



## **PENGUJIAN KEMURNIAN VARIETAS BERBASIS DNA *SIMPLE SEQUENCE REPEAT* (SSR) PADA BENIH SORGUM**

Kementerian Pertanian menyiapkan program strategis antisipasi menjaga stok pangan dengan diversifikasi komoditas pangan potensial diantaranya sorgum yang merupakan sumber karbohidrat berpotensi tinggi yang bersifat *zero waste product* dengan biji, batang, dan daun dapat diolah menjadi sejumlah produk. Biji sorgum dapat diolah menjadi tepung, pakan ternak, nasi, dan biskuit. Batang dapat diolah menjadi gula, pakan sapi, kompos, dan permen, sedangkan daunnya dapat diolah menjadi kompos, pewarna alami, serta keripik (Miranti K dan Aprilia I, 2022). Tanaman sorgum sangat mirip dengan jagung dan beberapa varietas memiliki kandungan nira yang tinggi pada batang gabusnya sehingga berpotensi untuk dijadikan sebagai sumber bahan baku gula sebagaimana halnya tebu (Udin Abay, 2018). Guna ketersediaan benih sorgum telah terbit Petunjuk Teknis sertifikasi benih sorgum pada pasal K dalam Kepmentan Nomor 966/TP.010/C/04/2022 dan diikuti terbit Kepmentan Nomor 465/HK.220/C/02/2023 tentang perubahan dalam petunjuk teknis sertifikasi benih Sorgum secara ratun sehingga dapat memangkas tahap awal sertifikasi benih lanjut ke tahap pemeriksaan pertanaman sepanjang petani penangkar mematuhi petunjuk teknis sertifikasi benih yang dimaksudkan menjaga kualitas dan efisiensi biaya produksi.

Sorgum bukan tanaman asli Indonesia sehingga masih terdapat keragaman genetik yang perlu upaya perbaikan varietas tanaman melalui program pemuliaan tanaman. Guna memperbaiki sifat-sifat sorgum yang sudah ada sehingga menjadi lebih unggul dibanding dengan tanaman asalnya. Kegiatan perbaikan akan



dapat menyebabkan terjadi ketidakmurnian varietas benih yang diproduksi yang harus diantisipasi pada awal atau sebelum pertanaman terutama penangkaran benih. Untuk itu pengujian DNA disiapkan sebagai alternatif pengujian yang cepat dan valid untuk mendapatkan informasi kemurnian varietas benih dengan penanda yang dapat membedakan varietas sorgum yang telah dilepas. Bila dibandingkan pertanaman dari benih yang tanpa ada informasi kemurnian varietas akan mencegah kerugian besar dari biaya dan waktu

Tujuan pengembangan metode untuk melakukan verifikasi metode pengujian varietas benih sorgum berbasis penanda DNA SSR dan untuk memperoleh penanda DNA SSR yang dapat membedakan varietas benih sorgum yang diuji. Keluaran dalam penguatan metode adalah memberikan informasi tersedianya metode dan prosedur pengujian kemurnian varietas berbasis DNA serta penanda SSR pada varietas unggul benih sorgum menuju swasembada pangan dan pemenuhan diversifikasi pangan di Indonesia.

Bahan yang digunakan adalah biji dan jaringan daun varietas benih sorgum yang berasal dari BB PSI Biogen Pertanian Bogor, BSIP Sereal Sulawesi Selatan dan beberapa lokasi pertanaman kelompok Tani di Lampung, Balai Benih Kabupaten Banyumas Jawa Tengah dan kelompok Tani kabupaten Lebak Banten. Pada rencana awal contoh uji dari benih (biji) dan atau jaringan daun dari pertanaman sebelum dan sesudah pelaksanaan sertifikasi benih sorgum secara ratun namun pada pelaksanaan tidak dapat berlanjut karena areal pertanaman sertifikasi di Lampung gagal panen mengalami banjir dan areal pertanaman sertifikasi di Banten diserang hewan liar pengganggu tumbuhan sehingga contoh uji yang digunakan biji dari BSIP dan Balai Benih. Sarana dan peralatan pengujian berbasis



DNA yang digunakan meliputi perangkat ekstraksi isolasi DNA, perangkat pengujian kualitas kuantitas DNA spektrofotometer UV, perangkat elektroforesis, perangkat uji PCR dan perangkat gel dokumentasi di laboratorium Elektroforesis Balai Besar PPMBTPH.

