

KEKERABATAN TEMBAKAU MADURA (*Nicotiana tabacum* L.) BERDASARKAN KARAKTER MOLEKULAR

Budi Setiadi Daryono ¹⁾ Achmad Amzeri ²⁾, dan Kaswan Badami ²⁾

¹⁾ Staf Pengajar Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

²⁾ Staf Pengajar Fakultas Pertanian Jurusan Agroekoteknologi Universitas Trunojoyo Madura

ABSTRACT

The observed of exploration conducted in four Districts consisted in Madura could be 22 Madura tobacco genotypes. To assemble the desired tobacco varieties prior characterization of existing germplasm. Characterization based on molecular characters is one of the initial steps prior to assembly of the tobacco varieties to determine the potential of tobacco to be used as material cross. The purpose of the research is to identify the genetic variability and kinship Madura tobacco germplasm based on molecular characters with RAPD analysis. The result of this research concluded that : (1) based on RAPD markers used the primer OPB-8, OPC-11, OPF-10, OPA-2 and OPC-15, could distinguish genotypes that had a large genetic diversity and genotype had a small genetic distance. The results showed that tobacco Madura consisted of two clusters, A clusters was composed 15 genotypes and B clusters consisted of 7 genotypes, while Bukabu saang and Prancak-95 separated with other Madura tobacco with genetic distance of 0,44 and 0,50, and (3) Prospective elders best to get the desired varieties were Bukabu saang and Prancak-95.

Key word : Phenetic and genetic relationships, Madura tobacco, RAPD

ABSTRAK

Hasil eksplorasi tembakau Madura di empat kabupaten Madura didapatkan 22 genotip tembakau Madura. Untuk merakit varietas tembakau yang diinginkan terlebih dahulu dilakukan karakterisasi plasma nutfah yang ada. Karakterisasi berdasarkan karakter molekular merupakan salah satu langkah awal sebelum melakukan perakitan varietas

tembakau untuk mengetahui potensi tembakau yang akan digunakan sebagai bahan persilangan. Tujuan penelitian adalah untuk mengidentifikasi variabilitas genetik dan hubungan kekerabatan plasma nutfah tembakau Madura berdasarkan karakter molekular dengan analisis *RAPD*. Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa : (1) berdasarkan penanda *RAPD* menggunakan primer OPB-8, OPC-11, OPF-10, OPA-2 dan OPC-15, dapat membedakan genotip yang mempunyai keragaman genetik besar dan genotip yang mempunyai jarak genetik yang kecil, (2) Hasil dendrogram menunjukkan bahwa tembakau Madura terdiri dari dua kluster yaitu kluster A terdiri dari 15 genotip dan Kluster B terdiri dari 7 genotip, sedangkan buka busaang dan prancak-95 terpisah dengan tembakau Madura yang lain dengan jarak genetik 0.44 dan 0.50 dan (3) Calon tetua terbaik untuk mendapatkan varietas yang diinginkan adalah buka busaang dan prancak-95.

Kata kunci : hubungan kekerabatan, tembakau madura, *RAPD*

PENDAHULUAN

Tanaman Tembakau merupakan komoditi yang sangat penting bagi masyarakat Madura, dan dari empat kabupaten yang ada di Madura, terdapat 3 kabupaten yang penduduknya mayoritas menanam tembakau yaitu Kabupaten Pamekasan, Sampang dan Sumenep, sehingga tanaman ini merupakan salah satu komoditi yang banyak dibudidayakan oleh masyarakat Madura. Namun pada beberapa tahun terakhir petani tembakau di Madura mengalami kerugian karena harga dari tembakau Madura

mengalami penurunan yang disebabkan oleh rendahnya kualitas tembakau, serangan hama penyakit dan tuntutan beberapa pabrik yang menghendaki kadar nikotin dan tar rendah. Selain itu rendahnya pendapatan petani disebabkan juga oleh produksi dari tembakau madura yang agak rendah (Suwarso, 2002; Mukani, *et al*, 2003).

