



Pengembangan Metode Deteksi Kemurnian Beberapa Padi Varietas Lokal Menggunakan Marka Molekuler

Seiring dengan kebijakan pemerintah dalam meningkatkan potensi sumber daya lokal untuk pangan maka benih padi menjadi salah satu bahan perbanyakan yang harus dipersiapkan sesuai dengan kebutuhan nasional. Padi varietas lokal merupakan sumber plasma nutfah yang dikenal dengan karakter sebagai padi dengan potensi rendah, umur panjang dan tanaman relatif tinggi, namun saat ini ditemukan berbagai padi yang diklaim petani sebagai padi varietas lokal adaptif berproduksi tinggi.

Kemajuan padi varietas lokal tersebut muncul karena padi ini telah ditanam berulang-ulang oleh petani pada cekaman spesifik lokasi dalam waktu panjang, yang sekaligus hal ini merupakan proses seleksi secara alami. Padi lokal unggul dataran tinggi di Sumatera Selatan misalnya di Pagaralam, ditanam cukup luas oleh petani bahkan mencapai sekitar 30% dari luas pertanaman padi di daerah tersebut. Ketinggian tempat lokasi pertanaman padi varietas lokal tersebut rata-rata di atas 800 m dpl. Nama padi varietas lokal yang diklaim petani antara lain: Ayik Keruh, Barokah, Buku Hitam, dan Setangkai. Di dataran tinggi lainnya di Lahat keempat padi varietas lokal tersebut ditanam pula oleh petani secara luas. Provititas keempat padi varietas lokal tersebut berkisar antara 7-9 ton/ha, bahkan bisa lebih dari 10 ton/ha GKP seperti di Lahat untuk padi Ayik Keruh atau Air Keruh (<http://sumsel.litbang.pertanian.go.id>, 2018).

Contoh padi varietas lokal yang digunakan pada pengembangan metode ini dari daerah yang memiliki aneka plasma nutfah jenis padi dan berkontribusi sebagai stok bahan pangan. Untuk itu laboratorium Elektroforesis Balai Besar PPMB-TPH pada TA 2019 melaksanakan pengembangan metode dengan pemanfaatan marka molekuler atau penanda DNA dalam verifikasi kebenaran varietas padi lokal Indonesia, terutama yang memiliki karakter padi lahan rawa dan padi gogo dari Sumatera Barat, Jambi, Sumatera Selatan, dan Kalimantan Selatan.



Tujuan pengembangan metode ini adalah memperoleh penanda DNA padi varietas lokal berdasarkan karakter keunggulan spesifik yang dimiliki varietas padi gogo maupun padi rawa. Manfaat hasil pengembangan metode berupa data penanda DNA yang berguna dalam verifikasi kebenaran varietas padi sawah, padi gogo maupun padi rawa serta informasi bagi pengguna sesuai kebutuhan nasional atau kondisi lingkungan.

Bahan dan sarana pengujian untuk pelaksanaan kegiatan pengembangan metode ini bersumber pada anggaran kegiatan pengembangan dan validasi metode Balai Besar PPMB-TPH Tahun Anggaran 2019. Peralatan yang digunakan dalam pengembangan metode meliputi perangkat ekstraksi isolasi DNA tanaman, perangkat PCR untuk penggandaan DNA dan perangkat elektroforesis horisontal serta kamera gel dokumentasi yang bertempat di laboratorium Elektroforesis, Balai Besar PPMB TPH.

Bahan pengujian padi berupa 19 varietas lokal dan empat varietas padi unggul sebagai acuan, yang terperinci sebagai benih acuan (bersertifikat/label) adalah Ciherang, Inpago 9, Inpari 32, Inpara 8 sedangkan varietas lokal dari daerah Sumatera Barat terdiri Indramayu, Kuku Balam, Merah Jao, daerah Jambi Kuku Balam, Seni Lentik, Seribu Naik Sarolangun, Seri Naik Tebo, daerah Sumatera selatan terdiri Makmur 15, Makmur 16, Srimbo 17, TW Banyuasin, Vietnam, Kuda Banyuasin, Bromo Banyuasin, Seni Mungin Putih Marangin dan daerah Kalimantan selatan terdiri Siam Unus Kuning, Siam Pandak, Siam Ketan, Ketan Mayang.

