

1. Verifikasi Metode Pengujian Campuran Varietas Lain (CVL) Benih Jagung Berbasis Marka Mikrosatelit

Penguatan verifikasi metode pengujian benih menjadi salah satu tugas fungsi Balai Besar PPMBTPH dalam mendukung kegiatan sertifikasi benih untuk ketersediaan pangan. Pengujian mutu benih berbasis analisis molekuler di laboratorium dapat menjadi alternatif parameter metode pengujian Campuran Varietas Lain (CVL) yang telah dituangkan dalam Kepmentan Nomor 966 Tahun 2022 tentang petunjuk teknis sertifikasi benih menggunakan pemeriksaan lapangan saat fase pertumbuhan vegetatif atau generatif. Pengujian CVL dari sampel berbasis marka molekuler di laboratorium dikerjakan oleh analis kompeten dalam rentang waktu kurang lebih 3 hari berupa hasil uji isolasi DNA dan hasil uji PCR yang akurat yang tidak dipengaruhi kondisi lingkungan serta cuaca.

Aturan pengujian mutu benih ISTA (2024) telah memuat pengujian varietas berbasis marka DNA menggunakan sebanyak 8 pasang penanda mikrosatelit yang direkomendasikan untuk komoditas jagung serta rincian langkah kerja isolasi DNA, penggandaan DNA (PCR), dan proses elektroforesis sampai pelaporan hasil uji. Meskipun demikian, dalam penerapannya metode pengujian tersebut dapat dimodifikasi sesuai dengan kondisi laboratorium. Kelebihan penggunaan metode uji CVL berbasis marka mikrosatelit di laboratorium, antara lain adalah dapat segera memberikan informasi ada tidak CVL pada kelompok benih yang sedang disertifikasi, efisiensi dalam waktu pelaksanaan pengujian serta biaya pengujian dan kondisi pengujian yang dapat kendalikan. Dengan kata lain, metode pengujian CVL pada benih jagung berbasis marka mikrosatelit dapat dikembangkan di seluruh laboratorium pengujian mutu benih guna mempersingkat waktu dalam penyediaan benih bermutu.

Penguatan metode ini bertujuan untuk: 1) mengonfirmasi keberhasilan penerapan metode uji Campuran Varietas Lain (CVL) pada benih jagung berbasis marka DNA mikrosatelit; dan 2) memperoleh penanda mikrosatelit yang dapat membedakan varietas benih jagung yang digunakan dalam pengujian.

Pada awal kegiatan, dilakukan pengambilan contoh benih jagung dengan jenis benih sumber yang berasal dari BSIP Serealia Maros, yaitu terdiri 6 varietas jagung. Contoh uji, yang sebelumnya dilakukan homogenitas dari 1 kg contoh menjadi 900 gram contoh benih jagung, selanjutnya digunakan dalam kegiatan optimasi metode isolasi DNA. DNA diisolasi dari biji menggunakan metode Sambrook (1989) dalam IKP 9B. Pada tahapan verifikasi metode isolasi DNA ini, tim pengembangan metode melakukan uji coba terhadap keberhasilan isolasi DNA menggunakan perlakuan biji yang digerus. Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA hasil ekstraksi dilakukan berdasarkan pengukuran spektrofotometer UV. Kemurnian DNA ditentukan berdasarkan nilai yang diperoleh dari rasio absorbansi 260/280, sedangkan konsentrasi DNA yang diperoleh dicatat sesuai nilai konsentrasi ($\mu\text{gr/ml}$) yang muncul untuk masing-masing sampel DNA. Pada tahapan selanjutnya, dilakukan penyiapan DNA template melalui pengenceran stok DNA menjadi larutan kerja. Larutan kerja ini yang selanjutnya digunakan sebagai sampel DNA untuk uji PCR dengan primer mikrosatelit.

Hasil Kegiatan

Pada tahap kegiatan penggandaan DNA (PCR) akan dilakukan kegiatan optimasi program PCR terlebih dahulu. Selain itu, akan dilakukan survei polimorfis kedelapan primer mikrosatelit yang direkomendasikan dalam aturan ISTA (2024) terhadap masing-masing varietas jagung yang digunakan dalam pelaksanaan penguatan metode ini. Primer polimorfik yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk mengamplifikasi contoh kerja dengan dua campuran varietas atau CVL.

