0,8462	0,8462	0,8333	0,9333	0,9167	0,9170	0,9412	0,9286	0,9231	0,6000	0,0000													
TD50	0,6667	0,7692	0,7500	0,7857	0,8333	0,8333	0,7333	0,7692	0,8462	0,8462	0,7500	0,0000												
TD53	0,6923	0,7857	0,7692	0,8000	0,8462	0,8462	0,7500	0,7857	0,8571	0,8571	0,7692	0,1111	0,0000											
IJ76-375	0,9545	0,9545	0,9000	0,9091	0,8947	0,8947	0,8696	0,9545	0,9524	0,9524	1,0000	0,9545	0,9565	0,0000										
IJ76-374	0,9565	0,9565	0,9048	0,9130	0,9000	0,9000	0,9200	0,9565	0,9545	0,9545	1,0000	1,0000	1,0000	0,4500	0,0000									
IJ76-370	0,9565	0,9565	0,9545	0,9130	0,9524	0,9524	0,9200	0,9091	0,9545	0,9545	0,9545	0,9565	0,9583	0,6522	0,6087	0,0000								
IJ76-396	0,9565	0,9565	0,9545	0,9583	0,9524	0,9524	0,9615	0,9565	0,9545	0,9545	0,9545	1,0000	1,0000	0,7083	0,6667	0,4000	0,0000							
IJ76-348	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9545	1,0000	1,0000	0,7600	0,7692	0,5455	0,3158	0,0000						
XOC55	1,0000	1,0000	0,9375	0,9444	0,9333	0,9333	0,9500	0,9412	0,9375	1,0000	1,0000	0,9412	0,9444	0,9583	0,9167	0,9600	0,9600	0,9600	0,0000					
XOC56	1,0000	1,0000	0,9412	0,9474	0,9375	0,9375	0,9524	0,9444	0,9412	1,0000	1,0000	0,9444	0,9474	0,9167	0,9200	1,0000	0,9615	0,9615	0,5000	0,0000				
IS76-175	1,0000	0,9375	0,9333	0,9412	0,9286	0,9286	0,8889	0,9375	0,9333	1,0000	1,0000	0,8667	0,8750	0,9091	0,9583	1,0000	1,0000	1,0000	0,7333	0,7500	0,0000			
IS76-181	0,9412	0,8750	0,9375	0,9444	0,9333	0,9333	0,8947	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9412	0,9444	0,9130	0,9600	1,0000	0,9600	0,9600	0,8235	0,7647	0,4167	0,0000		
M442-51	1,0000	1,0000	0,9500	0,9545	0,9474	0,9474	0,9130	1,0000	1,0000	0,9500	1,0000	0,9524	0,9545	0,8846	0,9286	0,9655	0,9655	0,9655	0,8571	0,8636	0,7895	0,8000	0,0000	
PS862	1,0000	1,0000	0,9412	0,9474	0,9375	0,9375	0,9000	1,0000	1,0000	0,9412	1,0000	0,9444	0,9474	0,8696	0,9200	0,9615	0,9615	0,9615	0,8333	0,8421	0,7500	0,7647	0,2143	0,0000

4.2 Pembahasan

Penanda yang digunakan pada penelitian ini yaitu penanda morfologi dan penanda molekuler mikrosatelit, yang masing-masing memiliki kekurangan dan kelebihan. Penggunaan dua penanda tersebut pada penelitian ini untuk dapat saling menunjang dan melengkapi analisis pengelompokan dan hubungan kekerabatan dari 24 klon *Saccharum complex*.

Hasil pengamatan dari dua penanda bersifat kualitatif, sehingga ditransformasikan menjadi data biner dahulu sebelum digunakan untuk membuat dendogram. Dendogram hasil pengamatan morfologi dikonstruksi berdasarkan koefisien kemiripan Simple Matching (SM). Lamadji (1998) menggunakan koefisien yang sama pada penelitiannya untuk mengetahui kekerabatan pada tebu.

Berdasarkan hasil dendogram morfologi yang dihasilkan (Gambar 4) menunjukkan hubungan kekerabatan antara 24 klon tebu anggota *Saccharum complex* terbagi menjadi dua kelompok besar. Kelompok besar pertama terdiri dari dua subkelompok. Subkelompok pertama terdiri kelompok genus *Erianthus*, kelompok spesies *S.spontaneum*, kelompok spesies *S.officinarum*, kelompok *S.robustum* (IJ76-415) dan kelompok *S.hybrid* (M442-51). Subkelompok kedua terdiri dari kelompok *S.sinense*, kelompok genus *Miscanthus*, kelompok *S.robustum* (IJ76-412) dan kelompok *S.barberi* (XOC56). Kelompok besar kedua terdiri dari *S.hybrid* (PS862) dan klon *S.barberi* (XOC55). *Saccharum hybrid* (M442-51 dan PS862) merupakan pembanding dari penelitian ini karena *Saccharum hybrid* outgroup dari *Saccharum complex*.

Hasil pengelompokan tersebut menunjukkan sebagian besar sub kelompok terbentuk menurut jenisnya. Klon dalam kelompok yang sama memiliki kekerabatan yang dekat atau tingkat kemiripan yang lebih tinggi dibandingkan dengan klon-klon pada kelompok lain, contohnya IS76-205 dan IJ76-375 menjadi satu kelompok pada tingkat kemiripan 97%; IS76-202 dan IK76-149 mengelompok pada tingkat kemiripan 95%; dan IJ374 dan IJ348 mengelompok pada tingkat kemiripan 94,4%. Berdasarkan hasil analisis morfologi tidak ditemukan adanya duplikasi pada 24 klon, hal tersebut berarti tidak terdapat klon yang memiliki kemiripan genetik sama dengan satu (100% sama).

Secara garis besar, hasil pengelompokan secara morfologi klon yang berasal dari genus *Erianthus* membentuk kelompok yang berbeda dengan klon yang berasal dari

genus *Saccharum* karena berdasarkan pengamatan klon-klon dari kedua genus tersebut menunjukkan beberapa perbedaan morfologi meliputi susunan ruas (*Erianthus* lurus, *Saccharum* berbiku); penampang melintang ruas (*Erianthus* pipih, *Saccharum* bulat); jumlah mata akar (*Erianthus* 1 baris, *Saccharum* 2-3 baris); dan bagian terlebar mata (*Erianthus* pada bawah tengah mata, *Saccharum* pada tengah mata). Senada dengan Amalraj dan Balasundaram (2006) bahwa perbedaan antara *Saccharum* dan *Erianthus* antara lain pada *Erianthus* mata akar hanya 1 baris sedangkan pada *Saccharum* jumlah mata akar 2 baris atau lebih.

Informasi mengenai nilai kemiripan genetik dapat dijadikan acuan untuk mengetahui besarnya nilai jarak genetik, hubungan kekerabatan dan tingkat keragaman genetik. Nilai kemiripan genetik berdasarkan penanda morfologi disajikan pada Tabel 9 sedangkan nilai jarak genetiknya disajikan pada Tabel 10. Nilai kemiripan genetik berbanding lurus dengan hubungan kekerabatan, dan berbanding terbalik dengan nilai jarak genetik. Semakin besar nilai kemiripan antar dua individu maka hubungan kekerabatannya semakin besar (dekat), dan sebaliknya untuk nilai jarak genetiknya.

Dari Tabel 9 dan Tabel 10 dapat diketahui bahwa dari 24 klon *Saccharum* complex yang termasuk didalamnya anggota genus *Erianthus* dan *Saccharum* memiliki hubungan kekerabatan yang cukup dekat dan keragaman genetik yang cukup rendah yaitu sebesar 0,5714-0,9683 untuk nilai kemiripan genetik atau sebesar 0,0317-0,4286 untuk nilai jarak genetiknya. Keragaman yang rendah tersebut karena dari 24 klon memiliki kemiripan morfologi yang hampir sama pada sebagian besar karakter dari 37 karakter yang diamati. Pengelompokan berdasarkan penanda morfologi belum cukup untuk dapat membuktikan kebenaran pengelompokan koleksi plasma nutfah yang dikelola P3GI, oleh karenanya masih diperlukan penanda lain yang dapat mendukung kebenaran dari pengelompokan yang ada, yaitu berdasarkan penanda molekuler.

Dendogram hasil pengamatan molekuler dikonstruksi berdasarkan koefisien kemiripan Jaccard. Penggunaan koefisien Jaccard dianggap sesuai untuk penanda molekuler karena koefisien Jaccard hanya mempertimbangkan karakter/pita yang tampak (*present*) sebagai faktor yang berkontribusi terhadap kemiripan individu dan mengabaikan nilai nol (0) atau *absent*. Penelitian Corderio *et al.* (2003) dan Widyasari *et*

al. (2008) menggunakan koefisien Jaccard untuk menganalisis keragaman genetik tebu berdasarkan penanda molekuler.

