

A. TEKNISI LITKAYASA

IDENTIFIKASI KEMURNIAN GALUR JAGUNG SECARA CEPAT DAN SEDERHANA

Fristy Damanik

Balai Penelitian Tanaman Serealia

Jl. Dr. Ratulangi No. 274 Maros Kode Pos 90514

email : fristydamanik09@gmail.com

RINGKASAN

Teknik penggunaan marka molekuler dapat dijadikan alternatif teknologi identifikasi kemurnian galur yang cepat dan sederhana (tidak harus melalui satu siklus pertanaman). Identifikasi kemurnian galur ini dilakukan dengan tujuan untuk menguji kemurnian galur-galur secara tepat dan sederhana. Penelitian dilakukan di Lab Biologi Molekuler Maros dengan metode marka SSR menggunakan primer dupssr 10 dan umc 1066. Hasil analisis menggunakan primer SSR dupssr 10 dan umc 1066 menunjukkan 100% galur murni berdasarkan karakter ketahanan terhadap penyakit bulai. Hasil analisa disimpulkan bahwa galur F3 memiliki kemurnian genetik sebesar 100% berdasarkan karakter ketahanan terhadap bulai.

Kata Kunci : Galur, kemurnian, marka SSR

PENDAHULUAN

Galur adalah tanaman hasil pemuliaan yang telah diseleksi dan diuji, serta sifat unggul sesuai tujuan pemuliaan, seragam dan stabil, tetapi belum dilepas sebagai varietas (BBPadi, 2015). Galur murni atau lini murni adalah generasi zuriat (keturunan, progeny) asal satu induk yang masing-masing individu anggotanya memiliki genotipe seragam karena homozigot untuk (hampir) semua lokusnya akibat penyerbukan/pembuahan sendiri yang berulang-ulang. Galur murni merupakan tanaman yang selalu menghasilkan keturunan dengan sifat yang sama dengan sifat induknya (Wulan, 1999).

Keberhasilan pengembangan suatu varietas inbrida tidak hanya ditentukan oleh ketersediaan benih secara kuantitas, tetapi juga kualitas (Mulsanti et al, 2013). Mutu benih mencakup mutu fisik, mutu fisiologis, mutu genetik. Mutu fisik benih dapat dilihat penampilan benih secara fisik, mutu fisiologis merupakan viabilitas benih tersebut sedangkan mutu genetik benih salah satunya yang dilihat adalah kemurnian benihnya (Nasihin et al, 2015). Pengujian kemurnian genetik benih merupakan tahapan yang penting sebagai salah satu upaya penjaminan benih bermutu tinggi, yaitu sesuai dengan keunggulan benih itu sendiri (budiarti dkk, 2011).

Metode pengujian kemurnian galur secara konvensional memiliki banyak kelemahan diantaranya pelaksanaan metode uji keseragaman dilapangan membutuhkan waktu yang lama, karena harus melalui satu siklus pertanaman (ISTA, 2010). Teknik penggunaan marka molekuler dapat dijadikan alternatif teknologi identifikasi kemurnian galur yang cepat dan sederhana (tidak harus melalui satu siklus pertanaman), tepat dan akurat (tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan). Metode marka molekuler telah banyak

diterapkan untuk identifikasi kemurnian galur-galur tanaman diantaranya marka SSR (*Simple Sequencing Repeats*). Marka SSR telah digunakan secara luas dalam analisis berbasis molekuler. Marka ini juga telah banyak digunakan dalam studi keragaman genetik, verifikasi, dan identifikasi varietas tanaman (Pabendon, 2005). Pengujian ini dilakukan dengan melihat kemiripan atau kedekatan antara pola pita yang terbentuk antara suatu populasi dengan tetuanya atau dengan standart marka yang digunakan (Yashiotola et al, 2002).

Identifikasi kemurnian galur ini dilakukan dengan tujuan untuk menguji kemurnian galur-galur secara tepat dan sederhana.

BAHAN DAN METODE

Kegiatan ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Balitsereal pada tahun 2017 dan 2018. Materi genetik yang digunakan adalah sampel daun muda galur-galur F3 jagung sebanyak 28 galur dan 2 tetua. Bahan lainnya adalah paket bahan kimia yang digunakan dalam kegiatan isolasi DNA pada umumnya seperti buffer *cetyl trimethylammonium bromide* (CTAB), β -mercaptoethanol, chloroform : isoamylalkohol (chisam), Isopronol, etanol, buffer tris (TE), aquadest, TBE 10 x , nanopurewater, primer SSR jagung, Enzim, mineral oil, polyakrilamid, Amonium persulfat, Temed, Silver Nitrat, NAOH, Formaldehid. Alat yang digunakan adalah timbangan analitis, gunting, mortal, pestel, spatula, tabung mikrosentrifus 2 ml dan 1,5 ml, pipet mikro, tip mikro, waterbath, shaker, sentrifus, gelas ukur, magnetik stirer, hot plate, freezer, perangkat elektroforesis vertikal, nampan, kamera, spektrofotometer, mikroplate, PCR, white table, plastik gulung.