Tabel 1. Varietas contoh benih sorgum pada pengembangan metode pengujian SSR

No	Varietas	Kelas Benih	Kode	Asal
1	Bioguma 1	BS	A	BB PSI Biogen Pertanian
2	Bioguma 3	BS	B	BB PSI Biogen Pertanian
3	Soper 6	BS	C	BSIP Sereal
4	Soper 7	BS	D	BSIP Sereal
5	Numbu	BS	E	BSIP Sereal
6	Suri 4	BS	F	BSIP Sereal
7	Suri 3 Agritan	BP	G	Poktan Lampung Timur
8	Bioguma 2 Agritan	BR	H	Poktan Lampung Timur
9	Bioguma 2	BS	I	BB SIP Biogen Pertanian
10	Kawali	BS	J	BSIP Sereal
11	Suri 3	BS	K	BSIP Sereal

Pelaksanaan pengembang dimulai pada bulan Januari sampai dengan Desember 2023 dengan pengumpulan informasi literatur teknis metode maupun primer SSR terkait karakter spesifik sesuai saran masukan narasumber hasil seminar proposal. Pengambilan contoh dari pertanaman di Lampung Timur, Lebak Banten dan Banyumas Jawa Tengah serta varietas benih acuan (BS)



dari BSIP Sereal Maros juga BB SIP Biogen Bogor. Kegiatan awal penyusunan proposal, seminar dan konsultasi Narasumber; pengadaan contoh benih, diantaranya benih sorgum acuan dan contoh sorgum dari 3 lokasi pertanaman sertifikasi benih secara ratun namun tidak terlaksana, sarana pengujian; pengujian isolasi sampai PCR pendahuluan dilanjutkan optimasi metode uji PCR menggunakan kurang lebih 13 primer SSR dan aplikasi metode SSR hasil verifikasi menggunakan primer SS polimorfik terhadap beberapa varietas sorgum. Visualisasi pita hasil PCR yang dapat menunjukkan amplicon yang berbeda berupa ukuran pasang basa. Guna verifikasi metode dan primer diuji pada beberapa varietas yang terdiri 5 contoh kerja terdiri ck 1 sd ck4 @ 25 butir dari varietas sama dan 24 butir dari dua varietas berbeda @ 12 butir sebagai ck 5

Pengambilan contoh kerja berdasarkan metode paruh tangan dimana untuk satu contoh kerja @ 25 butir yang dihaluskan selanjutnya dilakukan isolasi ekstraksi DNA benih sorgum menggunakan metode Sambrook (1990). yang contoh kerja dan untuk uji PCR

Langkah kerja ekstraksi isolasi DNA dengan contoh berupa biji menggunakan metode Sambrook,(1989)

- a. Buffer ekstraksi dipanaskan dalam *waterbath* pada suhu 65°C selama 15-30 menit.
- b. Contoh biji sebanyak 25 butir digerus dalam kondisi kering sampai lembut.
- c. Hasil gerusan dimasukkan ke dalam tabung mikro 2ml hingga 0,5ml dan ditambahkan 1000 µl buffer ekstraksi Sambrook yang sudah dipanaskan, dan dicampur dengan baik.
- d. Komposisi buffer ekstraksi Sambrook pada volume 100 ml terdiri 0,05 M TrisHCl pH 8,0 dengan volume 5



ml, 0,05 M EDTA pH 8,0 dengan volume 10 ml, SDS sbesar 3 gr dalam 85 ml aquades.