Analisis molekuler dengan penanda mikrosatelit terhadap 24 klon anggota *Saccharum complex* menggunakan tiga pasang primer menghasilkan 90 larik DNA pada kisaran 76 bp - 1642 bp. Pita DNA yang dianalisa ialah pita DNA yang dapat dilihat dengan jelas, tanpa memperhatikan perbedaan intensitas (tebal-tipisnya pita DNA). Hasil pembacaan pita DNA tersebut kemudian ditransformasikan menjadi data biner dan selanjutnya digunakan untuk membentuk dendogram berdasarkan koefisien kemiripan genetik.

Dendogram yang dihasilkan tiap-tiap primer, yaitu primer SMC1047HA, primer mSSIR5 dan primer MCSA053C10 (Lampiran 9) menunjukkan adanya duplikasi, sebagian besar klon-klon yang dianalisis memiliki kemiripan genetik mutlak (1,00), yang berarti 100% sama. Hasil yang ditunjukkan dari dendogram masing-masing primer tersebut belum cukup menunjukkan hasil secara keseluruhan, Pandin (2010) menyatakan bahwa primer mikrosatelit mengapit sequen mikrosatelit dimana sequen tersebut diapit atau berdekatan dengan gen penyandi sifat tertentu, sehingga perlu membentuk dendogram gabungan dari ketiga primer yang diharapkan dari dendogram tersebut mampu menunjukkan hasil yang lebih akurat.

Dendogram gabungan tiga primer mikrosatelit yang terbentuk (Gambar 9) menunjukkan pengelompokan dari 24 klon *Saccharum complex* terbagi menjadi 2 kelompok besar pada tingkat kemiripan 0,02. Kelompok besar I pada nilai kemiripan 0.19 terbentuk 2 subkelompok yaitu 1.1 dan 1.2. Sub kelompok 1.1 terbagi menjadi 4 subsubkelompok yaitu: (A) kelompok *Saccharum spontaneum*; (B) kelompok *Saccharum officinarum*; (C) kelompok *Erianthus* yang berasal dari Kalimantan dan Sulawesi; (D) kelompok *Saccharum sinense*. Subkelompok 1.2 terdiri dari kelompok *Saccharum robustum*. Kelompok besar II pada nilai kemiripan 0.04 terbagi menjadi 2 subkelompok yaitu subkelompok II.1 yang terdiri dari klon-klon *Erianthus* yang berasal dari Irian Jaya dan subkelompok II.2 terdiri dari (A) klon-klon dari *Saccharum barberi*; (B) klon-klon dari *Miscanthus*; dan (C) klon-klon dari *Saccharum hybrid*.

Pengelompokan berdasarkan molekuler tersebut menunjukkan dari 24 klon yang diamati, masing-masing klon mengelompok berdasarkan jenisnya. Hal tersebut berarti

pengelompokan tebu koleksi P3GI hingga saat ini masih sesuai dengan pengelompokan pada saat konservasi dahulu.

Nilai kemiripan genetik dan nilai jarak genetik berdasarkan penanda molekuler disajikan pada Tabel 12 dan Tabel 13 yang menunjukkan bahwa nilai kemiripan genetik antar 24 klon antara 0,000-0,889 dan nilai jarak genetiknya antara 0,111-1,000. Tidak dijumpai adanya duplikasi klon (nilai kemiripan=1,00) antar 24 klon yang diamati. Informasi tersebut dapat menunjukkan tingkat keragaman genetik yang luas/tinggi dalam koleksi *Saccharum* complex berdasarkan penanda molekuler.

Berdasarkan hasil analisis, nilai kemiripan pada 24 klon berdasarkan penanda morfologi lebih tinggi dibandingkan dengan penanda molekuler. Perbedaan tersebut karena variabel yang diamati dengan penanda morfologi sebanyak 37 karakter dengan 126 deskripsi, sedangkan pada penanda molekuler didapatkan 90 larik DNA, selain itu pada analisis penanda morfologi, deskripsi karakter yang sama-sama tidak muncul dianggap sebagai variabel yang sama, sehingga meningkatkan nilai kemiripan. Faktor lainnya yang mempengaruhi perbedaan tersebut ialah perbedaan koefisien yang digunakan antara dua penanda. Penanda morfologi menggunakan koefisien Simple Matching yang melibatkan nilai *absent* ($d,0-0$), sedangkan penanda molekuler menggunakan koefisien Jaccard yang hanya melibatkan nilai *present* (a,b,c). Perbedaan pada nilai kemiripan secara morfologi yang lebih tinggi dibanding secara molekuler juga dijumpai pada penelitian Kartikaningrum *et al.* (2002).

Hasil pengelompokan akhir berdasarkan penanda morfologi dan molekuler sebagian besar menunjukkan kesamaan. Kedua penanda mengelompokkan 24 klon berdasarkan pada spesies masing-masing yaitu klon dari *S.officinatum* TD50 dan TD53 sekelompok; IK76-36 dan IK76-41 dari *S.spontanum* sekelompok; 15OC18 dan 15OC19 dari *S.sinense* sekelompok; klon-klon *Erianthus* yang berasal dari Irian Jaya (IJ) juga membentuk subkelompok sendiri dari *Erianthus* yang berasal dari Kalimantan dan Sulawesi. Ada beberapa klon yang pengelompokannya berbeda antara morfologi dan molekulernya yaitu klon dari *S.barberi*, *S.robustum* dan *Saccharum* hybrid.

Adanya kenyataan bahwa pengelompokan menurut penanda molekuler tidak sama persis dengan pengelompokan menurut morfologi dijumpai juga pada penelitian lain, misalnya penelitian identifikasi ketahanan terhadap blas pada plasma nutfah padi

secara fenotipik dan dengan marka RAPD dan RFLP yang mendapatkan bahwa pengelompokan dengan marka molekuler tidak selalu sama dengan pengelompokan berdasarkan fenotipiknya (Tasliyah *et al.*, 2000 dan Utami *et al.*, 2000 dalam Zainal dan Bahagiawati, 2005).

Zainal dan Bahagiawati (2005) dan Pandin (2010) menyatakan, informasi genetik tanaman tersimpan pada DNA dari kromosom nukleus maupun DNA organel yaitu mitokondria dan kloroplas. Beberapa mekanisme seperti substitusi basa, inversi, translokasi, dan delesi yang dapat terjadi secara alami maupun diinduksi yang menyebabkan perubahan susunan nukleotida pada sekuen DNA. Perubahan tersebut tidak selalu mengubah karakter morfologi sehingga penggunaan penanda yang langsung berintegrasi dengan sistem genetika akan lebih mampu menggambarkan keadaan genom yang sesungguhnya. Faktor-faktor tersebut menurut Zainal dan Bahagiawati (2005) memberi penjelasan mengapa pengelompokan berdasarkan marka molekuler berbeda dengan berdasarkan morfologi.

Mengenai keakuratan informasi, hasil dari penanda molekuler dinilai lebih akurat dalam analisis kekerabatan dibanding penanda morfologi karena penanda molekuler menganalisis individu pada level DNA, sedangkan penanda morfologi memiliki beberapa kekurangan yang bisa saja mempengaruhi keakuratan data, seperti yang dinyatakan oleh Bagali *et al.* (2010), penanda morfologi adalah penanda yang mengenali suatu karakter menurut penampilan nyata berdasarkan pandangan pengamat (subyektivitas). Martinez *et al.* (2003) menambahkan bahwa ketika dibandingkan antara teknik sidik jari DNA, penanda morfologi relatif tidak nyata dan tidak efisien untuk ketepatan dalam membedakan genotip yang berkerabat dekat dan menganalisis kemiripan genetiknya namun bagaimanapun juga, penanda morfologi berguna pada permulaannya/ tahap awal, cepat, sederhana, dan tidak mahal dalam mengidentifikasi varietas dan dapat digunakan sebagai pendekatan umum untuk mengukur keragaman genetik antara kultivar yang berbeda-beda fenotipnya. Karuri *et al.* (2010) menyatakan karena keterbatasan yang ada pada penanda morfologi maka perlu dikombinasikan dengan menggunakan penanda yang berbasis genetik.

Informasi hubungan kekerabatan dan pengelompokan dari 24 klon anggota koleksi plasma nutfah tebu yang dimiliki P3GI dari hasil penelitian ini diharapkan dapat

berguna dalam penentuan langkah pemuliaan selanjutnya. Informasi tentang hubungan kekerabatan genetik antar varietas bisa sebagai acuan dalam memilih calon tetua persilangan (Lamadji,1998), juga sangat berguna untuk mengelola plasma nutfah yang ada karena merupakan sumber daya genetik yang harus dilestarikan untuk mempertahankan sumber-sumber gen yang merupakan bahan mentah dalam program pemuliaan untuk merakit jenis-jenis unggul (Julisaniah *et al.*, 2008).