Tahap awal kegiatan dengan pengambilan contoh padi lokal berdasarkan informasi dari personel UPT BPSB TPH Sumatera Barat, Jambi, Sumatera Selatan dan Kalimantan Selatan. Contoh padi lokal tersebut merupakan bahan perbanyakan milik Gapoktan/Poktan setempat sedangkan benih padi Bina dari Balai Besar Penelitian Padi Sukamandi menjadi acuan varietas pengujian. Contoh kerja pengujian dari padi yang ditanam sampai umur empat minggu di rumah kaca dan



pengujian ekstraksi isolasi DNA sampai penggandaan DNA dengan PCR menggunakan delapan marka molekuler atau primer SSR. Pemilihan penggunaan primer tersebut berdasarkan informasi bahwa marka yang digunakan informatif dalam membedakan varietas padi sawah dan padi gogo (Kristianto N dkk, 2017), yang secara terperinci pada Tabel 20 berikut.

Tabel 20. Daftar primer SSR yang digunakan pada pengembangan metode

Nama Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Pola SSR	Posisi Kromosom
RM 5742	GGCGAGCGATCCTCAAAC	GTTACTCACGCTTGCCAG	(ACC)8	4
RM 6997	CAACGCGCAGTAAATTTGC	GGCCTTGTCACTACATGC	(TTG)12	4
RM 263	CCCAGGTAGCTCATGAACC	GCTACGTTTGAGCTAACCACG	(CT)34	2
RM 518	CTTCACTCACTCACCATGG	ATCCATCTGGAGCAAGCAAC	(TC)15	4
RM 124	ATCGTCTGCGTTGCGGCTGTG	CATGGATCACCGAGCTCCCCC	(TC)10	4
RM 223	GAGTGAGCTTGGGCTGAAAC	GAAGCAAGGGGGGTCTTGGCACTG	(CT)25	8
RM 259	TGGAGTTTGAGAGGAGGG	CTTGTTCATGGTGCCATGT	(CT)17	1
RM 536	TCTCTCCTCTGTGTTGGCTC	ACACACCAACACGACCACAC	(CT)16	11

Tahap pengujian dimulai dengan pengujian ekstraksi isolasi DNA dari jaringan tanaman (daun) padi menggunakan metode *Minipreparation CTAB* (1989) yang dimodifikasi, hingga menghasilkan DNA dengan konsentrasi dan kemurnian yang belum diketahui dimana pada satu sampel pengujian molekuler DNA terdapat dua ulangan contoh uji. Untuk itu hasil isolasi DNA dilakukan uji kuantitas DNA melalui pengukuran spektrofotometer UV Nanodrop dan uji kualitas DNA dengan *running* elektroforesis 30 menit pada agarose 1% buffer TAE 1x yang hasil DNA disebut sebagai stok DNA dengan kemurnian DNA antara 1.8 sd 2.0 dan konsentrasi DNA sampai ng/ul.

Pengujian berlanjut dengan penggandaan DNA atau PCR metode SSR terhadap cetakan DNA dengan konsentrasi tertentu menggunakan delapan primer SSR yang melalui tahap optimasi kondisi PCR atau suhu amplifikasi masing-masing primer sehingga menghasilkan amplicon yang dapat terbaca jelas oleh analis seperti pada Gambar 35 visualisasi alel varietas acuan, Gambar 36 visualisasi



alel varietas lokal Sumatera Barat, Gambar 37 visualisasi alel varietas lokal Kalimantan Selatan. Berdasarkan Instruksi Kerja Pengujian untuk kondisi PCR yang meliputi tahap pertama denaturasi awal pada suhu 95°C selama 3 menit sebanyak 1 siklus, tahap kedua terdiri denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, annealing pada suhu 61°C selama 30 detik, elongasi pada suhu 72°C selama 30 detik sebanyak 35 siklus, dan tahap akhir atau final extension dengan suhu 72°C selama 5 menit sebanyak 1 siklus.