Cara memecahkan permasalahan tersebut adalah (1) memperbaiki lingkungan tempat tanaman tersebut tumbuh dan berkembang, (2) merakit suatu varietas yang tahan terhadap cekaman lingkungan biotik maupun abiotik dan mempunyai potensi hasil tinggi yang dihasilkan melalui program pemuliaan. Menurut Mangoendidjojo (2003), bahwa untuk merakit suatu varietas membutuhkan strategi dalam pemuliaan tanaman agar varietas yang diinginkan bisa tercapai, diantaranya (1) Pengenalan tanaman (karaktersisasi tanaman), (2) Pemilihan bahan pemuliaan (*breeding materials*), (3) Pengenalan pola atau metode pemuliaan yang dipilih, dan (4) Pengelolaan. Karaktersisasi tanaman dan pemilihan bahan pemuliaan merupakan langkah awal dari perakitan suatu varietas yang diinginkan, sehingga kedua kegiatan tersebut sangat menentukan keberhasilan suatu program pemuliaan tanaman.

Dalam merakit varietas tembakau yang mempunyai potensi hasil yang tinggi dan tahan terhadap cekaman lingkungan baik biotik maupun abiotik, serta mempunyai kadar nikotin dan tar rendah dibutuhkan bahan pemuliaan (*breeding materials*) yang cukup banyak dengan dilengkapi informasi karakter penting dari masing-masing bahan persilangan tersebut (Hartana, 1996). Bahan pemuliaan yang dibutuhkan bisa diperoleh dari kultivar lokal madura. Menurut Poespodarsono (1988), bahwa kultivar lokal merupakan bahan pemuliaan yang cukup baik untuk merakit varetas yang tahan terhadap cekaman lingkungan di mana varietas itu berasal atau beradaptasi lama, karena kultivar lokal tersebut sudah mempunyai gen ketahanan terhadap cekaman lingkungan.

Permasalahannya adalah belum diketahui karakter penting dari beberapa varietas tembakau lokal Madura yang akan digunakan

sebagai bahan pemuliaan untuk perakitan varietas yang diharapkan. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengkarakterisasi sifat-sifat penting tembakau beberapa kultivar lokal Madura yang hasilnya nanti akan menjadi sumber genetik bagi program pemuliaan tanaman.

METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 24 genotip tanaman tembakau Madura dimana terdiri dari 4 varietas yang dlepasoleh Balittas yaitu Cangkring-95, Prancak-95, Prancak N-1, Prancak N-2, serta 18 kultivar lokal yang ditanam Petani Madura yaitu Baruno, Hibrida, Jepon Kasturi, Jepon Kasturi Mawar, Talangkitan, Cangkring Dalar, Jepon kenik, Jepon Moris-1, Jepon Moris-2, Prancak-96, JeponBojon, Berbeddih, Jepon Tarnyak, Cangkring Kuning, Danangan, Melati Tumpang, Bukabu Saang dan Bukabu, sedangkan ismir dan Virginia sebagai out group.

Isolasi DNA total daun dilakukan dengan *Kit reagen phytopure* (Daryono dan Natsuaki, 2002), kualitas isolat dilihat dari *Optical density* dan konsentrasi. Ramuan PCR terdiri dari 20 µl *Kit Mega Mix Blue*, 2.5 µl primer (OPB-8, OPC-11, OPF-10, OPA-2 dan OPC-15), dan 2.5 µl DNA template dari 1/50 konsentrasi isolat DNA. Pelaksanaan PCR dengan denaturasi 94⁰C 1 menit, annealing 36⁰C, sintesis 72⁰C 1 menit, siklus diulang sebanyak 45 kali, dan perbanyak basa-basa nukleotida 72⁰C 10 menit. Elektroforesis untuk amplifikasi produk PCR pada 100 volt selama 30 menit, visualisasi pola pita DNA dalam transluminator sinar UV kemudian diambil gambar hasil kenampakan pola pita DNA dengan kamera digital, Skoring dilakukan berdasarkan hadir (1) dan tidak (0) pola pita *RAPD*, dan dihitung similaritas genetik menggunakan rumus Jaccard Coefficient. Dilakukan analisis pengelompokan dengan metode UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Aritmatic Average*) atau *Average Linkage*. untuk mendapatkan

dendrogram, yang berguna untuk menentukan variabilitas genetik dan hubungan kekerabatan antar OTU's.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA Daun Tanaman tembakau