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Berdasarkan dendrogram hubungan kekerabatan 24 klon *Saccharum* complex, baik secara morfologi maupun molekuler umumnya klon-klon mengelompok sesuai dengan jenis dan asalnya.
2. Hasil pengelompokan berdasarkan molekuler lebih teratur, masing-masing spesies membentuk satu kelompok dan terpisah dari kelompok spesies lainnya, sedangkan hasil pengelompokan berdasarkan morfologi agak tidak teratur, beberapa klon yang tidak membentuk satu kelompok sesuai jenisnya yaitu klon-klon dari *S.robustum*, *S.barberi*, *S.hybrid* dan *Miscanthus*.
3. Hasil pengelompokan berdasarkan molekuler menunjukkan bahwa pengelompokan klon tebu anggota *Saccharum* complex koleksi P3GI hingga saat ini masih sesuai dengan pengelompokan pada saat konservasi.
4. 24 klon *Saccharum* complex memiliki tingkat keragaman yang rendah secara morfologi dan tinggi secara molekuler.

5.2 Saran

1. Penambahan jumlah primer pada penelitian selanjutnya akan lebih menambah keakuratan data guna melengkapi database koleksi plasma nutfah tebu sehingga bermanfaat untuk proses pemuliaan selanjutnya.
2. Hasil penelitian ini dapat dijadikan masukan bagi pihak P3GI untuk langkah pemuliaan selanjutnya, seperti dalam proses pemilihan tetua untuk merancang kombinasi persilangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Adisewojo,R.S. 1983. Bercocok tanam tebu (*Saccharum officinarum*). Sumur Bandung. Bandung
- Ainsworth, C.,J. Beynon and V.Buchanan. 1995. Techniques in plant molecular biology. Wye Collage. University of London. London. p.44
- Alix,K., F.C.Baurens, F. Paulet, J.C.Glaszmann and A. D'Hont. 1998. Isolation and characterization of a satellite DNA family in the *Saccharum* complex. Genome. (41): 854-864
- Alwala,S., A. Suman, J. A. Arro, J. C. Veremis and C. A. Kimbeng.2006.Target Region Amplification Polymorphism (TRAP) for assessing genetik diversity in sugarcane germplasm collections. Crop Sci. (46): 448-455
- Anonymous. 2006. Genetics Laboratory Techniques.
<http://www.ocf.berkeley.edu/~edy/intro/intro2.html> diakses 10-7-2010
- _____. 2009^a. Data gula nasional semrawut.
<http://www.tempointeraktif.com/bisnis/> diakses tanggal 4-2-2010
- _____. 2009^b. Mikrosatelit. www.wikipedia.com diakses tanggal 15-12-2009
- Amalraj,V.A. and N. Balasundaram. 2006. On the taxonomy of the members of 'Saccharum complex'. Genetic Resources and Crop Evolution (53): 35-41
- Arnheim,N and C.H.Levenson. 1990. Polymerase chain reaction in special report. C and CN. Washington DC. pp.36-47
- Arro,J.A, J.C.Veremis, C.A.Kimberg and C.Botanga. 2006. Genetik diversity and relationships revealed by AFLP markers among *Saccharum spontaneum* and related species and genera. Journal American Society Sugar Cane Technologists. (26):101-115
- Azrai, M. 2005. Pemanfaatan penanda molekuler dalam proses seleksi pemuliaan tanaman. AgroBiogen 1(1): 26-37
- Bagali, P.G., P.D. Antony, K. Raghavendra, Pramod G.B., S. Hittalmani and J.S.Vadivelu. 2010. Application of molecular markers in plant tissue culture. Aspac J.Mol.Biol. Biotechnol. 18(1): 85-87
- Balestre,M., R.G. Von Pinho, J. C. Souza and J. L. Lima. 2008. Genetika dan molekul penelitian. 7(3): 695-705

- Brown, J.S., R.J. Schnell, E.J. Power, Stephanie L.D., D.N. Kuhn. 2007. Analysis of clonal germplasm from five *Saccharum* species: *S. barberi*, *S. robustum*, *S. officinarum*, *S. sinense* and *S. spontaneum*. A study of inter and intra species relationships using microsatellite markers. *Genet Resour Crop Evol* (54) :627-648
- CIMMYT. 2005. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Third Edition. Mexico, D.F.: CIMMYT
- Cordeiro, G.M., Y.B. Pan and R.J. Henry. 2003. Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. *Plant Sci.* (165) :181-189
- Dalirsefat, S.B., S.M. Andreia and Z.M. Seyed. 2009. Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with amplified fragment length polymorphism markers in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Science* (9):71.p.3
- Direktorat Jenderal Perkebunan. 2009. Luas areal dan produksi perkebunan seluruh Indonesia menurut pengusaha. http://ditjenbun.deptan.go.id/web.old//index.php?option=com_content&task=view&id=123&Itemid=81 diakses tanggal 4-2-2010
- Fegan, M. 1995. Agarose Gel Elektrophoresis of DNA in Finger Printing in Plant Pathology. Conference Workshop Manual, Lincoln University. New Zealand
- Guasmi, F., L. Touil, K. Feres, W. Efelah, T. Triki and A. Ferchichi. 2008. Genetic diversity of Tunisian barley accessions based on microsatellite markers. *Biotechnology* 7 (4): 781-786
- Grivet, L., J. Christophe, Glaszmann and A.D'Hont. 2006. Molecular evidence of sugarcane evolution and domestication. *Genetics and Origin of Crops*. pp. 49-62
- Handayani, S. 2008. Evaluasi keragaman genetik plasma nutfah tebu asli (*Saccharum Officinarum*) asal Indonesia berdasarkan penanda molekuler mikrosatelit. Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang
- Hartati, D., A. Rimbawanto, Taryono, E. Sulistyanyingsih, dan AYPBC Widyatmoko. 2007. Pendugaan keragaman genetik di dalam dan antar provenan pulai (*Alstonia scholaris* (L.) R.Br.) menggunakan penanda RAPD. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*. 1(2):1-9
- Hays, L. 2007. Introduction to DNA extraction. <http://www.accessexcellence.org/captcha/email.cgi>. diakses 20-6-2010

- Heinz, J.D. 1987. Sugarcane improvement through breeding. Elsevier. New York. pp.128-132
- Herison, C., Rustikawati dan Eliyati. 2003. Penentuan protocol yang lengkap untuk menyiapkan DNA genom cabai (*Capsicum* sp). Jurnal Akta Agrosia 6(2):38-43
- Hoffmann. 2002. Polymerase Chain Reaction. <http://www.sci.sdsu.edu/smaloy/MicrobialGenetics/topics/in-vitro-genetics/PCR.html>. Diakses tanggal 2-7-2010
- Indriani dan Sumiarsih. 1992. Pembudidayaan tebu di lahan sawah dan tegalan. PT. Penebar Swadaya. Jakarta. pp. 8-23
- James, G. 2004. Sugarcane. Second Edition. Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing Company. pp. 1-7
- Julisaniah, N.I., L.Sulistyowati dan A.N.Sugiharto. 2008. Analisis kekerabatan mentimun (*Cucumis sativus* L.) menggunakan metode RAPD-PCR dan isozim. Biodiversitas. 9(2):99-102
- Karsinah, Sudarsono, L.Setyobudi dan H. Aswidinnor. 2002. Keragaman genetik plasma nutfah jeruk berdasarkan analisis penanda RAPD. Jurnal Bioteknologi Pertanian. 7 (1): 9
- Kartikaningrum, S., N.Hermiati, A.Baihaki, M. Haeruman dan N.T.Mathius. 2002. Kekerabatan antar genus anggrek sub tribe *Sarcanthinae* berdasarkan data fenotip dan pola pita DNA. Zuriat. 13(1):1-10
- Karuri, H.W., E.M. Ateka, R. Amata, A.B. Nyende, A.W.T. Muigai, E. Mwasame and S.T. Gichuki. 2010. Evaluating diversity among Kenyan sweet potato genotypes using morphological and SSR markers. Int. J. Agric. Biol. 12: 33-38
- Khan, F.A., A.Khan, F.M.Azhar and S.Rauf. 2009 Genetik diversity of *Saccharum officinarum* accessions in Pakistan as revealed by random amplified polymorphic DNA. Genet.Mol.Res. 8(4): 1376-1382
- Kumaunang, J., I. Maskromo, E. Manaroinsong. 2006. Evaluasi keragaman genetik plasma nutfah kelapa genjah di kp.mapanget berdasarkan penanda DNA SSRs (*Simple Sequence Repeats*). Jurnal Littri. 12 (3):116-120
- Lamadji, S. 1994. Pelestarian plasma nutfah tebu. Gula Indonesia. 19(1):33-37
- _____. 1998. Pemberdayaan sifat morfologi untuk analisis kekerabatan plasma nutfah tebu. Buletin P3GI.148:17-31
- Lowe, A., S.Harris and P.Ashton. 2004. Ecological genetics: design, analysis and application. Blackwell Publishing. United Kingdom

