



Kajian Penanda DNA pada Keragaman/Sertifikasi Varietas Benih Porang

Keputusan Menteri Pertanian Nomor 620/Hk.140/C/04/2020 tentang petunjuk teknis sertifikasi benih tanaman pangan pada butir O, telah mencantumkan persyaratan dan prosedur sertifikasi benih porang yang dapat dilakukan melalui sertifikasi benih baku, sertifikasi pemurnian varietas dan sertifikasi benih varietas lokal. Pada sertifikasi benih baku yang dilakukan dalam bentuk umbi menggunakan kultur invitro dan pemeriksaan siap salur umbi mempersyaratkan adanya informasi kebenaran sumber benih diantaranya dengan uji DNA. Sampai dengan Ta 2021 baru ada satu varietas benih porang yang dilepas yaitu Madiun 1, sedangkan permintaan produksi porang belum terpenuhi sementara beberapa daerah atau provinsi telah mengklaim memiliki varietas lokal masing-masing.

Untuk itu laboratorium Balai Besar PPMBTPH melakukan pengembangan metode uji cepat dan akurat dapat memberikan informasi hasil uji DNA yang membedakan antara varietas yang telah dilepas (sebagai acuan) dengan varietas lokal. Penggunaan metode uji berbasis DNA ini diberlakukan karena penanda DNA mempunyai kelebihan dibandingkan pemeriksaan morfologi tanaman di lapang yang membutuhkan waktu lama, tenaga dan biaya yang besar. Manfaat pengujian berbasis DNA dan penanda RAPD SCAR adalah dapat menguji keragaman antar spesies guna mengetahui kebenaran benih sumber benih porang dalam sertifikasi benih untuk percepatan ketersediaan benih porang. Tujuan dari pengembangan metode uji ini yaitu untuk memperoleh metode pengujian penciri varietas berbasis DNA RAPD SCAR



dan penanda DNA (primer) RAPD SCAR pada benih porang yang telah dilepas varietasnya oleh Kementan.

Penyiapan bahan uji contoh benih bulbi porang dari 14 provinsi dan sebagai acuan disiapkan bulbi varietas Madiun 1 dari produsen Jawa timur yang terdiri tiga ukuran S, M dan L. Koleksi porang dari Balitkabi terdiri 3 lot A, B dan C. Kultur jaringan bulbi porang varietas Madiun 1 terdiri 3 kuljar 1,2 dan 3.

Tabel 41. Daftar contoh benih porang yang digunakan dalam pengembangan metode

No	Asal Contoh Pengujian	Contoh Pengujian Porang
1	Produsen Banyumas Jateng	Bulbi Mirip varietas Madiun 1
2	Prod Jateng (Mega Raya)	Bulbi Varietas Madiun 1 Kls b BR Uk S,
3	Produsen Jatim (MR)	Bulbi Var Madiun 1 Kls b BR Uk M
4	Produsen Jatim (MR)	Bulbi Var Madiun 1 Kls b BR Uk L
5	Poktan NTT	Bulbi Mirip Varietas Madiun 1
6	Poktan Sawahlunto Sumbar	Bulbi Mirip Varietas Madiun 1
7	Poktan Sumatera Utara	Bulbi Mirip Varietas Madiun 1
8	Poktan Sulawesi Tenggara	Bulbi Mirip Varietas Madiun 1
9	Poktan Semarang Jateng	Bulbi klaim Varietas Lokal
10	Poktan Sijunjung Sumbar	Bulbi klaim Varietas Lokal
11	Poktan Mancak Banten	Bulbi klaim Varietas Lokal
12	Poktan Goporange	Bulbi klaim Varietas Lokal Goporange
13	Poktan Kalimantan selatan	Bulbi klaim Varietas Lokal Halau Kalsel
14	Poktan Sulawesi Tenggara	Bulbi klaim Varietas Lokal Konawe Sultenggara
15	Poktan Purbalingga	Bulbi klaim Varietas Lokal Purbalingga Jateng
16	Poktan Tabanan Bali	Bulbi klaim Varietas Lokal Tabanan Bali
17	Poktan Pusaka	Bulbi klaim Varietas Lokal Pusaka Subang Jabar
18	Poktan Jembrana Bali	Bulbi klaim Varietas Lokal Jembrana Bali
19	Poktan NTB	Bulbi klaim Varietas Lokal NTB
20	Poktan Gunung Kencana	Bulbi klaim Varietas Lokal G Kencana Banten
21	Poktan Gorontalo	Bulbi klaim Varietas Lokal Gorontalo
22	Poktan Kalsel	Bulbi klaim Varietas Lokal Kalsel
23	Poktan Cilacap Jateng	Bulbi klaim Varietas Lokal Cilacap Jateng
24	Poktan Huawei Kalsel	Bulbi klaim Varietas Lokal Huawei Kalsel
25	Balitkabi	Bulbi koleksi Varietas Madiun 1 lot a, lot b, lot c
KJ	Kuljar Magelang	Kuljar bulbi varietas Madiun 1 (Kj1, Kj2, Kj3)