Isolasi DNA Jagung Galur F3

Pada tahapan ini isolasi DNA menggunakan metode Ekstraksi Modifikasi prosedur George I.A Khan (2008) yang menggunakan teknik atau metode CTAB (*cetyl trimethylammonium bromide*). Metode dilakukan sebagai berikut :

1. Sampel daun jagung diambil setiap galur dipotong dalam ukuran kecil, kemudian ditimbang sebanyak 0,4 per galur kemudian dimasukkan setiap galur ke dalam mortar yang berisi 1.700 μ l buffer CTAB kemudian digerus sampai berbentuk cairan atau bubur daun dan dimasukkan ke dalam 2 tabung mikro 2 ml masing-masing setengah volume. Masing-masing tabung ditambahkan β -mercaptoethanol sebanyak 10 μ l.
2. Tabung di inkubasi pada suhu 65°C selama 60 menit di alat *waterbath*. Bolak-balik tabung dengan hati-hati setiap 15 menit. Tabung kemudian di angkat dari *waterbath* dan di dinginkan pada suhu ruang dan selanjutnya ditambahkan 700 μ l kloroform isoamilalkohol pada setiap tabung.
3. Dengan menggunakan shaker tabung dihomogenkan selama 15 menit dan di sentrifugasi pada 12000 rpm selama 10 menit. Memindahkan secara hati-hati cairan bagian atas (supernatan) ke dalam tabung 1,5 ml yang kosong diatas Es batu. Menambahkan 700 μ l isopropanol dingin pada setiap tabung, kemudian menyimpan dalam freezer pada suhu -30°C selama maksimal 24 jam.

4. Setelah 24 jam memutar tabung secara perlahan sampai terbentuk untaian DNA yang berupa untaian lendir benang berwarna putih. Kemudian mensentrifugasi pada 12000 rpm selama 10 menit untuk mengendapkan DNA pada dasar tabung. Membuang larutan dari endapan DNA dan mencuci pelet DNA sebanyak 2 kali dengan 700 μ l ethanol 70% dengan waktu pencucian 10 menit sekali pencucian kemudian mengeringkan pellet DNA dengan cara diangin-anginkan dengan membalik tube di atas kertas tissue bersih.
5. Setelah kering menambahkan TE buffer sebanyak 75 μ l setiap tabung lalu menginkubasi tabung selama 60 menit di dalam alat *waterbath* sampai DNA larut dalam buffer TE.
6. Menguji kualitas dan kuantitas DNA di alat nanospektrofotometer dengan cara DNA yang sudah larut dihomogenkan dan tabung di sentrifugasi kemudian memipet 4 μ l DNA per tabung lalu meneteskannya di alat spektrofotometer untuk mengecek konsentrasi DNA dan kemurnian DNA nya.

Proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

1. DNA yang sudah diketahui konsentrasinya diencerkan menjadi 10 ng/ μ l untuk memenuhi standart konsentrasi DNA PCR.
2. Menambahkan larutan pereaksi yang lain dengan mengambil volume per reaksi dengan jumlah sampel (melebihi 3-5 untuk kesalahan pipet), larutan pereaksi (PCR-*mix*) terdiri dari komponen-komponen air ultrapure/nanopure 2,25 μ l per reaksi, @Primer Mix (F dan R) 5 uM 0,5 μ l per reaksi, dan enzim 6,25 μ l per reaksi.
3. Mengambil 9 μ l PCR-*mix* kemudian memasukkan ke dalam mikroplate yang berisi DNA. Menambahkan 1 tetes mineral oil dan menutup mikroplate
4. Meletakkan mikroplate tersebut dalam mesin *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan melakukan proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) sesuai suhu primer yang digunakan. Setelah proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) selesai, siap dilakukan elektroforesis gel poliakrilamid.

Elektroforesis gel poliakrilamid

1. Menyiapkan larutan *polyacrylamid* 8% sebanyak 500 μ l dari 100 μ l *Acrylamid* 40%, TBE (Tris-borate-EDTA) 50 μ l, dan Aquadest 350 μ l. Untuk elektroforesis dalam 2 page terdiri atas 2 plate digunakan larutan *Acrylamid* 8% sebanyak 100 μ l, TEMED 100 μ l, dan *Amonium persulfat* (APS) 1000 μ l kemudian larutan tersebut dimasukkan ke plate kaca kemudian masukkan sisir diantara dua plate, membiarkan gel mengalami polimerisasi. Setelah gel mengalami polimerisasi, angkat sisir dari kedua plate dan plate dimasukkan kerangkaian alat elektroforesis vertikal yang berisi larutan TE 1X.
2. Masukkan sampel yang telah di *Polymerase Chain Reaction* (PCR) sebanyak 4 μ l ke masing-masing sumur gel dan 2 μ l marker sebagai penanda pada sumur gel.
3. Melakukan proses elektroforesis pada tegangan 100 volt sampai warna pertama mencapai bagian paling bawah gel.
4. Gel hasil elektroforesis dicuci dengan aquadest, kemudian direndam ke dalam larutan silver selama 5-7 menit dan kemudian dibilas ke dalam aquadest \pm 2 detik, selanjutnya