- e. Tambahkan 25 ul Proteinase K dalam hasil gerusan
- f. Campuran hasil gerusan dan buffer ekstraksi diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit dengan sambil dibolakbalik tabungmikro.contoh agar terjadi homogenisasi
- g. Tambahakan 25 ul RNase ke dalam hasil gerusan yang telah diinkubasi
- h. Campuran disentrifuse dengan kecepatan 7000 rpm selama 10menit
- i. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke tabung mikro 1,5ml yang baru.
- j. Pada supernatan ditambahkan satu volume Phenol kemudian campuran disentrifuse dengan kecepatan 7000 rpm 10 menit dan supernatan dipindahkan ke tabung mikro 1,5 ml baru.
- k. Campuran ditambahkan satu volume Phenol : Chloroform :Isoamil alkohol (25:24:1) dan sentrifuse pada 12000 rpm selama 7 menit dan supernatan yang terbentuk dipindahkanketabung mikro 1,5 ml yang baru.
- l. Campuran ditambahkan satu volume Chloroform:Isoamilalkohol (24:1) dan sentrifuse pada 12000 rpm selama 7 menit dan supernatan yang terbentuk dipindahkan ke tabung mikro1,5 ml yang baru.
- m. Pada supernatan ditambahkan 0,1 volume Potasium asetat (KOAc) M an  $\frac{3}{4}$  volume Isopropanol dingin
- n. Inkubasi selama semalam atau 2 jam pada suhu - 20°C dan sentrifuse pada 12000 rpm selama 5 menit dan buang supernatan
- o. Tambahkan 100 ul alkohol 70% untuk membilas DNA



- dan sentrifugase pada 12000 rpm selama 5 menit dan buang supernatan
- p. Keringkan pelet DNA dalam oven 50°C selama 2-3 jam atau kering angin semalam
  - q. Setelah kering, endapan DNA dilarutkan kembali dengan 50-100 µl buffer TE

Hasil stok DNA dilakukan pengujian kuantitas dan kualitas DNA dengan langkah kerja berikut

Pengujian kualitas kuantitas DNA menggunakan Spektrofotometer Biodrop

- a. Siapkan larutan kontrol atau buffer TE (larutan untuk menyimpan DNA) dan larutan stok DNA hasil isolasi DNA serta mikropipet dengan tip untuk 1 ul
- b. Atur spektrofotometer untuk pengukuran absorbansi DNA pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm
- c. Gunakan tip baru dari mikropipet volume 1 ul sebagai pengambil volume sampel
- d. Pengukuran yang pertama diberlakukan untuk larutan kontrol dan akan memberikan hasil absorbansi 0,000
- e. Lakukan pengukuran berikutnya stok DNA sebagai sampel kedua dst hingga diperoleh hasil pengukuran kemurnian  $A_{260}/A_{280}$  dan konsentrasi DNA (µg/ml)
- f. Mencatat hasil pengukuran spektrofotometer sebagai data kualitas yaitu kemurnian DNA dan kuantitas yaitu konsentrasi DNA

Selanjutnya dilakukan pengujian kualitas DNA menggunakan elektroforesis horizontal dan pembanding Lambda DNA

- a. Siapkan gel agarose dengan konsentrasi 1% (bubuk agarose dilarutkan dengan buffer TAE 1x).



- b. Cetak gel pada cetakan yang telah terpasang sisir sumur sampel hingga beku padat
- c. Penuhi tangki elektroforesis dengan buffer TAE 1x sampai batas yang ditentukan
- d. Masukkan gel yang telah dicetak ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi buffer TAE 1 x sampai seluruh permukaan gel terendam.
- e. Campurkan 5,5 ul stok DNA hasil isolasi dengan 1,5 ul *loading dye gelred*
- f. Masukkan campuran DNA dan loading dye yang akan diuji serta Lambda DNA dengan satu atau dua tingkat konsentrasi (50 ng atau 100 ng) sebagai pembanding DNA ke dalam sumur pada gel. Catat posisi sampel pada sumur/kolom pada buku analisis
- g. Sampel DNA dirunning pada gel agarose dengan tegangan 50 volt selama kurang lebih 30 menit sd 1.0 jam.
- h. Atur mesin UV trans illuminator untuk visualisasi dan dokumentasi DNA
- i. Visualisasi hasil running gel elektroforesis pada UV dan dokumentasi dengan kamera sehingga diperoleh file foto (jpg) pita DNA contoh dan pita Lambda DNA sebagai data kuantitas DNA.

Setelah memperoleh stok DNA varietas sorgum dilakukan pengujian penggandaan DNA (PCR) menggunakan contoh uji DNA yang diencerkan pada konsentrasi tertentu (DNA cetakan) dan komposisi reagen PCR.