Selanjutnya hasil running PCR menggunakan 8 primer pada enam varietas jagung dilakukan elektroforesis agarose 2 % dengan bufer TAE 1x menggunakan 80 volt selama 60 menit. Hasil separasi elektroforesis dilanjutkan dokumentasi gel UV transillumination sehingga visualisasi pola pita hasil PCR yang terkumpul dapat dianalisa pada ukuran panjang basa berapa dan ada tidak pola tersebut contoh DNA yang diuji. Jika ukuran panjang basa ada maka di skor dengan 1 dan jika tidak ada skor 0. Kemudian dilakukan

perhitungan persentase polimorfik tiap primer guna informasi potensi ada variasi atau perbedaan dari DNA varietas jagung.

Untuk memperoleh persentase CVL berdasarkan hasil ada tidak alel atau molekul basa dari primer pembeda varietas benih jagung yang diuji. Bila dilakukan melalui perhitungan.

$$\% \text{ Polimorfik} = \frac{\text{Jumlah lokus (pita) polimorfik}}{\text{Jumlah total lokus yang visual}} \times 100 \%$$

Tabel 4. Primer mikrosatelit untuk verifikasi varietas jagung (ISTA, 2024)

No	Primer	Posisi pada Kromosom	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	Kisaran Perkiraan ukuran alel
1	Umc 1545	7	GAAGAACTGCATCAAC AACAAGCTG	ATTGGTTGGTTCTT GCTTCCATTA	66-81
2	Umc 1448	3	ATCCTCTCATCTTTA GGTCCACCG	CATATACAGTCTCT TCTGGCTGCTCA	165-180
3	Umc 1117	4	AATTCTAGTCTGGG TCGGAAGCTC	CGTGGCCGTGGAG TCTACTACT	140-168
4	Umc 1061	10	AGCAGGAGTACCCA TGAAAGTCC	TATCACAGCACGAA GCCGATAGATG	99-108
5	Phi 109275	1	CGGTTTCATGCTAGC TCTGC	GTTGTGGCTTGTGG TGGTGGTG	123-138
6	Phi 102228	3	ATTCCGACGCAATCA ACA	TTCATCTCCTCCAG GAGCCTT	123-129
7	Phi 083	2	CAAAACATCAGCCAGA GACAAGGAC	ATTCATCGACGCGT CACAGTCTACT	123-135
8	Phi 015	8	GCAACGTACCGTAC CGTACCTTTCCGA	ACGCTGCATTCAAT TACCGGAAG	81-102

~ Tahap I. Denaturasi awal 94°C 10 menit 1x

~ Tahap II. Denaturasi 94°C 30 detik
 Annealing 64°C 30 detik } 10x
 Elongasi 72°C 30 detik }

~ Tahap III. Denaturasi 94°C 30 detik
 Annealing 64°C 30 detik } 30x
 Elongasi 72°C 30 detik }

~ Tahap IV. Sintesa akhir 72°C 10 menit 1x

~ Tahap V. Penyimpanan 10°C Tidak tentu 1x

Catatan: *Suhu turun 1°C tiap satu siklus: ** sesuai suhu melting primer dengan kisaran ± 5°C

Komposisi PCR

~ Bufer PCR + Tag Pol	: 5,0 ul
~ Primer SSR F (5 pmol)	: 9,5 ul
~ Primer SSR R (3 pmol)	: 9,5 ul
~ Nuclease Free Water	: 3,0 ul
~ DNA Cetakan (25)	: 1,0 ul
~ Jumlah	: 10,0 ul

Verifikasi metode CVL berbasis marka mikrosatelit diawali ada informasi riwayat varietas benih jagung yang diuji berdasarkan dekripsi varietas dan informasi posisi urutan basa dari primer yang digunakan guna konfirmasi kebenaran bahan uji.

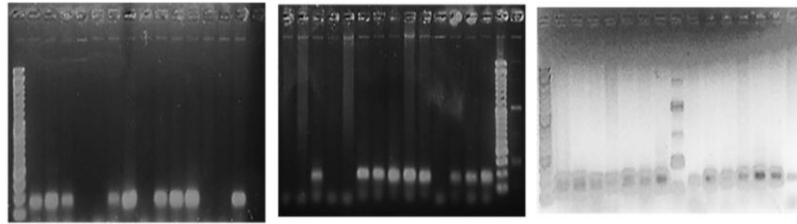
Tabel 5. Riwayat varietas benih jagung yang diuji (Balitsereal, 2010; 2013)