Untuk penanda RAPD yang akan digunakan adalah sebagai berikut:



Tabel 42. Daftar primer acak RAPD yang digunakan dalam pengujian

No	Primer	Urutan basa (5 [^] - 3 [^])	No	Primer	Urutan basa (5 [^] - 3 [^])
1	OPA 18		6	OPD 20	ACC CGG TCA C
2	OPC 07	CAC ACT CCA G	7	OPH 15	CGA TCG AGG A
3	OPB 18	CCA CAG CAG T	8	OPN 18e	AAG GTG AGG TCA
4	OPB 17	AGG GAA CGA G	9	OPZ 10	CCG ACA AAC C
5	OPD 04	TCT GGT GAG G	10	OPH 8	

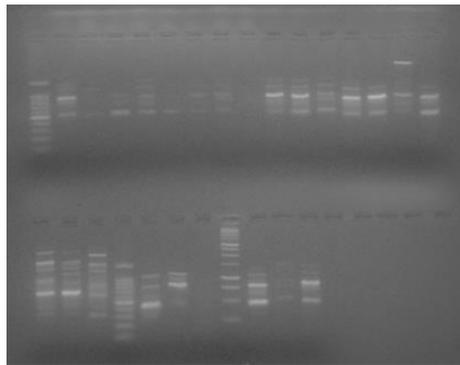
Teknik Penanda DNA ini digunakan untuk mengidentifikasi genotipe tumbuhan, karena memiliki kelebihan dalam pelaksanaan dan analisisnya yaitu teknik RAPD lebih murah, mudah dilakukan, cepat memberikan hasil, menghasilkan polimorfisme pita DNA dalam jumlah banyak, tidak memerlukan pengetahuan tentang latar belakang genom yang dianalisis dan mudah memperoleh primer acak yang diperlukan untuk menganalisis genom semua jenis organisme. Walaupun metode ini kurang sempurna dan memiliki kelemahan dalam konsistensi produk amplifikasi, tetapi kelemahan ini dapat diatasi dengan mengoptimalkan ekstraksi, dan kondisi PCR serta pemilihan primer yang tepat. Marka RAPD sudah banyak digunakan pada jenis jenis tumbuhan tropis, khususnya dari suku *Araceae*.

Pada tahap awal pengembangan dilakukan pengambilan contoh porang dari 14 provinsi berupa bulbi/katak yang kemudian dilakukan optimasi uji ekstraksi isolasi DNA selain dari daun bulbi juga dari kulit bulbi. Hasil ekstraksi isolasi DNA diuji kualitas kuantitas dengan spektrofotometer UV biodrop dan uji elektroforesis gel agarose 1% selama 30 menit.