- a. Siapkan komposisi reaksi PCR dengan konsentrasi dan volume tertentu dalam tabung mikro 200 ul sesuai metode SSR
- b. Menggunakan tip baru dari mikropipet sesuai volume yang diperlukan dalam reaksi PCR
- c. Tambahkan DNA cetakan (kualitas/kuantitasnya



- yang memenuhi untuk proses PCR) sehingga dihasilkan komposisi sebanyak 10ul (atau 20 ul atau 25□l).
- d. Masukkan dalam mesin PCR yang telah diprogram untuk proses denaturasi awal, denaturasi, annealing (penempelan primer), elongasi (perpanjangan DNA), sintesa akhir dan penyimpanan.
  - e. Mencatat kondisi proses PCR pada buku analis dan menyimpan hasil proses PCR pada refrigerator 4°C.
  - f. Sebagai catatan primer untuk proses PCR baik metode SSR yang dipergunakan harus dilakukan verifikasi lewat tenggat atau kadaluarsa minimal sekali dalam dua setahun setelah stok primer dilarutkan dengan buffer TE. Hal ini dilakukan untuk dapat mempertahankan mutu jaminan pengujian penanda genetic secara biomolekuler.

Tabel 2. Komposisi reagent PCR (Karlina, 2022)

No.	Reagen Uji PCR dan konsentrasi	Volume
1.	ddH <sub>2</sub> O	3,0 ul
2.	Cetakan DNA (30 ng)	1,0 ul
3.	Primer SSR S1/S2/S3 Forward + Reverse (@20 pmol)	@ 0,5 ul
4.	Bufer PCR master mix plus (Tiangen )	5,0 ul
	Jumlah	10,0 ul

Tabel 3. Program PCR (Karlina, 2022)

No	Tahapan PCR	Suhu	Lama	Siklus
1	Tahap I. Denaturasi awal	94 °C	2 menit	1x
2	Tahap II.			
	a. Denaturasi	94 °C	40 detik	30x
	b. Annealing (Sesuai suhu melting primer)	60 °C	45 detik	
	c. Elongasi	72 °C	1 menit	
3.	Tahap III. Sintesa akhir	72 °C	10 menit	1x
4.	Tahap IV. Penyimpanan	12 °C	10 menit	1x



Tabel 4. Penanda primer terkait karakter gula Brix  
(Tesfaye D, et all 2018)

No	Primer karakter Bit Gula	Urutan basa (5 <sup>^</sup> - 3 <sup>^</sup> )
1.	XtXp 273 (S1) Forward	GTA CCC ATT TAA ATT GTT TGC AGT AG
	XtXp 273 (S1) Reverse	CAG AGG AGG AGG AAG AGA AGG
2.	Xisep0622 (S2) Forward	GAG GAT CGG AGG AAG AGA CC
	Xisep0622 (S2) Reverse	TCT CCC ATT CTC CCC CTC TTT
3.	XtXp 296 (S3) Forward	CAG AAA TAA CAT ATA ATG ATG GGG GTG AA
	XtXp 296 (S3) Reverse	ATG CTG TTA TGA TTT AGA GCC TGT AGAGTT
4.	X1sep 0449 (S4) Forward	CCG CTC ATC AGT CAT CAC AT
	X1sep 0449 (S4) Reverse	ACA AAA TCC ATC CCA CAA CG
5.	Xtxp 008 (S5) Forward	ATA TGG AAG GAA GAA GCC GC
	Xtxp 008 (S5) Reverse	AAC ACA ACA TGC ACG CAT G
6.	Xisep0639 (S6) Forward	TCG GAC GGA GTC ATC AGA TA
	Xisep0639 (S6) Reverse	GCC TTC GTG TCT TCT GTC CT
7.	Xcup 02 (S7) Forward	GAC GCA GCT TTG CTC CTA TC
	Xcup 02 (S7) Reverse	GTC CAA CCA ACC CAC GTA TC
8.	Xisep0612 (S8) Forward	CTC TCT GTC CTC CTC GTC GT
	Xisep0612 (S8)	CCT GCT TCT TGG ACA CCT TC
9.	Xiabtp_26 (S9) Forward	CGC ACT CGA TCG ACT AGC TTA
	Xiabtp_26 (S9) Reverse	CGA GAG AGG CGA TAA GGA TC
10.	Xtxp270 (S11) Forward	AGC AAG AAG AAG GCA AGA AGA AGG
	Xtxp270 (S11) Reverse	GCG AAA TTA TTT TGA AAT GGA GTT GA