Hasil eksplorasi yang dilakukan dipulau madura didapatkan 22 genotip dan sudah dikarakterisasi morfologisnya pada

penelitian sebelumnya. Pada tahun berikutnya dilakukan isolasi DNA pada 22 genotip ditambah 2 genotip (ismir dan virginia) sebagai *out group*. Isolasi DNA daun sebanyak 24 sampel telah dilakukan menggunakan *reagen Phytopure*. Berdasarkan test OD (*optical density*), konsentrasi DNA daun, dan nomor koleksinya, didapat data seperti pada Tabel 1 berikut:

Tabel 1. *OpticalDensity* (OD) dan konsentrasi DNA hasilIsolasi

| Nomor | Genotip | OD | Konsentrasi |
|-------|-------------------|-------|-------------|
| 1 | Baruno | 1.836 | 169.1 |
| 2 | Hibrida | 1.762 | 552.7 |
| 3 | JeponKasturi | 1.849 | 1031.6 |
| 4 | JeponKasturiMawar | 1.840 | 302.3 |
| 5 | Talangkitan | 1.929 | 328.3 |
| 6 | Cangkring/dalar | 1.899 | 1298.5 |
| 7 | JeponKenik | 1.986 | 342.6 |
| 8 | Jepon Moris-1 | 1.919 | 521.5 |
| 9 | Jepon Moris-2 | 1.085 | 3943.5 |
| 10 | Prancak-96 | 1.829 | 545.9 |
| 11 | JeponBojon | 1.845 | 2193.1 |
| 12 | Berbeddih | 1.992 | 832.5 |
| 13 | JeponTarnyak | 1.860 | 309.3 |
| 14 | CangkringKuning | 1.729 | 1569,8 |
| 15 | Prancak-95 | 1.609 | 783.9 |
| 16 | Cangkring-95 | 1.749 | 753.1 |
| 17 | Varietas N-1 | 1.769 | 831.9 |
| 18 | Varietas N-2 | 1.709 | 848.7 |
| 19 | Danangan (colat) | 1.909 | 548.9 |
| 20 | MelatiTumpang | 1.967 | 987.6 |
| 21 | BukabuSaang | 1.792 | 865.1 |
| 22 | Bukabu | 1.587 | 998.2 |
| 23 | Virginia | 1.902 | 676.2 |
| 24 | Ismir | 1.897 | 788.1 |

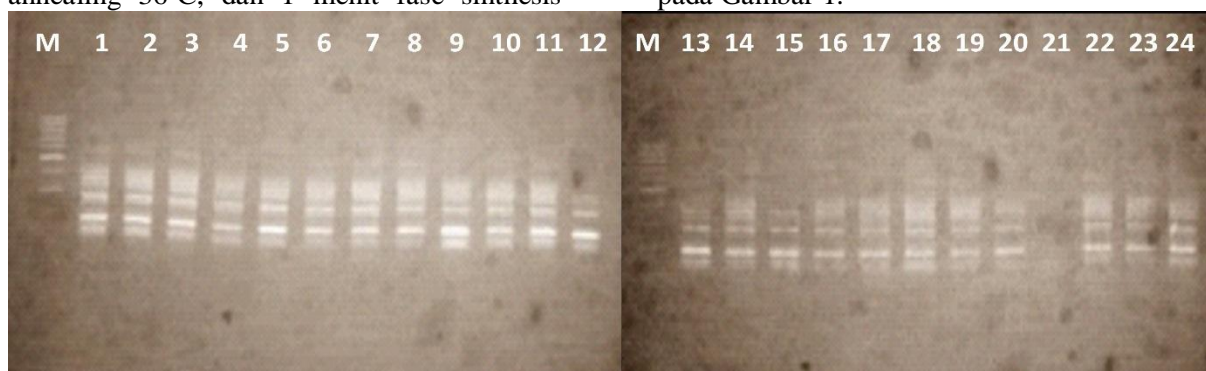
Tabel 2. Jumlah pita polimorfikdiantar tembakau Madura pada 5 primer RAPD