direndam ke dalam larutan NaOH (Formaldehid 3000 µl/L) sambil digoyang secara perlahan sampai muncul pita-pita DNA.

5. Melakukan visualisasi pita-pita DNA menggunakan kamera di atas *white table*.
6. Analisis data kemurnian DNA galur jagung yaitu dengan pengamatan pola pita DNA hasil visualisasi. Pengamatan yang dilakukan meliputi pembacaan pita DNA hasil visualisasi. Pengamatan dilakukan dengan melihat pola pita DNA yang terbentuk pada generasi F3 yang dibandingkan dengan tetua persilangan yang memiliki karakter yang diduga terpaut. Pola pita yang sama dengan tetua penyumbang karakter unggulnya dihitung 1, sedangkan yang tidak sama dengan tetuanya dihitung 0. Adapun perhitungan persentase kemurnian (Hipi, 2013) sebagai berikut :

$$\% \text{ Kemurnian galur} = \frac{\text{Jumlah galur memiliki pola pita sama dengan tetua}}{\text{Jumlah Keseluruhan galur yang diamati}} \times 100 \%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji kualitas DNA dari 28 Galur F3 menggunakan nanospektrofotometer menunjukkan konsentrasi yang dihasilkan cukup besar hal ini terlihat dari konsentrasi tertinggi terlihat pada galur No. 16 yaitu 300 ng/ul dan Konsentrasi tertinggi terlihat pada galur no. 23 dengan konsentrasi DNA nya 196 ng/ul. Hal ini masih sesuai dengan standart konsentrasi DNA untuk proses PCR selanjutnya yaitu setara 10 ng/ul (Sambrook and Russel, 1989). Konsentrasi DNA yang diperoleh hasil isolasi DNA berbeda-beda setiap galur dipengaruhi oleh teknik isolasi yang digunakan dan cara ekstraksi DNA yang dilakukan pada saat isolasi DNA.

Tabel 1. Hasil Pengujian Konsentrasi dan Kemurnian DNA Galur F3 secara Spektrofotometer

No	Galur F3	Konsentrasi (ng/ µl)	Kemurnian (A260/A280)
1	Galur 1	219	1.987
2	Galur 2	298	1.835
3	Galur 3	245	1.846
4	Galur 4	243	2.018
5	Galur 5	283	2.003
6	Galur 6	291	1.987
7	Galur 7	243	1.827
8	Galur 8	204	1.867
9	Galur 9	205	1.928
10	Galur 10	274	1.892
11	Galur 11	286	1.888
12	Galur 12	288	1.928
13	Galur 13	199	1.889
14	Galur 14	238	1.922
15	Galur 15	256	1.935
16	Galur 16	300	1,886
17	Galur 17	295	1.966

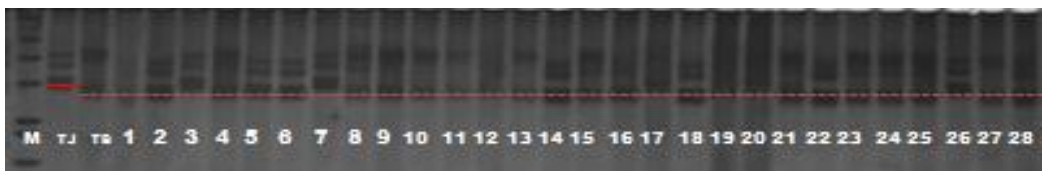
No	Galur F3	Konsentrasi (ng/ μ l)	Kemurnian (A260/A280)
18	Galur 18	198	1.874
19	Galur 19	297	1.930
20	Galur 20	259	1.840
21	Galur 21	249	1.854
22	Galur 22	248	1.856
23	Galur 23	196	1.968
24	Galur 24	256	2.011
25	Galur 25	298	1.932
26	Galur 26	221	1.855
27	Galur 27	260	1.906
28	Galur 28	197	1.883