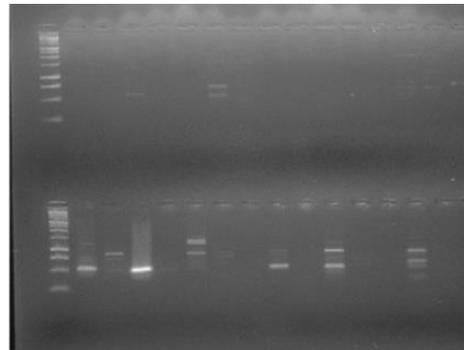
Analisis setiap pita RAPD merupakan satu lokus dimana hanya lokus yang menunjukkan pita yang jelas yang digunakan skoring yaitu ada adalah 1 dan kosong tidak ada adalah 0. Kemudian dibuat matriks fenogram



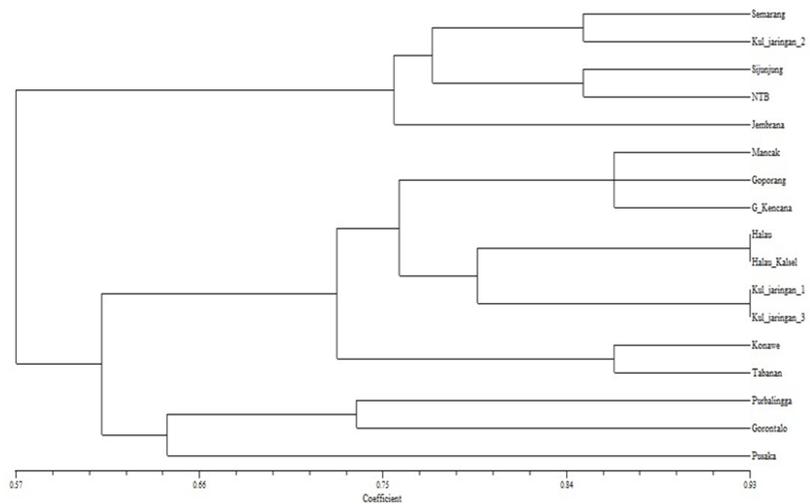
RAPD yang disusun untuk analisis cluster individu contoh yang diuji dengan metode UPGMA dalam program NTSYS-Pc. Berdasarkan hasil PCR RAPD menggunakan delapan primer dimana lima primer yang memberikan hasil fragmen pita DNA. Namun pada hasil uji PCR menggunakan DNA kulit bulbi belum memberikan hasil pita untuk dilakukan analisis fenogram (*missing data*). Beberapa hasil visualisasi hasil PCR RAPD porang berikut:



Gambar 47. Visualisasi hasil uji PCR RAPD pada sampel daun bulbi porang menggunakan primer OPZ 10



Gambar 48. Visualisasi hasil uji PCR RAPD menggunakan OPA 18 dan OPB 18 pada sampel kulit bulbi yang tidak semua sampel memberikan hasil visualisasi amplifikasi



Gambar 49. Kluster yang dihasilkan dari analisis RAPD menggunakan contoh DNA daun

C o n t o h u j i	S e m a r a n g	S i j u n g	M a n c a k	G o p o r a n g	H a l a u	K o n a w e	K a l a e u	P u r b a l i n g g a	T a b a n a	P u s a k a	J e m b r a n a	N T B	G K e n c a n a	G o r o n t a l o	K u l - j a r 1	K u l - j a r 2	K u l - j a r 3
Semarang	1,0																
Sijunjung	0,7	1,0															
Mancak	0,5	0,6	1,0														
Goporang	0,5	0,7	0,9	1,0													
Halau	0,5	0,7	0,7	0,7	1,0												
Konawe	0,6	0,7	0,8	0,7	0,7	1,0											
Halau_Kalsel	0,5	0,6	0,7	0,7	0,9	0,8	1,0										
Purbalingga	0,6	0,6	0,6	0,5	0,7	0,7	0,6	1,0									
Tabanan	0,5	0,5	0,8	0,7	0,7	0,9	0,8	0,7	1,0								
Pusaka	0,5	0,6	0,6	0,6	0,5	0,7	0,6	0,6	0,5	1,0							
Jembrana	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6	0,5	0,5	0,6	0,5	0,6	1,0						
NTB	0,8	0,9	0,6	0,7	0,5	0,6	0,5	0,6	0,4	0,6	0,8	1,0					
G_Kencana	0,5	0,6	0,9	0,9	0,8	0,7	0,9	0,6	0,8	0,6	0,8	0,6	1,0				
Gorontalo	0,6	0,8	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6	0,7	0,6	0,7	0,6	1,0			
Kul_jar_1	0,5	0,7	0,8	0,8	0,7	0,7	0,8	0,7	0,7	0,6	0,6	0,6	0,7	0,6	1,0		
Kul_jar_2	0,9	0,8	0,6	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,4	0,6	0,9	0,9	0,6	0,7	0,7	1,0	
Kul_jar_3	0,3	0,6	0,7	0,7	0,8	0,7	0,9	0,5	0,7	0,6	0,5	0,5	0,9	0,7	0,9	0,5	1,0