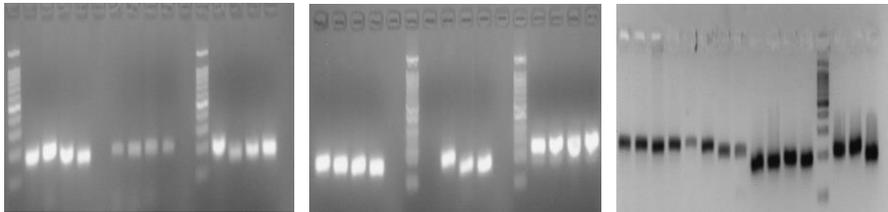
Pada optimasi kondisi PCR dilakukan penyesuaian suhu annealing yaitu plus minus 5°C dari masing-masing primer sehingga diperoleh tiga kondisi optimal yaitu suhu annealing 60°C untuk RM 5742, RM 6997, RM 263, RM 518, RM 223, RM 536, kondisi suhu annealing 68°C untuk RM 124 dan kondisi suhu annealing 57°C untuk RM 259. Pada tahap optimasi PCR ini juga dilakukan verifikasi metode uji terhadap volume reagen PCR yang pada Instruksi Kerja Pengujian sebelumnya menggunakan volume 25 ul per mikrotube (campuran reagen PCR terdiri dari 4,5 ul buffer PCR + MgCl + dNTP, 2,5 ul primer forward reverse, 0,15 ul Tag DNA Polimerase, 1,0 ul DNA cetakan dan 16,8 ul dd H₂O) sedangkan pada pelaksanaan pengembangan metode ini digunakan volume 10 ul per mikrotube (campuran terdiri 5,0 ul PCR ready mix, 1,0 ul primer forward reverse, 2 ul cetakan DNA dan 2 ul dd H₂O) dimana optimasi volume uji PCR yang dilakukan memberikan hasil uji yang tidak berbeda berdasarkan visualisasi amplikon setelah running elektroforesis gel agarose 3% selama 120 menit dengan daya 50 volt.

Setelah diperoleh kondisi PCR dan volume uji PCR maka pengembangan metode berlanjut melakukan uji molekuler metode SSR terhadap empat varietas unggul dan 19 padi varietas lokal menggunakan hasil optimasi metode PCR. Berdasarkan visualisasi amplikon DNA hasil PCR pada varietas yang diuji memberikan hasil berupa alel dengan pasang basa pada kisaran 150 bp sd 400 bp diantaranya seperti Gambar 35, dan Gambar 36. Hasil uji dari 23 varietas yang beragam kemudian



dianalisa menggunakan program NTSys. Hasil analisa secara molekuler menggunakan penanda SSR menghasilkan persentase tingkat kekerabatan/kemiripan contoh yang diuji.

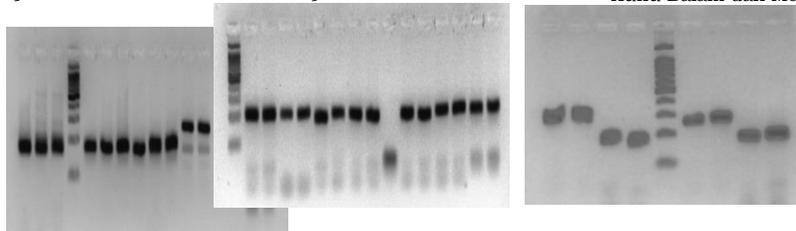
Hasil tersebut menunjukkan terpenuhinya atau tidak terpenuhinya kemurnian genetik dari varietas yang diuji berupa daftar alel varietas yang diuji dengan 8 primer SSR dan fenogram kekerabatan varietas yang diuji. Hasil stok DNA hasil ekstraksi isolasi DNA metode minipreparation CTAB dilakukan uji kualitas dan kuantitas DNA (metode Nanodrop UV dan elektroforesis gel agarose 1%) terhadap 4 varietas unggul dan 19 padi varietas lokal. Pengujian dilanjutkan dengan penggandaan atau PCR menggunakan metode SSR dengan 8 primer SSR yang terperinci pada Tabel 21. Visualisasi hasil PCR berupa amplikon atau alel dengan pasang basa (bp) yang kemudian direkapitulasi menjadi fenogram (Gambar 35).



Pola pita visualisasi gel agarose 3% dengan RM 5742, RM 6997, RM 263 dari varietas Ciherang dan Inpago 9

Pola pita visualisasi gel agarose 3% dengan RM 518, RM 223, RM 536 dari varietas Ciherang dan Inpago 9

Pola pita visualisasi gel agarose 3% dengan RM 5742, RM 6997, RM 263 dari varietas lokal Indramayu, Kuku Balam dan Merah Jao



Pola pita visualisasi gel agarose 3% dengan RM 518, RM 223, RM 536 dari varietas lokal Indramayu, Kuku Balam dan Merah Jao

Pola pita visualisasi gel agarose 3% dengan RM 259 dari varietas lokal Seribu Naik Sarolangun, Seribu Naik Tebo,

Pola pita visualisasi gel agarose 3% marka RM 124 dan RM 259 dari varietas Siam Pandak dan Siam Unus Kuning Kalsel