No	Primer karakter Bit Gula	Urutan basa (5 <sup>^</sup> - 3 <sup>^</sup> )
11.	Xisep0805 (S12) Forward	CTC CCC CGT GAT TTG ATC T
	Xisep0805 (S12) Reverse	TAA GCA AAA GCA CCA TCA GC
12.	Undhsbm 105 (S13) Forward	CCA TCC CAC AAC GAA GAA AC
	Undhsbm 105 (S13) Reverse	GAC GTC CCA GTC GAA GAA TG
13.	Xtxp265 (S14) Forward	GTC TAC AGG CGT GCA AAT AAA A
	Xtxp265 (S14) Reverse	TTA CCA TGC TAC CCC TAA AAG TGG

Berikutnya dilakukan running elektroforesis hasil PCR

- Siapkan gel agarose dengan konsentrasi 2 % (bubuk agarose dilarutkan dengan buffer TAE 1x) atau sesuai besar molekul DNA target (satuan pasang basa)
- Cetak gel pada cetakan yang telah terpasang sisir sumur sampel hingga bekupadat
- Penuhi tangki elektroforesis dengan buffer TAE 1x sampai batas yang ditentukan
- Masukkan gel yang telah dicetak ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi buffer TAE 1x sampai seluruh permukaan gel terendam.
- Menggunakan tip baru dari mikropipet untuk mencampurkan 5,5  $\mu$ l stok DNA hasil PCR dengan 1,5  $\mu$ l *loadingdye gelred*
- Masukkan campuran DNA dan *loadingdye gelred* serta marker DNA (terdiri 7sd13 satuan bp) sebagai pembanding ke dalam sumur pada gel. Catat posisi sampel dari sumur / kolom 1 sd 12, 16 atau 20 pada buku analis
- Sampel DNA hasil PCR di *running* ada gel agarose dengan tegangan 80 volt selama kurang lebih 55-

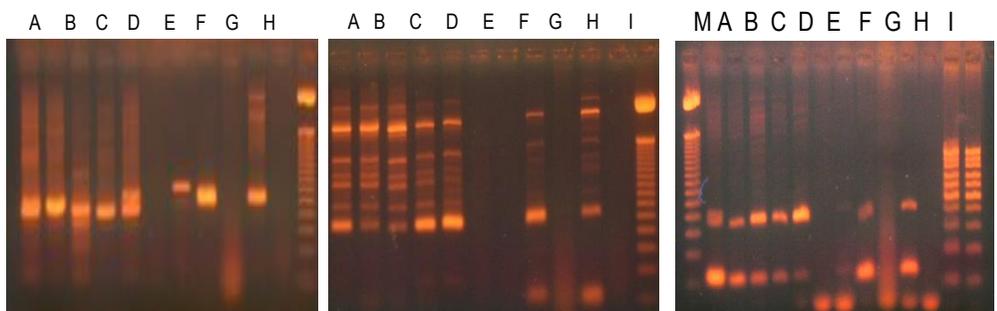


- 60 menit atau sampai pewarna DNA orange mendekati batas akhir
- h. Atur mesin UV trans illuminator untuk visualisasi dan dokumentasi DNA hasil PCR
  - i. Visualisasi hasil running gel elektroforesis pada UV dan dokumentasi dengan kamera sehingga diperoleh file foto (jpg) pita DNA dari hasil PCR dan pita Marker DNA yang merupakan data hasil penggandaan DNA.