- Martinez,L., P. Cavagnaro, R. Masuelli and J. Rodriguez. 2003. Evaluation of diversity among Argentine grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties using morphological data and AFLP markers. *Electronic Journal of Biotechnology*. 6(3)
- Miller,J.D. and R.A. Gilbert. 2009. Sugarcane Botany: A Brief View. IFAS Extension.SS-AGR-234.pp:1-6 <http://edis.ifas.ufl.edu> diakses tanggal 11 Maret 2010
- Moenandir. 1993. Budidaya tanaman tebu. FP. Unibraw. Malang
- Muladno. 2002. Teknologi rekayasa genetika. Pustaka Wirausaha Muda-USESE Foundation. Bogor
- Nair,V., Nair S., T.V. Sreenivasan, M.Mohan. 1999. Analysis of genetic diversity and phylogeny in *Saccharum* and related genera using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 46: 73–79
- Notojoewono, A.W. 1983. Berkebun tebu lengkap. PT. Soeroengan. Jakarta
- Pabendon, M.B. 2004. Pemanfaatan marka molekuler untuk identifikasi varietas tanaman dalam bidang pemuliaan tanaman. Makalah Pribadi Falsafah Sains. IPB: 1-11
- Pan,Y.B., G.M. Corderio., E.P. Richard Jr. and R.J. Henry. 2003. Molecular genotyping of sugarcane clones with microsatelit DNA markers. *Maydica*. (48) : 319-329
- Pan,Y.B. 2006. Highly polymorphic microsatellite DNA markers for sugarcane germplasm evaluation and variety identity testing. *Sugar tech*. 8(4):246-256
- Pandin, D. 2010. Penanda DNA untuk Pemuliaan Tanaman kelapa (*Coccoloba nucifera* L.). *Perspektif*. 9(1): 21-35
- Parida,S.K, S.K. Kalia, K.Sunita, D.Vivek, G. Hemaprabha, A.Selvi, A.Pandit, S.Archana, K.Gaikwad, T.R. Sharma, P.S. Srivastava, N.K. Singh, T.Mohapatra. 2009. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. *Theor Appl Genet*. 118:327–338
- Piperidis,G., M.J. Christopher, B.J. Carroll, N.Berding and A.D’Hont. 2000. Molecular contribution to selection of intergeneric hybrid between sugarcane and the wild spesies *Erianthus arundinaceus*. *Genome* (43): 1033-1037
- Prana,T.K. dan N.S. Hartati. 2003. Identifikasi sidik jari DNA talas (*Colocasia esculenta* L. Schott) Indonesia dengan teknik RAPD : skrining primer dan optimalisasi kondisi PCR. *Jurnal Natur Indonesia*. 5(2):107-112

- Prasetyono,J., Tasilah, H. Aswidinnor, dan M.Sugiono. 2003. Identifikasi marka mikrosatelit yang terpaut dengan sifat toleransi terhadap keracunan aluminium pada padi persilangan Dupa x ITA 131. *Bioteknologi Pertanian*.8(2):35-45
- Promega. 1996. PCR protocols and reference guide. Promega Crop.USA.p.195
- Ramdoyal,K. and G.H.Badaloo. 2002. Prebreeding in sugarcane with an emphasis on the programme of the mauritius sugar industry research institute. *Managing Plant Genetic Diversity*. IPGRI.pp.307-309
- Roslim,D.I., H.Alex dan Suharsono. 2003. Kemiripan genetika tiga populasi kelapa tipe dalam berdasarkan tiga metode analisis data penanda RAPD.*Hayati*(10):1. pp.12-18
- Ruswandi,D., N.Wicaksana, M.B.Pabendon, M.Azrai, M.Rachmadi, A.Ismail, N.Carsono, F.damayanti dan F.Kasim. 2005. Molecular characterization of quality protein maize and downy mildew resistance lines bases on simple sequence repeats (SSRs) Marker. *Zuriat*.16(1):21-35
- Sambrook, J., E. Fritish and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning*. Cold Spring. Harbor Laboratory Press. New York. USA
- Sastrowijono,S. 1996. Cara mengenal klon-klon tebu secara morfologis.PG3I. Pasuruan
- Saghai-Marooof, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. and Allard,R.W. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 8014–8018.
- Schenk,S., M.W.Crepeau, K.K. Wu, P.H. Moore, Q. Yu, and R. Ming. 2004. Genetic diversity and relationships in native Hawaiian *Saccharum officinarum* sugarcane. *Journal of Heredity*. 95(4):327-331
- Setyamidjaja dan Azharni. 1992. *Tebu bercocok tanam dan pascapanen*. CV Yasaguna. Jakarta. pp. 26-42
- Smith ,C.A. and E.J. Wood. 1991. *Molecular biology and biotechnology* .Chapman and Hall,ltd. California
- Srivastava,S. and S.G.Prashant. 2008. Inter simple sequence repeat profile as a genetic marker system in sugarcane. *Sugar Tech.* 10 (1):48-52
- Sudarnadi,H. 1996. *Tumbuhan monokotil*. Penebar Swadaya. Jakarta
- Suharyanto.2002. Analisis keragaman genetik dan hubungan kekerabatan pada tanaman sengon (*Paraserianthes falcataria*) dengan marka molekuler RAPD dan marka morfologi. <http://www.tanindo.com/abdi8/hal74501.htm> diakses 20-12-2009

- Sukarso,G. dan B.Hermono. 1992. Pemuliaan tebu di Indonesia. Prosiding Simposium Pemuliaan Tanaman I. Jawa Timur.pp.190-192
- Susila,W. 2006. Momentum emas kejayaan kembali industri gula Indonesia. http://www.ipard.com/art_perkebun/may24-06_wrs02.asp diakses 19-12-2009
- Susilo,A.W. 2007. Akselerasi program pemuliaan kakao (*Theobroma cacao* L.) melalui pemanfaatan penanda molekuler dalam proses seleksi. Warta Pusat Penelitian Kopi dan kakao Indonesia. 23(1):11-24
- Talbot,S.J. Gusti, K.Sage, J.Pearce dan T.Wiecke. 2003. DNA Sampling Protocols. <http://absc.usgs.gov/>. Diakses tanggal 20-6-2010
- Tjatjo, A.A., Baharuddin dan L.Asrul. 2008. Keragaman morfologi buah kakao harapan tahan hama penggerek buah kakao di Sulawesi Selatan dan Sulawesi Barat. Jurnal Agrisistem 4(1): 37-43
- Varshney,R.K., T.Mahendar, R. K.Aggarwal and A.Borner. 2007. Genetic molecular markers in plants: development and applications. Book_Varshney&Tuberosa_9781402062940_Proof3.:13-14
- Wahyuni,S., D.H.Xu, N.Bermawie, H.Tsunematsu and T.Ban. 2004. Skrining ISSR primer studi pendahuluan kekerabatan antar jahe merah, jahe emprit dan jahe besar. Buletin TRO. 15(1)
- Watson,J.D., J.Tooze dan D.T. Kurtz. 1988. DNA rekombinan: suatu pelajaran singkat. Alih Bahasa: W.Gunarso. Penerbit Erlangga. Jakarta. pp.19-25
- Weaver,R.F. 2002. Molecular Biology. Second Edition. Mc Graw Hill. New York.p.92
- Welsh,R.W. 1981. Fundamental of plan genetics and breeding. John Willey & Son. New York. pp.116-123
- Widodo,I. 2003. Penggunaan marka molekuler pada seleksi tanaman. <http://www.tanindo.com/abdi8/hal74501.htm> diakses 15-12-2009
- Widyasari,W.B. 2004. Mengenal lebih dekat mikrosatelit. Buletin Gula Indonesia. XXVII:(1)
- Widyasari,W.B. dan E.Sugiyarta. 2008. Koleksi dan konservasi plasma nutfah tebu di Indonesia. Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia Pasuruan
- Widyasari,W.B., N.Basuki dan E.Sugiyarta. 2008. Identifikasi keragaman genetik koleksi tebu asli (*Saccharum officinarum* L.) asal Indonesia menggunakan penanda molekuler mikrosatelit. MPG. 2(44): 73-95

Yukamgo,E. dan N.Widya. 2007. Peran silikon sebagai unsur bermanfaat pada tanaman tebu. Jurnal Ilmu Tanah dan lingkungan. 7(2) :103