| No | Primer | UrutanBasa (5'-3') | Total pita | Pita Poli- morfik | % Pita Poli- morfik | UkuranFragmen (bp) | |
|-------|--------|-----------------------|---------------|----------------------|------------------------|--------------------|-----------|
| | | | | | | Terendah | Tertinggi |
| 1 | OPB-8 | GGAAGCTTGG | 8 | 7 | 88 | 150 | 800 |
| 2 | OPC-11 | GTCCCGACGA | 12 | 12 | 100 | 100 | 550 |
| 3 | OPF-10 | CCAGTACTCC | 11 | 10 | 91 | 100 | 900 |
| 4 | OPA-02 | TGCCGAGCTG | 10 | 8 | 80 | 150 | 1000 |
| 5 | OPC-15 | GACGGATCAG | 13 | 12 | 92 | 75 | 600 |
| Total | | | 54 | 49 | 90 | | |

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Berdasarkan isolat DNA daun terpilih, dilakukan optimasi pengaturan konsentrasi DNA, didapatkan pada 1/50 konsentrasi yang didapat. Ramuan PCR terdiri dari 20 μ l *Mega Mix Blue*, 2,5 μ l primer, dan 2,5 μ l DNA *template*. Primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah OPA-01, OPA-02, dan OPG-02. Pelaksanaan amplifikasi dalam mesin PCR dilakukan dengan fase denaturasi 1 menit 94°C, 1 menit fase sintesis 72°C, 1 menit fase annealing 36°C, dan 1 menit fase sintesis

72°C, dan fase pemanjangan basa-basa nukleotida 72°C selama 10 menit. Amplifikasi produk PCR secara elektroforesis, pada voltasestabel 100 volt selama 30 menit, elektroforesis dalam media agar 1,5%, dengan pewarna DNA merk *Good View*, dengan DNA ladder (marker) untuk 1 Kb (*Fermentas*). Visualisasi pemunculan pola pita RAPD dengan trns luminator sinar ultra violet, kemudian diambil fotonya. Hasil dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil elektroforesis tembakau Madura dengan primer OPB-8

Keterangan : M = marker; 1 = Baruno; 2 = Hibrida; 3 = Jepon kasturi; 4 = Jenpon kasturi mawar; 5 = Talangkitan; 6 = Cangkring; 7 = Jepon kenik; 8 = Jepon moris-1; 9 = Jepon moris-2; 10 = Prancak 96; 11 = Jepon bojon; 12 = Berbeddih; 13 = Jepon tanyak; 14 = Cangkring kuning; 15 = Prancak-95; 16 = Cangkring-95; 17 = Varietas N-1; 18 = Varietas N-2; 19 = Danangan; 20 = Melati tumpang; 21 = Bukabu saang; 22 = Bukabu; 23 = Virginia; 24 = Ismir

Hubungan Kekerabatan Tembakau Madura Berdasarkan Karakter Molekular RAPD

Hasil amplifikasi dari 5 primer menghasilkan 54 pita dari 24 genotip yang diuji dengan rata-rata 9,9 pita per primer dengan Ukuran produk amplifikasi berkisar antara 75 – 1000 bp pada primer yang berbeda (Tabel 2). Rata-rata polimorfik pada 5 primer yang digunakan adalah 90 persen. Jumlah total pita setiap primer berbeda, dari 8 pita (OPB-8) sampai 13 (OPC-12), sedangkan persen polimorfik berkisar antara 80 % (OPA-2) dan 100% (OPC-11).