Untuk rekaman pelaporan hasil pengujian terdiri

- a. Hasil uji kuantitas dan kualitas DNA serta melengkapi dengan foto visualisasi hasil DNA
- b. Hasil uji penggandaan DNA (PCR) dengan data primer yang digunakan, jumlah pita DNA hasil PCR dan besar molekul DNA (pasang bsaa) serta melengkapi dengan foto visualisasi hasil DNA

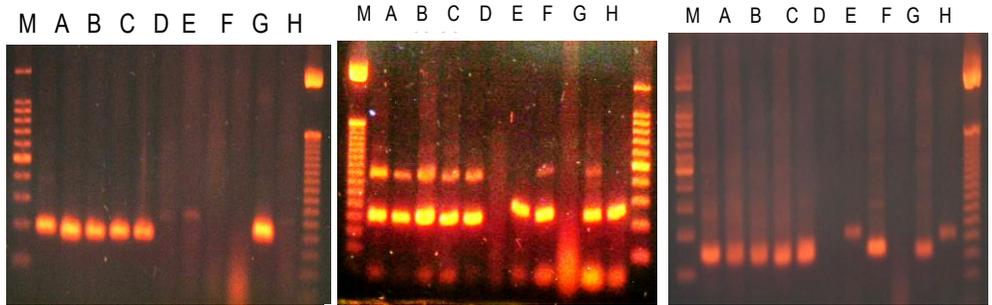
Untuk analisa hasil pengujian kemurnian varietas (genetik) berbasis PCR SSR maka data hasil visualisasi tiap varietas dari primer yang diuji diinventarisasi kemunculan amplikon pita DNA atau ukuran molekul basa dengan cara membandingkan DNA marker atau DNA Ladder yang digunakan sebagai dasar ukuran basa. Hasil pengembangan metode PCR SSR pada 11 varietas benih sorgum menggunakan 13 primer menunjukkan visualisasi amplikon pada 12 primer kecuali pada satu primer Xiabtp\_26 (S9)



Gbr 1. Visualisasi PCR SSR  
S1

Gbr 2. Visualisasi PCR SSR  
S2

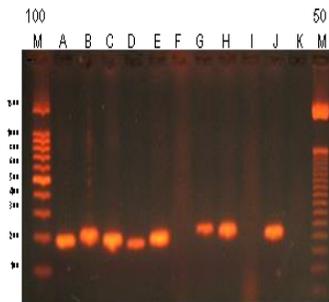
Gbr 3. Visualisasi PCR SSR S3



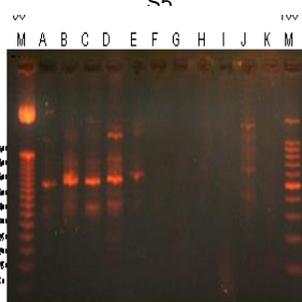
Gbr 4. Visualisasi PCR SSR S4

Gbr 5. Visualisasi PCR SSR S5

Gbr 6. Visualisasi PCR SSR S6



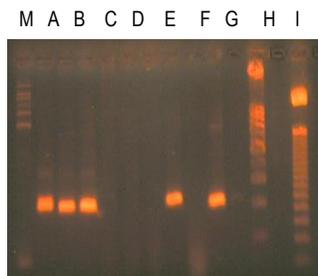
Gambar 1. Visualisasi hasil PCR SSR primer terkait gula bite S7 pada Sorgum A-K dg gel 2,0%, B TAE 1x run elektroforesis 55 volt, selama 90 mnt



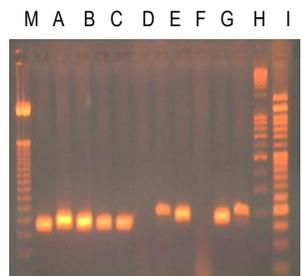
Gambar 2. Visualisasi hasil PCR SSR primer terkait gula bite S8 pada Sorgum A-K dg gel 2,0%, B TAE 1x run elektroforesis 55 volt, selama 90 mnt



Gambar 3. Visualisasi hasil PCR SSR primer terkait gula bite S9 pada Sorgum A-K dg gel 2,0%, B TAE 1x run elektroforesis 55 volt, selama 90 mnt



Gbr 10. Visualisasi PCR SSR



Gbr 11. Visualisasi PCR SSR S11



Gbr 12. Visualisasi PCR SSR S13

Pengujian PCR SSR yang berhasil ditunjukkan pada gambar 1 sampai gambar 12 yaitu beberapa primer menghasilkan pita yang polimorfik menggunakan primer XtXp 273 (S1), Xcup 02 (S7) dan Xtxp270 (S11) sedangkan 9 primer yang lain memberikan pita yang monomorfik bahkan tidak memberikan hasil amplicon yaitu dari primer Xiabtp\_26 (S9)