Yuwono,T. 2006. Teori dan aplikasi polymerase chain reaction. Andi Press. Yogyakarta

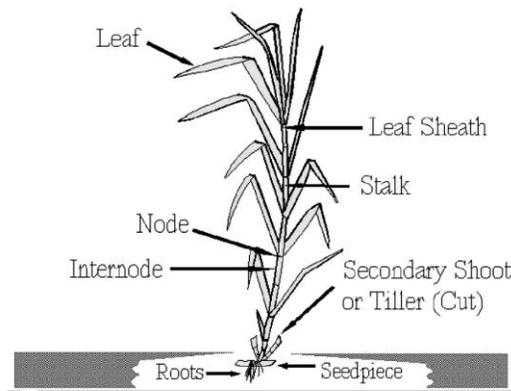
Zainal,A. dan Bahagiawati. 2005. Pengelompokan tetua padi hibrida berdasarkan sifat-sifat morfologi dan RAPD-PCR. Zuriat. 16(1): 9-21

Zhang,M., X.F.Zheng, A.L.Yu, J.S.Xu and H.Zhou. 2004. Molecular marker application in sugarcane. Sugar Tech. 6(4) : 251-259

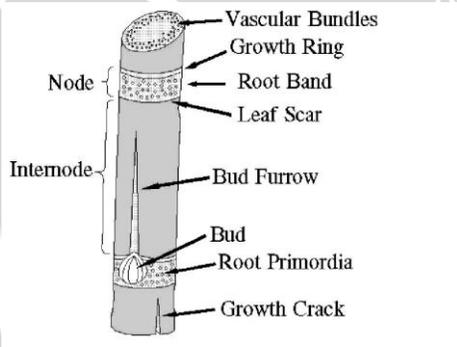
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



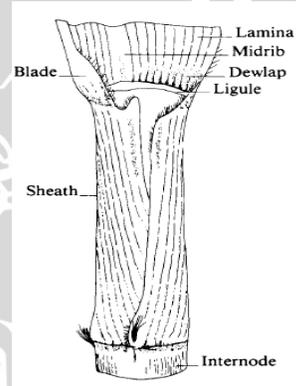
LAMPIRAN 1. Gambar Morfologi Tanaman Tebu (James, 2004; Miller dan Gilbert, 2009)



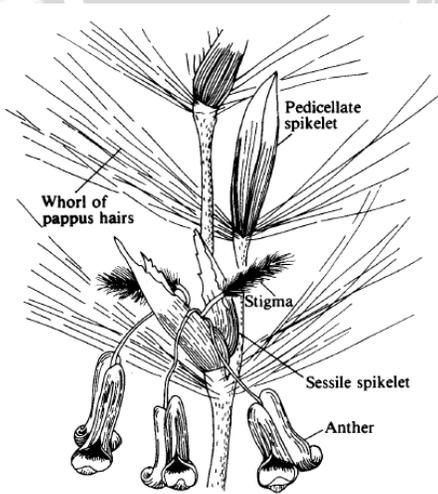
Gambar Tanaman Tebu



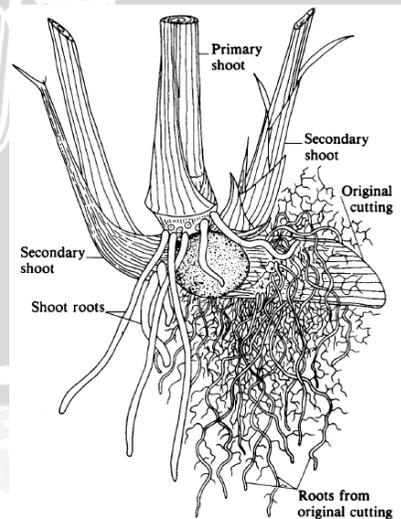
Gambar Bagian-Bagian Batang



Gambar Bagian-Bagian Daun



Gambar Bagian-Bagian Bunga



Gambar Bagian-Bagian Akar

LAMPIRAN 2.

Kegiatan Ekspedisi Plasma Nutfah Tebu di Indonesia (Widyasari dan Sugiyarta, 2008)

Nama	Tahun	Spesies/klon yang dikumpulkan
Haga	1916	Tebu hitam Rokan, <i>Erianthus</i> dan <i>Narenga</i>
Van Harreveld	1921	<i>S. spontaneum</i> klon Tabongo; <i>S. robustum</i> klon Tanangge
Asper Slag	1921	Tebu Salah (<i>S. robustum</i>)
Posthumus	1930	Di sekitar sungai Mahakam Kalimantan dan Sulawesi Tengah : <ul style="list-style-type: none"> - Tebu Salah Tipe (3) - <i>S. spontaneum</i> (9) - <i>Miscanthus spp.</i> (1)
Warner dan Grassl	1957	<ul style="list-style-type: none"> - <i>S. officinarum</i> (45) - <i>S. robustum</i> (7) - <i>S. edule</i> (3). - Biji-biji dari <i>S. robustum</i> (5), <i>S. spontaneum</i> (1) dan <i>Miscanthus spp.</i> (1).
Berding dan Koike	1976	Kalimantan (112), Sulawesi (114), Maluku (34), Papua (310): <ul style="list-style-type: none"> - <i>S. officinarum</i> (124) - <i>S. spontaneum</i> (51) - <i>S. edule</i> (24) - <i>S. robustum</i> (117) - <i>Erianthus spp</i> (152) - <i>Miscanthus spp</i> (40)
Tew, Purdy, Lamadji dan Irawan	1984	Papua, Maluku, Sulawesi dan Sumatera utara: <ul style="list-style-type: none"> - <i>S. officinarum</i> (51) - <i>S. spontaneum</i> (41) - <i>S. edule</i> (6) - <i>S. robustum</i> (22) - <i>Erianthus spp.</i> (9) - <i>Miscanthus spp.</i> (4)
Sastrowijono	1985	Papua : <ul style="list-style-type: none"> - <i>S. officinarum</i> (34) - <i>S. spontaneum</i> (34) - <i>S. edule</i> (4) - <i>Erianthus spp.</i> (11) - <i>Miscanthus spp.</i> (1) - <i>Nephia spp.</i> (1) - tak teridentifikasi (3)
Sastrowijono, Lamadji, Irawan dan Suwarno	1995	Papua : <ul style="list-style-type: none"> - <i>S. officinarum</i> (55) - <i>S. robustum</i> (21) - <i>S. edule</i> (17) - <i>Ripidium spp</i> (2) - lain-lain (2)