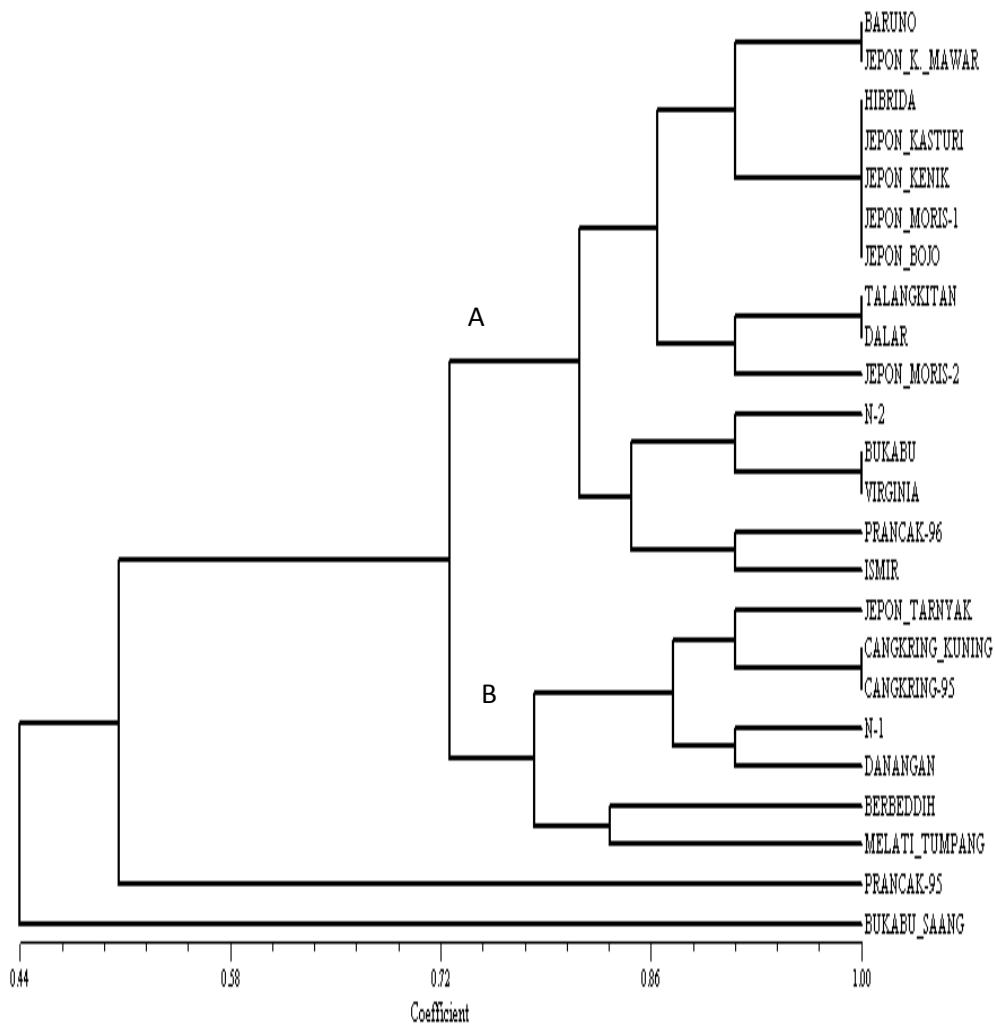
Berdasarkan pada pemunculan pola pita RAPD tersebut, kemudian dilakukan skoring secara *binair* yaitu hadir dan tidak hadirnya pola pita RAPD, dari setiap sampel,

sehingga dihasilkan nilai indeks similiaritas. Berdasarkan nilai indeks similiaritas tersebut dengan analisis pengelompokan secara UPGMA, dibentuk dendrogram seperti yang ditampilkan pada Gambar 2.

Dendrogram pada Gambar 2 menunjukkan bahwa berdasarkan karakter molekular dengan analisis RAPD terdapat dua kluster yaitu kluster A dan kluster B dengan jarak genetik 0.72. Kluster A terdiri dari 15 genotip (Baruno, Jepon kasturi mawar, Hibrida, Jepon kasturi, Jepon kenik, Jepon moris-1, Jepon bojon, Talangkitan dalar, N-2, Bukabu, Virginia, Pprancak-96 dan Ismir), sedangkan kluster B terdiri dari 7 genotipe (Jepon tanyak, Cangkring kuning, Cangkring-96, N-1, Danangan, Berbeddih dan Melati tumpang).

Bukabu saang dan Prancak-95 terpisah dengan tembakau Madura yang lain dengan jarak genetik 0.44 (bukabu saang) dan 0.50 (prancak-95). Berdasarkan primer OPB-8, OPC-11, OPF-10, OPA-2 dan OPC-15 menunjukkan bahwa Hibrida, Japon kasturi, Japon kenik, Japon moris-1 dan Japon bojon memiliki kemiripan genetik dengan jarak

genetik 100. Dengan demikian kelima genotip tersebut merupakan satu varietas berdasarkan primer yang digunakan. Selanjutnya cangkring kuning dan cangkring-95 mempunyai jarak genetik 100, sehingga dapat disimpulkan bahwa kedua genotipe tersebut masih satu varietas.