Varietas	Asal	Ketahanan penyakit (Keunggulan)	Sebaran lahan
Bisma	Persilangan Pool 4 dengan bahan introduksi	Tahan bulai, karat dan hawar daun	Dataran rendah sd 500 mdpl
Pallaka	Dibentuk dari 3 galur GK, SW, GM	Peka penyakit bulai dan karat	Dataran rendah sd 600 mdpl
Nasa 29 (Nakula Sadewa)	Persilangan galur murni MAL dan G (Hibrida, bertongkol 2)	Tahan karat dan bercak daun	-
Jakarin 1	Persilangan Balace komposit dari beberapa galur	Agak tahan penyakit bulai, hawar dan karat	Toleran cekaman kering menjelang berbunga atau ketersediaan air rendah dan kurang subur
Sukmaraga	Introduksi dan hasil kombinasi lingkungan asam serta normal	Cukup tahan penyakit bulai, tahan bercak daun dan karat	Dataran rendah sd 800 mdpl, adaptif tanah masam
Lamuru	Dibentuk dari 3 galur GK, SW, GM	Cukup tahan penyakit bulai dan tahan bercak daun	Dataran rendah sd 600 mdpl

Tahap berikutnya isolasi DNA dan uji kualitas kuantitas DNA dari 6 varietas jagung dengan spektrofotometer serta running elektroforesis.

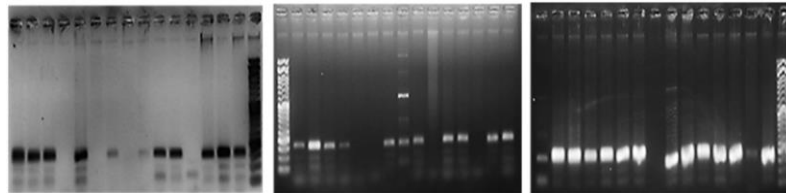
Hasil kemurnian DNA pada kisaran 1,8 s.d 2,0 baik perlakuan 5 ulangan @ 20 butir maupun 2 ulangan @ 50 butir. Stok DNA yang diperoleh diuji PCR menggunakan 8 primer yang menghasilkan amplifikasi dan dianalisa dari visualisasi ampikon untuk mengetahui ada atau tidak ada pita DNA yang muncul, jumlah pita DNA yang muncul serta ukuran panjang basa dari pita DNA.

Amplifikasi dengan Umc 1545 memberikan visualisasi tidak berbeda dari 6 varietas baik perlakuan contoh A dan B yaitu 2 pita alel pada kisaran 100-150 bp namun diluar kisaran spesifik primer Umc 1545 yaitu 66-81 bp.



Gambar 1. Visualisasi hasil PCR Umc 1545 (P1) pada Bisma, Pallaka, Nasa 29, Jakarin 1 Sukmaraga, Lamuru running gel 2% : 80 volt: 60 menit

Berikutnya hasil PCR dengan marka mikrosatelit Umc 1448 memberikan visualisasi pita yang berbeda pada 6 varietas yaitu 3 pita alel pada kisaran 50-100 namun di luar kisaran spesifik marka 165-180 bp.



Gambar 2. Visualisasi hasil PCR Umc 1448 (P2) pada Bisma, Pallaka, Nasa 29, Jakarin 1 Sukmaraga, Lamuru running gel 2%: 80 volt: 60 menit

Hasil verifikasi metode marka mikrosatelit Umc 1061 memberikan visualisasi berbeda pada 6 varietas pada kisaran 140-168 bp. Hasil verifikasi metode marka mikrosatelit Umc 1117 memberikan visualisasi berbeda pada 6 varietas yaitu 3 pita alel pada kisaran 140-400 bp namun di luar kisaran alel spesifik marka.

Hasil amplifikasi dengan Phi 109275 memberikan visualisasi berbeda dari 6 varietas 4 pita alel pada kisaran 150-500 bp. Sedangkan hasil amplifikasi marka mikrosatelit Phi 102228 memberikan visualisasi tidak berbeda dari 6 varietas yaitu satu pita alel pada kisaran 100-

500 bp. Hasil verifikasi metode marka mikrosatelit Phi 083 memberikan visualisasi berbeda pada 6 varietas yaitu 2 pita alel pada kisaran 100-150 bp). Untuk hasil verifikasi metode marka mikrosatelit Phi 015 memberikan visualisasi berbeda pada 6 varietas yaitu 3 pita alel pada kisaran 50-200 bp.

Hasil pembacaan ada tidak pola pita, ukuran pasang basa dan sifat polimorfisme primer mikrosatelit yang digunakan pada tabel *scoring primer* pada contoh A dan B serta tabel rekapitulasi persentase polimorfik tiap primer.