Tabel 5. Hasil Uji PCR SSR dengan 13 Penanda Gula Bit pada stok DNA varietas Sorgum

No	Var / Kode	Pasang Basa hasil Penanda PCR SSR Karakter Gula Bite Pada Sorgum												
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13
1.	Bioguma 1/A	200; 250	250 - 1000	200	100	150; 350	75	200	550	-	350	100	150	300
2.	Bioguma 3/B	250	250 - 1000	200	100	150; 350	75	> 200	550	-	350	100	160	300
3.	Soper 6/C	200	250 - 1000	200	100	150; 350	75	200	550	-	350	100	160	300
4.	Soper 7/D	200	250 - 1000	200	100	150; 350	75	< 200	550; > 800	-	350	-	160	300
5.	Numbu/E	200; 300	250 - 1000	200	100	150; 350	75	200	-	-	350	-	160	300
6.	Suri 4/F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Suri 3 Agritan/G	300	-	-	-	150	100	> 200	-	-	-	100	200	-
8	Bioguma 2 Agritan/H	250	250; 100	-	-	150; 350	75	> 200	-	-	350	-	200	300
9	Bioguma 2/I	--	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-
10	Kawali/J	250	250; 100	200	100	150; 350	75	> 200	-	-	350	-	200	300
11	Suri 3/K	-	-	-	-	150	100	-	-	-	350	-	200	300

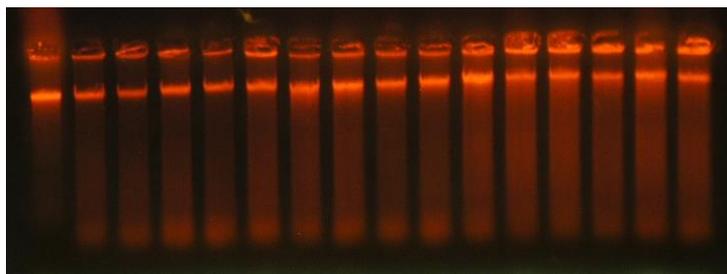
Tabel 5 ini memberikan data bahwa metode PCR SSR dapat menghasilkan amplicon jika menggunakan komposisi reagen dan program PCR



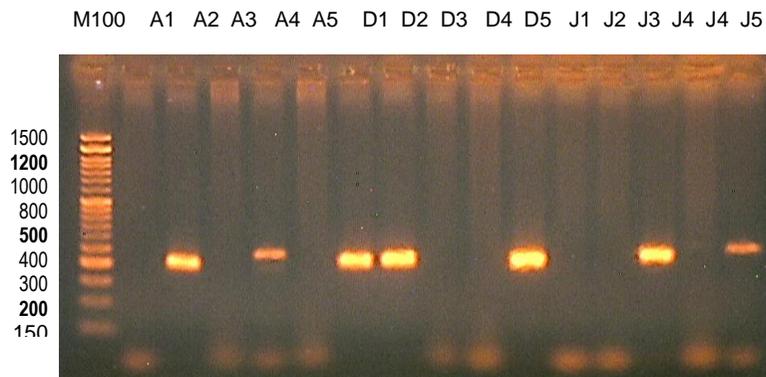
yang optimal serta primer yang polimorfis. Selanjutnya dilakukan uji coba aplikasi metode PCR SSR menggunakan satu primer yang polimorfis yaitu Xcup 02 pada tiga contoh varietas dengan pita yang berbeda yaitu Bioguma 1 dengan visualisasi basa 200 bp, Soper 7 dengan ukuran basa kurang dari 200 bp dan Kawali dengan ukuran basa lebih dari 200 bp. Uji coba aplikasi metode PCR SSR dimaksudkan sebagai bukti bahwa metode PCR SSR yang telah diverifikasi dengan primer yang polimorfis yaitu Xcup02 dapat menunjukkan pita yang sama pada contoh murni dan pita berbeda pada contoh campuran.