Gambar 50. Hubungan koefisien kemiripan contoh pengujian dalam pengembangan metode dengan acuan contoh yang sumber benihnya bulbi porang varietas Madiun 1



Tabel 43. Hasil hubungan kemiripan antar contoh porang dengan acuan dari DNA daun pada PMV

No	Asal Contoh	Koefisien Kemiripan vs acuan			Keterangan
		KJ1	KJ2	KJ3	
1	Banyumas Jateng				
2	Jatim (Mega Raya)uk S				
3	Jatim (Mega Raya)uk M				
4	Jatim (Mega Raya)uk L				
5	NTT				
6	Sawahlunto Sumbar				
7	Sumatera Utara				
8	Sulawesi Tenggara				
9	Semarang Jateng	0,5	00.09	00.03	DNA daun
10	Sijunjung Sumbar	00.07	00.08	00.06	DNA daun
11	Mancak Banten	00.08	00.06	00.07	DNA daun
12	Goporange	00.08	00.06	00.07	DNA daun
13	Halau Kalsel	00.08	00.05	00.08	DNA daun
14	Konawe Sulawesi Tenggara	00.07	00.06	00.07	DNA daun
15	Purbalingga	00.08	00.05	00.09	DNA daun
16	Tabanan Bali	00.07	00.06	00.05	DNA daun
17	Pusaka	00.07	00.04	00.07	DNA daun
18	Jembrana Bali	00.06	00.09	00.06	DNA daun
19	NTB	00.06	00.09	00.05	DNA daun
20	Gunung Kencana	00.06	00.06	00.05	DNA daun
21	Lokal Gorontalo	00.07	00.07	00.09	DNA daun
22	Lokal Kalsel	00.06	00.07	00.07	DNA daun
23	Cilacap Jateng				
24	Huawei Kalsel				
25	Balitkabi Lot a, b,c				
KJ	Kuljar Magelang (1;2;3)	1	1	1	DNA daun

Berdasarkan hasil pelaksanaan pengembangan metode pengujian dapat disimpulkan sebagai berikut:

- a. Pengembangan dapat mengembangkan metode ekstraksi DNA dari daun dan kulit porang dengan penambahan PVP untuk mengatasi masalah keberadaan metabolit pada porang yaitu senyawa polyphenol. Langkah ke depan perlu dilakukan pengembangan metode baku untuk ekstraksi DNA porang, baik berdasar bagian maupun konsentrasi PVP;
- b. Untuk percepatan waktu uji perlu dicoba ekstraksi dari tunas, kulit katak maupun umbi dengan



penambahan PVP (Poli Vinil Poliridon) sehingga reaksi uji PCR.berlangsung optimal;

- c. Analisis koefisien kemiripan contoh yang diuji menggunakan 3 penanda RAPD (OPB 17, OPD 20 dan OPH 15) berdasarkan acuan Kultur Jaringan menunjukkan kisaran 0,3 sd 0,9 dimana koefisien yang mendekati 1,0 memiliki kemiripan dengan acuan. Diperlukan pengembangan lanjut dari penanda RAPD yang digunakan menggunakan metode SCAR guna memperoleh penanda pencari varietas benih acuan dalam rangka sertifikasi benih.