Tabel 6. *Scoring primer* marka mikrosatelit yang polimorfik pada contoh a (20 btr x 5 ulangan)

No	Primer	Jml	Ukuran (BP)	Bisma (B)	Pallaka (C)	Nasa 29 (D)	Jakaran 1 (E)	Sukmaraga (F)	Lamuru (G)	Jenis Primer
1	Umc 1545	1	100	1	1	1	1	1	0	Polimorfik
		2	120	1	1	1	1	1	1	Monomorfik
2	Umc 1448	1	50	1	1	1	1	1	1	Monomorfik
		2	100	1	0	1	1	0	0	Polimorfik
		3	150	1	1	0	0	1	1	Polimorfik
		4	180	1	0	1	1	1	1	Polimorfik
		5	220	0	0	0	1	1	1	Polimorfik
3	Umc 1117	1	100	0	0	1	1	0	0	Polimorfik
		2	120	1	1	1	1	1	1	Monomorfik
		3	150	0	0	0	1	0	0	Polimorfik
		4	180	0	0	1	0	0	0	Polimorfik
4	Umc 1061	1	100	0	0	1	0	0	0	Polimorfik
		2	120	1	1	1	1	1	0	Polimorfik
		3	150	1	1	1	0	0	0	Polimorfik
		4	180	0	1	1	1	1	0	Polimorfik
		5	200	1	1	1	1	1	1	Monomorfik
		6	400	0	1	0	0	0	1	Polimorfik
5	Phi 109275	1	50	1	0	1	1	1	1	Polimorfik
		2	100	1	1	1	1	1	1	Monomorfik
		3	120	1	1	1	1	0	0	Polimorfik
		4	150	1	1	1	1	1	1	Monomorfik
		5	180	0	0	0	1	1	1	Polimorfik
		6	200	0	0	1	1	0	1	Polimorfik
		7	400	1	1	0	0	0	0	Polimorfik
6	Phi 102228	1	300	1	1	1	1	-	-	Monomorfik
7	Phi 083	1	50	0	1	1	0	-	-	Polimorfik
		2	100	1	1	1	1	-	-	Monomorfik
		3	150	1	1	1	1	-	-	Monomorfik
		4	210	1	1	0	0	-	-	Polimorfik
		5	300	0	0	0	1	-	-	Polimorfik
8	Phi 015	1	50	1	1	1	1	1	1	Monomorfik
		2	80	0	0	1	1	1	1	Polimorfik
		3	100	1	1	1	1	1	1	Monomorfik
		4	130	1	1	1	1	1	1	Monomorfik
		5	150	0	0	0	0	0	1	Polimorfik
		6	200	0	0	0	0	1	0	Polimorfik
		7	400	0	0	0	0	1	1	Polimorfik

Tabel 7. *Scoring primer* marka mikrosatelit yang polimorfik pada contoh b (50 btr x 5 ulangan)

No	Primer	Jml	Ukuran (BP)	Bisma (B)	Pallaka (C)	Nasa 29 (D)	Jakarin 1 (E)	Sukmaraga (F)	Lamuru (G)	Jenis Primer
1	Umc 1545	1	100	1	1	1	1	1	0	Polimorfik
		2	120	1	1	1	1	1	1	Monomorfik
2	Umc 1448	1	50	1	1	1	1	1	1	Monomorfik
		2	100	1	0	1	1	0	0	Polimorfik
		3	150	1	1	0	0	1	1	Polimorfik
		4	180	1	0	1	1	1	1	Polimorfik
		5	220	0	0	0	1	1	1	Polimorfik
3	Umc 1117	1	100	0	0	1	1	0	0	Polimorfik
		2	120	1	1	1	1	1	1	Monomorfik
		3	150	0	0	0	1	0	0	Polimorfik
		4	180	0	0	1	0	0	0	Polimorfik
4	Umc 1061	1	100	0	0	1	0	0	0	Polimorfik
		2	120	1	1	1	1	1	0	Polimorfik
		3	150	1	1	1	0	0	0	Polimorfik
		4	180	0	1	1	1	1	0	Polimorfik
		5	200	1	1	1	1	1	1	Monomorfik
		6	400	0	1	0	0	0	1	Polimorfik
5	Phi 109275	1	50	1	0	1	1	1	1	Polimorfik
		2	100	1	1	1	1	1	1	Monomorfik
		3	120	1	1	1	1	0	0	Polimorfik
		4	150	1	1	1	1	1	1	Monomorfik
		5	180	0	0	0	1	1	1	Polimorfik
		6	200	0	0	1	1	0	1	Polimorfik
		7	400	1	1	0	0	0	0	Polimorfik
6	Phi 102228	1	300	1	1	1	1	-	-	Monomorfik
7	Phi 083	1	50	0	1	1	0	-	-	Polimorfik
		2	100	1	1	1	1	-	-	Monomorfik
		3	150	1	1	1	1	-	-	Monomorfik
		4	210	1	1	0	0	-	-	Polimorfik
		5	300	0	0	0	1	-	-	Polimorfik
8	Phi 015	1	50	1	1	1	1	1	1	Monomorfik
		2	80	0	0	1	1	1	1	Polimorfik
		3	100	1	1	1	1	1	1	Monomorfik
		4	130	1	1	1	1	1	1	Monomorfik
		5	150	0	0	0	0	0	1	Polimorfik
		6	200	0	0	0	0	1	0	Polimorfik
		7	400	0	0	0	0	1	1	Polimorfik