LAMPIRAN 3. Data Hasil Pengamatan Berdasarkan Penanda Morfologi

No.	Klon	Kode karakter morfologi																																				
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	B1	B2	B3	B4	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
1	IS76-202	C	A	B	C	D	E	A	D	C	D	C	A	C	A	C	A	A	A	A	A	B	A	A	A	C	A	A	A	A	B	A	C	C	B	A	C	A
2	IS76-205	B	A	B	C	D	A	A	D	C	D	C	A	C	A	C	A	A	A	A	A	B	A	A	A	C	A	A	A	A	B	A	A	C	B	A	C	A
3	IK76-149	C	A	B	C	D	C	A	D	C	D	C	A	E	A	C	A	A	A	A	A	B	A	A	A	C	A	A	A	A	B	A	C	B	B	A	C	A
4	IK76-150	C	A	B	C	D	A	A	D	C	D	C	A	E	A	B	A	A	A	A	A	B	A	A	A	C	A	A	A	A	B	B	C	B	B	A	C	A
5	IK76-153	B	A	A	C	D	A	A	D	C	D	C	A	C	A	B	A	A	A	A	A	B	A	A	A	C	A	A	A	A	B	B	A	C	B	A	B	A
6	IJ76-374	C	C	A	C	D	A	A	D	C	D	C	A	B	A	B	A	A	A	A	A	B	A	A	A	C	A	A	B	A	B	A	C	C	A	A	C	A
7	IJ76-375	B	A	B	C	D	A	A	D	C	D	C	A	B	A	C	A	A	A	A	A	B	A	A	A	C	A	A	B	A	B	A	A	C	B	A	C	A
8	IJ76-370	C	A	A	C	D	A	A	D	C	D	C	A	B	A	C	B	A	A	A	A	B	A	A	A	C	A	A	B	A	B	A	C	C	B	A	C	A
9	IJ76-348	C	A	A	C	D	D	A	D	C	D	C	A	B	A	B	A	A	A	A	A	B	A	A	A	C	A	A	B	A	B	A	A	C	A	A	C	A
10	IJ76-396	C	A	A	C	D	D	A	D	C	D	C	A	B	C	A	A	A	A	A	B	A	A	A	C	A	A	B	A	E	C	C	B	B	A	C	A	
11	M442-51	B	B	B	C	D	B	A	D	C	D	B	A	D	C	C	A	C	A	A	A	A	A	A	B	A	B	B	A	A	B	A	C	A	A	B	A	
12	PS862	B	A	B	A	C	D	C	A	A	B	A	C	D	A	D	B	F	A	A	A	A	B	B	B	B	A	B	C	A	C	B	C	C	A	B	C	A
13	TD50	B	B	A	C	D	B	A	D	C	D	C	C	D	A	D	B	A	B	C	C	A	A	A	B	A	B	B	A	C	B	B	C	A	A	A	A	
14	TD53	C	B	B	C	D	A	A	D	C	D	C	B	D	A	D	B	A	A	A	C	A	A	A	B	A	B	A	A	B	B	A	C	A	A	B	A	
15	15OC18	B	B	B	C	D	A	B	A	A	A	C	B	B	A	C	B	D	A	A	A	A	A	A	C	A	B	A	A	C	B	A	C	B	B	A	C	A
16	15OC19	C	B	C	C	D	A	B	A	A	A	C	B	E	A	C	B	D	A	A	A	A	A	A	B	A	B	B	A	C	B	A	C	B	A	C	A	
17	IK76-36	C	A	A	C	D	A	A	D	C	D	A	C	D	A	D	B	D	A	A	A	A	A	A	C	A	A	C	A	B	B	A	C	B	A	C	B	A
18	IK76-41	B	A	A	C	D	A	A	D	C	D	A	C	D	A	C	B	A	A	A	A	A	A	A	C	A	A	C	A	B	B	A	C	B	A	C	A	
19	IS76-175	C	C	C	C	D	C	B	A	A	A	C	A	B	A	B	A	D	A	A	A	B	C	C	C	C	A	B	A	B	B	A	C	B	A	B	A	
20	IS76-181	C	A	B	C	D	A	B	A	A	A	A	C	B	A	B	A	D	A	A	A	B	A	A	B	A	A	C	A	A	B	B	C	B	A	A	A	
21	IJ76-412	C	A	B	A	A	A	C	A	A	B	A	A	B	A	D	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	B	B	A	A	C	B	A	C	A	B	A	
22	IJ76-415	C	A	C	B	A	B	A	D	C	D	C	A	E	A	C	A	D	A	A	A	A	B	A	A	C	A	B	A	B	B	A	C	C	B	B	C	A
23	XOC55	C	A	A	A	A	A	A	D	C	D	A	B	D	E	D	B	D	A	B	A	B	B	B	B	B	A	B	B	A	B	B	C	B	A	C	A	
24	XOC56	C	A	B	C	D	A	B	A	A	A	A	A	B	A	D	B	A	A	C	A	A	A	A	C	A	B	A	A	C	B	C	C	B	A	C	A	

Keterangan: Arti kode karakter morfologi pada Lampiran 5

LAMPIRAN 4. Data Biner Berdasarkan Penanda Morfologi

Klon	D1			D2			D3			D4			D5					D6					P1			P2				P3			P4				P5			P6			P7				
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	D	A	B	C	D	E	A	B	C	A	B	C	D	A	B	C	A	B	C	D	A	B	C	A	B	C	A	B	C	D	E	
IS76-202	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	
IS76-205	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0		
IK76-149	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	
IK76-150	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1			
IK76-153	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0			
IJ76-374	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0			
IJ76-375	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0			
IJ76-370	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	
IJ76-348	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
IJ76-396	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
M442-51	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0		
PS862	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
TD50	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	
TD53	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0		
15OC18	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0		
15OC19	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1		
IK76-36	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
IK76-41	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0
IS76-175	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0		
IS76-181	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	
IJ76-412	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
IJ76-415	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1		
XOC55	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	
XOC56	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	

Keterangan: Arti kode karakter morfologi pada Lampiran 5

LAMPIRAN 5. Deskripsi Kode dari Karakter Morfologi (Sastrowijono, 1996)

D1 = Lengkung helai daun	(A) Tegak ; (B) Melengkung $< 1/2$; (C) Melengkung $\leq 1/2$
D2 = Warna daun	(A) Hijau ; (B) Hijau tua ; (C) Hijau kekuningan
D3 = Ukuran lebar daun	(A) Sempit ($< 4\text{ cm}$) ; (B) Sedang ($4-6\text{ cm}$) ; (C) Lebar ($> 6\text{ cm}$)
D4 = Kedudukan telinga daun	(A) Tegak ; (B) Serong ; (C) Tidak bertelinga
D5 = Tinggi telinga daun	(A) Tinggi 1 ; (B) $> 1- < 3$ kali lebarnya ; (C) ≥ 3 kali lebarnya ; (D) Tidak bertelinga
D6 = Warna sendi segitiga	(A) Hijau kekuningan ; (B) Hijau kecoklatan ; (C) Hijau kuning kecoklatan ; (D) Hijau ; (E) Lainnya
P1 = Bidang punggung	(A) Tidak ada ; (B) Jarang ; (C) Lebat
P2 = Panjang bidang punggung	(A) Tidak mencapai puncak pelepah ; (B) Hampir mencapai ($\leq 1\text{ cm}$) puncak pelepah ; (C) Mencapai puncak pelepah ; (D) Tidak ada
P3 = Lebar bidang punggung	(A) $< 1/4$ lebar pelepah ; (B) $\geq 1/4$ lebar pelepah ; (C) Tidak ada
P4 = Kedudukan bidang punggung	(A) Rebah ; (B) Condong ; (C) Tegak ; (D) Tidak ada
P5 = Lapisan lilin pelepah	(A) Sedikit ; (B) Sedang ; (C) Banyak
P6 = sifat lepas pelepahan	(A) Sukar ; (B) Agak mudah ; (C) mudah
P7 = Warna pelepah	(A) Hijau tua ; (B) Hijau kekuningan ; (C) Hijau kuning keunguan ; (D) Hijau kuning kemerahan; (E) Lainnya
R1 = Warna ruas	(A) Hijau kekuningan; (B) Hijau; (C) Hijau kuning kecoklatan; (D) Hijau kuning keunguan; (E) Hijau kuning kemerahan; (F) Lainnya
R2 = Lapisan lilin ruas	(A) Tidak ada ; (B) Sedikit ; (C) Sedang ; (D) Banyak
R3 = Susunan ruas	(A) Lurus ; (B) Berbiku
R4 = Bentuk ruas	(A) Silindris ; (B) Tong ; (C) Kumparan ; (D) Konis ; (E) Konis terbalik ; (F) Cembung-cekung
R5 = Noda gabus	(A) Tidak ada ; (B) Sedikit ; (C) Banyak
R6 = Retakan gabus	(A) Tidak ada ; (B) Sedikit ; (C) Banyak
R7 = Retakan tumbuh	(A) Tidak ada ; (B) Jarang ; (C) Hampir di seluruh ruas
R8 = Penampang melintang ruas	(A) Bulat ; (B) Pipih
R9 = Alur mata	(A) Tidak ada ; (B) Ada dangkal ; (C) Ada dalam
R10 = Lebar alur mata	(A) Tidak ada ; (B) Sempit ; (C) Lebar
R11 = Panjang alur mata	(A) Tidak ada ; (B) Tidak mencapai tengah ruas ; (C) Mencapai tengah ruas
B1 = Letak cincin tumbuh	(A) Diatas puncak mata ; (B) Menyinggung puncak mata ; (C) Di belakang puncak mata; (D) Di bawah puncak mata
B2 = Bentuk cincin tumbuh	(A) Melingkar datar ; (B) Melengkung
B3 = Jumlah mata akar	(A) 1 baris ; (B) 2-3 baris ; (C) 3-4 baris ; (D) > 4 baris
B4 = Bentuk buku ruas	(A) Silindris ; (B) Konis ; (C) Konis terbalik ; (D) Tong ; (E) Kumparan
M1 = Kedudukan mata	(A) Pada bekas pangkal pelepah daun ; (B) Di atas bekas pangkal pelepah daun
M2 = Bentuk mata	(A) Bulat ; (B) Bulat panjang ; (C) Lebat
M3 = Bagian terlebar mata	(A) Di bawah mata ; (B) Pada mata; (C) Di atas tengah-tengah mata
M4 = Ukuran sayap mata	(A) Sama lebar ; (B) Basis sempit ; (C) Basis lebar
M5 = Pusat tumbuh	(A) Di bawah tengah mata ; (B) Pada tengah mata ; (C) Di atas tengah mata ; (D) Di puncak mata
M6 = Rambut tepi basal	(A) Tidak ada ; (B) Ada
M7 = Rambut jambul	(A) Tidak ada ; (B) Ada
M8 = Ukuran mata	(A) Kecil ; (B) Sedang ; (C) Besar
M9 = Tepi sayap	(A) Rata ; (B) Bergerigi ; (C) Puncak berlekuk