Identifikasi kemurnian galur F3 hasil analisis pola pita pada gel Polyakrilamid dilakukan dengan mengamati pola pita DNA galur F3 yang disesuaikan dengan tetua yang menyumbang karakter yang diharapkan. Persentase kemurnian galur dihitung berdasarkan jumlah tanaman yang terdeteksi primer yang digunakan. Jumlah galur yang diidentifikasi sebanyak 28 tanaman. Analisis dilakukan dengan menggunakan primer dupssr 10 dan umc 1066 yaitu primer polimorfisme dan spesifik yang diduga terpaat dengan gen ketahanan terhadap penyakit bulai. Pola Pita yang dihasilkan pada primer dupssr 10 dan Umc 1066 menunjukkan keturunan persilangan tetua jantan dan tetua betina memiliki karakter tahan bulai dimana pola pita DNA 28 galur F3 keturunannya sama dengan karakter tetuanya (Gambar 1 dan Gambar 2). Adapun perhitungan persentase kemurnian Galur berdasarkan primer polimorfisme sebagai berikut :

$$\begin{aligned} \% \text{ Kemurnian galur} &= \frac{28}{28} \times 100 \% \\ &= 100 \% \end{aligned}$$

TJ sebagai tetua jantan dalam persilangan TJ x TB diharapkan dapat mendonorkan karakter ketahanan terhadap bulai. Hasil visualisasi menggunakan primer dupssr 10 dan Umc 1066 menunjukkan seluruh populasi Galur generasi F3 (28 tanaman) memiliki gen ketahanan terhadap penyakit bulai (Gambar 1 dan Gambar 2). Perhitungan persentase kemurnian Galur berdasarkan ketahanan bulai sebagai berikut :

$$\begin{aligned} \% \text{ Kemurnian galur} &= \frac{28}{28} \times 100 \% \\ &= 100 \% \end{aligned}$$



Gambar 1. Hasil Visualisasi galur F3 menggunakan primer dupssr 10 untuk karakter ketahanan Bulai pada jagung. Keterangan : M = Marker, TJ = Tetua Jantan, TB = Tetua Betina, 1-28 = Galur F3



Gambar 2. Hasil Visualisasi galur F3 menggunakan primer dupsr 10 untuk karakter ketahanan Bulai pada jagung. Keterangan : M = Marker, TJ = Tetua Jantan, TB = Tetua Betina, 1-28 = Galur F3

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa dari 28 galur F3 yang di uji memiliki kemurnian genetik sebesar 100% berdasarkan karakter ketahanan terhadap bulai. Galur F3 memiliki kemurnian genetik tinggi berdasarkan karakter yang diharapkan.

DAFTAR BACAAN

- BBPadi. 2015. Pengertian Umum Varietas, Galur, Inbrida, dan Hibrida. <http://bbpadi.litbang.pertanian.go.id/index.php/info-berita/info-teknologi/pengertian-umum-varietas-galur-inbrida-dan-hibrida> (14 September 2015)
- Budiarti, S, H Puspa, A Widiastuti, Dina, Niluh, ES Vine dan A Nurul. 2011. Petunjuk Teknis Pengujian Mutu Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura. Balai Besar Pengembangan dan Pengujian Mutu Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura: Depok.
- ISTA. 2010. International rules for seed testing. Verification of species and cultivar. 8.1-8.11. ISTA. Bassersdorf, Switzerland.
- George, I.A. Khan, F.S. Awan, A. Ahmad and A.A. Khan. 2008. A modified mini-pred method for economical and rapid extraction of genomic DNA in plant. *Plant Moleculer Reporter* 22 : 89a-89e
- Hipi, A, S Memen, I Satriyas and Giyanto. 2013. Seed genetic purity assessment og maize hybrid using microsatellite markers (SSR). *International Journal of Applied Science and Technology* 3(5).
- Mulsanti, WI, Memen Surahman, Sriwahyuni, Dwinita W Utami. 2013. Galur tetua Padi Hibrida dan Uji Kemurnian Benih. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan, Bogor*. Vol. 32 No. 1
- Nasihin SR, Wieny H. Rizky, Nono Carsono. 2015. Pengujian kemurnian Genetik Benih Padi Galur F3(Pandanwangi x PTB33) Terseleksi Menggunakan Marka Molekuler Simple Sequence Repeats (SSR). *Agrikultura* 26(2) : 61-67

- Pabendon, M.B., M.J. Mejaya, Subandi, dan M. Dahlan. 2005. Sidik jari empat varietas jagung hibrida beserta tetuanya berdasarkan marka mikrosatelit *Zuriat* 16(2): 192-200.
- Sambrook J. and D.W. Russel. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York : Cold-Spring Harbor Pr.
- Wulan, Ana. 1999. *Genetika-Bahan Kuliah Kapsel Biologi prodi IPA*. Upi
- Yashitola, J, T Thirumurgan, RM Sudaram, MK Naseerullah, MS Ramesha, NP Sarma, and RV Sonti. 2002. Assesment of purity of rice hybrid using microsatellite and STS marker. *Crop Sience*. 42 : 1369-1373.