Gambar 2. Dendrogram hubungan kekerabatan tembakau madura

Dalam program pemuliaan untuk mendapatkan varietas yang diinginkan melalui persilangan diperlukan pembentukan populasi yang bersegregasi. Calon tetua terpilih harus memiliki tingkat keragaman yang besar. Berdasarkan dendrogram menunjukkan bahwa

bukabu saang merupakan varietas yang mempunyai jarak genetik dan prancak-95 yang rendah sehingga mempunyai tingkat keragaman yang besar diantara 22 genotip yang lain. Untuk itu 2 genotip tersebut dapat digunakan sebagai tetua dalam persilangan

untuk menghasilkan varietas yang diinginkan, karena akan terjadi segregasi yang besar sehingga memudahkan dalam pemilihan varietas yang diinginkan dalam populasi yang bersegregasi. Dalam menyilangkan varietas harus melihat penampilan morfologi, penelitian tahun sebelumnya dapat digunakan sebagai pedoman genotip yang sesuai untuk dijadikan tetua, berdasarkan karakter morfologi yang diinginkan dan jarak genetik yang optimal untuk dijadikan tetua

KESIMPULAN

Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Berdasarkan penanda RAPD menggunakan primer OPB-8, OPC-11, OPF-10, OPA-2 dan OPC-15, dapat membedakan genotip yang mempunyai keragaman genetik besar dan genotip yang mempunyai jarak genetik yang kecil.
2. Hasil dendrogram menunjukkan bahwa tembakau Madura terdiri dari dua kluster yaitu kluster A terdiri dari 15 genotip dan Kluster B terdiri dari 7 genotip, sedangkan Buka busaang dan Prancak-95 terpisah dengan tembakau Madura yang lain dengan jarak genetik 0.44 dan 0.50.
3. Calon tetua terbaik untuk mendapatkan varietas yang diinginkan adalah Buka busaang dan Prancak-95.

DAFTAR PUSTAKA

- Daryono, B.S. and K.T. Natsuaki, 2002. Application of Random Amplified Polymorphic DNA Markers for Detection of Resistant Cultivars of Melons (*Cucumis melo*, L.) Against Cucurbit Viruses. *Acta Horticulturae*. 588 : 321-329.
- Hallauer, A.R., Carena, M.J., dan Filho, J.B.M., 2010. *Quantitative Genetics in Maize Breeding*. Springer. London
- persilangan. Menurut Hallauer *et al.* (2010) bahwa penentuan untuk memilih genotipe yang baik untuk program pemuliaan dan pengembangan budidaya, selain harus mempunyai daya hasil tinggi dan mutu baik, juga harus mempunyai daya gabung yang tinggi, serta hubungan kekerabatan jauh agar tidak terjadi *depresi inbreeding*.
- Hartana, I., 1996. Pemuliaan Tembakau Untuk Mengantisipasi Era Perdagangan Bebas. hal 396-400. *Dalam* Soemarno, Hari Bowo, Bambang Prayitno, Nora Augustine, K., dan Widi Wuryani (penyunting). *Prosiding Simposium Pemuliaan Tanaman IV. PERIPI Komda, Jawa Timur*.
- Mangoendidjojo, W., 2003. *Dasar-dasar Pemuliaan Tanaman*. Kanisius. Yogyakarta.
- Mukani, Murdiyati AS., Tirtosastro, S. 2003. Mengatasi Terpuruknya Harga Tembakau. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian*. Vol.25 No.2.2003.
- Poespodarsono, S., 1988. *Dasar-dasar Ilmu Pemuliaan Tanaman*. PAU-IPB Bekerjasama dengan Lembaga Sumber Daya Informasi IPB, Bogor.
- Suwarso. 2002. Perbaikan Mutu dan Penurunan Kadar Nikotin dengan Galur-Galur Baru dan Pengelolaan Lingkungan. RPTP. Tahun 2000, Balittas, Malang.