LAMPIRAN 6. Data Biner 24 Klon *Saccharum* complex Berdasarkan Penanda Molekuler (Primer MCSA053C10)

Klon	Ukuran Pita (bp)																							
	98	100	150	158	164	175	186	200	263	337	400	425	433	450	467	475	480	490	500	550	650	800	810	950
IK76-36	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IK76-41	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IK76-149	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IK76-150	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IK76-153	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IS76-202	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IS76-205	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
15OC18	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15OC19	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IJ76-412	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IJ76-415	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
TD50	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TD53	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
IJ76-375	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
IJ76-374	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
IJ76-370	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
IJ76-396	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
IJ76-348	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
XOC55	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XOC56	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IS76-175	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
IS76-181	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M442-51	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
PS862	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

LAMPIRAN 7. Data Biner 24 Klon *Saccharum complex* Berdasarkan Penanda Molekuler (Primer SMC1047HA)

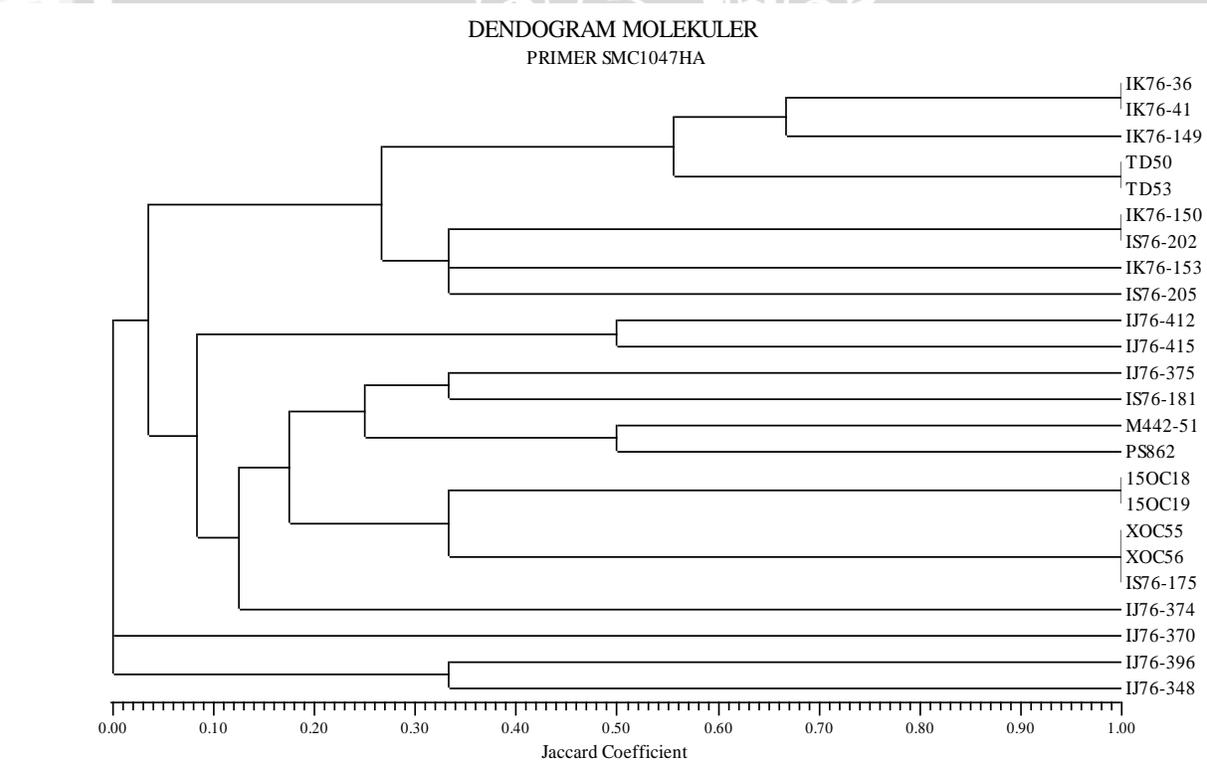
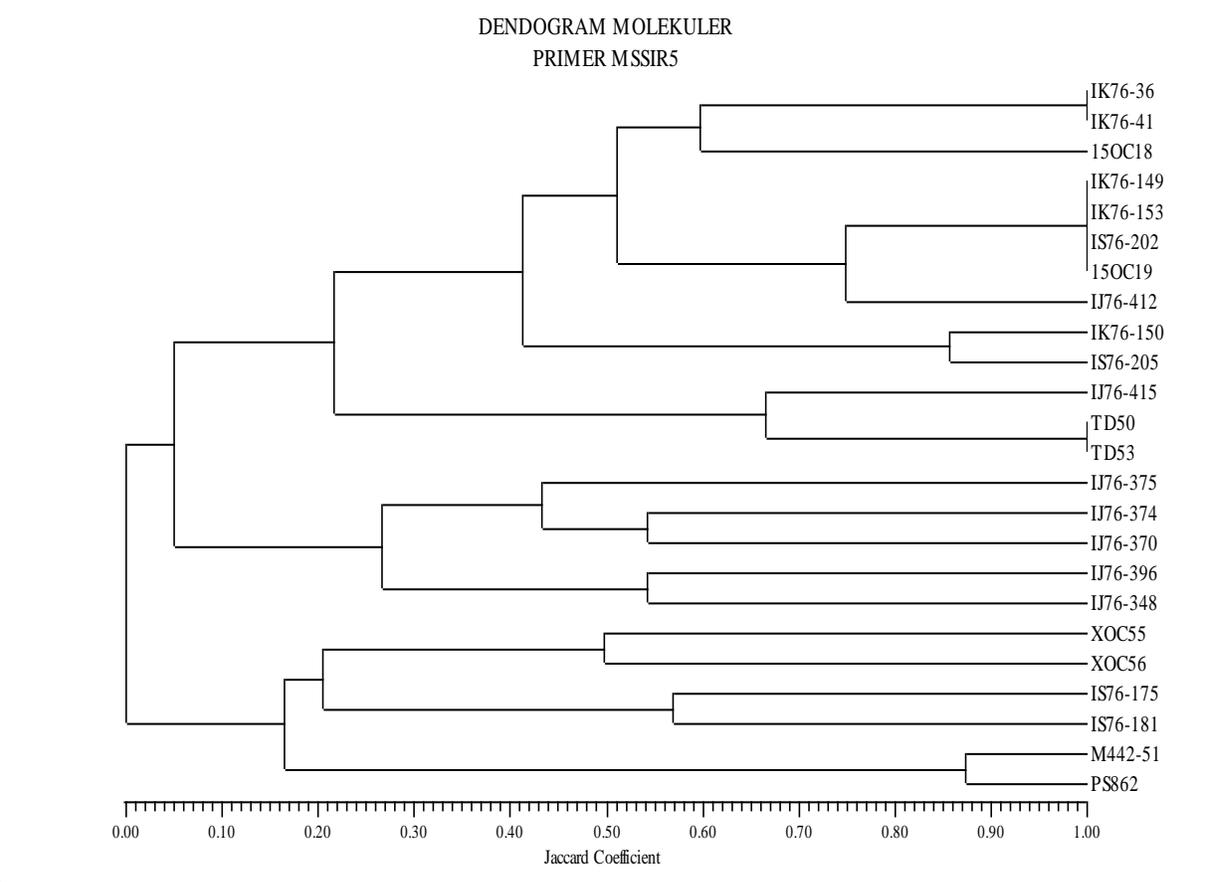
Klon	Ukuran Pita (bp)																					
	76	88	140	150	180	188	190	200	220	260	300	325	350	540	610	650	675	700	750	810	950	1642
IK76-36	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IK76-41	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IK76-149	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IK76-150	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IK76-153	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IS76-202	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IS76-205	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15OC18	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
15OC19	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
LJ76-412	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LJ76-415	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TD50	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
TD53	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
LJ76-375	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LJ76-374	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
LJ76-370	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
LJ76-396	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
LJ76-348	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XOC55	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
XOC56	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
IS76-175	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
IS76-181	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M442-51	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
PS862	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

LAMPIRAN 8. Data Biner 24 Klon *Saccharum complex* Berdasarkan Penanda Molekuler (Primer MSSCIR5)