Tabel 8. Jumlah pita DNA, persentase polimorfik dan PIC primer mikrosatelit

No	Primer Mikrosatelit	Contoh Kerja	Jumlah Pita DNA	Jumlah Pita Polimorfik	% Polimorfik
1	Umc 1545	a	2	1	50
		b	2	1	50
2	Umc 1448	a	5	4	80
		b	5	4	80
3	Umc 1117	a	4	3	75
		b	4	3	75
4	Umc 1061	a	6	5	83
		b	6	3	50
5	Phi 109275	a	7	5	71
		b	7	5	71
6	Phi 102228	a	1	0	0
		b	1	0	0
7	Phi 083	a	5	3	60
		b	5	3	60
8	Phi 015	a	7	4	57
		b	7	4	57

Reaksi amplifikasi merupakan hasil penempelan urutan basa pendek dan berulang dari marka yang komplementer dengari DNA contoh varietas melalui proses PCR yang terdiri tahap denaturasi (untai ganda terurai), annealing (penempelan primer), elongasi (perpanjangan untai DNA) serta perbanyakkan sehingga saat running elektroforesis terjadi separasi DNA target hasil PCR yang kemudian didokumentasi dengan UV .

Berdasarkan hasil persentase primer yang polimorfik terdapat 7 primer merupakan yang polimorfik dan satu primer Phi 102228 bersifat monomorfik. Guna memperoleh data primer polimorfik yang dapat menunjukkan ketidakmurnian contoh atau campuran varietas dilakukan uji amplifikasi dari primer yang memiliki persentas polimorfik yang besar yaitu Umc 1448, Umc 1117, Umc 1061 dan Phi 109275.

Hasil amplifikasi Umc 1117 memberikan visualisasi berbeda pada contoh CVL Bisma dalam Pallaka, Nasa 29, Jakarin 1, Sukmaraga dan Lamuru yaitu 2 alel dengan ukuran 75 s.d 450. Sedangkan amplifikasi Umc 1061 memberikan visualisasi tidak berbeda pada pada contoh CVL Pallaka dalam Bisma, Nasa 29, Jakarin 1, Sukmaraga dan Lamuru yaitu 100 s.d 150 bp.

Kesimpulan hasil penguatan metode adalah: 1) Konfirmasi metode kemurnian varietas berbasis marka mikrosatelit dari *ISTA Rules* (2024) berhasil dilaksanakan terhadap enam varietas jagung berupa pola pita DNA yang teramplifikasi, dengan modifikasi teknis sesuai dengan kondisi laboratorium. Kedua beberapa primer mikrosatelit dapat menunjukkan polimorfisme (pola pita berbeda) sebagai informasi ada potensi ketidakmurnian pada enam contoh DNA varietas jagung yaitu Umc 1448 sebesar 80%, primer Umc 1117 sebesar 75% dan primer Phi 109275 sebesar 71%. Ketiga penggunaan primer mikrosatelit yang polimorfik dalam uji CVL pada varietas jagung perlu dilanjutkan dengan kegiatan validasi sebagai bukti akurasi data secara repeatabilitas dan reproduibilitas.

Rekomendasi penguatan metode adalah layanan informasi kemurnian varietas (genetik) benih yang cepat menjadi kebutuhan teknis saat tahap awal penyediaan stok benih, untuk itu metode uji campuran varietas lain (CVL) berbasis marka mikrosatelit di laboratorium dapat digunakan sebagai pilihan metode cepat karena telah dikonfirmasi (verifikasi) berdasarkan *ISTA Rules* (2024) dengan waktu uji 3 hari terdiri tahap isolasi DNA, tahap penggandaan DNA (PCR) dan analisa pelaporan hasil uji. Namun guna memperkuat pemilihan metode ini perlu dilanjutkan dengan validasi primer mikrosatelit yang akan melibatkan laboratorium eksternal.