Bahwa dengan hipotesis kemurnian varietas dari contoh uji bila mencapai 100 (butir) sehingga dibuat contoh kerja yang murni atau varietas yang sama dan contoh kerja yang dicampur dengan varietas berbeda. Uji coba menggunakan 3 varietas Bioguma 1 (A), Soper 7 (D) dan Kawali (J). Contoh murni dibuat empat contoh kerja @ 25 butir dan contoh campuran dibuat dari dua varietas berbeda. Selanjutnya dilakukan uji ekstraksi isolasi DNA dan Uji PCR SSR menggunakan primer Xcup02

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



Gambar 13. Visualisasi hasil isolasi ekstraksi DNA



Gambar 14. Visualisasi hasil PCR SSR dengan Xcup 02

Primer Xcup berhasil mengamplifikasi tiga contoh sampel varietas, yaitu Bioguma 1 (A), Soper 1 (D), dan Kawali (J). Verifikasi marka SSR dan Pengujian kemurnian genetik pada sampel A (Bioguma 1). Berdasarkan empat sampel DNA yang dibulk, yaitu A1, A2, A3, dan A4 (masing-masing berasal dari 25 butir sorgum) dan campuran antara bioguma 1 dan soper 7, dengan kode A5 diketahui bahwa amplicon muncul pada bulk yang ke-2 (A2) dan ke-4 (A4) masing-masing dengan satu pita (homosigot) pada A2 dan dua pita (heterosigot) pada A4. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat variasi pada sampel benih Bioguma 1. Amplicon yang tidak terdeteksi pada A1, A3, dan A5 kemungkinan disebabkan oleh belum optimumnya konsentrasi DNA yang digunakan (pada tahap selanjutnya akan dilakukan pengulangan PCR, terutama untuk sampel A5). Verifikasi marka SSR dan Pengujian kemurnian genetik pada sampel D (Soper 7). Marka DNA ini dapat menghasilkan amplicon pada varietas soper 7, yaitu pada bulk D1, D2, dan D3 dengan pola pita yang seragam (homosigot). Hal ini menunjukkan bahwa biji varietas Soper 7 yang digunakan menunjukkan keseragaman. Pita DNA juga



dihasilkan pada sampel D5 (campuran Soper 7 dan Kawali) dengan pola pita homosigot (satu pita). Meskipun D5 merupakan campuran antara dua varietas, akan tetapi menunjukkan tidak terbentuk dua pita yang berbeda, yang berarti tidak terdapat variasi alel pada kedua varietas tersebut pada lokus Xcup02.

Verifikasi marka SSR dan Pengujian kemurnian genetik pada sampel J (Kawali). Marka DNA ini dapat menghasilkan ampikon pada varietas Kawali, yaitu pada bulk J3 dengan pola pita yang seragam (homosigot). Hal ini menunjukkan bahwa 25 biji varietas Kawali yang digunakan menunjukkan keseragaman. Pita DNA juga dihasilkan pada sampel J5 (campuran Kawali dan Bioguma 1) dengan pola pita homosigot (satu pita) tetapi berbeda ukuran dengan sampel J3. Pita DNA yang teramplifikasi tersebut hanya berasal dari Bioguma 1 (dapat dilihat pada pola pita A4).

Pengembangan metode menghasilkan kesimpulan dan rekomendasi sebagai berikut

1. Verifikasi metode pengujian kemurnian varietas benih sorgum berbasis penanda SSR dapat digunakan sebagai pengujian kemurnian varietas dengan program PCR SSR terdiri empat siklus meliputi tahap denaturasi awal 1 siklus, tahap denaturasi, annealing dan elongasi masing-masing 30 siklus, tahap sintesa akhir 1 siklus dan penyimpanan 12 °C satu siklus
2. Penanda primer SSR Xcup02 (polimorfis) dapat menunjukkan perbedaan ada tidak kemurnian varietas antara varietas Bioguma 1 dan Soper 7



Rekomendasi dari pengembangan metode pengujian ini bahwa pengujian kemurnian varietas (genetic) benih sorgum berbasis DNA dapat menggunakan metode PCR SSR dan primer Xcup02 dapat menunjukkan kemurnian varietas benih sorgum Bioguma 1 dan Soper 7.