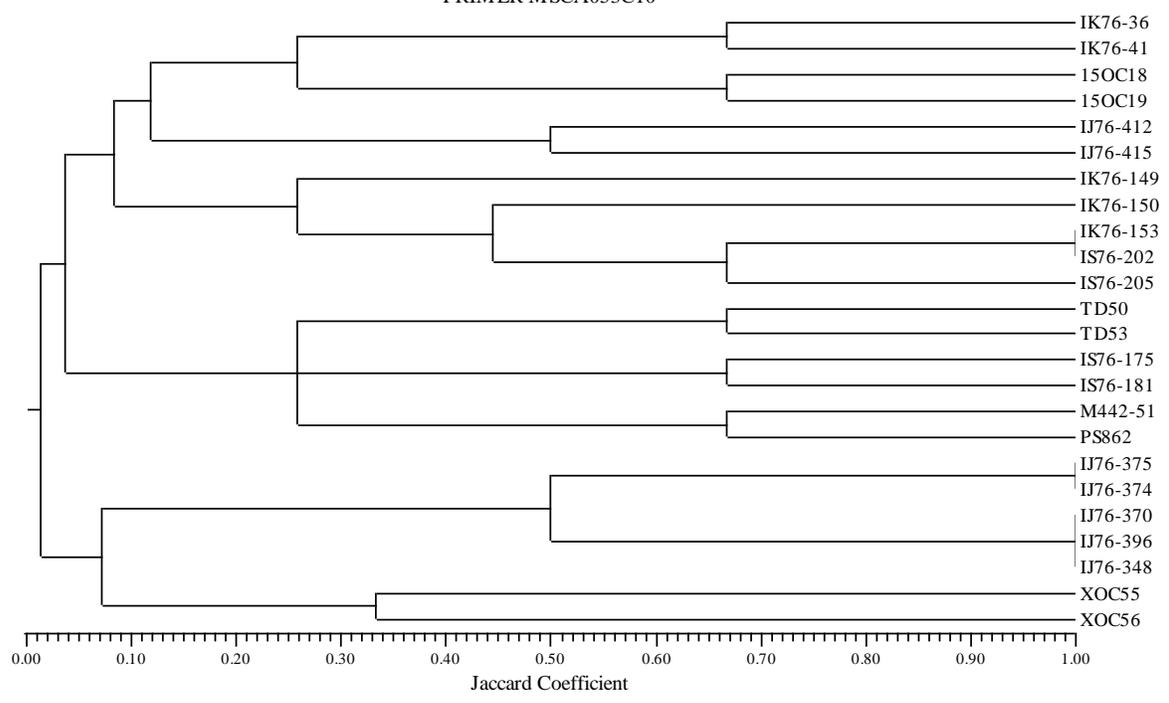
Klon	Ukuran Pita (bp)																					
	83	85	93	100	107	114	123	139	143	157	165	178	185	210	215	235	245	250	275	283	285	290
IK76-36	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IK76-41	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IK76-149	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
IK76-150	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
IK76-153	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
IS76-202	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
IS76-205	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
15OC18	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
15OC19	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
IJ76-412	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
IJ76-415	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TD50	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TD53	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IJ76-375	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
IJ76-374	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
IJ76-370	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
IJ76-396	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
IJ76-348	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
XOC55	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
XOC56	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
IS76-175	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
IS76-181	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
M442-51	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
PS862	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Klon	Ukuran Pita (bp)																					
	330	350	388	395	400	434	468	484	550	560	600	650	700	750	900	934	966	1031	1100	1400	1500	1600
IK76-36	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IK76-41	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IK76-149	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IK76-150	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
IK76-153	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IS76-202	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IS76-205	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
15OC18	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
15OC19	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IJ76-412	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
IJ76-415	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
TD50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
TD53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
IJ76-375	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
IJ76-374	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
IJ76-370	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
IJ76-396	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
IJ76-348	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
XOC55	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
XOC56	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
IS76-175	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
IS76-181	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
M442-51	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
PS862	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0

LAMPIRAN 9.



DENDOGRAM MOLEKULER
PRIMER MSCA053C10



LAMPIRAN 10. Daftar Bahan yang Digunakan

No.	Bahan	Fungsi
1.	Aquabides	Pelarut bahan-bahan yang digunakan
2.	Tris base	Merusak integritas barier dinding sel
3.	NaCl	Menghilangkan kontaminan polisakarida
4.	EDTA	Menghilangkan ion magnesium untuk mempertahankan keseluruhan struktur selubung sel
5.	CTAB	Menghilangkan kontaminan polisakarida
6.	Nitrogen cair	Merusak dinding sel dan memudahkan dalam penggerusan
7.	Isopropanol	Membantu presipitasi DNA yang diekstraksi
8.	TE buffer	Pelarut DNA sampel
9.	Etanol 76%	Mencuci DNA dari berbagai kontaminan
10.	Natrium Asetat (NaOAC)	Presipitasi DNA yang diekstraksi
11.	Amonium Asetat (NH ₄ OAC)	Presipitasi DNA yang diekstraksi
11.	TAE 1x	Pelarut pembuatan agarose dalam pembuatan gel untuk elektroforesis DNA; sebagai elektrolit dalam elektroforesis DNA dan produk PCR
12.	Agarose	Elektroforesis kualitas DNA dan membantu dalam visualisasi hasil PCR
13.	MgCl ₂	Berperan dalam proses penempelan primer dan aktivitas enzim <i>Taq Polymerase</i> dalam reaksi PCR
14.	Buffer Go Green	Sebagai buffer komponen PCR (mengandung KCl dan Tris Cl)
15.	Deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs)	Material untuk sintesis DNA, bersama <i>Taq Polymerase</i> mencetak rangkaian molekul DNA baru
16.	Primer mikrosatelit (forward dan reverse)	Merupakan oligonukleotida pendek untuk mengawali reaksi polimerisasi
17.	Taq DNA Polymerase	Berperan dalam amplifikasi DNA, untuk mencetak rangkaian DNA baru
18.	Nuclease Free Water	Sebagai pelarut komponen PCR
19.	Ethidium Bromide	Berinteraksi dengan basa DNA dan memberikan warna orange fluoresen dibawah sinar ultraviolet; mendeteksi asam nukleat untai tunggal atau ganda
20.	DNA Ladder	Ukuran panjang DNA tertentu yang sudah diketahui. Digunakan untuk mengestimasi ukuran DNA sample yang dianalisis (satuan <i>basepair</i>)

LAMPIRAN 11. Daftar Alat yang Digunakan

No.	Nama Alat	Fungsi
1.	Ultrasonic Cleaner (BRANSON 1200)	Untuk sterilisasi alat-alat yang kecil seperti tip dan tube (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/larutan dengan jumlah skala mikro tertentu
7.	Tube (eppendorf)	Wadah sampel DNA dan larutan lain
8.	Gelas ukur	Untuk mengukur banyaknya larutan yang dibutuhkan
9.	Botol dengan ukuran yang variatif	Wadah larutan-larutan yang dibutuhkan
10.	Waterbath	Untuk inkubasi sampel DNA hasil isolasi
11.	Mesin Centrifuge (HERMLE z233 MK-2)	Memisahkan komponen-komponen yang terdapat dalam larutan; memisahkan supernatan dan endapannya pada proses isolasi DNA
12.	Timbangan analitik	Untuk menimbang bahan-bahan yang diperlukan
13.	Mesin Spektrofotometer (U-1800)	Mengukur kuantitas dan kualitas DNA yang diuji
14.	Electrophoresis chamber	Untuk mengetahui kualitas DNA hasil isolasi; untuk separasi pita DNA hasil amplifikasi pada tegangan tertentu
15.	Microwave	Untuk memanaskan larutan agarose
16.	Flash (Denver Instrument)	Menghomogenkan larutan
17.	Lemari es (Frezeer)	Menyimpan sample DNA dan bahan-bahan lainnya
18.	Distiled water	Untuk sterilisasi H ₂ O
19.	UV Transluminator	Melihat visualisasi kualitas DNA dan hasil amplifikasi
20.	Foto Pollaroid	Untuk dokumentasi gambar kualitas DNA dan pita-pita DNA hasil amplifikasi dengan PCR

LAMPIRAN 12. Hasil Pengamatan Morfologi Tebu

Karakter Daun (Telaga Daun)



Saccharum
(IJ76-412)
Tinggi 1 cm



Erianthus
(IK76-150)
Tidak ada



Miscanthus
(IS76-181)
Tidak ada



Saccharum hybrid spp.
(PS862)
Tinggi 3 cm

Karakter Batang



S. Spontaneum
(IK76-36)



S. barberi
(XOC56)



S. officinarum
(TD50)



Erianthus
(IK76-149)



Miscanthus
(IS76-175)



Saccharum hybrid spp.
(PS862)

Karakter Bentuk Mata



S.officinarum
(TD53)



S.spontaneum
(IJ76-41)



S.barberi
(XOC56)



Erianthus
(IK76-150)



Erianthus
(IS76-202)



Miscanthus
(IS76-176)



Miscanthus
(IS76-181)



Saccharum hybrid spp.
(PS862)

