



2. Kajian Informasi Benih Sumber Berbasis DNA dalam Sertifikasi Invitro Benih Porang

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 tahun 2022 baru ada satu varietas benih porang yang dilepas yaitu Madiun 1 dengan Nomor Keputusan Menteri Pertanian Nomor 906/HK.540/C/07/2020 tentang pelepasan calon varietas porang Madiun 1 sebagai varietas unggul dengan nama Madiun 1. Sementara permintaan produksi porang belum terpenuhi namun beberapa daerah atau provinsi telah mengklaim memiliki varietas lokal masing-masing.

Untuk itu laboratorium Balai Besar PPMBTPH melakukan pengkajian metode uji kebenaran genetik berbasis DNA yang cepat dan akurat sehingga dapat memberikan informasi hasil uji DNA yang membedakan antara varietas yang telah dilepas (sebagai acuan/pembanding) dengan varietas lokal/calon varitas yang akan disertifikasi. 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 RAPD adalah dapat menguji keragaman antar spesies guna mengetahui kebenaran benih sumber benih porang dalam sertifikasi benih untuk percepatan ketersediaan benih porang.

Tujuan pengkajian metode uji untuk memperoleh metode pengujian kebenaran genetik berbasis DNA dan informasi teknis terkait pengujian. Informasi teknis metode uji berbasis DNA diperlukan karena permasalahannya belum ada referensi yang dapat menjadi acuan dalam pelaksanaan pengujian kebenaran genetik berbasis DNA yang meliputi contoh kerja yang diuji berupa jaringan tanaman daun atau bagian lain, metode isolasi ekstraksi DNA seperti reagen tertentu yang perlu ditambahkan untuk mengatasi metabolit yang mengganggu DNA serta



metode PCR yang terdiri konsentrasi volume reagen PCR juga program PCR untuk terjadi amplifikasi DNA porang. Pada kajian metode uji ini diharapkan menghasilkan informasi penanda DNA yang memberikan reaksi amplifikasi baik penanda RAPD dan penanda SSR pada varietas porang dan genus tanaman lain.

Bahan dan metode dalam pelaksanaan kajian metode kebenaran genetik berbasis DNA dari hasil pengembangan metode tahun 2021 dilakukan di laboratorium Elektroforesis Balai Besar PPMBTPH. Contoh benih porang yang digunakan adalah porang Sumber Genetik Hayati Madiun 1 dari Balitkabi, kultur invitro Madiun 1 dari BB Biogen, kultur invitro Madiun 1 dari Lab Kultur jaringan P4S V&M Biotechnology Magelang Jawa Tengah dan bulbi Madiun 1 dari areal sertifikasi benih porang CV. Mega Raya di Klamong Madiun Jawa Timur serta sumber genetik hayati satu genus *Amorphophallus* yaitu suweg (*Amorphophallus campenulatus* Decne) dan ile-iles (*Amorphophallus oncophyllus* Prain ex Hookf) dari BB Biogen.

Bahan pengujian yang digunakan terdiri dari reagen ekstraksi isolasi DNA, reagen running elektroforesis gel agarose, reagen KIT PCR Tiangen plus *Science weaker* serta primer penanda RAPD 10 (mers) sebanyak 17 primer dan penanda SSR 6 primer forward reverse (18-21 mers). Peralatan uji yang digunakan adalah perangkat uji ekstraksi isolasi DNA, perangkat uji kualitas kuantitas DNA, perangkat uji penggandaan DNA (PCR), perangkat alat elektroforesis gel agarose dan perangkat dokumentasi gel transilluminator.

Hasil dan pembahasan untuk metode pengujian penanda RAPD dapat mengidentifikasi genotip tumbuhan, memiliki kelebihan dalam pelaksanaan dan analisisnya lebih murah, mudah dilakukan, cepat memberikan hasil, menghasilkan polimorfisme pita DNA dalam jumlah banyak, tidak memerlukan pengetahuan tentang latar belakang genom yang dianalisis serta mudah memperoleh primer acak yang diperlukan untuk menganalisis genom semua jenis organisme (Tingey et al., 1994). Walaupun metode ini kurang sempurna dan memiliki kelemahan dalam konsistensi produk amplifikasi (Jones et al., 1997), tetapi kelemahan ini dapat diatasi dengan mengoptimalkan ekstraksi DNA dan kondisi PCR serta pemilihan primer yang tepat. Marka RAPD sudah banyak digunakan pada jenis jenis tumbuhan tropis, khususnya dari suku *Araceae*.



Gambar 2. Contoh jaringan genus *Amorphophallus* suweg dan iles-iles dari Sumber Genetik Hayati BB Biogen

Kesimpulan berdasarkan hasil pelaksanaan pengembangan kajian informasi benih sumber berbasis DNA dalam sertifikasi invitro benih porang dapat disimpulkan sebagai berikut:

- a. Metode minipreparation CTAB dengan penambahan merkaptoetanol 1% dan PVP 2% merupakan metode ekstraksi isolasi DNA optimal menggunakan contoh calon tunas pada bulbi selain jaringan daun sehingga dapat menghasilkan kemurnian DNA mendekati 1,8 – 2,0.
- b. Metode penggandaan DNA (PCR) dengan 13 penanda RAPD untuk volume 10 ul terdiri cetakan DNA 3 ng sebanyak 1 ul, primer RAPD (10 pmol) sebanyak 1 ul, buffer PCR Tiangen (2x) sebanyak 5 ul serta nuclease free water 3 ul dengan program PCR RAPD selama 45 siklus atau hampir 4 jam.
- c. Keterangan kebenaran genetik antara contoh hasil perbanyakan dengan benih sumber sebagai pembandingan berdasarkan analisis koefisien kemiripan bila mendekati 1,0.
- d. Pengujian DNA porang membutuhkan waktu isolasi DNA dua hari untuk menghasilkan keterangan kualitas kuantitas DNA dan waktu uji PCR penanda RAPD dua hari untuk menghasilkan keterangan kebenaran genetik.

Rekomendasi informasi keterangan kebenaran benih sumber dalam sertifikasi kultur invitro benih porang dapat menggunakan uji DNA dengan penanda RAPD yang menghasilkan pita polimorfik.