Gambar 34. Pola pita visualisasi gel agarose



Kompetisi di bidang agribisnis yang semakin ketat memerlukan metode pengawasan dan sertifikasi benih yang efektif diantaranya dengan memanfaatkan bioteknologi melalui penanda DNA yang lebih cepat, akurat dan berlaku standar untuk laboratorium mutu benih sehingga para pelaku pasar akan taat pada penegakan aturan dan perlindungan hak pemilik varietas bila dapat menyediakan benih yang murni dengan identitas yang jelas. Sebelum pelaksanaan pengujian metode SSR, tim telah melakukan tahap optimasi prosedur dalam pengujian penggandaan DNA (PCR) yaitu terhadap kondisi PCR dan volume reagen PCR yang digunakan. Tahap tersebut terdokumentasi dimana visualisasi hasil amplifikasi sebelum tahap optimasi dilakukan yaitu dengan kondisi *annealing* 61°C dan volume PCR 25 ul dimana hasil menunjukkan visualisasi DNA sulit terbaca sehingga perlu dilakukan optimasi pada sampel yang sama.

Pada saat optimasi kondisi PCR dibedakan berdasarkan primer yang digunakan dan volume reaksi yang digunakan adalah 10 ul. Pengujian dilanjutkan amplifikasi dengan 8 primer SSR yaitu RM 5742, RM 6997, RM 263, RM 518, RM 223, RM 536, RM 124 dan RM 259. Berdasarkan daftar alel dari varietas yang diuji dilakukan analisa NTSys melalui dukungan BB Biogen sehingga menghasilkan fenogram varietas yang diuji menunjukkan bahwa 23 varietas padi memisah menjadi dua klaster utama pada koefisien 0,69 (Gambar 37).

Klaster pertama terdiri 20 varietas dan klaster ke dua terdiri 3 varietas lokal dari Sumbar. Pada klaster pertama varietas acuan yang diuji masih mengelompok sebagai sub klaster pertama yaitu padi sawah yaitu ciherang dan sub klaster padi gogo yaitu Inpago 9 sedangkan sub klaster IA padi terbagi atas padi rawa yaitu Inpara 8 terpisah dengan Inpari 32 yang berlanjut sub klaster varietas lokal pada koefisien 0,81 terdiri atas Seni Lentik Jambi diiringi varietas lokal Seribu Naik Sarolangun, Seni Naik Tebo, Makmur 15 Sumsel, Makmur 16 Sumsel, Srimbo 17 Sumsel, Siam Unus Kuning, Siam Pandak, Siam Ketan, Ketan Mayang dari



Kalsel yang dikenal sebagai beras ketan. Untuk varietas lokal TW Banyuasin dan Vietnam mengelompok dengan koefisien 0,97.

Untuk varietas lokal Kuku Balam Jambi memisah dengan varietas Bromo Banyuasin dan Seni Mungin Putih. Berdasarkan informasi dari tingkat kekerabatan antar varietas yang diuji tersebut dapat dimanfaatkan sebagai informasi dalam budidaya perbanyak varietas lokal karena data kemurnian genetik telah diuji dan benar terdapat pada masing-masing varietas lokal serta karakter molekuler tersebut tidak dipengaruhi oleh lingkungan dalam pengujian di laboratorium. Perlu diketahui bahwa varietas lokal tidak melalui tahap pelepasan varietas sehingga data terkait deskripsi varietas tidak ada namun bila pemilik padi varietas lokal dapat menyatakan bahwa padi varietas lokal telah beradaptasi dan berkembang pada lokasi tertentu maka varietas lokal dapat dilakukan penangkaran benih melalui sertifikasi benih padi melalui UPT BPSB setempat. Bila pelaksanaan penangkaran benih padi varietas lokal dapat memenuhi prosedur sertifikasi benih padi varietas lokal sesuai Keputusan Menteri Pertanian Nomor 991/HK.150/C/05/2018, pada sub bab II.C sebagai benih padi varietas lokal bersertifikat dengan kelas benih BR.

Berdasarkan hasil dan pembahasan pelaksanaan pengembangan metode biomolekuler dapat disimpulkan sebagai berikut:

- a. Kemurnian genetik varietas lokal dapat menggunakan metode molekuler (DNA) PCR dengan primer SSR pada kondisi penempelan primer (*annealing*) suhu 60°C untuk RM 5742, RM 6997, RM 263, RM 518, RM 223, RM 536, kondisi suhu *annealing* 68 °C untuk RM 124 dan suhu *annealing* 57°C untuk RM 259 serta volume uji PCR 10 ul per mikrotube.
- b. Varietas lokal yang diuji menunjukkan sebagai padi bukan sawah berdasarkan analisis NTSys menggunakan delapan marker SSR (RM 5742, RM 6997, RM 263, RM 518, RM 223, RM 536, RM 124 dan RM 259).